



**UNIVERSITÉ
D'ANTANANARIVO**

**ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DES EAUX ET FORETS**

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies en
Foresterie - Développement - Environnement**

Promotion : TAHALA

Année : 2009-2010



**Variabilité de la composition chimique des caféiers spontanés de la
région malgache (*Mascarocoffea* Chev.) : cas de *Coffea homollei*,
C. kianjavatensis, *C. lancifolia* de la série *Verae***



Présenté par : RANARIVELO Njakarinala Dimbiniaina

le 21 décembre 2011

Devant le Jury composé de :

Président : Pr. RAKOTOZANDRINY Jean de Neupomuscène

Rapporteur : Dr. RAKOTOMALALA Jean Jacques

Examineurs : Dr. RAKOTONDRAVELO Jean Chrysostome

Pr. RASOARAHONA Jean





ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DES EAUX ET FORETS

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies en
Foresterie - Développement - Environnement**

Promotion : TAHALA

Année : 2009-2010

**Variabilité de la composition chimique des caféiers spontanés de la
région malgache (*Mascarocoffea* Chev.) : cas de *Coffea homollei*,
C. kianjavatensis, *C. lancifolia* de la série *Verae***

Présenté par : **RANARIVELO Njakarinala Dimbiniaina**

le 21 décembre 2011

Devant le Jury composé de :

Président : Pr. RAKOTOZANDRINY Jean de Neupomuscène

Rapporteur : Dr. RAKOTOMALALA Jean Jacques

Examineurs : Dr. RAKOTONDRAVELO Jean Chrysostome

Pr. RASOARAHONA Jean



... et multiplicabo fructum ligni et genimina agri ut non portetis ultra obprobrium famis in gentibus ...

... Et scient gentes, quaecumque derelictae fuerint in circuitu vestro, quia ego Dominus aedificavi dissipata plantavique inculta; ego Dominus locutus sum et facio.

PROPHETIA EZECHIELIS

36, 30 ; 36

... Je multiplierai le fruit des arbres et le produit des champs, afin que vous n'ayez plus l'opprobre de la famine parmi les nations ...

... Et les nations qui resteront autour de vous sauront que moi, l'Éternel, j'ai rebâti ce qui était abattu, et planté ce qui était dévasté. Moi, l'Éternel, j'ai parlé, et j'agirai.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce mémoire, je me permets de prendre quelques temps de réflexion pour regarder en arrière et voir le chemin parcouru ces derniers temps afin d'exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont accompagné et soutenu pour mener à bien ce travail de recherche.

Je voudrais adresser plus particulièrement mes remerciements au :

- ✿ **Professeur RAKOTOZANDRINY Jean de Neupomuscène**, Directeur scientifique de la formation troisième cycle de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Enseignant-chercheur à l'ESSA, qui nonobstant son emploi du temps très chargé a su trouver du temps et a pu nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire ;
- ✿ **Professeur RASOARAHONA Jean**, Directeur de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Enseignant-chercheur à l'ESSA, qui, malgré ses responsabilités a accepté de juger notre travail ;
- ✿ **Docteur RAKOTONDRAVELO Jean Chrysostome**, Chef du département Agriculture de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Enseignant-chercheur à l'ESSA, qui a l'amabilité de siéger parmi les membres de jury pour évaluer notre travail, en dépit de ses nombreuses obligations ;
- ✿ **Docteur RAKOTOMALALA Jean Jacques**, Responsable du Programme Café et Chercheur auprès de FOFIFA/DRA Ambatobe, notre encadreur, qui a dirigé ce travail avec beaucoup d'attention, une rigueur scientifique et un esprit méticuleux remarquable ;

Professeur RAMAMONJISOA Bruno, Chef du Département des Eaux et Forêts de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques et Coordinateur de la Formation de Troisième Cycle du Département des Eaux et Forêts.

Je réitère mes sincères remerciements à Jean Jacques RAKOTOMALALA, qui n'avait pas hésité à nous ouvrir sa porte en nous accueillant avec une grande amabilité au sein de son équipe. Je tiens à lui témoigner ma profonde gratitude pour les moyens, nécessaire à la réalisation de ce travail, dont il a mis à notre disposition ; pour son confiance et surtout pour la grande liberté qu'il nous a accordée tout au long de notre travail de recherche.

J'exprime toute ma gratitude à l'IRD d'Antananarivo et à l'IRD de Montpellier ainsi qu'à leurs Chercheurs missionnaires Perla HAMON et Claudine CAMPA, pour leurs soutiens matériels et financiers, et pour leurs précieux conseils.

Je tiens à vivement remercier, le Professeur Panja RAMANOELINA pour ses conseils, sa compréhension et son soutien dès les premiers jours de mes travaux de recherche.

J'exprime toute ma reconnaissance à l'encontre d'une Amie, sans laquelle ce mémoire n'aurait probablement pas vu le jour.

Je suis très reconnaissant envers Tanjona RATSIMBAZAFY et Ravaka ANDRIAMIALIHARISOA pour toutes les collaborations qu'ils m'ont offertes et les précieux coups de mains qu'ils m'ont apportés au cours des travaux de laboratoire.

Je remercie nos amis thésards :

Noroso RAZAFINARIVO, pour les conseils et les soutiens qu'elle nous a prodigués et surtout pour les clichés ainsi que les nombreux et précieux documents qu'elle nous a fournis gracieusement ;

Domohina ANDRIANASOLO, de nous avoir aimablement partagé ses connaissances et ses clichés, et pour ses encouragements incessants.

Arsène RAKOTONDRAVAO (FOFIFA/DRA), qui nous a fait profiter de ses expériences sur ce champ de recherche, et pour son précieux concours qui nous a permis de disposer des témoins commerciaux pour nos analyses.

Je tiens, aussi, à remercier José RANDRIATSARA de l'équipe café pour ses conseils techniques et ses aides logistiques.

Je remercie vivement Victor RAKOTONDRAMANANA de FOFIFA/DRA pour nous avoir fait profiter aimablement de son « Caverne d'Ali baba », à chaque fois que nous avons eu des besoins en réactifs ou de matériels de laboratoires.

J'associe à mes remerciements, nos amies stagiaires de FOFIFA/DRA qui m'ont toujours témoigné de leurs soutiens, en particulier Nathalie ; Mamisoa pour son apport appréciable qui m'a grandement aidé dans la conception de mes slides ; et tous les autres pour les bonnes ambiances que avons vécue ensemble.

Je remercie Zoly RAZAFIMANDIMBY, pour les documents et la carte qu'elle m'a fournis.

A toute l'équipe « Café » et à tout le personnel du Département de Recherche Agronomique de FOFIFA Ambatobe.

A toute l'équipe de la station de Recherche et de Collection de FOFIFA de Kianjavato.

Ma gratitude va aussi à tout le personnel du laboratoire et du Département de Recherche Technologique de FOFIFA à Ambatobe.

Merci à la famille RANDRIATINA, notamment au Docteur Richard RANDRIATINA et Irina RANDRIANTINA, pour leur soutien.

Toute ma sympathie reconnaissante va à une famille amie qui n'a cessé de me soutenir par le biais de leurs prières.

Mes pensées sont aussi tournées vers ma tante Eliane Sophie (Totolane) qui m'a toujours été d'un grand aide lors des tirages des documents de tous mes mémoires de fin d'études.

Je suis enfin reconnaissant envers ceux qui ont contribué, peu ou prou, à ce travail et que j'ai oubliés involontairement lors de la rédaction des ces remerciements.

*Une tendre pensée pour **Eugénie ANDRIANARY**,*

pour sa présence dans ma vie et sa contribution aux tirages de ce document

*A mes parents, **Dadah** et **Neny***

*A ma sœur **Miray** et sa famille*

*A ma sœur **Rova***

pour leur patience, leur soutien incommensurable et leur grand amour

RESUME

Les caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) sont marqués par une grande diversité de leurs caractères morphophysologiques et phénologiques, de leur adaptation pédoclimatique, de leurs contenus chimiques.

L'étude a été initiée pour évaluer la variabilité de la composition chimique des caféiers de la série *Verae* et de caractériser la distribution des composés du métabolisme secondaire dans les autres parties de la plante, notamment dans les feuilles.

Des analyses de la composition chimique des feuilles et des graines ont été réalisées, avec la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM), sur 7 populations représentatives des 3 espèces de la série *Verae* dont *C. Kianjavatensis* (2), *C. homollei* (2) et *C. lancifolia* (3).

Les analyses chromatographiques ont révélé une variabilité des composés chimiques entre les trois espèces. Pour la composition en méthylxanthines, les trois populations de *C. lancifolia* diffèrent des populations de *C. homollei* par la présence marquée de la théobromine (3,7-diméthylxanthine) dans leurs feuilles. Les feuilles des populations de *C. kianjavatensis* n'ont présenté aucune des bases puriques majeures. Quant à la composition en acides hydroxycinnamiques, l'acide chlorogénique ou acide caféyl-5 quinique est le seul composé formellement identifié. L'ensemble des échantillons analysés ont tous présenté cette substance dans leurs feuilles. Les feuilles adultes de *C. lancifolia* sont marquées par l'absence de la théobromine. La comparaison entre la composition chimique des feuilles et celle des graines montre une distribution différente des bases puriques entre ces deux organes. Pour les caféiers à caféine (*C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*), les feuilles se distinguent des graines par l'absence de la caféine (1,3,7-triméthylxanthine). Et, pour *C. kianjavatensis*, notamment la population A 602, la théacrine (acide 1,3,7,9-tetraméthylurique) fortement présente dans les graines n'est pas perceptible dans les feuilles.

Mots clés : *Coffea*, *Mascarocoffea*, diversité biochimique, méthylxanthines, acides chlorogéniques, diterpènes glucosidique, *Coffea kianjavatensis*, *C. lancifolia*, *C. homollei*, région malgache, CCM, Madagascar

ABSTRACT

The wild Madagascan and Mascarene coffee trees (*Mascarocoffea*) are characterized by a huge diversity of their morphophysiological and phenological traits, of their pedoclimatical adaptation and of their chemical contents.

The aim of the study is to apprehend the variability of chemical compound between coffee trees of the serie *Verae* and to characterize the distribution of the secondary metabolites in the other parts of the plant, notably in the leaves.

The chemical composition of the leaves and seeds analysis were carried out, with the chromatography on thin layer method (TLC), on 7 populations belonging to 3 species of the serie *Verae*: *C. Kianjavatensis* (2), *C. homollei* (2) and *C. lancifolia* (3).

The chromatographic analysis revealed a variability of the chemical compound between these three species. As for the composition of methylxanthine, the three populations of *C. lancifolia* differ from populations of *C. homollei* by the noted presence of the theobromine content (3,7-dimethylxanthine) in their leaves. The leaves of the populations of *C. kianjavatensis* showed no major purine alkaloid. Considering the composition of hydroxycinnamic acids, the chlorogenic acid or cafeyol-5 quinic acid is the only compound formally identified. All samples analyzed were shown this compound in their leaves. The adult leaves from *C. lancifolia* are marked by the absence of theobromine content. The comparison between the chemical composition of the leaves and the seeds shows a differing distribution of the purine alkaloids, between both organs. For the caffeine-containing coffee trees (*C. lancifolia* and *C. kianjavatensis*), the leaves distinguish themselves seeds by the absence of caffeine content (1,3,7-trimethylxanthine). And, for *C. kianjavatensis*, particularly the population A 602, the théacrine content (1,3,7,9-tetramethyluric acid) the main compound present in the seeds, is not perceptible in the leaves.

Key words: *Coffea*, *Mascarocoffea*, biochemical diversity, méthylxanthines, chlorogenic acids, glycosidic diterpenes, *Coffea kianjavatensis*, *C. lancifolia*, *C. homollei*, TLC, Madagascar.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES	3
1.1. Taxonomie des caféiers	3
1.1.1. <i>Mascarocoffea</i>	6
1.1.2. Série <i>Verae</i> (Chev.).....	7
1.2. Utilisations des caféiers sauvages.....	12
1.3. Composition chimique du café et les métabolites secondaires.....	12
1.3.1. Méthylxanthines.....	13
1.3.2. Intérêt des méthylxanthines	14
1.3.3. Acides hydroxycinnamiques et dérivés	15
1.3.4. Intérêt des acides hydroxycinnamiques	18
1.3.5. Diterpènes glycosidiques	19
1.3.6. Intérêt des diterpènes glycosidiques	20
DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES	21
2.1. Contexte.....	21
2.2. Problématique	22
2.3. Hypothèses.....	23
2.4. Matériel végétal	25
2.5. Composés chimiques ciblés.....	25
2.6. Intérêt et justifications du choix des composés chimiques étudiés et des matériels végétaux utilisés.....	26
2.6.1. Justifications du choix des composés chimiques	26
2.6.2. Justifications du choix du matériel végétal	27
2.7. Préparation des échantillons	27
2.8. Méthodes d'extraction et de purification.....	28
2.8.1. Extraction hydroalcoolique et purification	28
2.8.2. Extraction des bases puriques	29

2.8.3. Extraction des dérivés des acides hydroxycinnamiques	29
2.9. Méthode analytique	31
2.9.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	31
2.9.1.1. Principe.....	31
2.9.1.2. Matériels et techniques de développement.....	31
2.9.1.3. Mode opératoire.....	32
2.9.1.4. Révélation des chromatogrammes.....	32
2.9.1.5. Composés de référence.....	32
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	33
3.1. Résultats.....	33
3.1.1. Poids des résidus secs des extraits chloroformiques et des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles et des graines.....	33
3.1.2. Compositions en méthylxanthines des feuilles de <i>Verae</i>	34
3.1.2.1. Jeunes feuilles.....	34
3.1.2.2. Feuilles adultes	38
3.1.3. Compositions en dérivés hydroxycinnamiques.....	40
3.1.3.1. Jeunes feuilles.....	40
3.1.3.2. Feuilles adultes	43
3.1.4. Compositions en diterpènes glucosidiques	46
3.1.4.1. Jeunes feuilles.....	46
3.1.4.2. Feuilles adultes	48
3.1.5. Composition chimique des graines des caféiers <i>Verae</i>	52
3.1.5.1. Méthylxanthines	52
3.1.5.2. Diterpènes glucosidiques.....	55
3.2. Discussions	57
3.2.1. Discussion sur les résultats et les hypothèses	57
3.2.1.1. H1: <i>Les composés chimiques du métabolisme secondaire des feuilles des caféiers de la série Verae se distribuent qualitativement et quantitativement de manière différente selon les espèces et selon les populations</i>	57

3.2.1.2. H2 : <i>La composition en méthylxanthines et en dérivés hydroxycinnamiques des feuilles de caféiers spontanés varient avec leurs âges physiologiques.</i>	59
3.2.1.3. H3 : <i>Les constituants chimiques sont qualitativement et quantitativement différents entre les graines et les feuilles.</i>	61
3.2.2. Limites méthodologiques.....	63
3.2.2.1. Méthode analytique	63
3.2.2.2. Méthode comparative	64
3.3. Recommandations et perspectives	65
CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE	68

LISTE DES FIGURES ET PHOTOS

Figure 1 : Classification des caféiers.....	5
Figure 2 : Regroupement biogéographique des espèces du sous genre <i>Coffea</i>	6
Figure 3 : Origine et répartition géographique des populations de la série <i>Verae</i>	8
Figure 4 : Diversité morphologique des feuilles chez les <i>Verae</i>	10
Figure 5 : Fruits et graines de <i>C. lancifolia</i> A 405	10
Figure 6 : Fruits et graines de <i>C. kianjavatensis</i> A 213.....	11
Figure 7 : Fruits et graines de <i>C. kianjavatensis</i> A 602.....	11
Figure 8 : Fruits et graines de <i>C. homollei</i> A 945	11
Figure 9 : Structures des alcaloïdes puriques basées sur les squelettes de la xanthine et de l'acide urique.....	14
Figure 10 : Structures des acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés.....	17
Figure 11 : Structures des diterpènes glucosidiques et du cafestol	20
Figure 12 : Structure du fruit et de la graine du caféier.....	28
Figure 13 : Protocole d'extraction et de purification.....	30
Figure 14 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des feuilles des caféiers <i>Verae</i>	36
Figure 15 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des jeunes feuilles	37
Figure 16 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des feuilles adultes	40
Figure 17 : Chromatogrammes des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles	42
Figure 18 : Chromatogrammes des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes	45
Figure 19 : Chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles et des graines	51
Figure 20 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des graines de <i>Verae</i>	54
Figure 21 : Spectre d'absorption de la caféine pure et de l'AC5Q pure	81
Figure 22 : Spectre UV des bases puriques mises en évidence chez les caféiers sauvages.....	81
Figure 23 : Spectre UV de l'hétéroside diterpénique spécifique à <i>C. pseudozanguebariae</i>	81
Figure 24 : Spectre UV de quelques composés standards	82
Figure 25 : Chromatogrammes des extraits aqueux des jeunes feuilles	83
Figure 26 : Chromatogrammes des extraits aqueux des feuilles adultes	84
Figure 27 : Profils chromatographiques et spectre d'absorption du composé majeur du spot à Rf = 0,66 de l'extrait chloroformique des feuilles adultes de la population <i>C. homollei</i> A 574	85
Figure 28 : Profils chromatographiques et spectres d'absorption des composés majeurs du spot à Rf = 0,76 de l'extrait chloroformique des feuilles adultes de la population <i>C. homollei</i> A 574	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et phénologiques des caféiers de la série <i>Verae</i>	9
Tableau 2 : Analyse des hypothèses.....	24
Tableau 3 : Les populations et espèces étudiées.....	26
Tableau 4 : Poids des extraits chloroformiques et extraits d'acétate d'éthyle des échantillons de feuilles et de graines	33
Tableau 5 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits chloroformiques des jeunes feuilles, migrés avec le solvant MFE.....	35
Tableau 6 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des feuilles adultes, migrés avec le solvant MFE.....	38
Tableau 7 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles, séparés avec le solvant MFE.....	41
Tableau 8 : Caractéristiques chromatographiques des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles migrés avec le solvant BA	43
Tableau 9 : Caractéristiques chromatographiques des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes séparés avec le solvant MFE.....	44
Tableau 10 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes séparés par le solvant BA.....	45
Tableau 11 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des jeunes feuilles, séparés avec le solvant MFE	46
Tableau 12 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des jeunes feuilles, séparés avec le solvant BA	48
Tableau 13 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des feuilles adultes migrés avec le solvant MFE	49
Tableau 14 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des feuilles adultes migrés avec le solvant BA	50
Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des graines de <i>Verae</i> , migrés avec le solvant MFE	53
Tableau 16 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des graines, migrés avec le solvant BA	54
Tableau 17 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des graines (Solvant de migration MFE)	55
Tableau 18 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des graines (Solvant de migration BA)	56
Tableau 19 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires selon les espèces et les populations.....	58

Liste des tableaux

Tableau 20 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires en fonction de l'âge physiologique des feuilles	61
Tableau 21 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires selon les organes	63

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Les <i>Mascarocoffea</i> et leurs classements dans les catégories de la Liste Rouge de l'IUCN.....	78
ANNEXE 2 : Voie du métabolisme de la caféine	79
ANNEXE 3 : Voie du catabolisme de la caféine.....	80
ANNEXE 4 : Profils des spectres d'absorption de quelques composés étudiés.....	81
ANNEXE 5 : Chromatogrammes sur couche mince	83
ANNEXE 6 : Profils HPLC et spectres d'absorption	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AC5Q :	Acide caféyl 5-quinique
ACFQ :	Acide caféyl-férulylquinique
ACG :	Acide chlorogénique
ACQ :	Acide caféylquinique
AdiCQ :	Acide dicaféylquinique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AFCQ :	Acide férulyl-caféylquinique
AFQ :	Acide férulylquinique
ApCoQ :	Acide <i>para</i> -coumarylquinique
aq :	Phase aqueuse ou extrait aqueux
ATP :	Adénosine triphosphate
BA :	Butanol /Ammoniaque
Caf :	Caféine
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CLHP :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CR :	Critically endangered ou en danger critique d'extinction
EN :	Endangered ou en danger
FOFIFA :	Foibe Fikarohana ampiharina ho Fampanandrosoana ny Ambanivohitra ou Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural
IUCN :	International Union for Conservation of Nature ou Union mondiale pour la nature
LC :	Least concern ou préoccupation mineure
MEF :	Ministère de l'Environnement et des Forêts
MFE :	Méthyl-isobutyl-cétone / acide formique / eau
min :	minute
MS :	Matière sèche
NIRS :	Near Infrared Spectrometry ou spectrométrie proche infra-rouge
nm :	nanomètre
NT :	Near threatened ou quasi menacé
Pc :	Phase chloroformique ou extrait chloroformique
R_f :	Rapport frontal ou référence frontale
RMN :	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
SM :	Spectrométrie de masse
Tbr :	Théobromine
TLC :	Thin layer chromatography ou chromatographie sur couche mince

Liste des abréviations

Tph :	Théophylline
TR :	Temps de rétention
UV :	Ultra violet
v/v :	Volume par volume
VU :	Vulnérable

GLOSSAIRE

Adsorption : est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals).

Allélopathie : est l'ensemble des interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (y compris les micro-organismes), par le biais de composés biochimiques libérés dans l'environnement.

Allopatric : un terme qui s'applique lorsque des populations d'une même espèce possèdent des aires de répartition disjointes et non chevauchantes (isolement spatial ou géographique).

Chimiotaxonomie a pour objectif d'établir des rapports entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique (taxonomie). Elle s'applique surtout aux plantes, riches en métabolites secondaires.

Métabolites secondaires : sont des molécules qui, par exclusion, n'appartiennent pas au métabolisme primaire (protéine, lipide, glucide, acides aminés et acides nucléiques). Les plantes les produisent en dehors des voies métaboliques strictement nécessaires à assurer la survie (métabolisme primaire). Cette gamme de composés est très développée chez les végétaux et constitue un moyen de lutte contre des concurrents écologiques (allélopathie) ou des prédateurs (production de substances toxiques ou de mauvais goût contre un herbivore). Ce sont aussi les pigments, ou les odeurs des plantes.

Population ou **peuplement** : désigne un ensemble d'individus issus d'une même provenance géographique.

Région malgache : indique la subdivision régionale à laquelle sont regroupés Madagascar, les archipels des Comores et les Iles Mascareignes (Maurice, Rodrigues et La Réunion).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Madagascar, un véritable sanctuaire de la nature, est un pays réputé par l'extrême foisonnement de ses formes biologiques. L'île abrite une exceptionnelle richesse biologique tant en espèces faunistiques que floristiques, avec un taux d'endémisme très élevé, de l'ordre de 81 à 86 % (MEF, 2009). Cette biodiversité exceptionnelle est abritée dans divers types d'écosystèmes aussi variés que riches. Parmi, ces écosystèmes figurent les forêts. Ces types de formations végétales terrestres constituent l'une des formations écosystémiques les plus importantes et la plus complexe. La Grande Île possède une grande variété de types de forêts, parmi lesquelles : les forêts littorales, les forêts denses humides sempervirentes, les forêts denses semi-décidues, les forêts denses sèches, les forêts basses xérophiles, les forêts des hautes montagnes et les mangroves. Cette multitude de types d'habitats est l'une des raisons qui explique l'immensité de la diversité biologique de l'Île. En effet, la forêt est un important réservoir de la biodiversité, et par conséquent un réservoir génétique considérable.

L'une des expressions de cette richesse floristique malgache est la profusion des *Mascarocoffea*, espèces sauvages de caféiers. Avec 103 espèces identifiées que compte le genre *Coffea*, 57 espèces sont originaires de la région malgache (DAVIS et al., 2006). 53 de ces espèces sont endémiques de Madagascar et sont réparties principalement dans les forêts humides sempervirentes de l'Est. Madagascar est, ainsi, le premier centre de diversification pour ce groupe d'espèces.

Pourtant, cette biodiversité exceptionnelle est sévèrement menacée par la destruction des forêts et des habitats naturelles. Les habitats de ces espèces sont constamment en régression. Et, les espèces, qu'ils abritent, sont eux-mêmes en péril du fait de la fragmentation et la simplification de leurs habitats et des pressions qui pèsent sur leurs écosystèmes. Parmi ces 103 espèces de caféiers, 72 (69,9%) sont menacées d'extinction, dont 14 espèces (13,6%) sont en danger critique (CR), 35 espèces (33,9%) sont en danger (EN), et 23 espèces (24,2%) sont vulnérable (VU). Les autres sont classées dans les catégories : quasi menacée (NT) pour 13 espèces (13,7%) et préoccupation mineure pour 14 espèces (14,7%) (UICN, 2001 ; DAVIS et al., 2006).

Une perte des ressources génétiques des caféiers est donc à redouter. Une perte préjudiciable pour la diversité biologique en générale, mais aussi une perte néfaste pour la diversité génétique du caféier, et par extension très dommageable pour la culture du café. En effet, malgré le nombre élevé d'espèces identifiées, la production commerciale de café repose seulement sur deux espèces, notamment *Coffea arabica* L. et *C. canephora* Pierre, lesquelles représentent respectivement environ 70% et 30% de la production de la caféiculture mondiale (COSTE, 1968 ; RAKOTOMALALA, 1992 ; AGA, 2005). Ces deux espèces cultivées ont des origines génétiques très réduites d'où une grande uniformité génétique, surtout pour *C. arabica*, qui est à l'origine de nombreux problèmes. Effectivement, ces caféiers se montrent très vulnérables aux agressions du milieu et deviennent très sensibles aux parasites (rouille

du café) (RAKOTOMALALA, 1992). De plus, du fait de cette uniformité génétique, le matériel végétal se prête difficilement à l'amélioration variétale.

Cette faible étendue de la variabilité génétique du matériel biologique réellement exploitée est souvent rencontrée chez les plantes cultivées. Chez les caféiers pourtant ce problème pourrait être résolu par l'exploitation génétique du matériel sauvage apparenté aux espèces cultivées. Les caféiers sauvages disposent d'une variabilité génétique impressionnante. Cette grande diversité génétique s'exprime par une grande diversité de comportements phénologiques, une diversité d'adaptation pédoclimatiques (sécheresse, gel, sols variés) et par la résistance aux principales maladies (CHARRIER, 1978). Des caractères intéressants pour l'amélioration des cultivars de caféiers.

La conservation de ce patrimoine s'avère, donc, indispensable. Néanmoins, la préservation de cette ressource et son utilisation rationnelle requièrent une large connaissance du matériel végétal. Les caféiers africains ont déjà fait l'objet de plusieurs études sur le plan écologique, botanique, taxonomique, génétique. Et, les évaluations des caractères biochimiques se sont multipliées ces dernières années (RAKOTOMALALA et al., 1992 ; ANTHONY, CLIFFORD et NOIROT, 1993 ; KY et al., 2001 ; CAMPA et al., 2004). Mais elles demeurent encore fragmentaires sur l'ensemble des taxa sauvages malgaches. Pourtant, les analyses chimiques sur les caféiers peuvent aider à identifier les substances responsables des caractères organoleptiques des cafés produits et à préciser la variabilité de ces caractères pour chaque espèce.

La présente étude s'inscrit dans cette ligne et traite de la variabilité de la composition chimique des caféiers spontanés de la région malgaches (*Mascarocoffea*), en se focalisant tout particulièrement sur les espèces de la série *Verae* (*Coffea kianjavatensis*, *C. lancifolia* et *C. homollei*). Cette investigation a été initiée pour engranger davantage d'informations sur ces espèces. Des données qui contribueront à terme aux programmes de préservation et de valorisation rationnelle de ces espèces spontanées malgaches.

Dans ce document, la première partie essayera de synthétiser l'état de connaissance sur le complexe d'espèces des caféiers et sur les *Mascarocoffea* ; la deuxième partie sera consacrée à la méthodologie de la recherche et à la présentation du matériel végétal ainsi que les méthodes utilisées. Puis, la troisième partie présentera les résultats obtenus lors de l'étude expérimentale et les discussions relatives à ces résultats.

ETAT DES CONNAISSANCES

PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES

1.1. Taxonomie des caféiers

Depuis la création du genre *Coffea* L. par Linné en 1753, de nombreux remaniements ont été apportés sur la classification taxonomique des caféiers par les chercheurs. Les divisions taxonomiques des caféiers faites par les botanistes se sont reposées essentiellement sur les descriptions morphologiques et les aires naturelles de distribution. Et, au fur et à mesure de l'avancé des recherches et par suite des découvertes de nouveaux taxons, la classification n'a pas cessé d'évoluer.

Les caféiers se présentent sous la forme d'arbres ou d'arbustes reconnaissables, entre autres, à leurs feuilles simples et opposées. Leurs fleurs, groupées en inflorescences (cymes), sont petites, tubuleuses et de couleur blanche. Leurs graines sont caractérisées par une placentation dite « cofféenne », matérialisée par la présence d'un sillon, plus ou moins invaginé, dans la partie ventrale de l'albumen.

Les caféiers font partie de la grande famille des *Rubiaceae*¹, sous famille des Ixoroideae, tribu des Coffeae (Figure 1). Cette tribu a été scindée par ROBBRECHT et PUFF (1986) en deux genres : *Coffea* et *Psilanthus*. Mais, une récente étude basée sur des données moléculaires et morphologiques, réalisée par DAVIS et al. (2006 et 2007), a permis de réorganiser et d'élargir jusqu'à onze le nombre de genres² composant la tribu.

La classification la plus utilisée divise le genre *Coffea* en deux sous genres, d'après le mode de développement et la position des inflorescences, le sous genre *Coffea* et le sous genre *Baracoffea* (BRIDSON, 1987 et BRIDSON 1994). Au sens strict, le terme « caféiers » désigne les espèces appartenant au sous genre *Coffea*. Il renferme la plupart des espèces à placentation cofféenne. Son aire de répartition naturelle s'étend de l'Afrique de l'Ouest à Madagascar, aux Comores et aux îles Mascareignes.

Le sous genre *Coffea* a été scindé par CHEVALIER (1940 et 1947) en deux sections : (i) les espèces spontanées du continent africain, dont les deux espèces cultivées majeures (*C. arabica* et *C. canephora*), regroupées dans la section *Eucoffea* ; (ii) la section des *Mascarocoffea* composée des caféiers originaires de Madagascar, des îles Mascareignes et des Comores.

Devant l'impressionnante richesse génétique du genre *Coffea*, avec un foisonnement de formes et une adaptation écologiques très variés, les recours à d'autres méthodes comme la biosystématique, la

¹ *Rubiaceae* Juss. est une grande famille cosmopolite, principalement tropicale, représentée par près de 630 genres et environ 10 400 espèces. Elle est la plus grande famille ligneuse à Madagascar (SCHATZ, 2001)

² *Argocoffeopsis*, *Belonophora*, *Calycosiphonia*, *Coffea*, *Diplospora*, *Discospermum*, *Nostolachma*, *Psilanthus*, *Tricalysia*, *Sericanthe* et *Xantonnea*.

taxinomie numérique, la taxinomie chimique, la génétique, sont devenus nécessaires et déterminant dans la classification de ce complexe d'espèces.

Les travaux menés ces dernières années, par LOUARN (1993) sur la fertilité des hybrides interspécifiques entre caféiers africains diploïdes, CROS *et al.* (1995) et NOIROT *et al.* (2003) sur la variation de la taille de génome des caféiers africains, LASHERMES *et al.* (1997) sur la relation phylogénétique des caféiers d'après les séquences de leurs ADN ribosomiaux, HAMON *et al.* (2009) sur l'organisation du génome, vont dans le sens d'un regroupement biogéographique des espèces africaines. Les conclusions de ces travaux tendent vers le regroupement des caféiers du continent en deux groupes : les caféiers de l'Ouest et du centre qui correspondent à la section des *Eucoffea* et le groupe de l'Est et du Sud-est pour la section des *Mozambicoffea*. Cette classification rejoint celle de CHEVALIER (1942) et s'oppose à celle proposée par le même auteur (CHEVALIER, 1940 et 1947) qui regroupait les espèces africaines en une seule section, *Eucoffea*, et cinq sous-sections (dont les *Mozambicoffea*).

Les peuplements spontanés du sous-genre *Coffea*, endémiques de la zone forestière intertropicale sont, ainsi, répartis en trois ensembles biogéographiques limités par le Canal de Mozambique et la dorsale du Kivu à l'est de la République Démocratique du Congo (Figure 2) : la région malgache pour les *Mascarocoffea*, l'Afrique orientale pour les *Mozambicoffea* et l'Afrique occidentale et centrale pour les *Eucoffea*.

Les caféiers de la section *Mozambicoffea* semble tenir une position intermédiaire entre les caféiers ouest africains et ceux de la région malgache. Dès 1947, CHEVALIER soulignait déjà que cette section établissait la liaison entre les *Eucoffea* et les *Mascarocoffea* qu'il considérait à l'époque sans caféine. Une position confortée par les travaux de ANTHONY *et al.* (1993) qui ont montré que les caféiers Est africains présentaient des valeurs intermédiaires pour les concentrations en caféine et en acides chlorogéniques par rapport aux caféiers ouest africains (à teneurs élevées) et les caféiers de la région malgache (à faible teneur en ces composés).

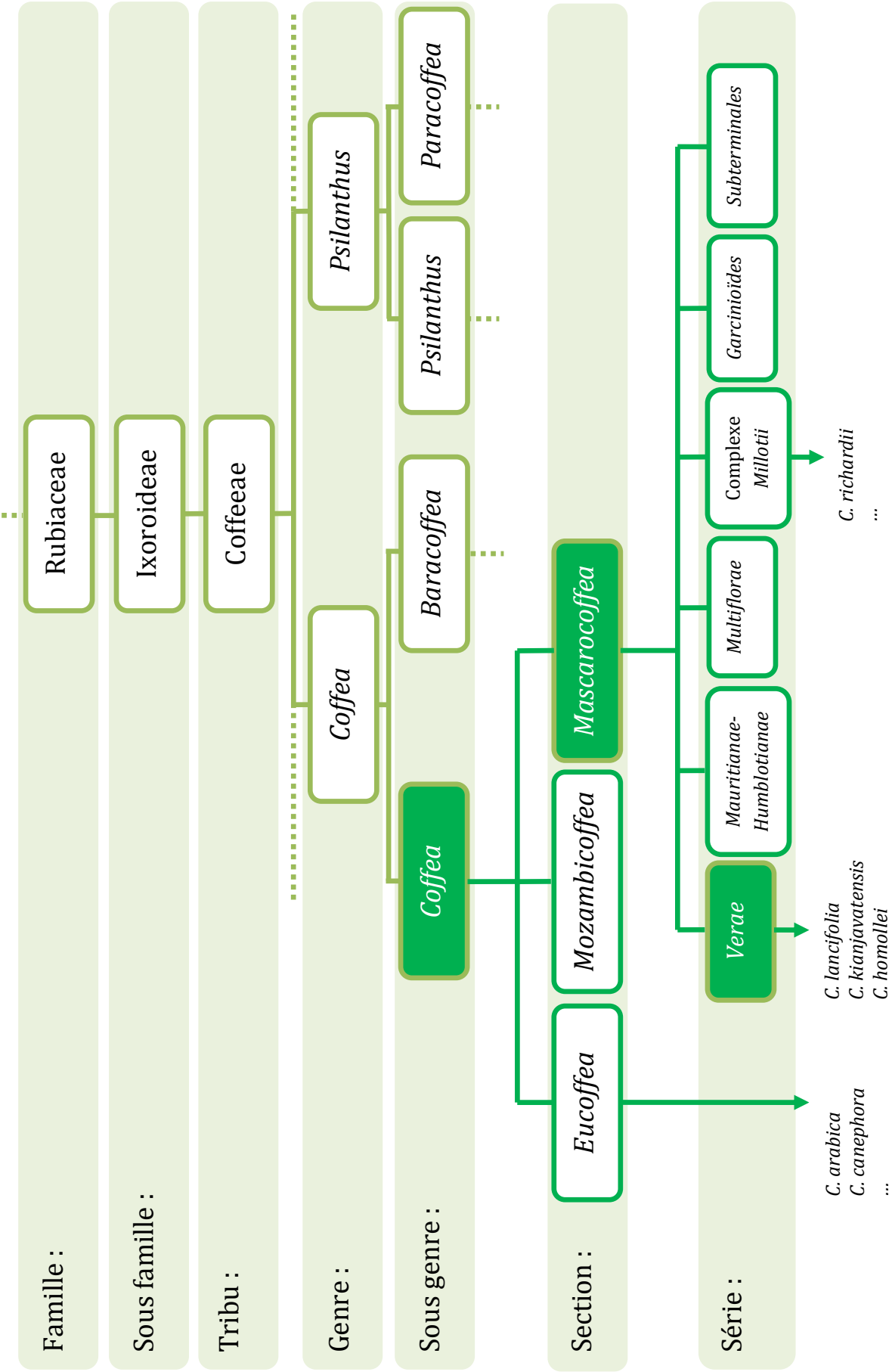


Figure 1 : Classification des caféiers d'après CHEVALIER (1940), CHARRIER (1978), ROBBRECHT et PUFF (1986), BRIDSON (1987), DAVIS et al. (2006)

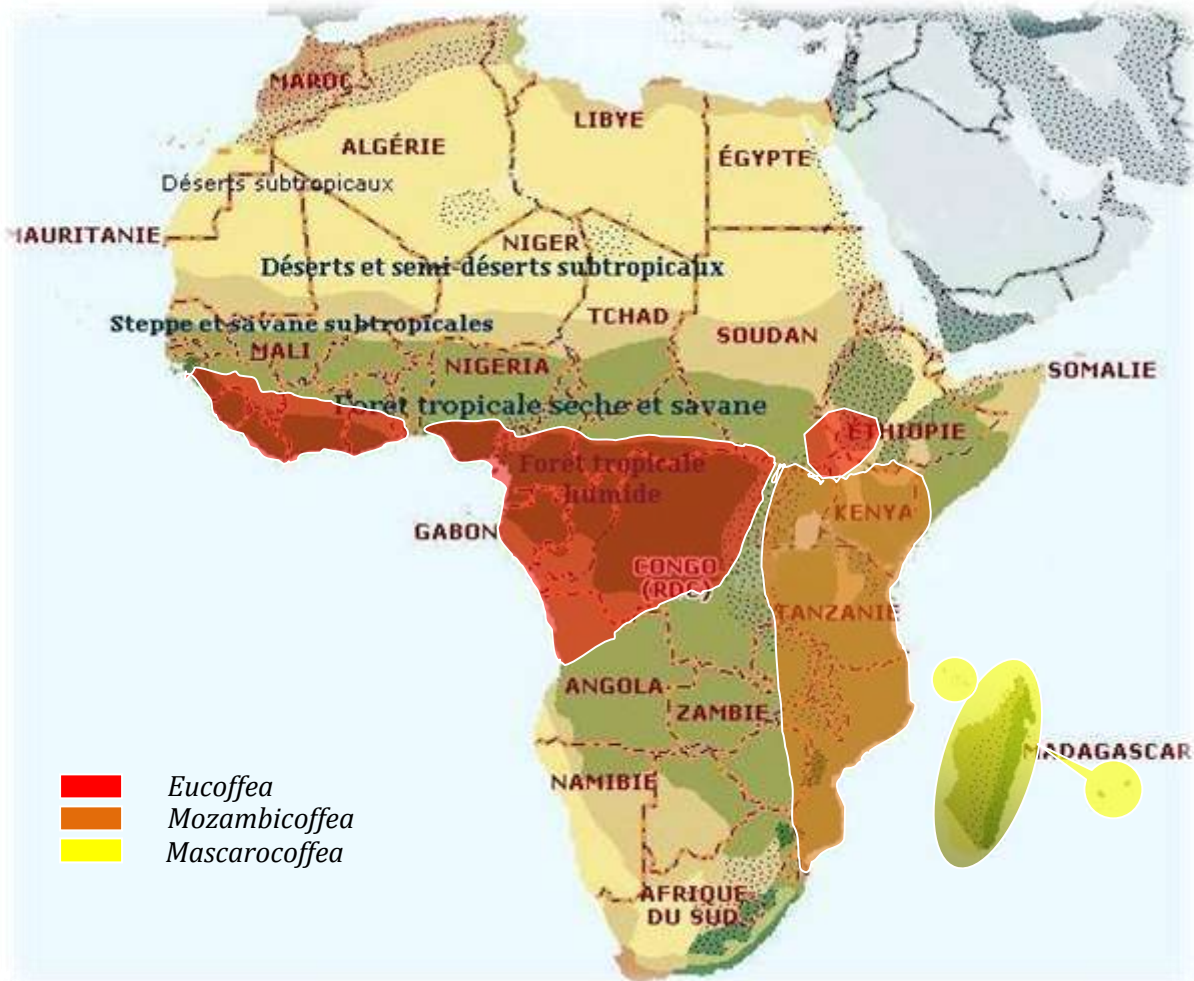


Figure 2 : Regroupement biogéographique des espèces du sous genre *Coffea*

1.1.1. *Mascarocoffea*

Cette section de caféiers spontanés de Madagascar, des îles Mascareignes et de l'archipel des Comores, a été divisée par CHEVALIER (1947) en huit séries d'après les particularités des feuilles (nervation secondaire et tertiaire, texture, forme et taille), des fleurs (position des inflorescences, taille des fleurs) et des fruits (taille, disque).

L'intensification des prospections des caféiers de cette région a conduit à la description de nouvelles espèces. Des modifications, basées sur l'habituelle analyse de la variabilité des caractères morphologiques, complétées par la prise en compte de la phénologie (croissance, floraison et fructification), des caractères agronomiques, technologiques et chimiques, ont été apportées par CHARRIER (1978) concernant les regroupements de CHEVALIER (1947). Les séries au sein de la section *Mascarocoffea* ont été ramenées à six. Ces séries, décrites par CHARRIER (1978), sont : *Verae*, *Mauritiana-Humblotiana*, *Multiflorae*, complexe *Millotii*, *Garcinioides* et *Subterminales*.

1.1.2. Série *Verae* (Chev.)

La série *Verae* regroupe les trois espèces qui font l'objet de cette étude : *C. lancifolia* Chev., *C. kianjavatensis* Ler. et *C. homollei* Ler. Cette dénomination est due à leur ressemblance morphologique avec certains caféiers africains (CHEVALIER, 1947). Les caféiers de cette série sont originaires du domaine phytogéographique de l'Est³ de Madagascar, du Cap Masoala à Fort Dauphin. Ils y croissent en petites populations allopatriques dans les forêts denses sempervirentes (Figure 3).

La série *Verae* peut être décrite par quelques caractéristiques qui sont communes aux trois espèces :

- des feuilles moyennes ou grandes, plus ou moins acuminées, à limbe papyracé souple et gaufré, à nervation caractéristique ;
- des domaties axillaires, punctiformes à la face supérieure, s'ouvrant à la face inférieure en un petit cratère plus ou moins pileux ;
- des ramifications plagiotropes⁴ porteuses de coussinets très florifères au niveau des cicatrices foliaires du vieux bois et de quelques fleurs axillaires dans les zones de jeune bois aoûté et feuillé ;
- des inflorescences uniflores, exceptionnellement pauciflores⁵ ;
- des fleurs en entonnoir du type 5 dominant ;
- des fruits de petite taille, de forme oblongue à ovoïde, à pulpe fine ;
- des petites graines à albumen jaune verdâtre ;
- une longue période de croissance végétative (6 à 8 mois par an), durant la saison chaude et pluvieuse ;
- un développement rapide des fruits (maturité 3 ou 4 mois après les floraisons) ;
- une faible valeur granulométrique (3 à 6 g/100 graines) ;
- une sensibilité marquée aux piqûres foliaires de *Dulinius unicolor* (« tigre » du caféier).

Les trois espèces de la série *Verae* sont faciles à différencier par leurs caractéristiques morphologiques et phénologiques (Tableau 1).

³ Domaine qui s'étend du littoral de l'océan indien jusqu'à une altitude d'environ 800 m sur le flanc oriental de l'île. Il jouit d'un climat subéquatorial de basse altitude caractérisé par des températures et des précipitations élevées et l'absence d'une saison sèche. La végétation primaire y est constituée essentiellement par des forêts denses sempervirentes.

⁴ Branches secondaires obliques ou horizontales

⁵ Inflorescence ayant peu de fleurs

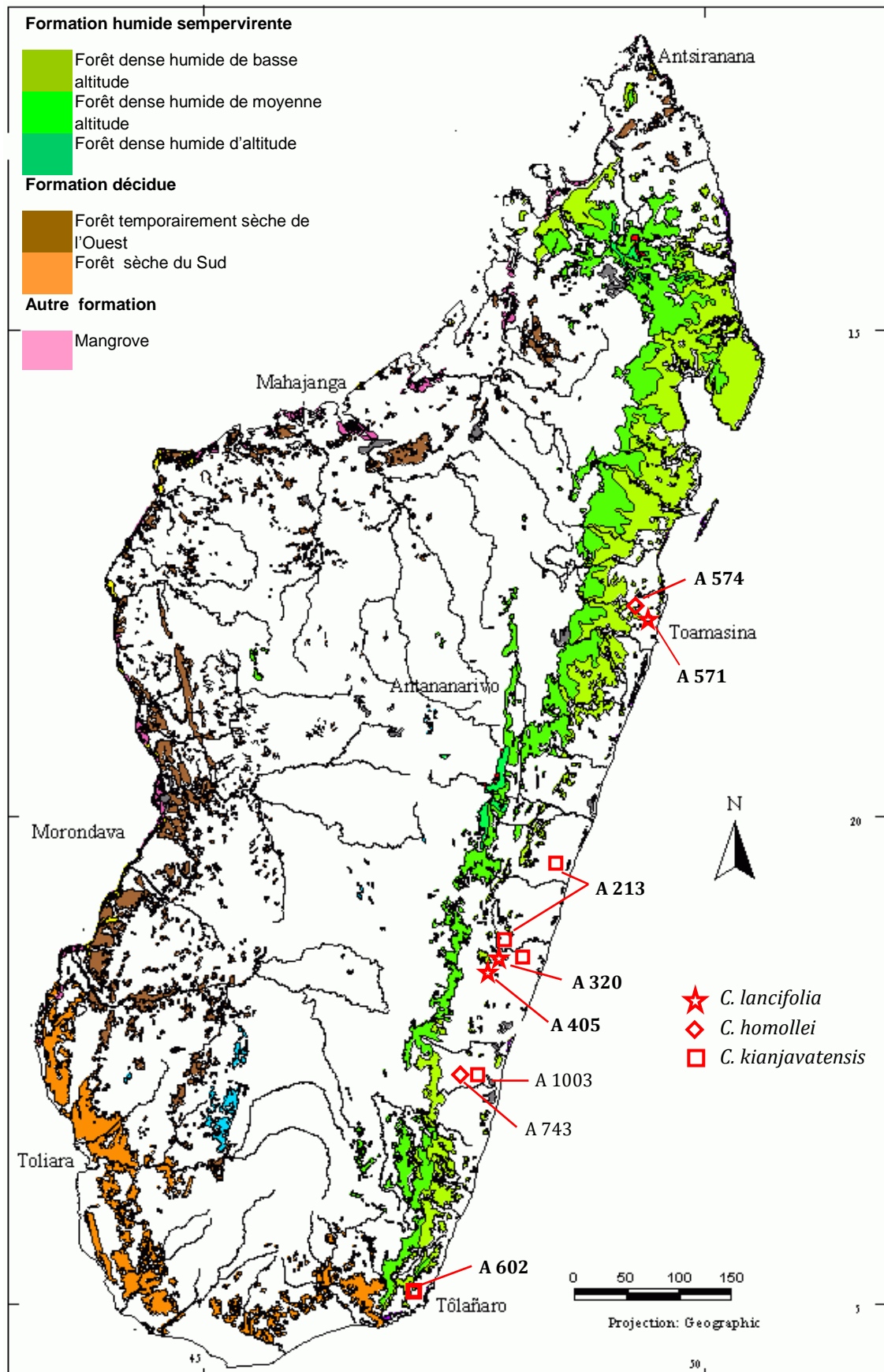


Figure 3 : Origine et répartition géographique des populations de la série *Vrae*
(D'après CHARRIER, 1978)

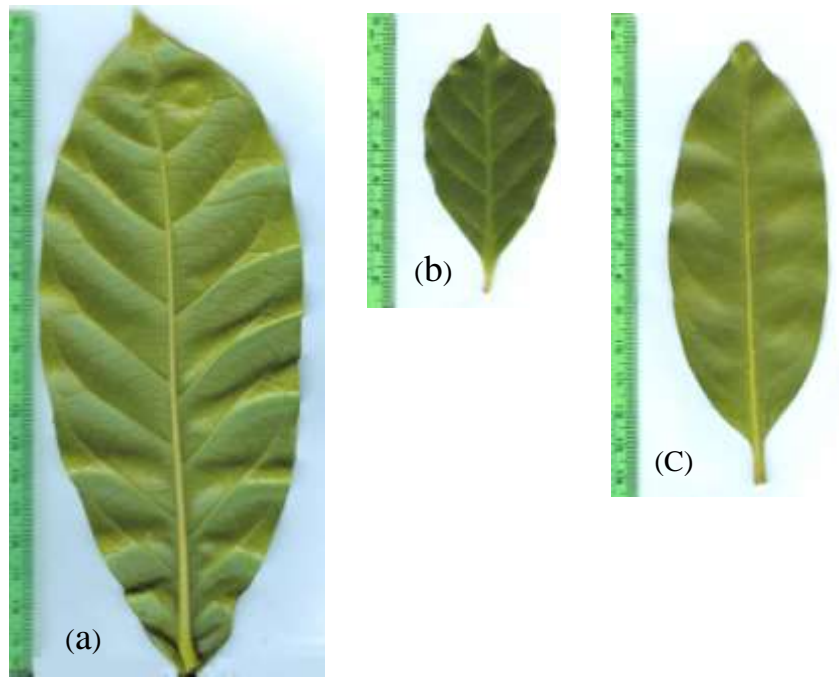
Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et phénologiques des caféiers de la série *Verae*
(d'après CHARRIER, 1978)

		<i>C. lancifolia</i>	<i>C. kianjavatensis</i>	<i>C. homollei</i>
Port		pyramidal	pyramidal	en fuseau
Ramifications	Primaires	grosses, longues et raides	plus dense et plus tassé	courtes
	Angle d'insertion	relevées à 30° par rapport à l'horizontale	même plan (« palmettes »)	érigées
	Secondaires	peu nombreuses	nombreuses	dense et spiralées
	Entre-nœuds	longs	moyens	courtes
Feuilles	Taille	grandes (oblancéolées ⁶ subsessiles ⁷)	moyennes	moyennes
	Couleur	vert	cuivre-rouge à l'état jeune	vert-olive
Fleurs	Taille	moyenne	petites	petites
	Couleur	blanc jaunâtre	blanches	blanches
Fruits	Forme	oblongs	ovoïdes à disque crénelé	ovoïdes
	Couleur (à maturité)	jaunâtres	jaunes	vert pâle
Floraison	Période	Octobre - novembre	Séptembre - octobre*	Octobre - novembre
	Pluie - floraison (j)	6 - 8	4 - 5	6
Nouaison	Floraison - nouaison (sem)	3 - 5	4 - 6	3 - 4
Maturité des fruits	Floraison - maturité (j)	90 - 101	100 - 137	96

*Floraisons précoces (j) : jour (Sem) : semaine

⁶ Feuille en forme de lance inversée avec un apex arrondi et une base rétrécie

⁷ Feuille au pétiole très court à quasiment inexistant



Clichés : RAZAFINARIVO

Figure 4 : Diversité morphologique des feuilles chez les *Verae*.

(a) *C. lancifolia* A 320 – (b) *C. kianjavatensis* A 213 – (c) *C. homollei* A945

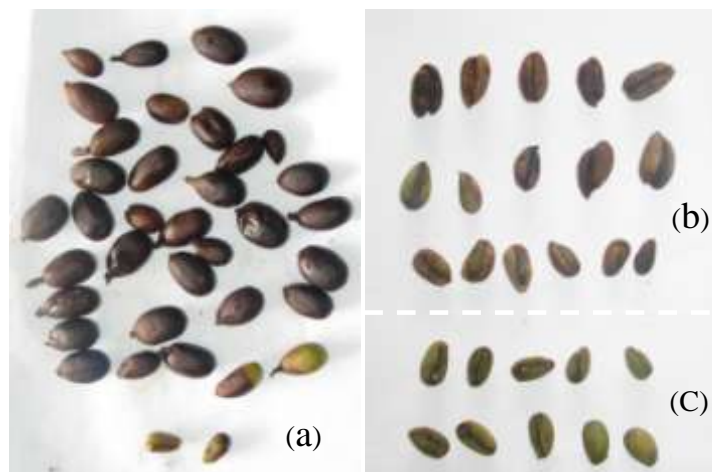


Figure 5 : Fruits et graines de *C. lancifolia* A 405 a) Cerises b) Graines en parche c) Graines débarrassés de la parche et de la pellicule

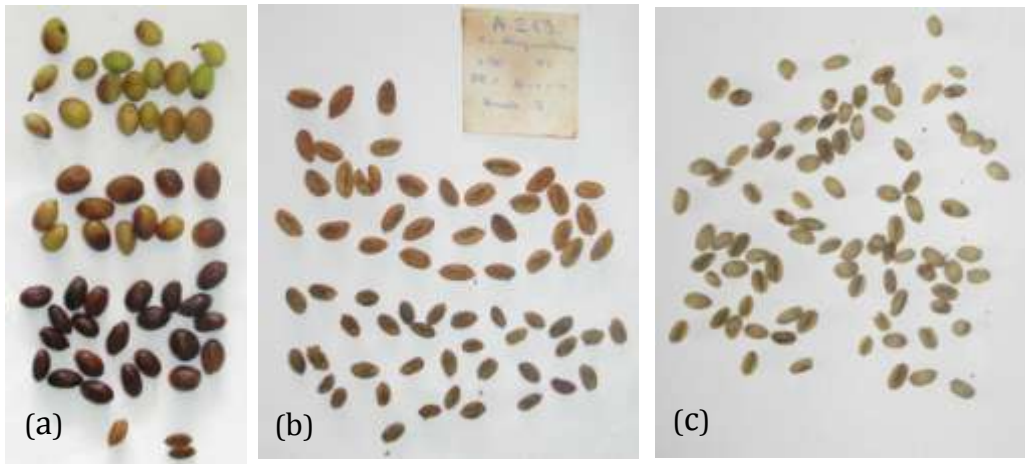


Figure 6 : Fruits et graines de *C. kianjavatensis* A 213 a) Fruits b) Graines en parche c) Graines débarrassés de la parche et de la pellicule

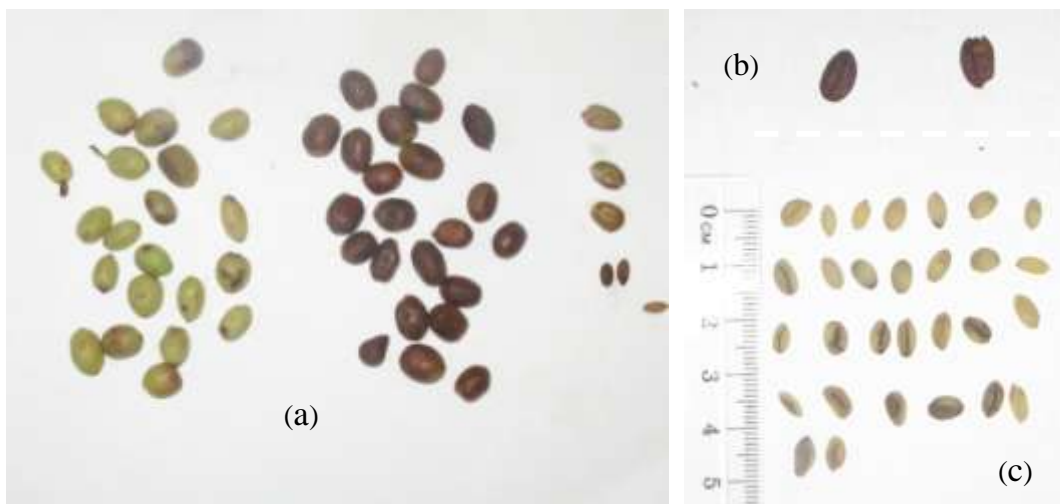


Figure 7 : Fruits et graines de *C. kianjavatensis* A 602 a) Fruits b) Graines en parche c) Graines débarrassés de la parche et de la pellicule

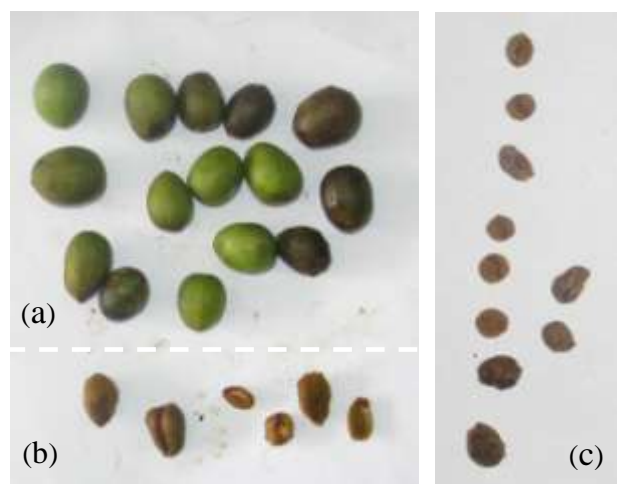


Figure 8 : Fruits et graines de *C. homollei* A 945 a) Fruits entiers b) Graines en parche c) Graines débarrassés de la parche et de la pellicule

1.2. Utilisations des caféiers sauvages

Sur l'île de La Réunion, *C. mauritiana*, une espèce spontanée de la série *Mauritianae-Humblotiana*, est consommé localement de manière occasionnelle en mélange avec l'Arabica (*C. arabica*), et ce, malgré une amertume variable et tenace mis en évidence dans ses graines (CHARRIER, 1978).

A Madagascar, souvent confondus avec divers taxa de *Rubiaceae* qui leurs ressemblent, les caféiers sauvages n'ont pas de noms vernaculaires distincts. Communément appelés « kafeala », ils ne sont pas exploités ou consommés directement par la population locale ni pour ses fruits ni pour les autres parties de la plante (feuilles). Cependant, certaines espèces sont utilisées comme bois de construction ou comme bois d'œuvre, notamment *C. millotii*. (ANDRIANASOLO, 2008). Tout comme la plupart des espèces de *Coffea* sylvestres, les troncs des individus adultes de *C. humblotiana* fournissent un bois dur particulièrement apprécié aux Îles Comores, pour la confection des piquets de case (CHARRIER, 1978).

SCHATZ (2001) a recensé d'autres appellations locales attribuées à ces caféiers spontanés malgaches comme « hazofotsy », « sakarife », « taolanosy ».

1.3. Composition chimique du café et les métabolites secondaires

La composition du café est très complexe, avec plus d'une centaine de substances chimiques identifiées (HOUESSOU, 2007). Elle est également très variable et tributaire des espèces, des variétés (facteurs génétiques) et des origines géographiques des caféiers (CHARRIER et BERTHAUD, 1975 ; CLIFFORD et JARVIS, 1988 ; CORREIA, LEITÃO et CLIFFORD, 1995 ; KY et *al.*, 1999 et 2001 ; CAMPA et *al.*, 2005a). La composition du café est également fonction, dans une moindre mesure, de la méthode de culture pour les caféiers cultivés (CHARRIER et BERTHAUD, 1975 ; CLIFFORD, 1985) ; et probablement des facteurs écologiques pour les espèces spontanées (CAMPA et *al.*, 2005a). La composition des grains de café varie aussi selon que ces derniers soient verts ou torréfiés (NAVELLIER et BRUNIN, 1962 ; TRUGO et MACRAE, 1984 ; FARAH et DONANGELO, 2006). Les teneurs des constituants chimiques des cafés rapportées par les différents auteurs (TONO, FUJITA et KAWABE, 1989 ; KY, NOIROT et HAMON, 1996 ; CAMPA et *al.*, 2005b ; HUCK, GUGGENBICHLER et BONN, 2005 ; FARAH et DONANGELO, 2006) fluctuent, également, suivant la précision des différentes méthodes d'extraction et d'analyse adoptées.

Les constituants chimiques présents dans les grains de café vert peuvent être classés dans huit groupes : (1) les alcaloïdes, regroupant les xanthines (dont la caféine) et la trigonelline ; (2) les acides, constitués par les acides aliphatiques et les acides chlorogéniques ; (3) les protéines et acides aminés libres ; (4) les glucides ; (5) les lipides, dans lesquels se trouvent les deux diterpènes caractéristiques du café (cafestol et kahweol) ; (6) les minéraux ; (7) les vitamines et (8) les amines.

Les analyses les plus poussées et les plus complètes se rapportent évidemment aux deux espèces de caféiers les plus cultivées, *C. arabica* et *C. canephora* (HOUESSO, 2007 ; FARAH et DONANGELO, 2006 ; KY et al. 2001 ; etc...). Cependant, d'autres auteurs se sont focalisés, dans leurs travaux, sur quelques composés chimiques des grains de caféiers spontanés (malgaches et africains), notamment : RAKOTOMALALA (1992) et RAKOTOMALALA et al., (1993b) sur les acides hydroxycinnamiques, les bases puriques et les diterpènes glycosidiques ; RAKOTOMALALA et al. (1992) sur la caféine et la théobromine ; RAKOTOMALALA, CROS et CHARRIER (1993a) sur les acides phénols ; ANTHONY et al., (1993) sur la caféine, les acides chlorogéniques et le mozambioside ; ANDRIANADISON (2001) sur la caféine, les acides chlorogéniques, la teneur en eau et la fraction lipidique ; CAMPA et al. (2004) sur la trigonelline et les sucres ; CAMPA et al. (2005b) sur les teneurs en acides chlorogéniques et en caféine.

1.3.1. Méthylxanthines

Les méthylxanthines sont des métabolites secondaires de la plante, formés à partir des nucléotides puriques (ASHIHARA et CROZIER, 1999a). Les plus connus des méthylxanthines sont la caféine (1,3,7-triméthylxanthine) et la théobromine (3,7-diméthylxanthine) lesquelles sont présentes dans le café mais aussi dans le thé, le cacao et d'autres boissons⁸.

La théophylline (1,3-diméthylxanthine) a aussi été identifiée dans les graines matures des caféiers, notamment dans deux caféiers spontanés de l'Afrique de l'Est : *C. racemosa* et *C. sessiliflora* (RAKOTOMALALA, 1992).

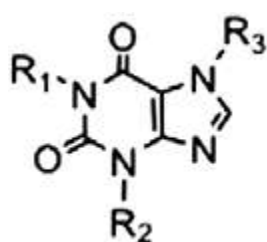
D'autres méthylxanthines et des acides méthyluriques (Figure 9) ont été décelés, mais à de très faibles quantités, dans les graines de café de *C. arabica* et de *C. canephora* (CITROREKSOKO et al., 1977) et dans les vieilles feuilles de *C. liberica*, *C. dewevrei* et *C. abeokutae* (BAUMANN, OECHSLIN et WANNER, 1976 ; PETERMANN et BAUMANN, 1983). Ces composés sont : la paraxanthine (1,7-diméthylxanthine), la théacrine (1,3,7,9-tétraméthylurique), la libérine [acide 0(2),1,9-triméthylurique] et le méthyllibérine [acide 0(2),1,7,9-tétraméthylurique]. La théacrine est la méthylxanthine majeur de *C. kianjavatensis* A 602 (RAKOTOMALALA, 1992).

La caféine est l'alcaloïde purique le plus important dans le café. En effet, son accumulation dans les graines influe sur la qualité du café-boisson en augmentant l'amertume de celui-ci. Elle a aussi un impact sur la santé. Car, elle provoque divers effets physiologiques sur le corps humain, en particulier la stimulation du système nerveux central qui a pour conséquence l'insomnie (NEHLIG, DAVAL et DEBRY, 1992).

⁸Boissons préparés à partir de : Maté (*Ilex paraguariensis*), Guarana (*Paullinia cupana*), Cola (*Paullinia pachycarpa* et *P. yoco*), ou à base citron (*Citrus sp.*).

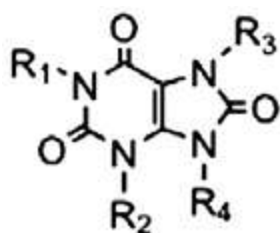
La formation, à partir de la xanthosine, de la caféine dans le café fait intervenir des étapes de méthylation successives et produit des méthylxanthines intermédiaires. La principale voie de biosynthèse de la caféine passe par la formation successive de 7-méthylxanthosine, 7-méthylxanthine et la théobromine (Cf. Annexe 2). Par contre, la voie majeure de dégradation de la caféine passe par la théophylline, 3-méthylxanthine, la xanthine pour arriver à la dégradation de l'acide urique en CO₂ et en NH₃ (ASHIHARA, SANO et CROZIER, 2008).

Les acides méthyluriques sont probablement formés à partir de la caféine après des étapes successives d'oxydation et de méthylation (ZHENG *et al.*, 2002)



Méthylxanthines

Composés	Nom trivial	R ₁ (1)	R ₂ (3)	R ₃ (7)
Xanthine		H	H	H
1-Méthylxanthine		CH ₃	H	H
3-Méthylxanthine		H	CH ₃	H
7-Méthylxanthine		H	H	CH ₃
1,3-Diméthylxanthine	Théophylline	CH ₃	CH ₃	H
1,7-Diméthylxanthine	Paraxanthine	CH ₃	H	CH ₃
3,7-Diméthylxanthine	Théobromine	H	CH ₃	CH ₃
1,3,7-Triméthylxanthine	Caféine	CH ₃	CH ₃	CH ₃



Acide urique et
acide méthylurique

Composés	Nom trivial	R ₁ (1)	R ₂ (3)	R ₃ (7)	R ₄ (9)	O(2)-
Acide urique		H	H	H	H	-
1,3,7-Triméthylurique		CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-
1,3,7,9-Tetraméthylurique	Théacrine	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-
O(2),1,9-Triméthylurique	Libérine	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
O(2),1,7,9-Tetraméthylurique	Méthyllibérine	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃

Figure 9 : Structures des alcaloïdes puriques basées sur les squelettes de la xanthine et de l'acide urique

1.3.2. Intérêt des méthylxanthines

La caféine est connue pour son action stimulante, mais aussi pour ses effets indésirables pour l'organisme humain. C'est cette situation qui explique l'augmentation de la demande de café à faible teneur en caféine sur le marché et qui accroît l'intérêt des consommateurs pour les cafés décaféinés. Les recherches actuelles tendent, ainsi, vers la recherche des voies (autre que chimiques) permettant de produire du café sans caféine ou du moins à faible teneur en cette alcaloïde. Quelques pistes de

recherches ont été explorées, notamment la production de caféiers transgéniques utilisant la génie génétique ou l'utilisation des plantes mutantes de *C. arabica* naturellement dépourvue de caféine (SILVAROLLA, MAZZAFERA et FAZUOLI, 2004) ; ou encore, l'hybridation interspécifique des caféiers cultivés avec les caféiers à faible teneur ou dépourvus de caféine (NAGAI et *al.*, 2008). Les caféiers spontanés de la région malgache ont cette particularité (BERTRAND, 1901 ; RAKOTOMALALA, 1992). Rappelons que, c'est du fait de cette absence ou de la présence exceptionnelle de faibles traces de cet alcaloïde dans leurs graines que CHEVALIER (1938) a groupé ces caféiers dans la section des *Mascarocoffea*, en plus de leur origine géographique commune.

Les méthylxanthines, notamment la paraxanthine, le principal produit de dégradation⁹ de la caféine (84%) dans les cellules hépatiques de l'homme, possèdent un fort pouvoir d'inhibition contre le développement des maladies chroniques du foie, comme la fibrose (GRESSNER, 2010). Ces composés peuvent ainsi être proposés comme des remèdes dans les traitements ou les préventions de cette maladie.

En outre, les rôles physiologiques de la caféine et des autres bases puriques dans les végétaux suscitent de nombreuses interrogations. Deux hypothèses ont été avancées concernant le rôle écologique de la caféine pour la plante.

La théorie de défense chimique, avance qu'une forte concentration en caféine dans les jeunes feuilles, des fruits et des bourgeons floraux des espèces végétales, comme les caféiers et les théiers, joue le rôle de défense de la plante et protège les jeunes tissus contre les organismes pathogènes et les herbivores (KUMAR, HEWAVITHARANAGE et ADIKARAM, 1995 ; HOLLINGSWORTH, ARMSTRONG et CAMPBELL, 2002 ; UEFUJI et *al.*, 2005 ; KIM et *al.*, 2006 ; KIM et SANO, 2007).

La théorie de l'activité allélopathique ou fonction autotoxique, suppose que la caféine des graines et des feuilles mortes de la litière inhibe la germination des graines autour de la plante mère (ANAYA, CRUZ-ORTEGA et WALLER, 2006).

1.3.3. Acides hydroxycinnamiques et dérivés

Les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés des produits secondaires chez les végétaux. Parmi ces composés phénoliques figurent les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés (Figure 10) qui dérivent, comme la plupart des composés phénoliques, d'un précurseur commun : l'acide cinnamique. Le plus connu et le plus répandu des esters d'acides hydroxycinnamiques dans les végétaux est l'acide chlorogénique. Il est souvent considéré comme la forme de stockage des dérivés d'acide cinnamique et apparaît comme un composé intermédiaire de la voie de biosynthèse de la lignine (SCHOCH et *al.*, 2001). Ce monoester appartient

⁹ La caféine est dégradée dans les cellules du foie (hépatocytes) en trois métabolites : paraxanthine (84%), théobromine (12%) et théophylline (4%).

à la classe des depsides, terme désignant d'une façon générale les composés résultant d'une condensation du carboxyle d'un acide phénol avec un groupement hydroxyle d'un autre acide (COLONNA, 1978).

L'acide chlorogénique *stricto sensu* désigne l'acide caféyl 5-quinique (AC5Q). C'est un monoester formé par la condensation entre un acide quinique et un acide caféique. L'acide caféyl 3-quinique correspond à l'acide néochlorogénique (CLIFFORD, 1985).

Par contre, les acides chlorogéniques (ACGs) *lato sensu* évoquent, d'une manière générale, les groupes de composés et leurs isomères formés par l'estérification d'une molécule d'acide quinique avec une à trois molécules d'acide *trans*-hydroxycinnamique spécifique.

Les principaux groupes d'acides chlorogéniques présentes dans les grains de café sont :

- Les acides caféylquiniques (ACQ), avec 3 isomères (3-, 4- et 5-ACQ)
- Les acides dicaféylquiniques (AdiCQ), avec 3 isomères (3,4-AdiCQ; 3,5-AdiCQ; 4,5-AdiCQ)
- Les acides férulylquiniques (AFQ), avec 3 isomères (3-, 4- et 5-AFQ)
- Les acides para-coumarylquiniques (ApCoQ), avec 3 isomères (3-, 4- et 5- ApCoQ)
- Les acides caféyl-férulylquiniques (ACFQ)
- Les acides férulyl-caféylquiniques (AFCQ)

Les trois premiers groupes représentent environ 98% des acides chlorogéniques des caféiers. (CLIFFORD, 1985 ; MORISHITA, IWAHASHI et KIDO, 1989)

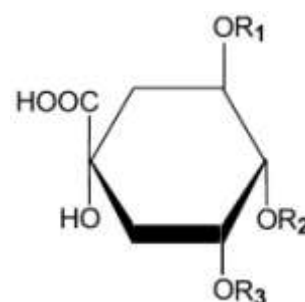
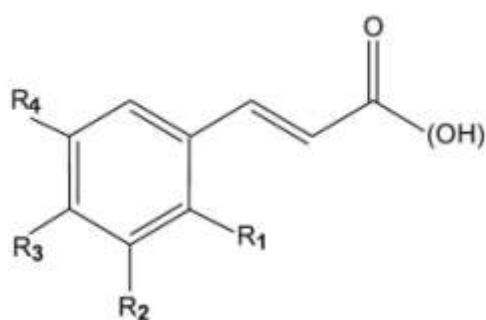
Les acides chlorogéniques sont les principales composés de la fraction phénolique des graines de café, avec une concentration pouvant aller jusqu'à 14% MS chez *C. canephora* (KY et al., 2001, FARAH et DONANGELO, 2006a). Elles s'accumulent dans les graines au fur et à mesure de leur maturation (CLIFFORD et KAZI, 1987). Cependant, on peut les retrouver dans les feuilles et dans les pulpes des cafés. Ils assurent une certaine résistance des fruits et de la plante face aux stress environnementaux, stress de natures biologiques et mécaniques (MACHEIX, FLEURIET et BILLOT, 1990). Ces composés contribuent à la qualité du café-boisson (CLIFFORD, 1985) car ils jouent un rôle important dans la formation de l'arôme et du goût (TRUGO et MACRAE, 1984 ; FARAH et al., 2006b). Les acides phénols, notamment l'AC5Q, permettent la détermination de la qualité des grains de café vert. En effet, des teneurs plus élevées en ce composé ont été observées et corrélées avec des grains défectueux ou immatures, par rapport à des grains sains ou de bonne qualité (FARAH et DONANGELO, 2006a).

Outre les esters quiniques des acides hydroxycinnamiques, les esters du glucose sont aussi largement distribués dans le règne végétal. Ces esters glucosidiques sont rencontrés dans de nombreuses plantes, notamment chez les tomates (MACHEIX et al., 1990), dans les pommes (FLEURIET, 1982) et dans

Etat des connaissances

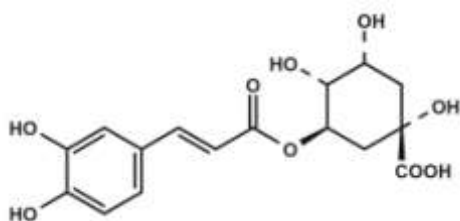
les feuilles de cotonniers (BRZOZOWSKA, HANOWER et TANGUY, 1973). Chez les tabacs (*Nicotiana tabacum*), le férulylglucose est parmi les composés phénoliques produits par la plante en réponse aux infections virales (TANGUY, 1971). Fréquent chez les caféiers sauvages malgaches, ce type d'estérification est, par contre, absent chez les caféiers cultivés (RAKOTOMALALA, 1992).

Les acides chlorogéniques peuvent former un complexe avec la caféine (chlorogénate de caféine) dans un rapport équimolaire (SONDHEIMER, COVITZ et MARQUISEE, 1961 ; HORMAN et VIANI, 1972 ; COLONNA, 1978). Ils peuvent aussi se lier à d'autres alcaloïdes, comme la théophylline, la paraxanthine, la théobromine ou la théacrine (KAPPELER, BAUMANN et GREUTERT, 1987). Toutefois, une part importante de ces acides reste sous forme libre (CAMPA et al., 2005b)

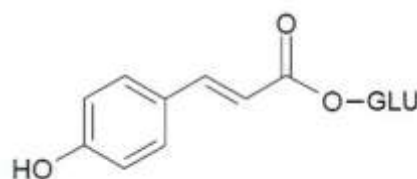


Nom trivial	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ac. cinnamique	H	H	H	H
ac. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H	H
ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
ac. caféique	H	OH	OH	H
ac. férulique	H	OCH ₃	OH	H
ac. 5-hydroxy-férulique	H	OCH ₃	OH	OH
ac. sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
ac. 3,4-diméthoxycinnamique	H	H	OCH ₃	OCH ₃

Composés	R ₁	R ₂	R ₃
ac. quinique	H	H	H
ac. chlorogénique	H	H	caféyl
ac. 4,5-diCQ	H	caféyl	caféyl
ac. 5- férulylquinique	H	H	férulyl



Acide caféyl 5-quinique (AC5Q)
acide chlorogénique *stricto sensu*



Acide *p*-coumaryl glucose

Figure 10 : Structures des acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés

1.3.4. Intérêt des acides hydroxycinnamiques

Les fonctions et les rôles dans les végétaux assignés aux composés phénoliques, en général, et aux acides hydroxycinnamiques, en particulier, sont nombreux et variés.

Plusieurs rôles sont avancés par les chercheurs : composés de détoxification (COLONNA, 1978) ; matières de réserve et forme de stockage de dérivés d'acides cinnamiques (SCHOCH *et al.*, 2001) ; substances impliquées dans la croissance de la plante ; métabolites intervenant dans le développement de la plante (germination de la graine, dormance des bourgeons, floraison, maturation du fruit) ; précurseurs dans les processus de lignification (HOFFMANN, 2003 ; MONDOLOT *et al.*, 2006) ou éléments de la biosynthèse des flavanes et des anthocyanes (HOFFMAN, 2003) ; corps biochimique lié aux réactions de la plante devant les agressions ou stress de natures physiques (irradiation UV) (LANDRY, CHAPPLE *et* LAST, 1995 ; CEROVIC *et al.*, 2002 ; TEGELBERG, JULKUNEN-TIITTO *et* APHALO, 2004), mécaniques (FLEURIET, 1982), biologiques (viraux, bactériens et cryptogamiques) et nutritionnels (MACHEIX *et al.*, 1990) ; éléments d'un système d'oxydo-réduction ; pigments intervenant dans les phénomènes photosynthétiques ; et activateur ou inhibiteur de divers systèmes enzymatiques.

C'est pour tout ces différents rôles biologiques, supposés ou avérés, joués par les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés dans les végétaux que ce groupe de composés est devenu si important et suscite, dans beaucoup de domaines, l'intérêt des chercheurs. Cet intérêt est à la fois d'ordre scientifique, économique et pratique.

Sur le plan scientifique, la diversité de ces composés, leur distribution et leur présence en quantité parfois élevée chez plusieurs espèces végétales sont autant de raisons qui ont suscité l'attention des chercheurs quant à leur signification biologique et leurs rôles chez les végétaux.

L'intérêt économique et pratique des depsides repose sur leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Leurs capacités à faire face aux diverses agressions et stress environnementaux leur confèrent une grande importance quant à leurs utilisations dans divers domaines.

Ces composés ont des effets physiologiques sur l'organisme animal et humain. Les acides caféylquiniques, synthétisés lors des stress oxydatives des plantes, ont un fort pouvoir antioxydant capable de réagir contre les peroxydations lipidiques (RICE-EVANS, MILLER *et* PAGANGA, 1997 ; TAMAGNONE *et al.*, 1998). Les radicaux libres sont très toxiques pour l'organisme humain et ne peuvent pas être efficacement éliminés par son système de défense. DEL CASTILLO, GORDON *et* AMES (2005) ont démontré que les cafés riches en acides caféylquiniques, notamment en AC5Q, possèdent la plus forte activité de neutralisation des radicaux libres de peroxy. Pour le café, ce type d'activité est fonction de l'espèce ou de la variété et des conditions de torréfaction. L'activité

antioxydante peut être bénéfique pour la santé humaine. Elle peut réduire les risques de maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et les cancers (NIGGEWEG, MICHAEL et MARTIN, 2004 ; JIN et *al.*, 2005), ou inhiber la réplication du VIH-1 (ZHU et *al.*, 1999). Ces composés peuvent également servir dans la prévention de maladies dégénératives chroniques de l'homme (SCALBERT, JOHNSON et SALTMARSH, 2005). Et, ils participent aux activités protectrices de l'organisme humain contre de nombreuses autres maladies (activité antispasmodique, hépatoprotective, hypoglycémique, antivirale) (TRUTE et *al.*, 1997 ; BASNET et *al.*, 1996 ; NATELLA et *al.*, 2002).

L'autre implication d'intérêt économique et technologique des acides chlorogéniques concerne leur participation aux qualités organoleptiques du café-boisson et d'autres productions végétales (thé, cacao, tabac). En effet, les arômes, le goût (une partie de l'amertume caractéristique, l'astringence et l'acidité finale du café) et la coloration brune proviennent de la dégradation et de l'oxydation des acides chlorogéniques en un grand nombre de phénols simples, pendant la torréfaction des graines (TRUGO et MACRAE, 1984).

1.3.5. Diterpènes glycosidiques

L'une des particularités qui caractérise la plupart des caféiers spontanés est la présence de substances amères de nature glucosidique dans les fèves. Ce sont des diterpènes associés avec du glucose (Figure 11). Les trois hétérosides diterpéniques identifiés, jusqu'à nos jours, chez les caféiers spontanés sont : (1) la cafamarine, isolée et identifiée partiellement chez *C. buxifolia* Ler. par d'ORNANO, CHASSEVENT et POUGNEAUD (1967) ; (2) le mascaroside, isolé des graines de *C. vianneyi* Ler. par HAMONNIERE en 1974 et identifié par DUCROUX et *al.* (1975), sa structure est étroitement apparentée au cafestol ; (3) le mozambioside, déterminé dans les graines de *C. pseudozanguebariae* (un caféier spontané Est africain) par PREWO et *al.* (1990).

Mais, d'autres composés de nature similaire qui ne sont pas encore identifiés ont été signalés dans plusieurs espèces de *Mascarocoffea* (RAKOTOMALALA, 1992).

Ces substances amères participent à la défense chimique de la plante au lieu et à la place de la caféine pour les espèces à faible concentration ou dépourvues de cet alcaloïde (PREWO et *al.*, 1990 ; RAKOTONDRAVAO, 2001).

Il est à noter que la présence de ces diterpènes glycosidiques est, en grande partie, responsable de l'amertume tenace des certaines espèces spontanées des *Mascarocoffea*, limitant ainsi leur exploitation agronomique.

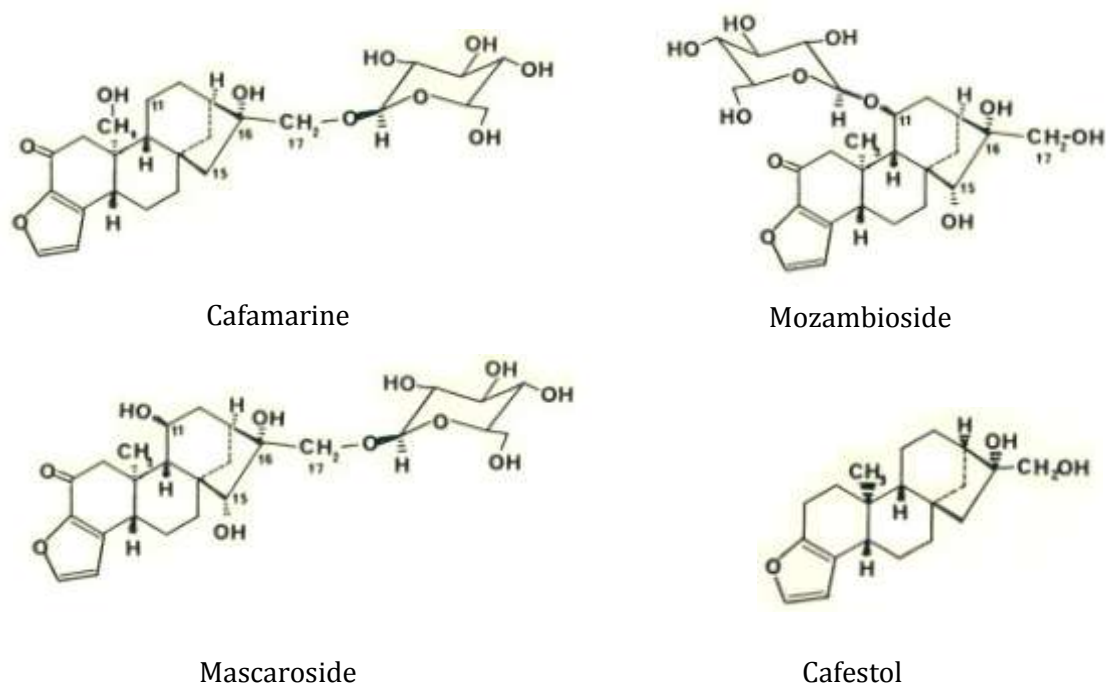


Figure 11 : Structures des diterpènes glucosidiques et du cafestol

1.3.6. Intérêt des diterpènes glycosidiques

La famille des diterpènes regroupe de nombreuses molécules actives, notamment les gibbérellines, hormones végétales, mais aussi des principes actifs comme le taxol, utilisé dans le traitement des cancers. Le cafestol et le kahweol, diterpènes caractéristiques des caféiers cultivés, ont deux types d'activité biologique. D'une part une action hypercholestérolémiant à court-terme (URGERT et KATAN, 1997), d'autre part une activité anti-oxydante avec un effet protecteur contre le développement de tumeurs (TAO et *al.*, 2008).

Pour les diterpènes glucosidiques des *Mascarocoffea*, ils seraient dotés de propriétés allélopatiques. Ils peuvent ralentir la croissance d'une plante. Par contre, la génine (obtenue par l'hydrolyse) d'un diterpène glucosidique semble avoir une action phytohormonale, à une certaine dose (RAKOTONDRAVAO, 2001). En outre, ces composés semblent détenir une propriété phytotoxique. En effet, les mascarosides, hétéroside diterpénique principal de *C. vianney*, bloquent la croissance de *Bidens pilosa*, une plante adventice dicotylédone et peuvent ralentir le développement du riz (*Oriza sativa*), à une concentration de 5 mg/ml (RAKOTONDRAVAO, 2001). En outre, d'après les expérimentations de RALALAMORIA (1999), les diterpènes glycosidiques de certaines espèces de *Mascarocoffea*, peuvent avoir une action inhibitrice contre la prolifération du champignon parasite du sol *Corticium rolfisii*, à une concentration supérieure à 2,5 mg/ml.

Enfin, rappelons qu'un des obstacles qui limite l'exploitation agronomique et commerciale des *Mascarocoffea* est la présence de diterpènes glycosidiques dans leurs graines (CHARRIER, 1972).

MATERIEL ET METHODES

DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES

2.1. Contexte

Les caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) ont pour aire d'origine les forêts naturelles. L'immense diversité que représentent ces caféiers spontanés n'est autre qu'une des expressions de la grande diversité des ressources génétiques forestières. Ces ressources génétiques sauvages sont caractérisées par une base génétique plus large par rapport aux espèces cultivées.

Cependant, elles sont beaucoup plus vulnérables car constamment menacées par les facteurs anthropiques (prévisibles) et les facteurs naturels (imprévisibles). Le fort taux de croissance de la population humaine accroît la pression sur les ressources naturelles, surtout sur les ressources forestières.

Les caféiers de la section *Mascarocoffea* figurent parmi les ressources forestières sévèrement menacées par l'érosion des gènes. Pourtant, ces ressources sauvages ont une importance fondamentale non seulement pour l'environnement et la diversité biologique, mais aussi pour l'agriculture. Effectivement, en possédant une exceptionnelle diversité, notamment sur le plan morphophysologique, édaphique, phénologique et biochimique, ces caféiers spontanés sont des réservoirs génétiques importants pour l'amélioration des variétés cultivées (RAKOTOMALALA, 1992). Parmi ceux-ci, les caféiers de la série *Verae* qui compte en son sein des espèces intéressantes sur le plan technologique et agronomique dont *C. kianjavatensis*, *C. lancifolia* et *C. homollei*. Des espèces menacées d'extinction. En effet, elles sont classées respectivement dans les catégories « en danger », « quasi menacée » et « préoccupation mineure » de la liste rouge de l'IUCN (2001).

Pour conserver cette ressource génétique, plusieurs stratégies et techniques de conservation ont été développées, ces dernières années ; des techniques qui profitent du progrès de la biotechnologie comme la culture *in vitro* en condition de vie ralentie (conservation à moyen terme) et la cryoconservation (conservation à long terme). Pour optimiser leurs efficacités, la combinaison des stratégies de préservation *in situ* et *ex situ* est nécessaire.

Par ailleurs, un des meilleurs moyens de gérer et de préserver ces potentiels immenses est de les valoriser. Néanmoins, la valorisation rationnelle de ces ressources passe, nécessairement, par une meilleure connaissance de la plante et de son environnement ; et une ample connaissance de ses propriétés phytochimiques et de ses constituants chimiques. Sur ce dernier point et compte tenu de l'impressionnante diversité que représentent les caféiers spontanés, une grande variabilité de caractères chimiques peut aussi exister pour ce groupe. La connaissance des substances chimiques du matériel végétale est également nécessaire pour les programmes d'amélioration génétique des caféiers. En effet, en plus de l'amélioration des caractères agronomiques (résistances aux maladies, adaptation

aux conditions environnementales et productivité) des caféiers cultivés, l'amélioration de la qualité organoleptique du café produit demeure l'autre objectif majeur visé par ces programmes.

La progression des demandes de café décaféiné sur le marché, d'un côté, et l'exigence d'une meilleure qualité organoleptique par les consommateurs, de l'autre côté, engendrent la multiplication des évaluations des caractères chimiques et organoleptiques des grains des caféiers. Dans ce domaine, l'immense diversité que représentent les caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) laisse entrevoir des possibilités non négligeables pour l'amélioration des caféiers cultivés, sur le plan biochimique et organoleptique.

L'utilisation éventuelle de ces matériels végétaux sauvages dans les programmes d'amélioration génétique ou biotechnologique nécessite davantage de connaissances, notamment sur la distribution et la variabilité des composés du métabolisme secondaire, molécules importantes dans le café.

2.2. Problématique

Les nombreuses recherches entreprises sur les constituants chimiques des caféiers ont été menées principalement sur l'identification et la quantification des composés chimiques des graines, et ce, essentiellement pour les caféiers cultivés (CLIFFORD et KAZI, 1987 ; FARAH et DONANGELO, 2006 ; FARAH et *al.*, 2006 ; etc...). Parallèlement à ces recherches, les travaux qui s'intéressent aux contenues chimiques des grains des caféiers sauvages ont davantage pris de l'importance. Sur ces deux groupes de caféiers (cultivés et spontanés), en plus de la caféine, les chercheurs se sont attelés sur l'étude des autres composés considérés comme responsable de la qualité organoleptique du café-boisson, comme les dérivés des acides hydroxycinnamiques, les bases puriques et les diterpènes glycosidiques, la trigonelline et les sucroses (COLONNA, 1978 ; TRUGO et MACRAE, 1984 ; RAKOTOMALALA, 1992 ; ANTHONY et *al.*, 1993 ; KY et *al.*, 2001, CAMPA et *al.*, 2004 ; FARAH et DONANGELO, 2006 ; FARAH et *al.*, 2006 ; HOUESSO, 2007 ; etc...).

La majorité des études se rapportent essentiellement aux graines des caféiers. Alors que de l'autre côté, les travaux de recherche effectués sur la distribution de ces métabolites dans d'autres parties de la plante demeurent très fragmentaires.

Pourtant, la connaissance des constituants chimiques et de leur distribution dans les autres organes de la plante, notamment dans les feuilles, peut présenter un intérêt chimiotaxonomique. Ces trois familles de composés peuvent servir à caractériser des subdivisions infraspécifiques (RAKOTOMALALA, 1992). Ainsi, la connaissance de la composition chimique des feuilles en ces substances contribuerait à consolider l'identification et la différenciation des taxons des caféiers spontanés originaires de la région malgache de la série *Verae*.

Si la présence de certains de ces substances dans les feuilles des caféiers spontanés a été mentionnée dans la littérature (COLONNA, 1978 ; PETERMANN et BAUMANN, 1983 ; MONDOLOT et *al.*, 2006). D'autres interrogations méritent encore d'être soulevées. En effet, des différences interspécifiques notables sont constatées en ce qui concerne les constituants des graines, notamment pour les espèces de la série *Verae* (RAKOTOMALALA, 1992). Ces différences s'expriment, même, jusqu'au niveau des populations. Cette constatation a été faite sur les graines des caféiers, mais est-ce que cette variabilité concerne-t-elle, aussi, les constituants des autres organes ? La question générale qui se pose est : **Comment se distribuent les composés du métabolisme secondaire des caféiers spontanés de la série *Verae* ?** Cette problématique générale se décline en plusieurs questions : Les compositions chimiques des feuilles sont-elles similaires à celles des graines ? La distribution qualitative et quantitative des métabolites secondaires des feuilles varie-t-elle en fonction de leur âge physiologique ? La composition chimique des feuilles de caféiers de la série *Verae* présente-t-elle une variabilité au niveau spécifique et infraspécifique ? Les biosynthèses des composés du métabolisme secondaire des caféiers débutent-elles dans les feuilles et continuent dans les graines ? Ou, s'achèvent-elles dans les tissus foliaires et les composés sont transportés jusqu'aux graines pour y être stockés ?

2.3. Hypothèses

A partir de la problématique et des interrogations évoquées précédemment, des hypothèses ont été formulées :

Hypothèse 1 : *Les composés chimiques du métabolisme secondaire des feuilles des caféiers de la série *Verae* se distribuent qualitativement¹⁰ et quantitativement de manière différente selon les espèces et selon les populations.*

Hypothèse 2 : *La composition en méthylxanthines, en dérivés hydroxycinnamiques et en diterpènes glucosidiques des feuilles de caféiers spontanés varient avec leurs âges physiologiques.*

Hypothèse 3 : *Les constituants chimiques sont qualitativement et quantitativement différents entre les graines et les feuilles.*

¹⁰ Présence ou absence

Tableau 2 : Analyse des hypothèses

Hypothèses	Indicateurs	Moyen de vérification	Mode de vérification
H1 : les composés chimiques se distribuent qualitativement et quantitativement de manière différente dans les feuilles selon les espèces	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité des substances identifiées dans les feuilles (présence /absence) - Teneur (%MS) de chaque composé identifié 	Extraction Séparation et identification des composés sur CCM	Identification, dosage et comparaison des bases puriques et acides hydroxycinnamiques majeurs des feuilles de chaque espèce
H2 : La composition en méthylxanthines, en dérivés hydroxycinnamiques et en diterpènes glucosidiques des feuilles de caféiers spontanés varient avec leurs âges physiologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité des substances identifiées dans les feuilles d'âge différent (présence /absence) - Teneur (%MS) de chaque composé identifié 	Extraction Séparation et identification des composés sur CCM	Comparaison des bases puriques et des acides hydroxycinnamiques majeurs entre les feuilles d'âges physiologiques différents
H3 : Les constituants chimiques sont qualitativement et quantitativement différents entre les graines et les feuilles	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité des substances identifiées dans les feuilles et dans les graines (présence /absence) - Teneur (%MS) de chaque composé identifié 	Extraction Séparation et identification des composés sur CCM Utilisation des données de la littérature	Comparaison des bases puriques et des acides hydroxycinnamiques majeurs des feuilles et des graines de chaque espèce

2.4. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué par 7 peuplements de caféiers (Tableau 3) issus de 3 espèces spontanées (*C. homollei*, *C. kianjavatensis*, *C. lancifolia*) de la série *Verae* des *Mascarocoffea*. Une espèce de caféier cultivé des *Eucoffea* (*C. canephora*) et *C. richardii* (série du complexe *Millotii*) ont été incluses dans l'étude à titre comparatif.

Les échantillons proviennent des collections vivantes de FOFIFA de Kianjavato.

Pour l'étude de la diversité des composés chimiques des caféiers, les échantillons utilisés sont constitués essentiellement de feuilles.

Les populations A 602 et A 213 de *C. kianjavatensis*, A 405 de *C. lancifolia* et A 945 de *C. homollei* ont servi pour la comparaison feuilles/graines.

L'étude de l'évolution de la composition chimique des feuilles a nécessité la collecte d'échantillons de feuilles issues de deux âges physiologiques différents : les « jeunes feuilles » qui sont constitués par les premières et deuxièmes paires de feuilles à partir des bourgeons terminaux des rameaux ; et les feuilles dites « adultes » situées au-delà des troisièmes paires de feuilles à partir du bourgeon terminal.

Les périodes de récolte des échantillons se sont déroulées au cours de la dernière semaine du mois de juillet (saison froide et humide) pour les feuilles ; et pendant la dernière semaine du mois de janvier (saison chaude et pluvieuse) pour les graines.

2.5. Composés chimiques ciblés

Les analyses se sont principalement focalisées sur trois groupes de composés chimiques : les bases puriques ou méthylxanthines auxquels appartiennent la caféine, la théobromine et la théophylline ; les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés, représentées par les acides chlorogéniques ; et les diterpènes glucosidiques.

Tableau 3 : Les populations et espèces étudiées

Série botanique	Espèce	Code d'identification / Numéro de la population	Origine	
			Géographique	Phytogéographique
<i>Verae</i>	<i>C. kianjavatensis</i>	A 213	Kianjavato	Domaine de l'Est
		A 602	Isaka – Ivondro (Fort Dauphin)	
	<i>C. lancifolia</i>	A 320	Madiorano Tologoina	
		A 405	Forêt Kararaika Tologoina	
		A 571	Réserve Ambodiriana (Toamasina)	
	<i>C. homollei</i>	A 574	Réserve Ambodiriana (Toamasina)	
A 945		Ambatolahy (Ranomafana)		
Complexe <i>Millotii</i>	<i>C. richardii</i>	A 575	Tampolo (Fénériver Est)	Domaine de l'Est
<i>Erythrocoffea</i>	<i>C. canephora</i>	K 76	Espèce cultivée d'origine Africaine	

2.6. Intérêt et justifications du choix des composés chimiques étudiés et des matériels végétaux utilisés

2.6.1. Justifications du choix des composés chimiques

Le choix d'étudier les bases puriques et les acides hydroxycinnamiques repose sur trois points :

- L'importance de ces deux groupes de métabolites secondaires, due à leurs propriétés, leurs rôles physiologiques et leur diversité (Cf. paragraphe 2.3) justifie amplement leur étude. En effet, les composés chimiques du métabolisme secondaire des caféiers (la trigonelline et les diterpènes glycosidiques y compris) contribuent pour une grande partie aux caractères organoleptiques du café-boisson. Et, leurs nombreuses propriétés biologiques et physiologiques les rendent intéressantes pour des applications dans des domaines variés.

- Eu égard à leur grande diversité, les métabolites secondaires présentent aussi un intérêt chimiotaxonomique. Une diversité et une variabilité de teneurs en ces composés au niveau spécifique et infraspcifique permettent la classification des espèces et la différenciation d'un taxon en fonction de la présence et/ou de l'importance de chaque constituant chimique de ce taxon. Chez les *Coffea*, plusieurs études ont montré la grande variabilité en ces composés secondaires, surtout les acides hydroxycinnamiques.

- Enfin, le choix des composés chimiques à étudier résultait surtout de la disponibilité, au cours de l'étude, des composés de référence nécessaire pour leurs identifications (Cf. paragraphe 3.6.1.5).

2.6.2. Justifications du choix du matériel végétal

La disponibilité des feuilles en grande quantité et pendant toute l'année est l'une des raisons qui justifie l'utilisation de ces dernières comme matériel végétal pour l'étude. Ce qui n'est pas le cas pour les graines qui ne sont disponibles que pendant une période restreinte de l'année. De plus, les feuilles peuvent être aisément regroupées en différents âges physiologiques.

L'autre intérêt est plutôt d'ordre scientifique. L'objectif de l'étude étant d'essayer de combler les connaissances, qui restent encore fragmentaires, (i) sur la distribution des métabolites secondaires dans les organes des caféiers spontanées de la région malgache ; et (ii) sur la diversité interspécifique et intraspécifique de ces substances chimiques dans les feuilles.

Les espèces de la série *Verae* ont été choisies pour leurs caractères organoleptiques généralement favorables (bonne odeur de café et une amertume moyenne à forte pour *C. homollei* ; liqueur plate et sans amertume pour *C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*) (CHARRIER, 1978). La série regroupe, aussi, les deux espèces dont les graines sont relativement les plus riches en bases puriques parmi les *Mascarocoffea* (RAKOTOMALALA, 1992). Les caféiers de cette série ont donc des potentialités pour l'amélioration génétique des caféiers cultivés.

2.7. Préparation des échantillons

Les feuilles collectées sont séchées de manière progressive à l'ombre. Après le séchage, elles sont finement broyées au broyeur de type Moulinex.

Les graines ou fèves provenant des fruits frais des caféiers sont, en premier lieu, débarrassés de l'exocarpe coloré ou peau et du mésocarpe charnu ou pulpe qui les enveloppent (Figure 12). Après un séchage à l'étuve, à une température constante de +35°C, l'endocarpe ou parche ainsi que le spermodermes (une pellicule argentée) sont enlevés. Les fèves ainsi obtenues sont finement broyées au broyeur de type Moulinex.

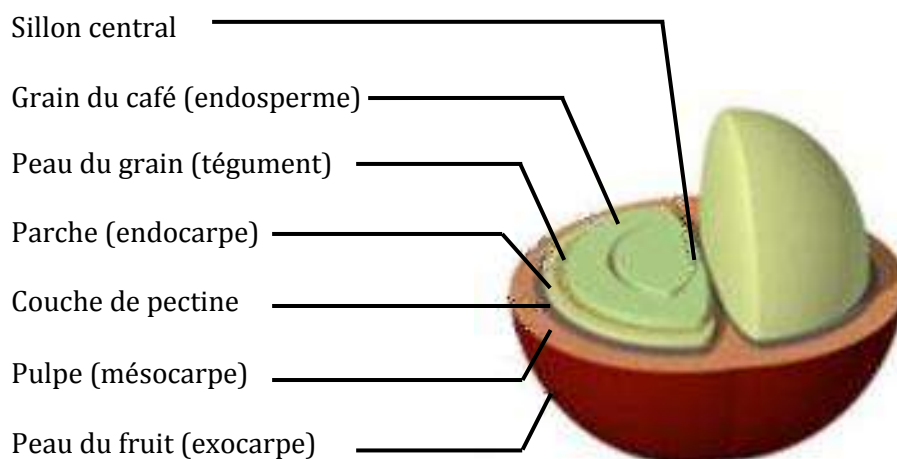


Figure 12 : Structure du fruit et de la graine du caféier

2.8. Méthodes d'extraction et de purification

La méthode d'extraction et de purification adoptée dans cette étude est basée sur la méthode mise au point par RAKOTOMALALA (1992), reprise par RALALAMORIA (1999) et RAKOTONDRAVAO (2001), et modifiée. Les extractions des composés étudiés font intervenir plusieurs solvants organiques. Le principe des extractions par solvant repose sur les différences de solubilité selon les molécules et selon les solvants utilisés.

2.8.1. Extraction hydroalcoolique et purification

Selon les échantillons, un ou deux grammes de feuilles ou de graines moulues sont extraits successivement cinq fois par 20 ml de d'éthanol aqueux (80/20, v/v) pendant une heure, sous agitation magnétique à température ambiante. Les phases hydroalcooliques sont ensuite regroupées, et l'éthanol est éliminé à l'évaporateur rotatif de type Buchi.

La phase aqueuse résiduelle (**aq1**) est lavée trois fois (v/v) par de l'éther de pétrole (40-60°C) dans une ampoule à décanter, pour éliminer les pigments et les fractions lipidiques contenus dans les extraits. Après agitation, le mélange est laissé au repos. La phase inférieure aqueuse (**aq2**) est soutirée.

La phase aqueuse (**aq2**) est ensuite traitée avec 1 ml de solution I plus 1 ml de solution II de CARREZ¹¹. Les réactifs de CARREZ permettent l'élimination par précipitation, centrifugation et

¹¹ La solution I 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 II est préparée en dissolvant 10,6 g de ferrocyanure de potassium trihydrate dans 100 ml d'eau distillée.

filtration des matières colloïdales et des protéines libres présents dans les extraits aqueux (CLIFFORD, 1985).

2.8.2. Extraction des bases puriques

Les bases puriques, dont la caféine, la théobromine et la théophylline, sont extraites de la phase aqueuse (**aq2**) par quatre traitements successifs (v/v) avec du chloroforme à l'aide d'une ampoule à décanter. Après la décantation, deux phases sont obtenues, une phase supérieure aqueuse (**aq3**) et une phase inférieure chloroformique. La phase chloroformique (**P_C**), ainsi soutirée, est évaporée à sec et le poids est noté. Le résidu contenant les bases puriques est repris avec du méthanol.

2.8.3. Extraction des dérivés des acides hydroxycinnamiques

A la phase aqueuse (**aq3**) est ajouté du sulfate d'ammonium (concentration finale 20g/l) pour renforcer la force ionique de l'extrait aqueux ; et de 4% d'acide phosphorique pour acidifier le milieu et rendre ainsi les acides chlorogéniques plus solubles dans l'acétate d'éthyle (FLEURIET et MACHEIX, 1972).

L'extraction à quatre reprises permet d'entraîner la majorité des composés phénoliques et la totalité des acides chlorogéniques (FLEURIET, 1982). Après décantation, la phase organique est évaporée à sec et le poids est noté. Le résidu est repris avec 2,5 ml de méthanol.

La phase aqueuse finale (**aqF**) contient la majorité des diterpènes glucosidiques.

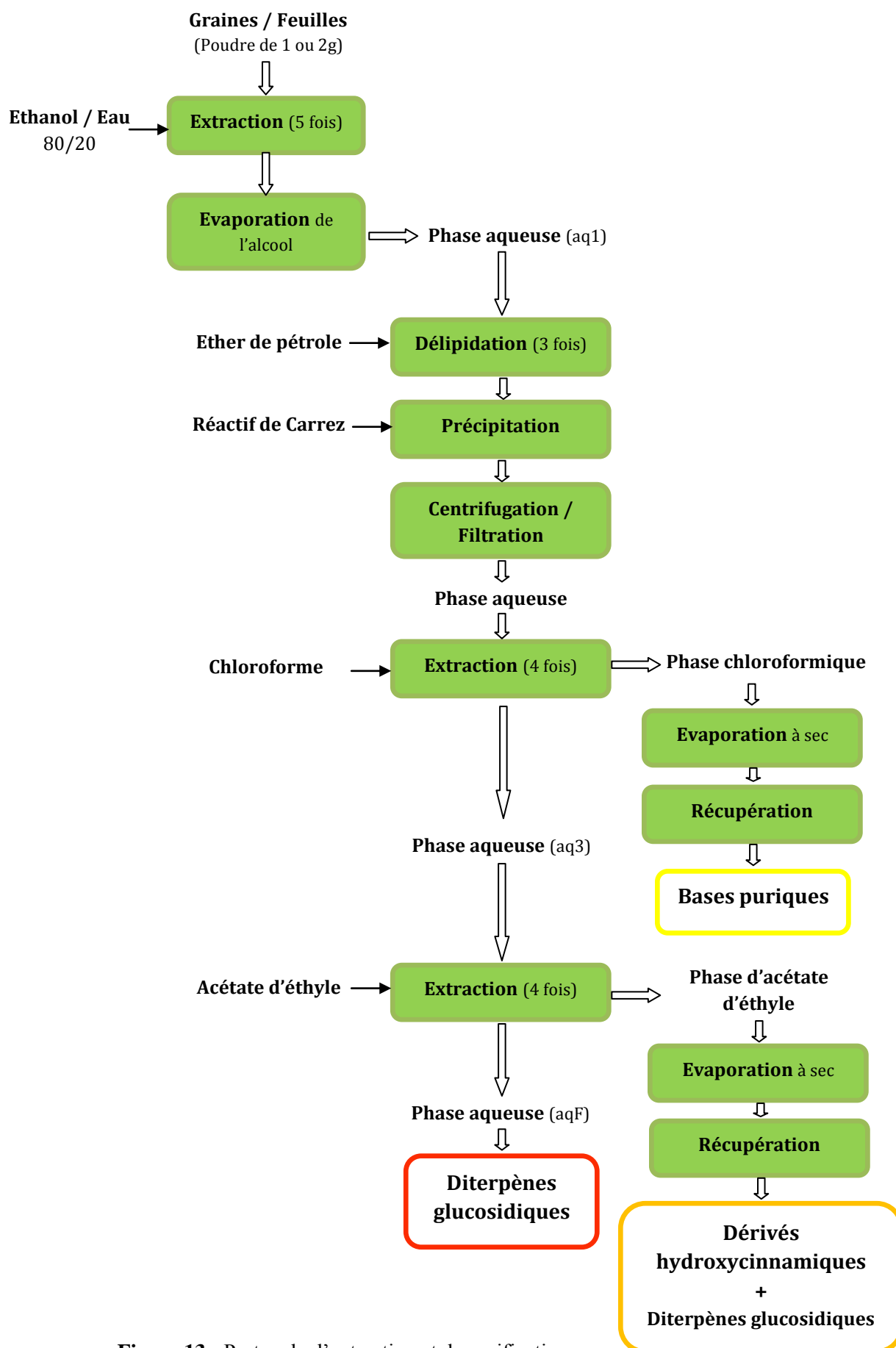


Figure 13 : Protocole d'extraction et de purification

2.9. Méthode analytique

Les analyses des extraits de feuilles et de graines obtenus ainsi que l'identification des composés ciblés présents dans ces extraits sont réalisés par la méthode chromatographique.

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique, qui permet de séparer les constituants, souvent très complexes, d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la (ré)partition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile). L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

2.9.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

2.9.1.1. Principe

La CCM est une technique chromatographique liquide-solide. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. De ce phénomène, il résulte une répartition des solutés entre une phase mobile formée par un système de solvant et une phase stationnaire composée par un adsorbant (solide) fixé sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide d'aluminium ou de plastique. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile.

Chaque composant de l'échantillon à séparer migre, le long de la plaque, à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.

2.9.1.2. Matériels et techniques de développement

L'adsorbant utilisé est composé par du gel de silice, supporté par une plaque en feuille d'aluminium de type TLC Gel de silice 60 W F₂₅₄ S ou en feuille de plastique de type 60 F₂₅₄ prêt à l'emploi, de dimension 20 x 20 cm.

Trois systèmes de solvants ou éluant ont été testés. Deux d'entre eux ont été retenus pour les éluations :

- MFE (methyl isobutyl cétone /acide formique/eau, 3/1/2), phase supérieure, a été retenu pour la plupart des éluations ;
- BA (butanol/ammoniaque 2%, 1/1), phase supérieure, a été utilisé pour séparer les esters glucidiques des ester quiniques, des acides hydroxycinnamiques.

La technique de développement adoptée est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve en verre, de marque DESAGA HEIDELBERG, et le solvant qui en recouvre le fond (extrémité inférieure de la plaque) monte par capillarité.

2.9.1.3. Mode opératoire

Sur les plaques d'aluminium ou de plastique de format 10 x 20 cm, les extraits à séparer sont déposés à l'aide d'un tube capillaire à 1,5 cm du bord inférieur et à 1 cm des bords latéraux, sous forme de traits horizontaux de 0,7 cm de long, espacés de 0,5 cm.

Après le séchage des dépôts, les plaques sont placées dans la cuve de développement contenant le solvant jusqu'à une hauteur de 0,5 cm environ. Auparavant, des mesures sont prises pour que l'atmosphère à l'intérieur de la cuve soit saturée par le solvant. Le mélange de solvants, ou éluant, monte et dépasse la ligne de départ. Les substances contenues dans le mélange initial sont alors entraînées à des vitesses différentes. Il se forme des bandes ou des taches. Quand le front du solvant a parcouru une distance suffisante et arrive à 1 cm du bord supérieur de la plaque, cette dernière est retirée et immédiatement séchée.

2.9.1.4. Révélation des chromatogrammes

La révélation des chromatogrammes est effectuée sous une lampe ultraviolette (UV) à 254 nm et 360 nm.

Chaque composé, observé sous forme de tache, sera identifié à l'aide de sa référence frontale ou rapport frontal¹² (R_f) et par la comparaison, avec celle des composés témoins, de la distance parcourue par chaque composé et leurs caractéristiques de fluorescence. Des données bibliographiques sont aussi utilisées dans l'identification de ces substances.

2.9.1.5. Composés de référence

Tous les composés témoins utilisés sont des produits commerciaux.

- Méthylxanthines : caféine, théobromine, théophylline ;
- Base pyrimidique : trigonelline ;
- Ester quinique d'acide hydroxycinnamique : acide caféyl 5-quinique (AC5Q) ;
- Acides hydroxycinnamiques libres : acide quinique, férulique, caféique, *p*-coumarique, *o*-coumarique, sinapique, 4-méthoxycinnamique, diméthoxy 3,4- cinnamique, triméthoxy 3,4,5-cinnamique.

¹² Le rapport entre la distance parcourue par la substance (chaque bande) et la distance parcourue par le front du solvant.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Résultats

3.1.1. Poids des résidus secs des extraits chloroformiques et des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles et des graines

Les résultats des pesés des résidus sec des extraits chloroformiques et ceux des extraits d'acétate d'éthyle des différents échantillons analysés (Tableau 4) traduisent les concentrations relatives des composés chimiques contenus dans les deux organes des caféiers étudiés, dont les bases puriques et les dérivés d'acides hydroxycinnamiques.

Tableau 4 : Poids des extraits chloroformiques et extraits d'acétate d'éthyle des échantillons de feuilles et de graines

Echantillons	Population	Prise d'essai (g)	Poids du résidu sec de l'EC (g)	Poids de l'EC par rapport à la prise d'essai (%)	Poids du résidu sec de l'EA (g)	Poids de l'EA par rapport à la prise d'essai (%)
Jeunes feuilles	A 213	2,009	0,1280	6,37	0,1811	9,01
	A 602	2,009	-	-	0,1642	8,17
	A 320	2,001	-	-	0,2961	14,80
	A 405	2,001	0,3169	15,84	0,0369	1,84
	A 571	2,005	-	-	0,1276	6,36
	A 574	2,004	0,2720	13,57	0,0337	1,68
	A 945	2,002	0,0479	2,39	0,2034	10,16
Feuilles adultes	A 213	2,003	0,2943	14,69	0,1278	6,38
	A 602	2,006	0,0849	4,23	0,2419	12,06
	A 405	2,005	0,1392	6,94	0,0380	1,90
	A 571	2,004	0,0202	1,01	0,0424	2,12
	A 574	1,003	0,3677	36,66	0,0556	5,54
	A 945	2,005	0,0513	2,56	0,0152	0,76
Graines	A 213	2,003	0,0430	2,15	#	#
	A 602	2,002	0,3595	17,96	0,0264	1,32
	A 405	2,002	0,0360	1,80	#	#
	A 945	0,900	0,0310	3,44	#	#
Feuilles Témoins	K 76	2,009	0,0820	4,08	0,0676	3,36
	A 575	2,001	0,3132	15,65	0,0874	4,37

EC : extrait chloroformique EA : extrait d'acétate d'éthyle (-) : pesée non effectuée (#) : extractions non réalisées

Les données obtenues montrent une grande disparité des poids des extraits secs. Ces poids varient entre 1,01 à 15,84 % pour les extraits chloroformiques des feuilles, contenant les bases puriques ; et entre 0,76 à 14,8 % pour ceux des extraits d'acétate d'éthyle renfermant les dérivés d'acides hydroxycinnamiques et une partie des diterpènes glucosidiques.

Dans son ensemble, ces valeurs sont relativement élevées par rapport aux données fournies par la littérature. En effet, les teneurs totales en méthylxanthines des feuilles, par exemple, varient entre 0,23

à 0,91% MS pour ASHIHARA *et al.* (1996). Nos extraits, notamment l'EC, pourraient donc contenir des impuretés ou d'autres composés autres que les méthylxanthines, ce qui expliquerait ces concentrations relativement élevées.

Le poids moyen des résidus secs des extraits d'acétate d'éthyle (EA) des jeunes feuilles est apparemment supérieur à celui des feuilles adultes, avec un poids moyen de 149 mg (7,43%) pour les premiers contre 86,8 mg (4,79%) pour les feuilles adultes. Comparées aux teneurs des acides hydroxycinnamiques des feuilles de caféiers trouvées dans la littérature (COLONNA, 1978 ; MONDOLOT, 2006), ces valeurs sont un peu plus élevées du fait que nos extraits renfermeraient en plus des dérivés hydroxycinnamiques d'autres composés comme les diterpènes glycosidiques et les flavonoïdes. Néanmoins, cette tendance concorde avec les observations de COLONNA (1978) et de MONDOLOT (2006). Pour ces deux auteurs, les concentrations des acides hydroxycinnamiques diminuent en fonction de l'âge des tissus foliaires.

Les observations de RALALAMORIA (1999) et de ANDRIANADISON (2001) sur les poids des extraits secs chloroformiques des graines et ceux de l'acétate d'éthyle ont révélé que les caféiers cultivés présentent des concentrations plus élevées par rapports aux caféiers hybrides et caféiers sauvages. Cette tendance n'est pas constatée avec nos résultats. Les poids des extraits secs des graines des caféiers dits « à caféine » (A 405, A 213) ne se démarquent pas de celui des graines du caféier sans caféine *C. homollei* A 945. Avec un seul essai pour chaque échantillon, une tentative de regrouper les concentrations selon les caféiers cultivés, caféiers sauvages à caféine ou sans caféine, serait une entreprise hasardeuse. Cela nécessite plusieurs répétitions et davantage de précision lors des extractions et des pesages.

3.1.2. Compositions en méthylxanthines des feuilles de *Verae*

Les méthylxanthines sont caractérisés par des spectres d'absorption UV à λ maximale de 276 nm, notamment pour la caféine, la théobromine et la théophylline (Cf. Annexe 4). Pour la théacrine, son maximum d'absorption se situe à 292 nm (RAKOTOMALALA, 1992). Ces bases puriques n'absorbent pas à 360 nm. Elles sont donc invisibles à cette longueur d'onde.

3.1.2.1. Jeunes feuilles

Les bandes les plus visibles sont traduites avec leurs caractéristiques chromatographiques (R_f et fluorescence) dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits chloroformiques des jeunes feuilles, migrés avec le solvant MFE

Tache (n°)	Rf	Standards	Caractéristique de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm												
			A 320 J	A 405 J	A 571 J	A 574 J	A 602 Gr								
1	0,71											SBR	INV		
2	0,67											SBR	INV		
3	0,60											SBR	INV		
4	0,52											SBR	INV		
5	0,45											SBR	INV		
6	0,44	Théophylline													
7	0,43	Caféine												SBR	INV
8	0,36													NOI	INV
9	0,29	Théobromine	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV						SBR	INV
10	0,28											SBR	BRU		

SBR : Sombre¹³ BRU : Brune INV : invisible (J) : Jeunes feuilles (Gr) : Graines

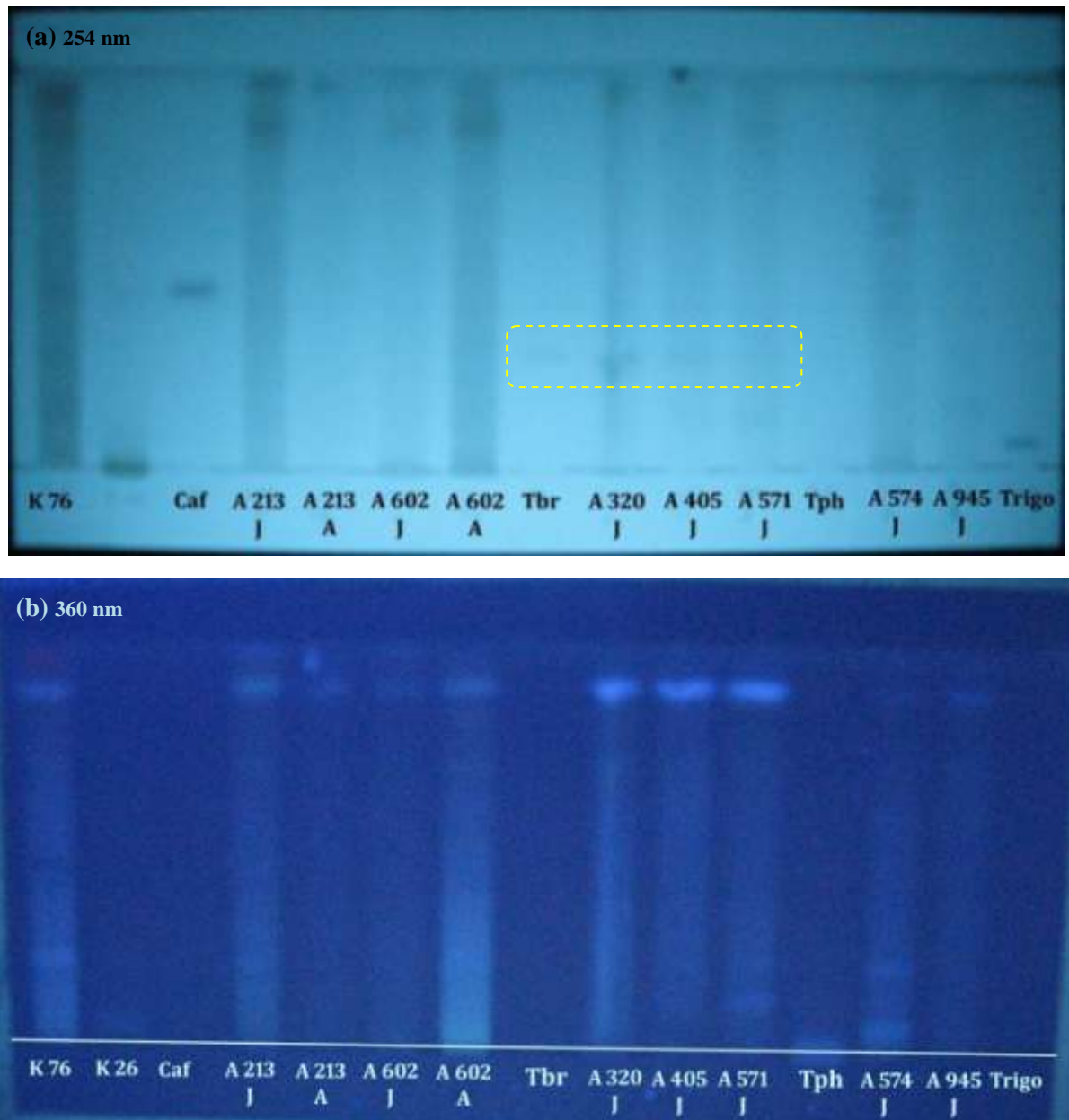
L’observation des profils chromatographiques des populations de *C. lancifolia* montre la présence d’une seule bande (Rf = 0,29) pour chaque profil (Tableau 5). Sur le chromatogramme, ces taches sont d’une intensité variable suivant les accessions de *C. lancifolia* A 320, A 405 et A 571 (Figure 14). Elle est nettement visible pour A 320 (Figure 15a). Ces bandes sont identifiées comme étant la théobromine. En effet, elles présentent la même référence frontale et les mêmes caractéristiques de fluorescence que le composé témoin. Et, ces taches sont invisibles à 360 nm.

Pour la population *C. homollei* A 574, six spots sont constatés. Ils ne correspondent à aucune des références frontales des composés utilisés comme témoins. Cinq de ces substances sont moins polaires par rapport à la caféine et à la théophylline (Rf = 0,45 à 0,71). Ces cinq spots ont des caractéristiques de fluorescence typique des bases puriques. Ils pourraient être des précurseurs de la caféine (autre que la théobromine). Pour cette espèce, la biosynthèse de la caféine dans les feuilles pourrait s’arrêter bien avant l’étape conduisant à la formation de la théobromine. *C. homollei* est connue pour l’absence dans ses graines de la caféine, mais aussi de la théobromine, ce qui la distingue des autres espèces de la série *Verae* (RAKOTOMALALA, 1992). Une interruption de la biosynthèse des méthylxanthines dans les feuilles pourrait résulter de : (i) l’absence d’enzymes nécessaires (les *N*-méthyltransférases) (UEFUJI et al., 2005) ; (ii) l’absence d’endophytes spécifiques qui participent à la synthèse des méthylxanthines. En effet, il a été constaté que des endophytes synthétisent des dérivés hydroxycinnamiques dans les feuilles de *C. sp* A 315 (ANDRIAMIALIHARISOA, 2011) ; ou au contraire, cette interruption est due à (iii) l’intervention d’endophytes qui dégradent les composés précurseurs (RATSIMBAZAFY, 2011).

¹³ Tache de couleur sombre ou noire

Résultats et discussion

Dans nos conditions analytiques, aucun spot ayant les caractéristiques chromatographiques (R_f et fluorescence) similaires à celles des bases puriques, n'a été décelé chez les échantillons de feuilles des populations *C. kianjavatensis* A 213 et A 602, ainsi que chez *C. homollei* A 945.



Caf : caféine
J : jeunes feuilles

Tbr : théobromine
A : feuilles adultes

Tph : Théophylline

Trigo : Trigonelline

Figure 14 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des feuilles des cafés *Verae*, observé sous UV à a) 254 nm b) 360 nm (solvant de migration : MFE)

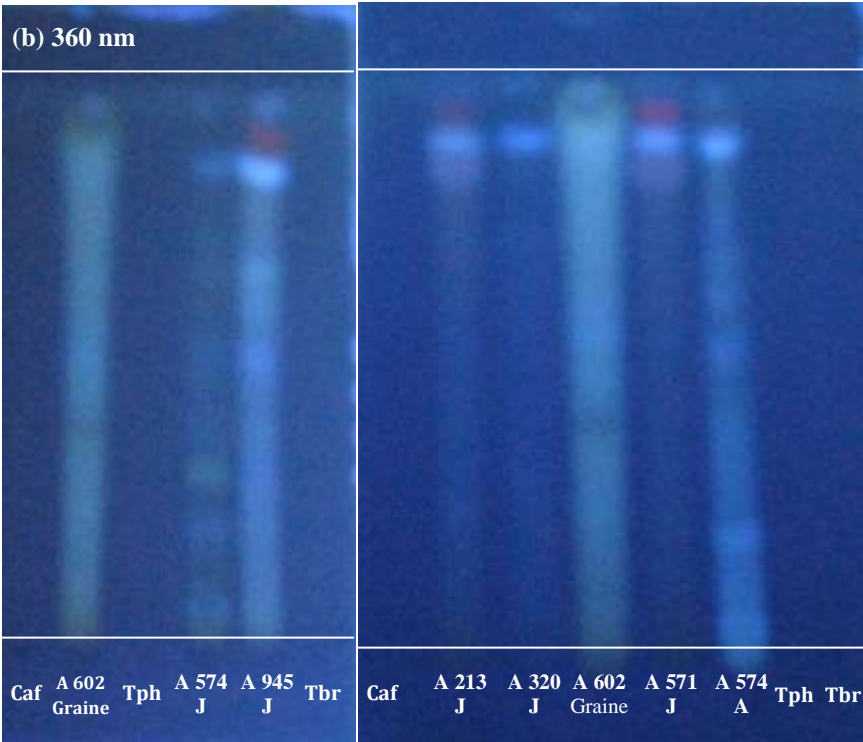
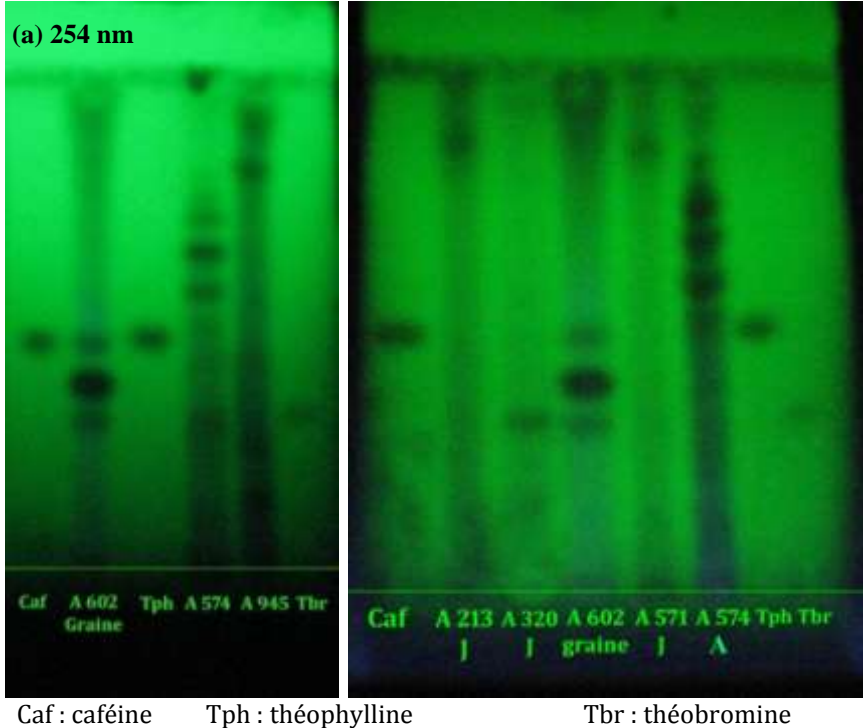


Figure 15 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des jeunes feuilles a) observés sous UV à 254 nm b) à 360 nm (solvant de migration : MFE)

3.1.2.2. Feuilles adultes

Les spots sur le chromatogramme des extraits chloroformiques des feuilles adultes peuvent être rassemblés en trois groupe (Tableau 6) : (i) groupe des composés apolaires ($R_f = 0,82$ à $0,97$), (ii) groupe des substances moyennement polaires ($R_f = 0,20$ à $0,76$) et (iii) le groupe des métabolites fortement polaires ($R_f = 0,05$ à $0,20$).

La plupart des spots révélés dans le premier et le troisième groupe sont aussi décelés dans les chromatogrammes des jeunes feuilles (Figure 14 et 15) mais ne sont pas notés dans le Tableau 5.

Tableau 6 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des feuilles adultes, migrés avec le solvant MFE

		A 213 Gr	A 213 A	A 602 A	A 405 A	A 571 A	A 574 A	A 945 A	K 76									
Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm																
0,97							SBR	BLU									SBR	BLU
0,96		SBR	JAU-OCR															
0,93				SBR	BLU-VIO	SBR	VIO					SBR	BLU					
0,93								SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ROU			
0,91		SBR	INV														SBR	INV
0,86						INV	BLU	INV	VIO	INV	BLU-VIO			INV	BLU	INV	VIO	
0,82		SBR	INV			SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV							
0,76												SBR	INV					
0,71												SBR	INV					
0,68														INV	BLU			
0,66												NOI	INV					
0,61												NOI	INV					
0,55												NOI	INV					
0,50		INV	JAU Foncé															
0,47		INV	JAU Foncé															
0,42	Théophylline											SBR	INV					
0,38	Caféine	NOI	INV														SBR	INV
0,30		NOI	INV															
0,27		INV	JAU Claire															
0,24	Théobromine	SBR	INV															
0,20		INV	JAU Claire															
0,05												INV	BLU					

BLU : Bleue INV : invisible NOI : Noire OCR : Ocre ROU : Rouge SBR : Sombre
 VIO : Violet Caféine : NOI/INV Théophylline : NOI/INV Théobromine : SBR/INV

(A) : Feuilles adultes (Gr) : Graines

Dans le premier groupe, quatre types de spots sont mis en évidence. Les spots de fluorescences sombre/bleue ou sombre/violet ($R_f = 0,97$ et $0,93$) et les spots avec un $R_f = 0,86$ et invisible (à 254 nm) / bleu ou violet (360 nm), ont les caractéristiques de fluorescences similaires aux dérivés d'acides hydroxycinnamiques (COLONNA, 1978). Ces composés pourraient donc appartenir à cette famille de substances. Mais, les natures exactes de ces substances chimiques restent à identifier.

Les taches sombres/rouges ($R_f = 0,93$) sont spécifiques aux extraits de feuilles. Elles ne sont pas décelées sur les profils chromatographiques des extraits chloroformiques des graines. CHAPPLE et *al.* (1992) et FRANKE et *al.* (2002 a, b) ont imputé à la chlorophylle la fluorescence rouge des feuilles (*Arabidopsis*) observées sous la lumière UV. Il existe ainsi une très forte présomption pour que ces spots de fluorescence rouge soient des chlorophylles.

Le dernier type de spots est constitué par les bandes aux caractéristiques sombre/invisible ($R_f = 0,82$ et $0,91$). Ce type de fluorescence est caractéristique des méthylxanthines. Elles sont observées uniquement sur les échantillons des feuilles et des graines des caféiers « à caféines » (*C. lancifolia* A 405 et A 571 ; *C. kianjavatensis* A 213 et A 602). Ces composés ne correspondent à aucune des substances servant de témoins. Cependant, du fait de leurs caractéristiques, elles sont supposées être des bases puriques.

Pour les substances fortement polaires du troisième groupe, seul l'échantillon *C. homollei* A 574 affiche des spots sur le chromatogramme. Ces deux spots ($R_f = 0,20$ et $0,05$) ont des caractéristiques similaires aux dérivés phénoliques. D'ailleurs, on retrouve ces mêmes spots sur le profil chromatographique de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles adultes de cette même population (A 574) (Cf. Tableau 9 et Figure 18). Dans cet extrait, ces deux bandes présentent une fluorescence très intense sous UV à 360 nm. Cela confirme l'appartenance de ces composés à la famille des dérivés phénoliques. Leurs identités restent encore à déterminer.

Dans le deuxième groupe, le groupe des composés moyennement polaires, seule la population *C. homollei* A 574 présente des spots parmi les échantillons des feuilles adultes. Six bandes de caractéristiques semblables aux bases puriques sont observées. Ces bandes ne correspondent à aucun des méthylxanthines témoins. Elles sont plus apolaires que la caféine et la théophylline. Pour A 574, ces composés sont communs aux deux catégories d'âge physiologique des feuilles. En effet, ces spots sont aussi détectés sur l'extrait chloroformique des jeunes feuilles (Cf. Tableau 5 et Figure 15).

Par contre, la théobromine, la seule méthylxanthine formellement détectée dans les jeunes feuilles n'est pas décelé dans nos échantillons de feuilles adultes de *C. lancifolia* A 571 et A 405.

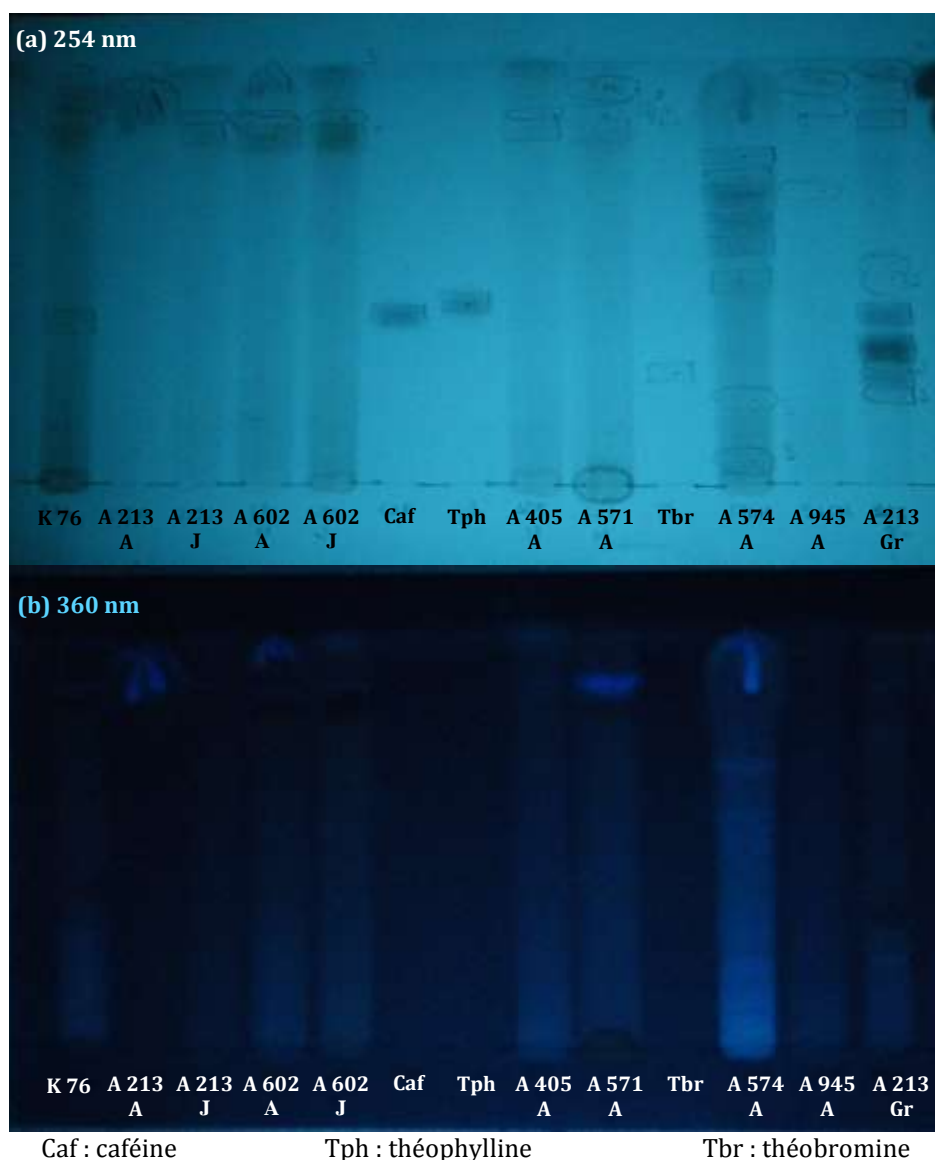


Figure 16 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des feuilles adultes, révélés à a) 254 nm et b) 360 nm (solvant de migration : MFE)

3.1.3. Compositions en dérivés hydroxycinnamiques

3.1.3.1. Jeunes feuilles

Tous les profils chromatographiques (Figure 17 et Tableau 7) des jeunes feuilles des populations analysés montrent la présence de spots de fluorescence bleue sous UV à 360 nm et des Rf avoisinant 0,41. La comparaison de ces taches avec celle du composé témoin permet de les identifier à l'acide caféyl-5 quinique (AC5Q). Les sept populations¹⁴ étudiées renferment, dans son ensemble, cette substance dans leurs feuilles.

¹⁴ Les profils chromatographiques des populations A 320, A 602 et A 945 présentent des taches correspondant à l'AC5Q, mais les données ne sont pas montrées sur le tableau

Résultats et discussion

La population A 574 de *C. homollei*, à part l'acide chlorogénique, contient deux composés fortement polaires très visibles (fluorescence de couleur bleue) de Rf=0,04 et 0,12. Ces deux spots, comme toutes les autres taches de couleur bleue sous UV à 360 nm sur le chromatogramme, ont les caractéristiques des dérivés hydroxycinnamiques. Ces composés appartiennent vraisemblablement à cette famille de substances, mais leurs natures restent à déterminer.

Tableau 7 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles, séparés avec le solvant MFE

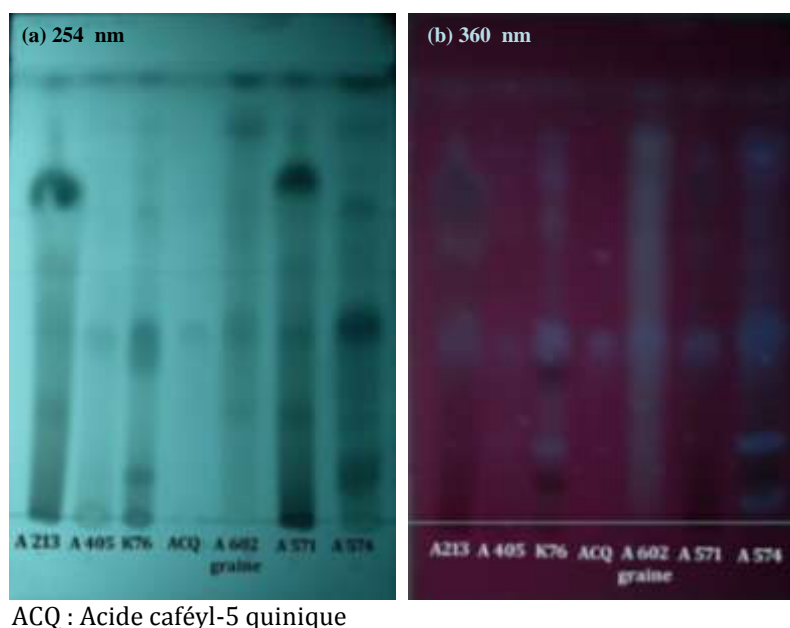
Bande n°	Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm											
			A 213 J		A 405 J		A 571 J		A 574 J		K 76		A 602 Gr	
1	0,97		SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU
2	0,91												SBR	BLU
3	0,85						SBR	BLU	SBR	BLU			SBR	ROX
4	0,77								SBR	BLU	SBR	BLU		
5	0,73		SBR	BRU			SBR	BRU						
6	0,67								SBR	BLU	SBR	BLU		
7	0,58								SBR	BLU				
8	0,55		SBR	ROX			SBR	ROX						
9	0,41	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU
10	0,35										SBR	BRU		
11	0,27								SBR	BRU				
12	0,24												SBR	INV
13	0,23		SBR	BRU			SBR	BRU						
14	0,21								SBR	BRU				
15	0,17								INV	BLU	INV	BLU		
16	0,12								SBR	BRU				
17	0,09								SBR	BRU	SBR	BRU		
18	0,04								INV	BLU				

SBR : Sombre BLU : bleu claire fluorescent BRU : brune¹⁵ ROX : roux¹⁶ INV : invisible

Outre les esters quiniques des acides hydroxycinnamiques, la littérature mentionnent aussi la présence des esters glucidiques dans les caféiers. Ce type d'estérification est fréquent chez les caféiers sauvages malgaches (RAKOTOMALALA, 1992). Ces composés sont caractérisés dans le BA. En effet, ils ont des Rf élevés par rapport aux esters quiniques. Ces derniers migrent peu dans ce solvant. D'après les données de RAKOTOMALALA (1992), les trois espèces de la série *Verae* renferment des composés de types esters glucosidiques.

¹⁵ Couleur intermédiaire entre le roux et le noir

¹⁶ Couleur orangée tirant sur le marron ou sur le rouge



ACQ : Acide caféyl-5 quinique

Figure 17 : Chromatogrammes des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles, révélés à a) 254 nm et b) 360 nm (solvant de migration : MFE)

Les analyses chromatographiques de nos échantillons avec le solvant BA ont révélé des spots pouvant être des esters glucidiques de l'acide hydroxycinnamique. En effet, des similitudes avec les caractéristiques des esters glucidiques décrites par RAKOTOMALALA (1992) sont constatées avec ces spots. Ils ont des R_f compris entre 0,53 à 0,89 (Tableau 8) et de couleurs bleue, violet ou gris. Ces composés sont repartis sur les échantillons de jeunes feuilles, sauf chez *C. kianjavatensis*. Ils sont aussi décelés chez *C. richardii* A 575, l'espèce présentant le plus de spots de type ester glucidique (5) selon le même auteur. Par contre, aucun de ces composés n'est caractérisé chez le caféier cultivé *C. canephora* K 76. Dans les travaux de RAKOTOMALALA (1992), les graines des populations de *C. canephora* étudiées ne comportent aucun dérivé hydroxycinnamique de type ester glucidique tandis que les graines de *C. kianjavatensis* laissent paraître des spots de ce type pour A 213 (3) et A 602 (2).

Les bandes au $R_f = 0,91$ sont communes à toutes les populations analysés, y compris les caféiers cultivés. Et, elles sont présentes autant chez les jeunes feuilles que chez les feuilles adultes. A ce stade de la recherche, ces composés ne sont donc pas encore considérés comme des esters glucidiques, car ils ne sont pas spécifiques aux caféiers spontanés.

Tableau 8 : Caractéristiques chromatographiques des extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles migrés avec le solvant BA

Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm															
		A 213 J		A 320 J		A 405 J		A 571 J		A 574 J		A 945 J		A 575		K 76	
0,91		SBR	BEG			SBR	BLA	SBR	BLA	SBR	BLA			SBR	BEG	SBR	BLA
0,89				NOI	VIO												
0,84												NOI	VIO				
0,79								INV	GRI								
0,72				INV	VIO					INV	BLU			INV	BLU		
0,65														SBR	BRU		
0,58				INV	VIO	INV	VIO			INV	VIO						
0,53										SBR	VIO			SBR	VIO		
0,49	Acide 4-méthoxy-cinnamique																
0,48	Acide <i>O</i> -coumarique																
0,47	Acide <i>p</i> -coumarique																
0,46				SBR	BRU												
0,45												INV	BLU	INV	BLU		
0,39	Acide 3,4,5-triméthoxy cinnamique												SBR	INV			
	SBR / VIO																
0,35						INV	VIO										
0,32				SBR	GRI								INV	VIO	INV	BLU	
				SBR	ROX											SBR	GRI
0,27				SBR	ROX									SBR	BRU	SBR	ROX
0,20	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU	SBR	BLU			SBR	BLU	BLU	BLU			SBR	BLU	SBR	BLU
0,18												INV	BLU				
0,05														SBR	OCR		
0,00		SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	OCR	SBR	ROX	SBR	ROU

BLU: Bleu
 JAU: Jaune
 SBR : Sombre
 BEG: Beige
 NOI: Noire
 VIO : Violet
 BRU: Brune
 OCR: Ocre
 GRI: Gris
 ROU: Rouge Vif
 INV: Invisible
 ROX: Roux

Acide 3,4,5-triméthoxycinnamique : SBR/VIO
 Acide 4-méthoxycinnamique : SBR/VIO Foncé
 Acide férulique : SBR/VIO
 Acide *O*-coumarique : SBR/JAU-BEG
 Acide *p*-coumarique : NOI/VIO Foncé
 Acide sinapique : SBR/BLU

3.1.3.2. Feuilles adultes

L'acide chlorogénique détecté dans les tissus foliaires des jeunes feuilles (Rf = 0,41 ; Cf. Tableau 7) de toutes les populations étudiées est aussi décelé chez les feuilles adultes (Rf=0,44 ; Cf. Tableau 9). Pour la population A 574 de *C. homollei*, elle est caractérisée par deux autres spots de fluorescence bleue. Ces composés sont très polaires et se situent juste au dessus de la ligne de dépôt des

Résultats et discussion

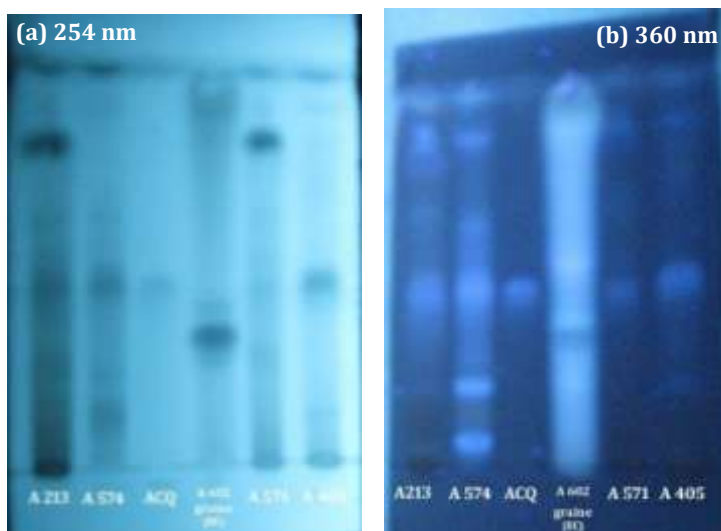
chromatogrammes (Figure 17). Ils sont aussi décelés indistinctement sur les jeunes feuilles ($R_f=0,04$ et $0,17$) et les feuilles adultes ($0,05$ et $0,19$).

Tableau 9 : Caractéristiques chromatographiques des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes séparés avec le solvant MFE

Bande n°	Rf	Standards	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm													
			A 213 A		A 602 A		A 405 A		A 571 A		A 574 A		A 945 A		A 602 Gr*	
1	0,97		NOI	BLU			NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU		
2	0,91												NOI	INV		
3	0,87		NOI	BLU			NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU				
4	0,80				NOI	BLU	NOI	BLU								
5	0,79		NOI	BRU					NOI	BRU						
6	0,69						NOI	BLU								
7	0,68		NOI	INV												
8	0,65		INV	BLU					INV	BLU						
9	0,61								NOI	INV	NOI	BLU				
10	0,59		NOI	BRU	NOI	BRU										
11	0,53												INV	BLU		
12	0,51				NOI	BRU										
13	0,49														INV	BLU
14	0,44	ac. caféyl-5 quinique	NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU	NOI	BLU		
15	0,39	Caféine													NOI	INV
16	0,32														NOI	INV
17	0,26								NOI	INV						
18	0,24		NOI	INV	NOI	INV										
19	0,23										NOI	INV				
20	0,19						INV	BLU			INV	BLU				
21	0,12						NOI	BRU					NOI	BRU		
22	0,05										INV	BLU	INV	BLU		

NOI: noire BLU: bleu fluorescent BRU: brune INV: invisible *extrait chloroformique

Les observations des chromatogrammes des extraits d'acétate d'éthyles migrés avec le solvant BA, révèlent quatre spots supposés comme étant des esters glucosidiques d'acide hydroxycinnamique (Tableau 10). Pour A 405 ($R_f = 0,58$) et A 574 ($0,72$), il s'agit des mêmes composés trouvés sur les jeunes feuilles (Cf. Tableau 8). Pour A 571, une différence de fluorescence (à 360 nm) est notée entre le spot ($R_f = 0,79$) sur le profil chromatographique des feuilles adultes et celui des jeunes feuilles, mais il pourrait s'agir du même composé. Par contre, pour les jeunes feuilles de A 602 aucun spot n'a été décelé dans la zone de migration spécifique aux esters glucidiques, mais les feuilles adultes présentent une bande ($R_f = 0,79$) de mêmes caractéristiques que celle trouvée sur les jeunes feuilles de A 571.



ACQ : acide caféyl-5 quinique A 602 graine (EC) : extrait chloroformique de graines de A 602

Figure 18 : Chromatogrammes des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes, migrés avec MFE révélés a) à 254 nm et b) à 360 nm

Tableau 10 : Caractéristiques chromatographiques des composés des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles adultes séparés par le solvant BA

Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm													
		A 213 A		A 602 A		A 405 A		A 571 A		A 574 A		A 945 A		K 76	
0,91		SBR	BEG	SBR	BEG	SBR	BLA	SBR	BEG	SBR	BLA	SBR	BEG	SBR	BLA
0,79				INV	GRI			INV	VIO						
0,72										INV	BLU				
0,58						INV	VIO								
0,48	Acide férulique														
0,39	Acide 3,4,5-triméthoxy cinnamique											SBR	INV		
	SBR / VIO														
0,32												INV	VIO		
														SBR	GRI
0,27														SBR	ROX
0,20	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU			SBR	BLU			SBR	BLU			SBR	BLU
0,18												INV	BLU		
0,00		SBR	ROU	SBR	ROU	SBR	ORA	SBR	ROU			SBR	OCR	SBR	ROU

BLU : Bleu BEG : Beige BLA : Blanc GRI : Gris INV : Invisible
 OCR : Ocre ROU : Rouge Vif ROX : Roux SBR : Sombre VIO : Violet

3.1.4. Compositions en diterpènes glucosidiques

Les diterpènes glucosidiques sont contenus essentiellement dans la phase aqueuse. En effet, ces composés sont peu solubles dans l'acétate d'éthyle et restent dans ces phases aqueuses lors de l'extraction des composés phénoliques (RAKOTOMALALA, 1992). Cependant, d'autres composés peuvent aussi se trouver dans cette phase.

3.1.4.1. Jeunes feuilles

Tableau 11 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des jeunes feuilles, séparés avec le solvant MFE

		A 213 J		A 602 J		A 320 J		A 405 J		A 574 J		A 945 J		K 76		A 575		
Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 250 nm / 360 nm																
0,93	Acide <i>p</i> -coumarique																	
0,89	Acide 3,4,5-triméthoxy-cinnamique	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV			SBR	INV	SBR	INV	
	SBR / VIO																	
0,80		SBR	INV															
0,66																	SBR	INV
0,59																	INV	BLU
0,51												INV	VIO					
0,49		INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU			INV	ROU			
0,42	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	INV	SBR	BLU			
	SBR / BLU																	
0,25										SBR	BLU-VIO							
0,17						SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU			SBR	BLU	SBR	BLU	
0,12												SBR	INV					
0,11				SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU					SBR	BLU	SBR	BLU	
0,08						SBR	INV			SBR	ROU-ORA			SBR	ROX	SBR	ROX	
0,07										SBR	BLU							
0,05	Trigonelline					SBR	BEG										SBR	BEG
	NOI / INV																	
0,04												INV	BLU					
0,03						SBR	BEG	SBR	BEG									
0,02																	SBR	BRU
0,00		SBR	OCR	SBR	OCR					SBR	BEG	SBR	BEG	SBR	OCR			
		SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	ROX			SBR	ROX			

BLU : Bleu BEG : Beige INV : Invisible JAU : Jaune OCR : Ocre
 ORA : Orangé ROU : Rouge ROX : Roux SBR : Sombre VIO : Violet

Les analyses chromatographiques faites sur les phases aqueuses des jeunes feuilles des *Verae* montrent encore la présence de l'acide caféyl-5 quinique (AC5Q) dans la quasi-totalité des extraits analysés. Sa présence dans les feuilles a été mise en évidence grâce à la similarité des caractéristiques

chromatographiques des spots avec celles du témoin commercial (AC5Q). Avec le solvant de migration MFE, l'AC5Q se situe à $R_f = 0,42$, le spot est d'une couleur sombre (254 nm) à bleue (360 nm) (Tableau 11) ; $R_f = 0,07$ et de couleur sombre (254 nm) à jaune ocre (360 nm) avec le solvant BA (Tableau 12). La présence de ce composé dans la phase aqueuse révèle que les extractions à l'acétate d'éthyle n'ont pas permis d'entraîner tous les dérivés phénoliques. Cependant, ces résultats confirment la présence effective de l'AC5Q dans les jeunes feuilles de toutes les populations de *Verae* étudiées.

L'observation des chromatogrammes révèle l'existence de substances non identifiées ($R_f = 0,89$; $0,49$; $0,17$ et $0,11$; Cf. Tableau 11) et ($R_f = 0,32$; $0,18$ et $0,14$; Cf. Tableau 12). Ces composés sont communs à la plupart des échantillons de jeunes feuilles analysés. Et, ils sont aussi observés chez le caféier cultivé *C. canephora* K 76 et l'espèce *C. richardii* A 575. Ces composés ne sont donc pas des diterpènes glycosidiques. Notons que les graines des caféiers cultivés ne renferment pas de composés présentant des caractéristiques chromatographiques et spectrales similaires à celles des diterpènes glycosidiques (RAKOTOMALALA, 1992). Par ailleurs, les hétérosides diterpéniques sont des composés chromophore absorbant dans l'UV à une longueur d'onde $\lambda_{max} = 280$ nm (DUCROUX et al., 1975 ; PREWO et al., 1990 ; BARRE et al., 1998). En générale, ils n'absorbent pas et restent invisible à 360 nm. De ce fait, les spots ayant des fluorescences bleu et violet sous UV à 360 nm ($R_f = 0,17$ et $0,11$; Tableau 11) et ($R_f = 0,18$ et $0,14$; Tableau 12) ne peuvent pas être des composés diterpéniques, mais ils pourraient s'agir des dérivés d'acides hydroxycinnamiques ou de flavonoïdes.

Le profil chromatographique de A 575, par contre, dispose des spots ($R_f = 0,66$; Cf. Tableau 11 et $R_f = 0,32$; Cf. Tableau 12) qui lui sont spécifiques. Ces composés ne présentent pas de fluorescence sous UV à 360 nm. D'après RAKOTOMALALA (1992), les graines de l'espèce *C. richardii* A 575 renferment du diterpène glycosidique de type cafamarine. Ces spots pourraient donc correspondre aux mêmes hétérosides diterpéniques.

Parmi les *Verae*, seules *C. homollei* semblent contenir des composés diterpéniques, mais à des faibles concentrations (RAKOTOMALALA, 1992). Dans nos résultats, *C. homollei* A 945 présentent deux spots ($R_f = 0,42$ et $0,12$; cf. Tableau 11 et Annexe 5) qui sont invisible sous UV à 360 nm. Ces deux composés ne coïncident à aucun des spots de A 575. Il ne pourrait donc pas s'agir des mêmes composés que ceux de *C. richardii*. Mais il y a de forte présomption pour que ce soit des diterpènes glycosidiques spécifiques de *C. homollei*.

Pour les échantillons des jeunes feuilles de *Verae*, en plus des deux spots cités ci-dessus, et à ce stade de la recherche, les spots à $R_f = 0,80$ de A 213 et $R_f = 0,08$ pour A 405 peuvent être aussi supposés comme étant des diterpènes glycosidiques de par ses caractéristiques de fluorescence. D'autres analyses permettront de le confirmer.

Tableau 12 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des jeunes feuilles, séparés avec le solvant BA

		A 213 J	A 602 J	A 320 J	A 405 J	A 571 J	A 574 J	A 945 J	A 575									
Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm																
0,38						INV	BLU-VIO	INV	BLU-VIO								INV	BLU-VIO
0,36	Acide sinapique																	
0,32		INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	VIO			
																	SBR	INV
0,23																	INV	BLU-VIO
0,21		INV	JAU	INV	JAU	INV	JAU	INV	JAU	INV	JAU							
0,18		INV	BLU	INV	VIO	INV	VIO	INV	VIO								INV	BLU-VIO
0,14		INV	BLU	INV	VIO	INV	VIO	INV	VIO			INV	BLU-FLU	INV	BLU-FLU	INV	VIO	
0,12										INV	OCR						INV	VIO
0,07	Acide caféyl-5 quinique	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	JAU-OCR
0,05		SBR	SBR															
0,00										SBR	JAU-BEG						SBR	JAU-BEG
		SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	SBR

BLU : Bleu BEG : Beige FLU : Fluorescent INV : Invisible JAU : Jaune OCR : Ocre
 ROU : Rouge ROX : Roux SBR : Sombre VIO : Violet

3.1.4.2. Feuilles adultes

Les chromatogrammes des extraits aqueux des échantillons de feuilles adultes ont révélé des groupes de spots dont la plupart sont commun aux populations analysées. Ces groupes de spots ont été trouvés autant dans les jeunes feuilles que dans les feuilles adultes. Il s’agit des spots au Rf = 0,83 ; 0,44 ; 0,15 (Tableau 13) et Rf = 0,38 ; 0,32 ; 0,21 ; 0,18 ; 0,14 (Tableau 14). Ils ne correspondaient à aucun des standards commerciaux utilisés comme témoins. Leurs natures restent indéterminées.

Comme pour les jeunes feuilles, les phases aqueuses issues des feuilles adultes contiennent aussi de l’AC5Q. Ce composé à Rf = 0,40 (Tableau 13) et 0,07 (Tableau 14) est commun à tous les échantillons analysés.

Tableau 13 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des feuilles adultes migrés avec le solvant MFE

		A 213 A		A 602 A		A 405 A		A 571 A		A 574 A		A 945 A		A 575	
Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm													
0,91	Acide O-coumarique														
0,87	Acide férulique														
0,83		SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV								
0,81	Acide sinapique														
0,57														INV	BLU-Clair
0,44		INV	ROU*					INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU*		
0,40	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU			SBR	BLU	SBR	BLU	SBR	BLU			SBR	BLU
0,37										INV	VIO				
0,33	Caféine														
0,15						INV	BLU			INV	BLU	INV	BLU	INV	BLU
0,10						SBR	INV					SBR	INV		
0,07										INV	BLU-Clair				
														SBR	INV
0,03												INV	BLU		
												SBR	MAR		
0,00		SBR	OCR-ORA			SBR	OCR	SBR	OCR	SBR	OCR	SBR	BEG	SBR	OCR
		SBR	BRU	SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	ROX	SBR	ROX				

BLU : Bleu BEG : Beige FLU : Fluorescent INV : Invisible MAR : Marron OCR : Ocre
 ORA : Orange ROU : Rouge ROX : Roux SBR : Sombre VIO : Violet

Par rapport aux spots spécifiques de l'échantillon *C. richardii*, les échantillons de feuilles adultes des *Verae* ne présentent aucune bande possédant les mêmes caractéristiques que celles trouvés sur A 575. Toutefois, deux spots (Rf = 0,10) montrent des caractéristiques de fluorescence analogues aux hétérosides diterpéniques (Tableau 13 et Annexe 5). Ces deux spots (A 405 et A 945) ne coïncident à aucune des bandes chromatographiques du caféier cultivé K 76. Pour *C. homollei* A 945, ce composé est observé à la fois sur les deux catégories d'âges des feuilles.

Tableau 14 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des feuilles adultes migrés avec le solvant BA

Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm													
		A 213 A	A 602 A	A 405 A	A 571 A	A 574 A	A 945 A	A 575							
0,38					INV	BLU-VIO								INV	BLU-VIO
0,36	Acide sinapique														
0,32		INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU	INV	ROU				
														SBR	INV
0,23														INV	BLU-VIO
0,21		INV	JAU			INV	JAU	INV	JAU			INV	JAU-VER		
0,18		INV	VIO			INV	VIO	INV	VIO	INV	VIO			INV	BLU-VIO
0,15				SBR	OCR										
0,14		INV	VIO			INV	VIO	INV	VIO	INV	BLU-VIO	INV	BLU-FLU	INV	VIO
0,12														INV	VIO
0,10				SBR	BLU-FLU										
0,07	Acide caféyl-5 quinique	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR
0,05															
0,00						SBR	BEG	SBR	BEG					SBR	JAU-BEG
		SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	SBR	ROX	SBR	OCR	SBR	SBR

BLU : Bleu BEG : Beige FLU : Fluorescent INV : Invisible JAU : Jaune OCR : Ocre
 ROU : Rouge ROX : Roux SBR : Sombre VER : Vert VIO : Violet

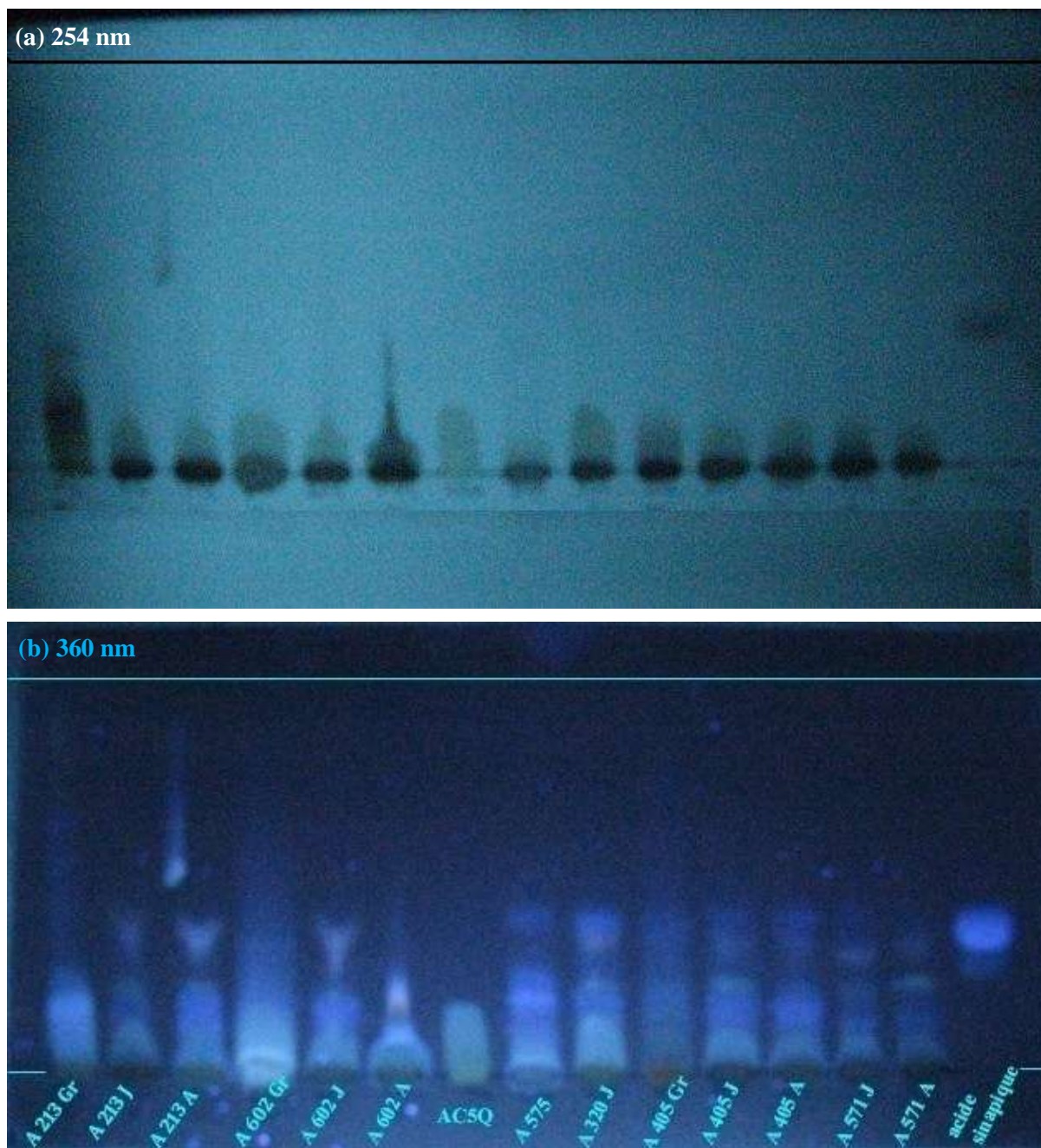


Figure 19 : Chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles et des graines, migrés avec BA
a) observé à 254 nm b) à 360 nm

3.1.5. Composition chimique des graines des caféiers *Verae*

3.1.5.1. Méthylxanthines

Le chromatogramme des extraits chloroformiques des graines des 3 espèces de la série *Verae* (Figure 20), révélé sous UV à 254 nm, montre des profils chromatographiques similaires pour les deux populations A 213 et A 602 de *C. kianjavatensis*. Les deux échantillons présentent chacun trois bandes majeures. Les premières taches ($R_f = 0,42$), présentant les mêmes caractéristiques que le composé témoin (Tableau 15), correspondent à la caféine. Les troisièmes bandes ($R_f = 0,27$) sont identifiées comme étant la théobromine. Les taches situées en $R_f = 0,34$ possèdent une coloration plus intense et une dimension plus importante par rapport aux deux autres composés précédents. RAKOTOMALALA (1992), en plus de ces deux bases puriques qui sont les mieux représentées dans les graines de la population A 602 [théobromine (0,36% MS) et caféine (0,43% MS)], a noté la présence de la théacrine sous une forte teneur (1,46% MS). Cette substance présente un temps de rétention intermédiaire ($TR=16,83$ min) à la CLHP, entre celui de la théobromine (9,37 min) et celui de la caféine (28,70 min) (RAKOTONDRAVAO, 2001). Les deuxièmes bandes du chromatogramme pourraient donc être de la théacrine. Néanmoins, l'absence de composé témoin et d'analyse spectrale sur spectrophotométrie UV ne permettent pas une identification exacte de cette substance. De plus, la théacrine selon encore l'auteur, différencie les deux populations de *C. kianjavatensis*. En effet, dans ses travaux, ce composé n'était pas décelé dans les graines de A 213. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer cette différence. Cette différence de résultat pourrait être due à une faible présence de ce composé dans les échantillons de A 213 de l'auteur, ce qui l'aurait rendu inaperçu avec sa méthode d'analyse. L'autre hypothèse suppose que la théacrine a été synthétisée juste après la récolte des graines par des organismes endophytiques ou exophytiques. En effet, des champignons tapissant sur l'exocarpe des fruits de A 602 sont souvent observés au moment de la préparation des échantillons (RAKOTOMALALA, communication personnelle).

L'échantillon de *C. lancifolia* (A 405) présente quatre bandes majeures (Tableau 15 et Figure 20). La bande ($R_f = 0,44$) se trouvant sur la même ligne que le témoin est identifiée comme étant la caféine. La bande à $R_f = 0,27$ correspond à la théobromine. La nature exacte des deux autres bandes reste non déterminée. Cependant, le spot à $R_f = 0,39$ possède les mêmes caractéristiques de fluorescence que les méthylxanthines (tache noire à 254 nm et invisible à 360 nm). Il pourrait appartenir à cette famille de composés. Par contre, l'autre composé ($R_f = 0,36$) a une fluorescence très marquée de couleur bleu ciel à 360 nm. Ce type de fluorescence est caractéristique des dérivés d'acides hydroxycinnamiques (COLONNA, 1978).

Le profil chromatographique de *C. homollei* A 945 montre huit (8) bandes de couleur noire sous UV à la longueur d'onde 254 nm (R_f entre 0,21 à 0,86 ; Tableau 15). Ces bandes ne correspondent à aucun des témoins utilisés. Elles ne sont donc pas apparentées à ces méthylxanthines, d'autant plus que

Résultats et discussion

C. homollei diffère des autres taxa de la série *Verae* par l'absence dans ses graines des bases puriques (RAKOTOMALALA, 1992). Et, même si les données de ANTHONY et al. (1993) mentionnent une présence sous forme de trace (0,06% MS) de la caféine dans les graines de *C. homollei*, avec cette concentration, cette base purique ne devrait pas être aussi visible que les autres spots sur ces chromatogrammes. Observés sous UV à 360 nm, ces spots ont une fluorescence bleue claire ou jaune. Ces composés pourraient donc être des dérivés phénoliques qui ont pu être entraînés par l'extraction au chloroforme. En effet, des spots similaires sont observés dans les extraits d'acétate d'éthyle des jeunes feuilles (Tableau 7) et des feuilles adultes (Tableau 9) de *C. homollei* A 574 et A 945 pour les bandes à Rf = 0,10 ; 0,56 et 0,86 des graines de A 945. Des résidus de ce premier composé sont même décelés dans les extraits aqueux finaux des jeunes feuilles (Tableau 11) et des feuilles adultes (Tableau 13) de A 945. Il pourrait s'agir respectivement des mêmes composés, ce qui confirme que ce sont des métabolites appartenant à la famille des acides hydroxycinnamiques. Les identités précises de ces bandes ne peuvent néanmoins encore être définies à ce stade de la recherche.

Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des graines de *Verae*, migrés avec le solvant MFE

Tache (n°)	Rf	Composé	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm							
			A 602	A 213	A 405	A 945				
1	0,86						SBR	BLU	SBR	BLU
2	0,73								SBR	ROX
3	0,70						SBR	ROX		
4	0,62								SBR	ROX
5	0,56								SBR	BLU
6	0,44	Théophylline								
7	0,42	Caféine	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV		
8	0,39						SBR	INV		
9	0,37								SBR	BLU
10	0,36						SBR	BLU		
11	0,33		SBR	INV	SBR	INV				
12	0,31								SBR	BLU
13	0,29						SBR	JAU		
14	0,27	Théobromine	SBR	INV	SBR	INV	SBR	INV		
15	0,27								SBR	BLU
16	0,24						SBR	JAU		
17	0,21								SBR	JAU
18	0,10								INV	BLU

SBR : Sombre¹⁷ BLU : bleu claire fluorescent JAU : jaune ROX : roux INV : invisible

¹⁷ Sombre ou Noire

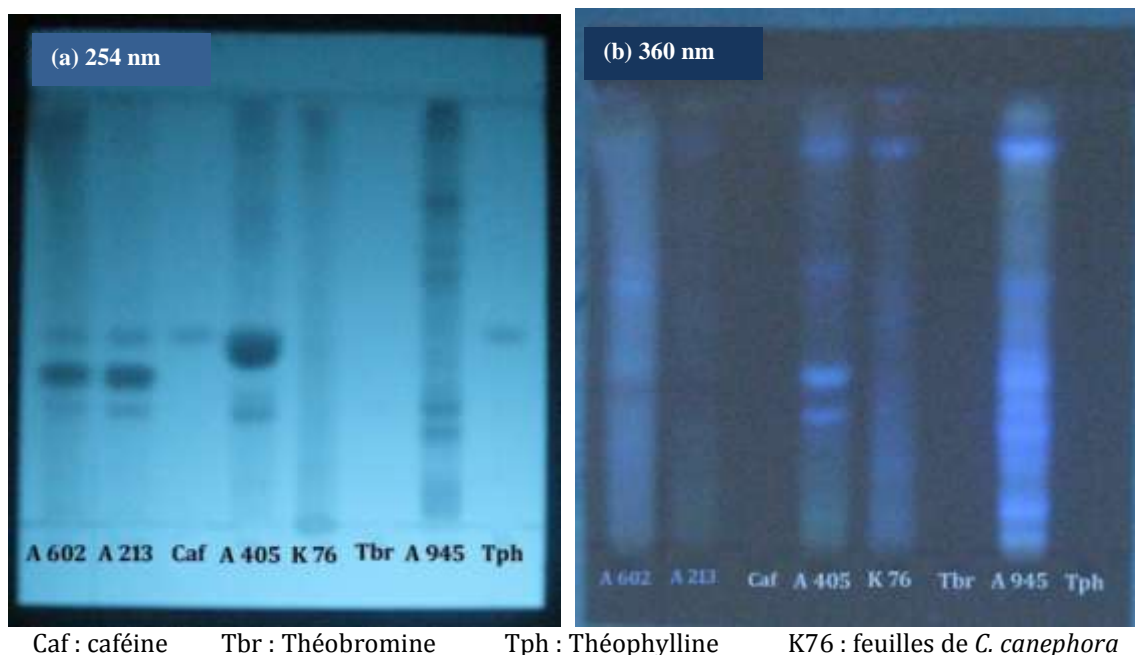


Figure 20 : Chromatogrammes des extraits chloroformiques des graines de *Vrae*, révélés à a) 254 nm et b) 360 nm (solvant de migration : MFE)

Tableau 16 : Caractéristiques chromatographiques des extraits chloroformiques des graines, migrés avec le solvant BA

Tache (n°)	Rf	Composé	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm							
			A 213		A 602		A 405		A 945	
1	0,88		SBR	JAU	SBR	JAU	SBR	JAU	SBR	JAU
2	0,80				SBR	BLA				
3	0,72						SBR	INV		
4	0,65		INV	BLU						
5	0,58						SBR	BLU-TUR	SBR	BLU
6	0,56	Théophylline								
7	0,50						SBR	INV		
8	0,45		SBR	VIO						
9	0,43	Caféine			SBR	INV	SBR	INV		
10	0,41		SBR	BLU-CIEL			SBR	VIO		
11	0,37	Théobromine	NOI	INV	NOI	INV	NOI	BLU-CIEL		
12	0,32		NOI	BLU-CIEL						
13	0,31				SBR	JAU	SBR	INV		
14	0,18								SBR	INV
15	0,13						SBR	JAU	SBR	JAU-VER
16	0,06		SBR	JAU-OCR			SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR

BLA : Blanc BLU : bleu claire fluorescent JAU : jaune INV : invisible NOI : Noire
 SBR : Sombre TUR : Turquoise VER : Vert

3.1.5.2. Diterpènes glucosidiques

Les profils chromatographiques des graines des populations de caféiers *Verae* ne présentent aucun spot ayant des caractéristiques de fluorescence semblables à celles que devraient avoir les diterpènes glycosidiques (Visible à 254 nm et invisible à 360 nm). Seule l'espèce *C. kianjavatensis* A 213 possède une bande qui a ces caractéristiques de fluorescences (Rf = 0,26 ; Tableau 17 et Rf=0,29 ; Tableau 18). Cependant, selon RAKOTOMALALA (1992), parmi les caféiers *Verae*, c'est seulement chez les espèces *C. homollei* (A 574, A 743 et SZ 108) que les diterpènes glycosidiques ont été détectés. Les teneurs relatives extrêmement très faibles avancées par l'auteur laisse envisager que ces composés, mêmes s'ils sont présentent dans les échantillons, passeraient inaperçus sur nos chromatogrammes. Le spot observé sur le profil chromatographique de A 213 pourrait être un composé appartenant à la famille des méthylxanthines.

Tableau 17 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des graines (Solvant de migration MFE)

Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm							
		A 213 Gr	A 602 Gr	A 405 Gr	A 945 Gr				
0,99		INV	ROU						
0,95		SBR	JAU						
0,93	Acide <i>p</i> -coumarique								
0,89	Acide 3,4,5-triméthoxy-cinnamique	SBR	BLU-VIO*						
0,85						INV	BLU		
0,79		SBR	BLU-VIO						
0,70		SBR	BLU-VIO						
0,23									
0,41	Acide caféyl-5 quinique	SBR	BLU-VIO	SBR	BLU	SBR	BLU		
0,34		SBR	BLU-VIO						
0,26		SBR	INV						
0,23		SBR	BLU					SBR	VIO
0,16						INV	BLU		
0,05	Trigonelline	SBR	INV						
0,03						SBR	OCR		
0,01		INV	JAU						
0,00						SBR	OCR	SBR	JAU-OCR
				SBR	ROX	SBR	ROX		

BLU : Bleu BEG : Beige INV : Invisible JAU : Jaune OCR : Ocre ROU : Rouge
 SBR : Sombre VIO : Violet

Tableau 18 : Caractéristiques chromatographiques des extraits aqueux des graines (Solvant de migration BA)

Rf	Standard	Caractéristiques de fluorescence sous UV à 254 nm / 360 nm							
		A 213 Gr	A 602 Gr	A 405 Gr	A 945 Gr				
0,88		INV	JAU-OCR						
0,62		INV	BLU-VIO						
0,52		INV	JAU-OCR						
0,38									
0,36	Acide sinapique								
0,32				INV	VIO	INV	ROX		
0,29		SBR	INV						
0,23		SBR	JAU						
0,21						INV	BLU		
0,17		SBR	BLU	INV	VIO				
0,14						SBR	JAU-OCR		
0,11								SBR	VIO
0,07	Acide caféyl-5 quinique	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR	SBR	JAU-OCR
0,05				SBR	JAU				
								INV	JAU
0,00		SBR	OCR	SBR	BEG	SBR	SBR	SBR	JAU-OCR

BLU : Bleu BEG : Beige INV : Invisible JAU : Jaune OCR : Ocre ROX : Rouge
 SBR : Sombre VIO : Violet

Néanmoins, d'autres composés ont été décelés dans les extraits aqueux des graines des caféiers analysés. Les analyse chromatographiques avec le solvant BA ont permis de mettre en évidence la présence de l'AC5Q (Rf=0,07) dans tous les extraits aqueux des graines analysés (Tableau 18 et Figure 19). Ce résultat a été confirmé pour A 213, A 602 et A 405 par l'analyse avec le solvant MFE. Mais pour A 945, le spot correspondant est difficilement perceptible sur le chromatogramme.

Les graines de A 213 présentent un spot (Rf = 0,89) qui a les mêmes caractéristiques chromatographiques que le composé de référence : l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique (Tache sombre à 254 nm et bleue violet à 360 nm ; Tableau 17). Chez les *Verae* seule l'espèce *C. homollei* (A 574) a été présentée par RAKOTOMALALA (1992) comme ayant dans ses graines ce composé. Cependant, des récentes études (JAISWAL et al., 2010 et KUHNERT et al., 2010) sur les acides chlorogéniques des graines des caféiers cultivés (*C. canephora* var. *robusta*) ont révélé la présence des dérivés de l'acide triméthoxycinnamique et de nombreux autres composés mineurs¹⁸, jusque là considérés comme spécifiques aux caféiers spontanés (RAKOTOMALALA, 1992). Ces découvertes démontrent la

¹⁸ Dont 15 composés dérivés de l'acide sinapique et de l'acide triméthoxycinnamylquinique qui ont été pour la première fois mis en évidence dans les caféiers *C. canephora robusta*

possibilité de l'existence de ces composés, auparavant insoupçonnés, dans les autres espèces de caféiers. Il est ainsi probable que les graines de A 213 contiennent des dérivés de l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique. La vérification de la nature de ce composé mérite encore d'être entreprise, d'autant plus que son Rf est très voisin de celui de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique. Ces deux composés possèdent les mêmes caractéristiques de fluorescence.

La population A 213, renferme aussi de la trigonelline (Rf = 0,05).

3.2. Discussions

3.2.1. Discussion sur les résultats et les hypothèses

3.2.1.1. H1: *Les composés chimiques du métabolisme secondaire des feuilles des caféiers de la série Verae se distribuent qualitativement et quantitativement de manière différente selon les espèces et selon les populations*

3.2.1.1.1. Méthylxanthines

La théobromine est la seule méthylxanthine clairement identifiée sur les chromatogrammes des extraits chloroformiques des feuilles analysées. Par rapport à ce composé, les accessions des caféiers dites « à caféine » comme A 320, A 405 et A 571 de *C. lancifolia*, se différencient des accessions de *C. homollei*, classé comme sans caféine. La population A 574 de cette espèce, par contre, présente d'autres composés majeurs encore non identifiés, mais de nature similaire aux bases puriques. Ces composés ne sont pas, par ailleurs, trouvés sur la population A 945 de cette même espèce.

RAKOTOMALALA (1992), en travaillant principalement sur les graines, a observé que *C. homollei* se distinguent des autres espèces de la série *Verae* par l'absence des bases puriques. Cependant, les feuilles sont considérés comme le lieu de synthèse des bases puriques (ASHIHARA *et al.*, 1996). Et, la littérature a déjà fait mention des cas d'accumulation de métabolites intermédiaires de la voie de biosynthèses des méthylxanthines pour les espèces à faibles concentration en caféine (NAGAI *et al.*, 2008). L'existence de ces composés intermédiaires de la voie de biosynthèses des méthylxanthines ou des produits de dégradations de ces mêmes composés, est donc fort probable dans les tissus foliaires de A 574, pour expliquer la présence de ces bandes absorbant à la longueur d'onde de 254 nm sous UV de *C. homollei* A 574.

Par ailleurs, comme la théobromine est le précurseur directe de la caféine (ASHIHARA *et al.*, 2008), le fait de ne pas trouver ce composé dans les feuilles est donc concevable pour *C. homollei*. La voie de biosynthèse des bases puriques aux niveaux des feuilles pour cette espèce pourrait s'arrêter bien avant la synthèse de ce métabolite.

Pour les échantillons de *C. kianjavatensis*, aucun spot majeur n'a été révélé sur les chromatogrammes.

Une variabilité entre les espèces est ainsi constatée par rapport à l'absence ou la présence de la théobromine. Au niveau infraspécifique, cette variabilité de la composition en méthylxanthines est constatée pour l'espèce *C. homollei*.

3.2.1.1.2. Dérivés hydroxycinnamiques

L'AC5Q est le composé identifié largement répartis dans tous les échantillons de feuilles des caféiers sauvages étudiés. Aucune distinction ne peut être ainsi faite entre les espèces de la série *Verae* et leurs populations respectives avec ce composé. Cependant, *C. homollei* est caractérisé par des teneurs en acides monocaféylquiniques des graines quatre à cinq fois plus faibles (0,69% à 0,85% MS) que les *Verae* à caféine (RAKOTOMALALA, 1992).

D'un autre côté, le profil chromatographique de la population A 574 de *C. homollei* se distingue des autres populations par une forte présence de deux composés très polaires, de type hydroxycinnamique.

Pour les composés présumés être des esters glucosidiques, les différentes populations présentent des spots aux caractéristiques et aux nombres variables.

3.2.1.1.3. Diterpènes glucosidique

Parmi les sept populations étudiées, trois populations seulement présentent des spots ayant les caractéristiques des hétérosides diterpéniques. La population *C. homollei* A 945 montre deux spots présumés comme étant des diterpènes glucosidiques et un seul pour *C. kianjavatensis* A 213 et *C. lancifolia* A 405. Une disparité de répartition de ces composés est ainsi constatée entre les populations.

Tableau 19 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires selon les espèces et les populations

		<i>C. lancifolia</i>			<i>C. kianjavatensis</i>		<i>C. homollei</i>	
		A 320	A 405	A 571	A 213	A 602	A 574	A 945
Méthylxanthines	Théobromine	+	+	+	-	-	-	-
	Rf = 0,76 / 0,71 / 0,67 / 0,60 / 0,54 / 0,45	-	-	-	-	-	+	-
Acide hydroxycinnamiques	AC5Q	+	+	+	+	+	+	+
	Rf = 0,20	-	-	-	-	-	+	-
	Rf = 0,05	-	-	-	-	-	+	-
Diterpènes glucosidiques	Rf = 0,80	-	-	-	+	-	-	-
	Rf = 0,42	-	-	-	-	-	-	+
	Rf = 0,12	-	-	-	-	-	-	+
	Rf = 0,10	-	+	-	-	-	-	-

Rf avec le solvant MFE

(+) : Présence

(-) : Non détecté

L'hypothèse 1 est vérifiée, *les composés chimiques du métabolisme secondaire des feuilles des caféiers de la série Verae se distribuent de manière différente selon les espèces et selon les populations*. Les différences qualitatives sont perceptibles par rapport aux méthylxanthines, mais pour l'AC5Q la différence ne serait palpable que par des études quantitatives.

3.2.1.2. H2 : *La composition en méthylxanthines et en dérivés hydroxycinnamiques des feuilles de caféiers spontanés varient avec leurs âges physiologiques.*

3.2.1.2.1. Méthylxanthines

La seule base purique formellement identifiées dans les feuilles des caféiers étudiés étant la théobromine. Il distingue les deux catégories d'âge délimitées dans la présente étude. Ce composé est aisément décelé dans les jeunes feuilles des populations de *C. lancifolia*. Ces derniers sont classés comme étant des caféiers à caféine (RAKOTOMALALA et al, 1993b). Par contre, dans les extraits chloroformiques des feuilles adultes, cette base purique n'est pas détectée. Une évolution similaire de la teneur en théobromine et de la caféine des feuilles de *C. arabica* a aussi été observée par ASHIHARA et al., (1996). Les concentrations de ces deux éléments diminuaient ostensiblement des jeunes feuilles aux vieilles feuilles, en passant par les feuilles matures. Les taux de réduction sont environ 60% et de 95% pour ces deux composés entre ces trois catégories d'âges. Une telle diminution pourrait expliquer l'absence de la caféine et de la théobromine sur les chromatogrammes des feuilles adultes. De plus, les *C. lancifolia* sont déjà connus par leur faible teneur en caféine. Par ailleurs, cette absence dans les feuilles âgées de la théobromine peut aussi découler de sa position dans la voie de biosynthèse des méthylxanthines, notamment dans la synthèse de la caféine. Elle est le précurseur direct dans la formation de la caféine. La biosynthèse des bases puriques, dont la caféine, se déroule dans les feuilles très jeunes (ZHENG et ASHIHARA, 2004), ce qui explique la présence de la théobromine dans les jeunes feuilles. Cette activité disparaît à la fin du développement des feuilles (FUJIMORI et ASHIHARA, 1994), mais la conversion de la théobromine et de la caféine continue dans les feuilles adultes (ASHIHARA, 2006), ce qui entraîne la diminution de leur concentration. L'absence de la caféine ou sa faible concentration dans les feuilles adultes pourrait résulter ainsi de plusieurs phénomènes: son transport des feuilles où elles sont synthétisées vers les graines où elles seront stockées (HAMIDI et WANNER, 1964); sa conversion, dans les feuilles, en acides méthyluriques (PETERMANN et BAUMANN, 1983); et sa dégradation rapide (ASHIHARA et CROZIER, 1999b); ou l'association de ces phénomènes.

Pour *C. homollei* A 574, les spots présumés comme étant des méthylxanthines se trouvent indifféremment sur les deux classes d'âges de feuilles.

La composition en méthylxanthines des feuilles des caféiers spontanés varie donc en fonction de leurs âges physiologiques, à l'exception de *C. homollei* A 574.

3.2.1.2.2. Dérivés des acides hydroxycinnamiques

Par rapport à l'acide chlorogénique, il n'y a pas de différence constatée pour la composition en cette substance entre les jeunes feuilles et les feuilles adultes, et ce, du point de vue qualitative. L'AC5Q est décelée dans tous les échantillons. De même, pour les deux autres composés majeurs de *C. homollei* A 574, l'âge des feuilles n'influe pas sur leurs présences.

Et, même si l'acide chlorogénique est indifféremment présent selon l'âge physiologiques des feuilles, sa concentration dans les jeunes feuilles est plus important par rapport à celle des feuilles adultes, jusqu'à un rapport de 1/10 d'après MONDOLOT (2006). A part, l'AC5Q les jeunes feuilles sont aussi caractérisées par une forte présence d'acides dicaféylquiniques (AdiCQ), avec une concentration presque équivalente à celle de l'acide chlorogénique (MONDOLOT, 2006).

Les jeunes feuilles sont, ainsi, présentés comme l'organe dans lequel s'accumule une forte concentration d'acides chlorogéniques. Au fur et à mesure de la maturation des feuilles la teneur en AC5Q diminue, mais devient le principal dérivé hydroxycinnamique présent dans les feuilles adultes, jusqu'à un rapport de 90% par rapport au acides chlorogéniques totaux (MONDOLOT, 2006). Ce composé, un des précurseur de la lignine, est transporté des jeunes feuilles vers les feuilles adultes. De ce fait, non seulement la concentration des acides chlorogéniques varie suivant le stade de développement des feuilles, mais aussi, leur nature et leur localisation (MONDOLOT, 2006).

Par ailleurs, la répartition des composés détectés et supposés être des esters glucidiques d'acides hydroxycinnamiques diffère, par leur nombre, entre les jeunes feuilles et les feuilles adultes. Cette différence dépend de l'espèce. Ainsi, les jeunes feuilles de *C. homollei* A 574 renferment plus de ces composés présumés que les feuilles adultes. Les populations de *C. lancifolia* A 405 et A 571, ne présentent aucune variation. Mais, dans son ensemble, les jeunes feuilles présentent plus d'esters glucidiques présumés que les feuilles adultes.

3.2.1.2.3. Diterpènes glucosidiques

Parmi les quatre spots, présumés étant des diterpènes glucosidiques, des jeunes feuilles, deux seulement sont retrouvés chez les échantillons des feuilles adultes. C'est le cas du composé de A 945, à référence frontale proche de 0,12 ; et le spot à $R_f = 0,10$ pour A 405. Les spots à $R_f = 0,80$ pour *C. kianjavatensis* et $R_f = 0,42$ pour *C. homollei* des feuilles adultes ne sont pas observés dans les extraits aqueux des feuilles adultes. Par rapport à ces composés, une variabilité de la composition chimique existe entre les deux catégories d'âges physiologiques de feuilles.

Tableau 20 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires en fonction de l'âge physiologique des feuilles

Espèce	Population	Composés / Spots	Jeunes Feuilles	Feuilles Adultes
<i>C. lancifolia</i>	A 405	Théobromine	+	-
		AC5Q	+	+
		Rf = 0,10	+	+
	A 571	Théobromine	+	-
		AC5Q	+	+
<i>C. kianjavatensis</i>	A 213	AC5Q	+	+
		Rf = 0,80	+	-
<i>C. homollei</i>	A 574	Rf = 0,76 / 0,71 / 0,67 / 0,60 / 0,54 / 0,45	+	+
		AC5Q	+	+
		Rf = 0,20	+	+
		Rf = 0,05	+	+
	A 945	AC5Q	+	+
		Rf = 0,42	+	-
		Rf = 0,12	+	+

Rf avec le solvant MFE

(+) : Présence

(-) : Non détecté

L'hypothèse 2 est en partie acceptée : la composition en méthylxanthines, en esters glucidiques d'acide hydroxycinnamiques et en diterpènes glucidiques des feuilles varie suivant leur âge physiologique. Par contre les analyses n'ont pas pu démontrer une évolution nette des acides hydroxycinnamiques en fonction de l'âge. D'après la littérature la concentration et la nature des isomères d'acides hydroxycinnamiques évoluent avec l'âge des organes. Néanmoins, cette thèse devrait être confirmée pour le cas des feuilles des *Verae*.

3.2.1.3. H3 : Les constituants chimiques sont qualitativement et quantitativement différents entre les graines et les feuilles.

3.2.1.3.1. Méthylxanthines

Pour *C. kianjavatensis* les analyses des graines ont montré la présence de trois composés nettement visible : la caféine, la théobromine et un composé assimilé à la théacrine. Par contre, les profils chromatographiques des jeunes feuilles et des feuilles adultes n'ont pas montrés de spots bien distincts et visibles pour ces trois substances. Une différence est ainsi notée entre la composition en méthylxanthines des graines et celle des feuilles pour les populations de *C. kianjavatensis*.

En ce qui concerne *C. lancifolia*, l'analyse des feuilles (jeunes) n'a montré que la présence de la théobromine. Pourtant, l'extrait chloroformique des graines de *C. lancifolia* A 405 contient, en plus de la théobromine, de la caféine. Cette observation confirme le rôle d'organe de synthèse des méthylxanthines des tissus foliaires des caféiers, et le rôle d'organe de stockage des graines. Ce processus biologique est surtout vrai pour la biosynthèse de la caféine, pour les caféiers « à caféine » comme *C. lancifolia*. En effet, d'après HAMIDI et WANNER (1964), la caféine est synthétisée en faibles quantités dans les feuilles puis transportée vers les fruits et les graines où elle s'accumule rapidement en fin de maturation. La différence par la présence (dans les graines) et l'absence (feuilles) de la caféine est ainsi expliquée par les rôles respectifs des deux organes.

Par ailleurs, SILVAROLLA et al. (2004), ont observé que les feuilles de caféiers *C. arabica* ne renferment que de très faible quantité de caféine (non précisée), alors que leurs graines contiennent en moyenne $0,76 \text{ mg.g}^{-1}$ (0,076% MS) pour le caféier *C. arabica* AC¹⁹ et 12 mg.g^{-1} (1,2% MS) pour le cultivar commercial de *C. arabica* Mundo Novo (MN). Pour CHARRIER (1978), les feuilles adultes de *C. arabica* contiennent en moyenne 0,59 % MS de caféine et 0,71 % MS pour *C. canephora*, alors que leurs graines renferment respectivement 1 à 1,3 % MS et 2 à 2,5 % MS de caféine en moyenne. Et, cet auteur, n'a pas décelé de la caféine dans les feuilles adultes de *Mascarocoffea* (dont *C. kianjavatensis* et *C. lancifolia*). Ces faits démontrent que les teneurs en caféine des feuilles sont nettement inférieures à celles des graines. En raison d'une faible activité de biosynthèse de la caféine et d'une faible accumulation de ce composé dans les feuilles des *Mascarocoffea*, celui-ci pourrait passer inaperçu pour les caféiers sauvages « à caféine », comme *C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*. Ce qui pourrait aussi expliquer sa non détection dans les feuilles des *Mascarocoffea* dans les travaux de COLONNA (1978). Toutefois, ces faits coïncident avec nos observations. La caféine est absente dans les feuilles des caféiers *Verae*.

Une distinction très nette des spots sur les profils chromatographiques des graines, par rapport à ceux des feuilles, démontre que les composés identifiés (caféine et théobromine) contenus dans les graines sont d'une concentration supérieure à celle des feuilles. Les graines renferment, ainsi, plus de bases puriques que les feuilles en termes de concentration. Néanmoins, des mesures de la concentration de chaque composé identifié devraient être menées pour conforter ces observations.

La composition chimique en méthylxanthines des graines diffère donc de celle des feuilles.

¹⁹ Génotype éthiopienne de *C. arabica*, naturellement presque sans caféine et baptisée Alcides Carvalho (AC)

3.2.1.3.2. Dérivés des acides hydroxycinnamiques

La comparaison des profils chromatographiques des graines avec ceux des feuilles a montré la large répartition de l'acide caféyl-5 quinique (AC5Q) dans les tissus des deux organes analysés. Tous les échantillons étudiés contiennent ce métabolite. Ce résultat est en accord avec les observations de COLONNA (1978). Mais, à part l'AC5Q, la plupart des spots révélés à partir des extraits aqueux des graines ne coïncide à aucun des spots trouvés sur les chromatogrammes des extraits aqueux et des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles. La répartition des dérivés d'acides hydroxycinnamiques diffère entre ces deux organes.

Tableau 21 : Récapitulation de la variation des métabolites secondaires selon les organes

Espèces	Populations	Composés	Graines	Feuilles
<i>C. kianjavatensis</i>	A 213	Caféine	+	-
		Théacrine	+	-
		Théobromine	+	-
		AC5Q	+	+
	A 602	Caféine	+	-
		Théacrine	+	-
		Théobromine	+	-
		AC5Q	+	+
<i>C lancifolia</i>	A 405	Caféine	+	-
		Théobromine	+	+
		AC5Q	+	+

(+) : Présence

(-) : Non détecté

En somme, l'hypothèse 3 est confirmée. *La distribution des composés chimiques dans les organes des caféiers se fait de manière différente.* Les graines renferment, du point de vue nature et concentration, plus de bases puriques que les feuilles. Et, en dehors de l'AC5Q, une diversité des constituants chimiques est constatée entre les deux organes.

3.2.2. Limites méthodologiques

3.2.2.1. Méthode analytique

Par rapport aux contenus des graines, les concentrations de certaines composées restent significativement très faibles dans les feuilles. Cette situation rend difficile leurs détections et des problèmes quant à leur identification avec la méthode de chromatographie sur couche mince. Ainsi, afin d'éviter les erreurs d'appréciation dues aux illusions d'optique, seuls les composés les plus importants et les spots les plus visibles ont été considérés dans les observations. Par conséquent, certains composés présents à de faible concentration dans les feuilles pourraient passer inaperçus.

L'identification de certaines acides méthyluriques, notamment la théacrine, et la détection des autres méthylxanthines comme 7-méthylxanthine étaient aussi limitées par l'absence de produits témoins.

L'absence des réactifs de révélation limite, aussi, l'identification des spots révélés sur les chromatogrammes, notamment les dérivés phénoliques. En effet, les composés phénoliques en général peuvent être révélés par le réactif au chlorure ferrique ; celui de Bénédict éteint la fluorescence des substances possédant un groupement ortho-dihydroxyphénolique libre ; le réactif de Neu rend très fluorescent, sous lumière UV à 366 nm, les coumarines et leur dérivés, les flavonols et les dérivés caféiques ; le réactif de Swain modifie les couleurs des spots, une modification des couleurs qui sont caractéristiques de chaque acide phénolique (RAKOTOMALALA, 1992).

La grande majorité des composés présumés comme étant des dérivés d'acides hydroxycinnamiques n'ont pas pu être identifiés, faute de temps. Pour identifier ces substances, les recours aux différentes techniques d'hydrolyse (acide, alcalin et enzymatique) auraient été nécessaires. En effet, les formes libres d'acides phénols sont très rares *in vivo* et leurs présences sur les chromatogrammes relevaient souvent à des artefacts (COLONNA, 1978 ; FLEURIET, 1982).

Par ailleurs, les possibilités d'utilisation des techniques plus performantes (CLHP et spectrophotomètre) dans la séparation, l'identification et le dosage des composés étudiés se sont heurtées à des problèmes techniques et de mise au point qui ont empêché leurs utilisations.

Les analyses par spectrophotométrie UV réalisées sur les composés, séparés par la CCM préparative, n'ont pas donné les profils spectraux escomptés. L'extraction par le méthanol du composé de la plaque a pu entraîner des résidus de silice. Le spectre d'absorption de ces derniers s'est interféré avec le profil spectral du composé et a entravé la confirmation de son identité.

Pour les analyses quantitatives, elles étaient rendues compliquées à réaliser avec l'impossibilité d'utiliser la CLHP. Les dosages des substances identifiées qui étaient prévus dans l'étude n'ont donc pas pu être réalisés.

3.2.2.2. Méthode comparative

La comparaison, des constituants chimiques, entre espèces requiert deux conditions : (1) l'évaluation doit concerner plus d'un pied de caféier, et chaque pied doit être représenté par plusieurs extractions, (2) la comparaison de toutes les espèces doit utiliser la même méthodologie (CAMPA et *al.*, 2004). Dans la présente étude, chaque population est représentée par un seul échantillon. Mais pour être plus représentativité de l'ensemble de la population, l'échantillonnage a été fait sur plusieurs pieds d'une même population. Ainsi, un échantillon représente un mélange de matériels végétaux issus de quelques pieds d'une même population, surtout pour les échantillons de feuilles.

3.3. Recommandations et perspectives

Les analyses des différents extraits de feuilles de quelques populations de caféiers de la série *Verae* au moyen de la chromatographie sur couche mince (CCM) ont permis de révéler la présence de nombreux composés dans les tissus foliaires. La nature de la plupart de ces substances reste encore non précisée au stade actuel de notre recherche. L'utilisation des techniques de séparation et d'identification plus performantes, comme la spectrophotométrie UV-visible, la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), la spectrométrie proche infra-rouge (ou NIRS), la spectrométrie de masse (SM) et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), est ainsi recommandée pour l'identification et la confirmation de la nature des spots mis en évidence sur les chromatogrammes, dans cette étude.

L'étude de la variabilité de la composition chimique des caféiers de la série *Verae* ne sera complète sans l'appréciation de la variabilité quantitative des différents composés communs ou spécifiques de ces caféiers ; et de l'évolution de leurs concentrations en fonction de l'organe ou de l'âge physiologiques des feuilles. L'utilisation de la chromatographie CLHP est donc nécessaire pour le dosage de ces différents constituants chimiques.

Les caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*) sont loin de livrer tous leurs secrets. En effet, les pistes de réflexions sont encore nombreuses et méritent d'être explorées, comme :

- l'identification du (des) substance(s) responsable(s) de l'émulsion persistante et manifeste qui se produit lors de l'extraction au chloroforme, et qui est spécifique aux extraits des feuilles des espèces *C. homollei* (observation personnelle) ;
- la détermination des relations entre les microorganismes endophytiques des feuilles des caféiers de la série *Verae* et la biosynthèse des principaux métabolites secondaires des feuilles ;
- la mise en évidence des relations entre les endophytes ou les exophytes des fruits de *C. kianjavatensis* et la présence de composés particuliers, notamment la théacrine, dans les graines de cette espèce ;
- enfin, l'élargissement l'étude de la variabilité de la composition chimique des feuilles à l'ensemble des espèces de la section *Mascarocoffea*.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*) disposent d'une immense potentialité sur le plan de la productivité, la résistance ou la tolérance aux parasites et aux conditions pédoclimatiques. L'exceptionnelle diversité génétique de ces espèces offre de nombreuses perspectives pour l'amélioration génétique des caféiers cultivées. Et, les nombreuses recherches réalisées sur le genre *Coffea*, en général, et sur les espèces cultivées, en particulier, témoignent de l'importance de ce complexe d'espèces qui est le caféier.

Il reste beaucoup de chemin, avant que toute la complexité de ce groupe d'espèces soit décryptée. Et, il faudra aussi, davantage de recherches et de prospections pour pouvoir espérer des résultats probants avec l'exploitation des taxons spontanés de la section *Mascarocoffea*, notamment dans les programmes d'amélioration génétique de la teneur en caféine.

L'objectif de cette recherche s'inscrit dans ce souci de rassembler davantage de connaissances sur les caféiers sauvages de la région malgache. En effet, l'étude a pour objectif d'évaluer la variabilité de la composition chimique des caféiers spontanés de la série *Verae* et d'apprécier la distribution des métabolites secondaires dans la plante.

L'expression de la diversité génétique des caféiers de la série *Verae* se manifeste, parmi tant d'autres caractères, par une diversité des compositions chimiques de leurs feuilles. Deux espèces parmi les trois étudiées ont montré une différenciation par rapport à la composition en bases puriques des feuilles. Chez les populations de *C. lancifolia*, une espèce à caféine, ont été décelé la théobromine. Par contre, les populations de *C. homollei*, espèces dépourvue de caféine, sont caractérisées par l'absence de la théobromine et l'existence de six autres composés, matérialisés sur les chromatogrammes, par des spots de caractéristiques similaires à celles des méthylxanthines. Concernant les dérivés hydroxycinnamiques, toutes les espèces étudiées renferment dans leurs feuilles l'acide chlorogénique *stricto sensu* (AC5Q). Toutefois, *C. homollei* dispose de deux autres composés qui la différencient des autres espèces. Ces observations confirment l'hypothèse selon laquelle les composés chimiques des caféiers se distribuent de manière différente suivant les espèces.

Les compositions en méthylxanthines et dérivés hydroxycinnamiques des feuilles de la première et deuxième paire à partir du bourgeon terminal des rameaux ont été comparés avec celles des feuilles issus des troisièmes paires et au-delà. Les jeunes feuilles ont présenté des compositions dissemblables à celles des feuilles adultes. La théobromine a été repérée dans les premières. Tandis que, les seconds semblent ne présenter aucune méthylxanthine particulière. Quant à l'acide chlorogénique (AC5Q), le seul dérivé de l'acide hydroxycinnamiques bien identifié, l'âge des tissus foliaires ne semble influencer sur sa présence dans les feuilles. L'hypothèse selon laquelle la distribution dans les feuilles des

Conclusion

méthylxanthines et des dérivés hydroxycinnamiques est fonction de leur âge physiologique est acceptée en partie. Néanmoins, une évaluation de la variation quantitative de l'acide chlorogénique pour confirmer les données de la littérature devrait encore être menée.

La comparaison des constituants des graines à ceux des feuilles pour chaque population a révélé une disparité de leur composition. Les graines, notamment celles des caféiers à caféine, contiennent plus de méthylxanthines, en termes de variabilité et de concentration, détectés et identifiés que les feuilles. La caféine et la théacrine sont bien représentées dans les graines des caféiers *C. kianjavatensis* en plus de la théobromine, alors que dans les feuilles ces deux premières substances ne sont pas perceptibles. De même pour *C. lancifolia*, la caféine et la théobromine sont observées dans les graines. Les feuilles, par contre, ne révèlent que la présence de la théobromine. Ces résultats valident l'hypothèse (H3) selon laquelle les métabolites secondaires des caféiers se distribuent de manière différente entre les organes de la plante. Les graines renferment plus de méthylxanthines par rapports aux feuilles.

En somme, chez les caféiers de la série *Verae*, en plus des graines, les métabolites secondaires majeurs des caféiers (les méthylxanthines et l'acides chlorogénique) sont repartis dans d'autres organes de la plante, notamment dans les feuilles. La répartition de ces métabolites dans ces organes est fonction de leur âge physiologique. Les espèces spontanées de la série *Verae* sont caractérisées par une disparité de ces métabolites secondaires en fonction de l'espèce.

Cependant, une évaluation exhaustive des composés du métabolisme secondaire des feuilles devrait encore être menée. En effet, l'implication des éléments du métabolisme secondaire du caféier dans les caractères organoleptiques du café-boisson n'est plus à démontrer. L'analyse approfondie de la disparité biochimique des populations vivant dans leur milieu naturel est, entre autres, une piste de recherche à explorer pour pouvoir apprécier l'influence de leur environnement écologique respectif sur les teneurs en métabolites secondaires. L'extension de l'évaluation à tout l'ensemble des populations des caféiers *Mascarocoffea*, permet d'apprécier l'organisation de la biosynthèse des métabolites secondaires et leur relation avec les conditions de leur milieu naturel.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AGA E., (2005). Molecular Genetic Diversity Study of Forest Coffee Tree [*Coffea arabica* L.] Populations in Ethiopia: Implications for Conservation and Breeding. Doctoral thesis, Department of Crop Science, Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden, 31p.
- ANAYA A.L., CRUZ-ORTEGA R., WALLER G.R. (2006). Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Frontiers in Bioscience*, **11** : 2354–2370.
- ANDRIAMIALIHARISOA R.F., (2011). Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *Mascarocoffea* et des endophytes des feuilles de *Coffea sp* A 315. Mémoire de fin de DEA, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée – Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo. 68p.
- ANDRIANADISON M.T., (2001). Etude de la variabilité biochimique des graines de café : Dosage de la caféine et des acides chlorogéniques par une méthode simple, analyse de la teneur en eau et de la fraction lipidique. Mémoire de DEA, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée – Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo. 94p.
- ANDRIANASOLO D.N., (2008). Etudes écobiogéographiques de cinq espèces de caféiers sauvages de la réserve naturelle intégrale n°1 de Betampona et modélisation de leurs niches écologiques favorables: *Coffea ambodirianensis*, *Coffea betamponensis*, *Coffea coursiana*, *Coffea lancifolia* et *Coffea aff. Millotii*. Mémoire de DEA, Département de Biologie et Ecologie Végétales - Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo 109p.
- ANTHONY F., CLIFFORD M.N., NOIROT M., (1993). Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **40**: 61-70.
- ASHIHARA H. (2006). Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **18**(1): 1-8.
- ASHIHARA H., CROZIER A. (1999a). Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Advances in botanical Research*, **30**:118–205.
- ASHIHARA H., CROZIER A. (1999b). Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**:3425–3431.
- ASHIHARA H., MONTEIRO A.M., GILLIES F.M., CROZIER A. (1996). Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiology*, **111**: 747-753.

- ASHIHARA H., SANO H., CROZIER A. (2008). Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, **69**: 841-856.
- BARRE P., AKAFFOU S., LOUARN J., CHARRIER A., HAMON S., NOIROT M. (1998). Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species *Coffea liberica* var *dewevrei* and a wild species caffeine-free *C. pseudozanguebariae*. *Theoretical and Applied Genetics*, **96** : 306-311.
- BASNET P., MATSUSHIGE K., HASE K., KADOTA S., NAMBA T., (1996). Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent Hepatoprotective activity in experimental liver Injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **19**:1479-1484.
- BAUMANN T.W., OECHSLIN M., WANNER H. (1976). Caffeine and methylated uric acids: chemical patterns during vegetative development of *Coffea liberica*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, **170** : 217–225.
- BERTRAND G., (1901). Sur la composition chimique du café de la Grande Comore. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, **132**: 162-164.
- BRIDSON D.M., (1987). Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). *Kew Bulletin*, **42**: 453–460.
- BRIDSON D.M., (1994). Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. *Kew Bulletin*, **49**: 331–342.
- BRZOZOWSKA J., HANOWER P., TANGUY J., (1973). Polyphénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, **12** : 2353-2357.
- 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.
- CAMPA C., DOULBEAU S., DUSSERT S., HAMON S., NOIROT M. (2005a). Diversity in bean Caffeine content among wild *Coffea* species: Evidence of a discontinuous distribution. *Food Chemistry*, **91**: 633-637.
- CAMPA C., DOULBEAU S., DUSSERT S., HAMON S., NOIROT M., (2005b). Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, **93** : 135–139.
- CEROVIC Z.G., OUNIS A., CARTELAT A., LATOUCHE G., GOULAS Y., MEYER S., MOYA I., (2002). The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1663–1676.

- CHAPPLE C., VOGT T., ELLIS B., SOMERVILLE C. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**: 1413-1424.
- CHARRIER A., (1972). L'intercompatibilité des clones de caféiers cultivés sur la Cote Est malgache. *Café, Cacao, Thé*, **16**(2) :111-122.
- CHARRIER A., (1978). La structure Génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*): leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*), Mémoire ORSTOM n°87, Paris, 216p.
- CHARRIER A., BERTHAUD J. (1975). Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé*, 19 : 251-264.
- CHEVALIER A., (1938). Essai d'un groupement systématique des caféiers sauvages de Madagascar et des Iles Mascareignes. *Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale*, **18** : 825-843.
- CHEVALIER A., (1940). Nouveau groupement des espèces du genre *Coffea* et spécialement de celles de la section *Eucoffea*. *Revue de Botanique Appliquée*, **18** : 827.
- CHEVALIER A., (1942). Les caféiers du globe, II: Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. Encyclopédie Biologique, P. Lechevalier, Paris, 36p.
- CHEVALIER A., (1947). Les caféiers du globe. III : Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. Encyclopédie Biologique, Paris, 356p.
- CITROREKSOKO P. S., PETERMANN J., WANNER H., BAUMANN T. W. (1977). Detection of trace amounts of methylated uric acids in crude caffeine from different sources. 8è Colloque de l'A.S.I.C., Abidjan (Cote d'Ivoire), 143-145.
- CLIFFORD M.N., (1985). Chlorogenic acids. R. J. Clarke and R. Macrae éd., Londres, *Chemistry*, **1**: 153-202.
- CLIFFORD M.N., JARVIS T., (1988). The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin. *Food Chemistry* **29**:291-298.
- CLIFFORD M. N., KAZI T., (1987). The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chemistry*, **26**: 59-69.
- COLONNA J.P., (1978). L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches : leur participation au métabolisme et leur signification biologique (distribution, variation, biosynthèse). Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 201p.

- CORREIA A.M.N.G., LEITÃO M.C.A., CLIFFORD M.N., (1995). Caffeoyl-tyrosine and Angola II as characteristic markers for Angolan robusta coffees. *Food Chemistry*, **53**: 309-313.
- COSTE R., (1968). Le caféier. Maisonneuve et Larose, Paris, 310p.
- CROS J., COMBES M.C., CHABRILLANGE N., DUPERRAY C, MONNOT DES ANGLES A., HAMON S., (1995). Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. *Canadian Journal of Botany*, **73**: 14-20.
- DAVIS A.P., CHESTER M., MAURIN O., FAY M.F., (2007). Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Ixoroideae): the circumscription and phylogeny of Coffeae based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany*, **94**(3): 313-329.
- DAVIS A.P., GOVAERTS R., BRIDSON D.M., STOFFELEN P., (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **152** : 465-512.
- DEL CASTILLO M.D., GORDON M.H., AMES J.M., (2005). Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, **221**:471–477.
- DUCROUX A., HAMONNIERE M., PASCARD C., POISSON J., (1975). Structure du mascaroside, hétéroside diterpénique de *Coffea vianneyi* Leroy. *Café Cacao Thé*, **19**, n°1: 57- 58.
- FARAH A., DONANGELO C. M., (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **18**(1): 23-36.
- FARAH A., MONTEIRO M. C., CALADO V., FRANCA A. S., TRUGO L. C., (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, **98**(2): 373-380.
- FLEURIET A., (1982). Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance, de la maturation et de la réaction aux blessures du fruit de la tomate " cerise " (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*), Thèse d'Etat, Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, 269p.
- FLEURIET A., MACHEIX J. J., (1972). Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. *Journal of Chromatography*, **198**: 373-376.
- FRANKE R., HEMM M.R., DENAULT J.W., RUEGGER M.O., HUMPHREYS J.M., CHAPPLE C. (2002a) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **30**: 47-59.

- FRANKE R., HUMPHREYS J.M., HEMM M.R., DENAULT J.W., RUEGGER M.O., CUSUMANO J.C., CHAPPLE C. (2002b). The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal*, **30**: 33-45.
- FUJIMORI N., ASHIHARA H. (1994). Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, **36**: 1359-1361.
- GRESSNER O. A. (2010). Identification of paraxanthine as the most potent inhibitor of TGF- β dependent Connective Tissue Growth Factor expression among the three primary caffeine metabolites – A new approach in the pharmacological management of chronic fibrogenic diseases ? *The Open Conference Proceedings Journal*, **1**: 239-250.
- HAMIDI A. el, WANNER H. (1964). The distribution pattern of chlorogenic and caffeine in *Coffea arabica*. *Planta*, **61**: 98-96.
- HAMON P., SILJAK-YAKOVLEV S., SRISUWAN S., ROBIN O., PONCET V., HAMON S., DE KOCHKO A., (2009). Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Research*, **17** : 291–304.
- HAMONNIERE M., (1974). Contribution à l'étude d'un principe amer cristallisé, isolé des graines du *Coffea vianneyi* Leroy. *Café Cacao Thé*, **18**(4) : 277-278.
- HOLLINGSWORTH R.G., ARMSTRONG J.W., CAMPBELL E., (2002). Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature*, **417** : 915–916.
- 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/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 166p.
- HORMAN I., VIANI R. (1972). The nature and conformation of caffeine-chlorogenate complex of coffee. *Journal of Food Science*, **37**: 925–927.
- HOUSSOU J.K., (2007). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction, Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. AgroParisTech, Paris, 193p.
- HUCK C.W., GUGGENBICHLER W., BONN G.K. (2005). Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **538**: 195-203.

IUCN, (2001), *IUCN red list categories*, Version 3.1. Gland/Cambridge: IUCN Species Survival Commission.

JAISSWAL R., PATRASMA A., ERAVUCHIRA P. J., KUHNERT N. (2010). Profile and characterization of the chlorogenic acids in green robusta coffee beans by LC-MSⁿ: Identification of seven new classes of compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(15): 8722-8737.

JIN U.H., LEE J.Y., KANG S.K., KIM J.K., PARK W.H., KIM J.G., MOON S.K., KIM C.H., (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences* **77**: 2760–2769.

KAPPELER A. W., BAUMANN T. W., GREUTERT H., (1987). Complexation of purine alkaloids in the coffee plant. Proceedings of the International Congress of ASIC, **12**: 247–253.

KIM Y.S., SANO H., (2008). Pathogen resistance in transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry*, **69**: 882-888.

KIM Y.S., UEFUJI H., OGITA S., SANO H., (2006). Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control. *Transgenic Research*, **15**: 667–672.

KUHNERT N., JAISSWAL R., ERAVUCHIRA P., EL-ABASSY R. M., VON DER KAMMER B., MATERNY A. (2011). Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. *Analytical Methods*, **3**: 144-155.

KUMAR N.S., HEWAVITHARANAGE P., ADIKARAM N.K.B., (1995). Attack on tea by *Xyleborus fornicatus*: inhibition of the symbiote, *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*, **40**: 1113–1116.

KY C.L., LOUARN J., DUSSERT S., GUYOT B., HAMON S., NOIROT M., (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, **75** : 223-230.

KY C.-L., LOUARN J., GUYOT B., CHARRIER A., HAMON S., NOIROT M. (1999). Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var ‘*dewevrei*’. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 628-637.

KY C.L., NOIROT M., HAMON S., (1997). Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 786-790.

- LANDRY L.G., CHAPPLE C.C.S., LAST R.L., (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*, **109**: 1159–1166.
- LASHERMES P., COMBES M.C., TROUSLOT P., CHARRIER A. (1997). Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, **94** : 947-955.
- LOUARN J., (1993). Structure génétique des caféiers africains diploïdes basée sur la fertilité des hybrides interspécifiques, 15^e colloque de l'ASIC, Montpellier, **1** : 243-252.
- MACHEIX J. J., FLEURIET A., BILLOT J. (1990). Fruit phenolics. CRC Press, Floride, U.S.A., 378p.
- MEF (2009). La biodiversité floristique terrestre. www.meeft.gov.mg [Consulté le 31 août 2011].
- MONDOLOT L., LA FISCA P., BUATOIS B., TALANSIER E., DE KOCHKO A., 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-*O*-feruloylquinic acid from green Robusta coffee beans. *Phytochemistry*, **25**: 2679–2680.
- NAGAI C., RAKOTOMALALA J.J., KATAHIRA R., YEYUN L., KATSUYA Y., HIROSHI A. (2008). Production of a new low-caffeine hybrid coffee and the biochemical mechanism of low caffeine accumulation. *Euphytica*, **164**(1): 133-142.
- NATELLA F., NARDINI M., GIANETTI I., DATTILO C., SCACCINI C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 6211-6216.
- NAVELLIER P., BRUNIN R., (1962). Évolution quantitative de quelques constituants fixes du café au cours de la torréfaction. *Café Cacao Thé*, **6**(1) : 47-54.
- NEHLIG A, DAVAL J.L., DEBRY G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanism of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, **17**: 139-170.
- NIGGEWEG R., MICHAEL A.J., MARTIN C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*, **22**: 746–754.
- NOIROT M., PONCET V., BARRE P., HAMON P., HAMON S., DE KOCHKO A., (2003). Genome size variations in diploid African *Coffea* species. *Annals of Botany*, **92** : 709-714.

ORNANO M. d', CHASSEVENT F., POUGNEAUD S., (1967). Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. IV- Isolement et étude de la structure de la cafamarine, substance amère de *C. buxifolia*. *Café Cacao Thé*, **11**(4) : 343-350.

PETERMANN J.B., BAUMANN T.W., (1983). Metabolic relations between méthylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. *Plant Physiology*, **73**: 961-964.

PREWO R., GUGGISBERG A., LORENZI-RIATSCH A., BAUMAANN T. W., WETTSTEIN-BATTIG M., (1990). Crystal structure of Mozambioside, a diterpene glycoside of *Coffea pseudozanguebariae*. *Phytochemistry* **29** : 990-992.

RAKOTOMALALA J.J., (1992). Diversité biochimique des caféiers : Analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques. Particularités des caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea* Chev.), Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 203p.

RAKOTOMALALA J.J., CROS E., CLIFFORD M.N., CHARRIER A., (1992). Caffeine and theobromine in green beans from *Mascarocoffea*. *Phytochemistry*, **31**(4): 1271-1272.

RAKOTOMALALA J.J., CROS E., CHARRIER A., (1993a). Quelques acides phénols particuliers des fèves de caféiers sauvages malgaches et africains. 15^e Colloque de l'ASIC, Montpellier, **1** : 637-643.

RAKOTOMALALA J.J., CROS E., CHARRIER A., ANTHONY F., NOIROT M., (1993b). Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers. 15^e Colloque de l'ASIC, Montpellier, **1** : 47-55.

RAKOTONDRAVAO A., (2001). Contribution à l'étude de l'activité biologique de quelques constituants chimiques spécifiques des graines de *Mascarocoffea* Chev., Mémoire de DEA, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée - Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo, 68p.

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* : *Coffea richardii* A 150, *Coffea sp* A 311, Mémoire de DEA, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo, 67p.

RATSIMBAZAFY T.T., (2011). Relation entre spécificité chimique de *Coffea perrieri* population A 305 (*Mascarocoffea*) et les endophytes de ses feuilles. Mémoire de DEA, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo, Antananarivo, 67p.

- RICE-EVANS C.A., MILLER N.J., PAGANGA G. (1997). Antioxidants effect of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2**: 152–159.
- ROBBRECHT E., PUFF C., (1986). A survey of the Gardenieae and related tribes (Rubiaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik*, **108**: 63–137.
- SCALBERT A, JOHNSON I.T., SALTMARSH M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(suppl): 215S-217S.
- SCHATZ G.E., (2001). Flore générique des arbres de Madagascar, Royal Botanic Garden, Kew & Missouri Botanical Garden, Grande Bretagne, 503p.
- SCHOCH G., GOEPFERT S., MORANT M., HEHN A., MEYER D., ULLMANN P., WERCK-REICHHART D., (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 30-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 36566–36574.
- SILVAROLLA M.B., MAZZAFERA P., FAZUOLI L.C. (2004). Plant biochemistry: a naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, **429**: 826.
- SONDHEIMER E., COVITZ F., MARQUISEE M. J. (1961). Association of naturally occurring compounds, the chrologenic acid-caffeine complex. *Archives of Biophysics and Biochemistry*, **93**: 63–71.
- TAMAGNONE L., MERIDA A., STACEY N., PLASKITT K., PARR A., CHANG C.-F., LYNN D., DOW J.M., ROBERTS K., MARTIN C. (1998). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, **10**:1801-1816.
- TANGUY J., (1971). Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du Tabac souche commune (V.M.T.). *Physiologie Végétale*, **9**(2): 169-187.
- TAO K.S., WANG W., WANG L., CAO D.Y., LI Y.Q., WU S.X., DOU K.F., (2008). The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. *Medical Hypotheses*, **71** : 730-736.
- TEGELBERG R., JULKUNEN-TIITTO R., APHALO P.J. (2004). Red: far-red light ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1005–1013.

- TONO T., FUJITA S., KAWABE M. (1989). Determination of chlorogenic acid in coffee samples by difference spectral method and DEAE-Toyopearl column chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**: 587-591.
- TRUGO L.C., MACRAE R., (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, **15**:219-227.
- TRUTE A., GROSS J., MUTSCHLER E., NAHRSTEDT A. (1997). In Vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Medica*, **63**:125-129.
- UEFUJI H., TATSUMI Y., MORIMOTO M., KAOTHIEN-NAKAYAMA P., OGITA S., SANO H., (2005). Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee *N*-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Molecular Biology*, **59**: 221–227.
- URGERT R., KATAN M.B. (1997). The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annual Review of Nutrition*, **17**: 305-324.
- ZHENG X.Q., ASHIHARA H. (2004). Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*, **166**: 807-813.
- ZHENG X.Q., YE C.X., KATO M., CROZIER A., ASHIHARA H. (2002). Theacrine (1,3,7,9-tetramethyluric acid) synthesis in leaves of a Chinese tea, kucha (*Camellia assamica* var. kucha). *Phytochemistry* **60**: 129–134.
- ZHU K., CORDEIRO M.L., ATIENZA J., ROBINSON Jr W.E., CHOW S.A. (1999). Irreversible inhibition of human immunodeficiency Virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *Journal of Virology*, **73**: 3309–3316.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Les *Mascarocoffea* et leurs classements dans les catégories de la Liste Rouge de l'IUCN

	Espèces		Catégorie de l'IUCN
	Madagascar		
1	<i>Coffea abbayesii</i>	J.-F.Leroy	EN
2	<i>Coffea alleizettii</i>	Dubard	EN
3	<i>Coffea ambanjensis</i>	J.-F.Leroy	EN
4	<i>Coffea andrambovatensis</i>	J.-F.Leroy	CR
5	<i>Coffea ankaranensis</i>	J.-F.Leroy ex A.P.Davis & Rakotonas.	EN
6	<i>Coffea arenesiana</i>	J.-F.Leroy	NT
7	<i>Coffea augagneuri</i>	Dubard	EN
8	<i>Coffea bertrandi</i>	A.Chev.	VU
9	<i>Coffea betamponensis</i>	Portères & J.-F.Leroy	EN
10	<i>Coffea boiviniana</i>	(Baill.) Drake	NT
11	<i>Coffea bonnierii</i>	Dubard	EN
12	<i>Coffea buxifolia</i>	A.Chev.	NT
13	<i>Coffea commersoniana</i>	(Baill.) A.Chev.	EN
14	<i>Coffea coursiana</i>	J.-F.Leroy	VU
15	<i>Coffea dubardi</i>	Jum.	LC
16	<i>Coffea farafanganensis</i>	J.-F.Leroy	VU
17	<i>Coffea fragilis</i>	J.-F.Leroy	NE
18	<i>Coffea gallienii</i>	Dubard	CR
19	<i>Coffea heimii</i>	J.-F.Leroy	VU
20	<i>Coffea homollei</i>	J.-F.Leroy	LC
21	<i>Coffea jumellei</i>	J.-F.Leroy	EN
22	<i>Coffea kianjavatensis</i>	J.-F.Leroy	EN
23	<i>Coffea lancifolia</i>	A.Chev.	NT
24	<i>Coffea leroyi</i> ²⁰	A.P.Davis	NT
25	<i>Coffea liaudi</i>	J.-F.Leroy ex A.P.Davis	EN
26	<i>Coffea littoralis</i>	A.P.Davis & Rakotonas.	CR
27	<i>Coffea mangoroensis</i>	Portères	VU
28	<i>Coffea manombensis</i>	A.P.Davis	EN
29	<i>Coffea mcphersoni</i>	A.P.Davis & Rakotonas.	EN
30	<i>Coffea millotii</i>	J.-F.Leroy	LC
31	<i>Coffea minutiflora</i>	A.P.Davis & Rakotonas.	DD
32	<i>Coffea mogeneti</i>	Dubard	EN
33	<i>Coffea montis-sacri</i> ²¹	A.P.Davis	CR
34	<i>Coffea morati</i>	J.-F.Leroy ex A.P.Davis & Rakotonas.	EN*
35	<i>Coffea perrieri</i>	Drake ex Jum. & H.Perrier	LC
36	<i>Coffea pervilleana</i>	(Baill.) Drake	VU

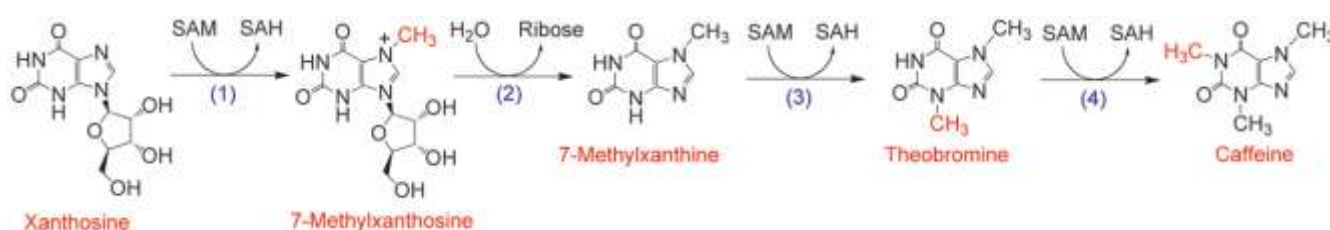
²⁰ D'après DAVIS et al., 2006, *C. leroyi* = *C. sp.* A 315 , série *Multiflorae*

²¹ D'après DAVIS et al., 2006, *C. montis-sacri* = *C. sp.* A321, série *Multiflorae*

Espèces			Catégorie de l'IUCN
37	<i>Coffea rakotonasoloi</i>	A.P.Davis	CR
38	<i>Coffea ratsimamangae</i>	J.-F.Leroy ex A.P.Davis & Rakotonas.	EN
39	<i>Coffea resinosa</i>	(Hook.f.) Radlk.	NT
40	<i>Coffea richardii</i>	J.-F.Leroy	NT
41	<i>Coffea sahafaryensis</i>	J.-F.Leroy	EN
42	<i>Coffea sakarahae</i>	J.-F.Leroy	VU
43	<i>Coffea sambavensis</i>	J.-F.Leroy ex A.P.Davis & Rakotonas.	EN
44	<i>Coffea tetragona</i>	Jum. & H.Perrier	VU
45	<i>Coffea tricalysioides</i>	J.-F.Leroy	LC
46	<i>Coffea tsirananae</i>	J.-F.Leroy	EN
47	<i>Coffea vatovavyensis</i>	J.-F.Leroy	EN
48	<i>Coffea vavateninensis</i>	J.-F.Leroy	EN
49	<i>Coffea vianneyi</i>	J.-F.Leroy	EN
50	<i>Coffea vohemarensis</i>	A.P.Davis & Rakotonas.	EN
Mascareignes et Comores			
51	<i>Coffea ambodirianensis*</i>	Portères	LC
52	<i>Coffea dolichophylla*</i>	J.-F.Leroy	LC
53	<i>Coffea tsaratananensis**</i>	J.-F.Leroy	LC
54	<i>Coffea humblotiana</i>	Baill.	EN
55	<i>Coffea macrocarpa</i>	A.Rich.	VU
56	<i>Coffea mauritiana</i>	Lam.	VU
57	<i>Coffea myrtifolia</i>	(A.Rich. ex DC.) J.-F.Leroy	EN

*Assimilées à *C. millotii* **assimilée à *C. tricalysioides* (DAVIS et al., 2006)

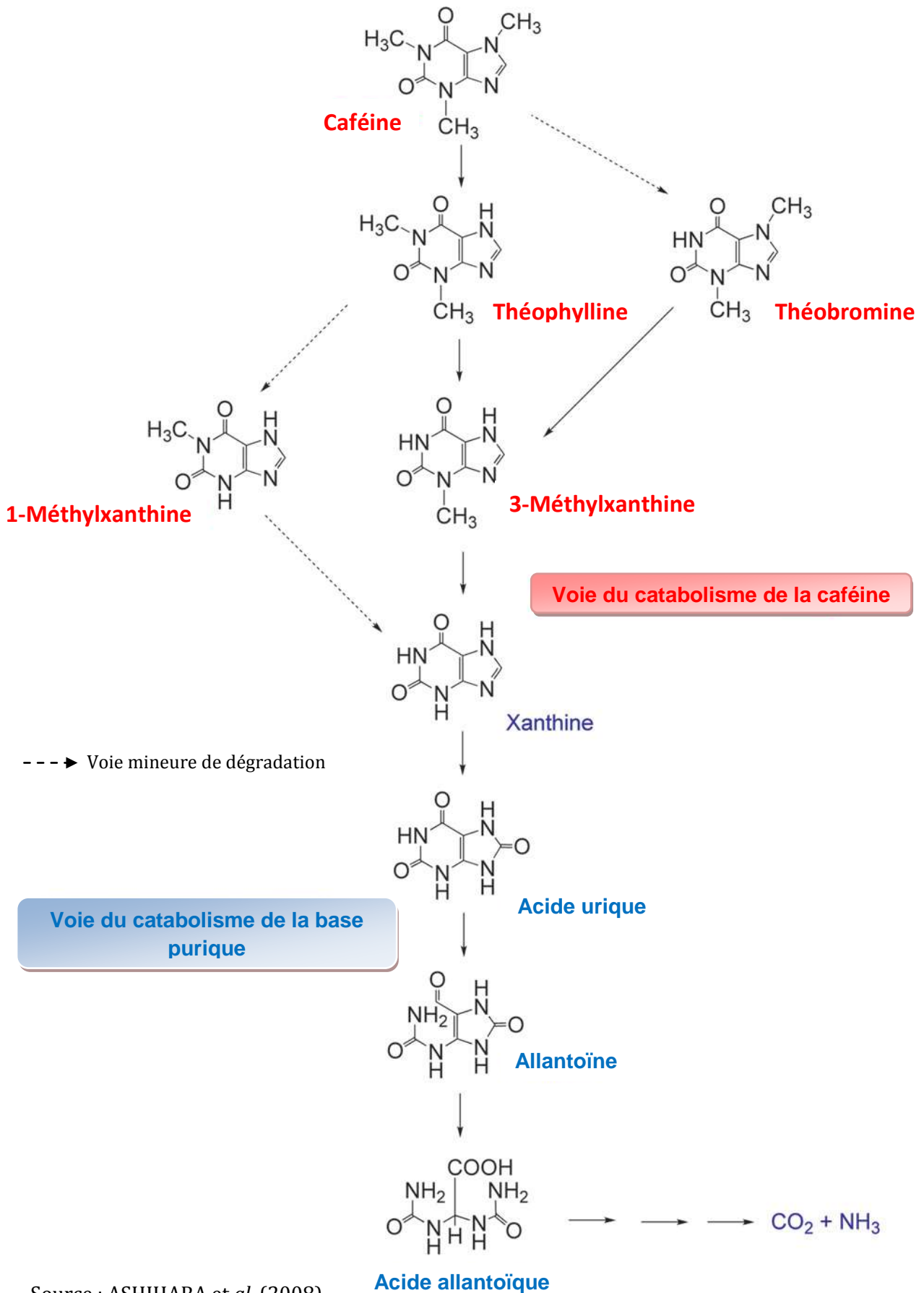
ANNEXE 2 : Voie du métabolisme de la caféine



La principale voie de biosynthèse de la caféine à partir de la xanthosine: (1) 7-méthylxanthosine synthase (xanthosine *N*-méthyltransferase); (2) *N*-méthylnucleosidase; (3) théobromine synthase (monométhylxanthine *N*-méthyltransferase); (4) caféine synthase (diméthylxanthine *N*-méthyltransferase); (3–4) double fonction de la caféine synthase (EC 2.1.1.160). SAM, *S*-adenosyl-L-méthionine; SAH, *S*-adenosyl-L-homocystéine.

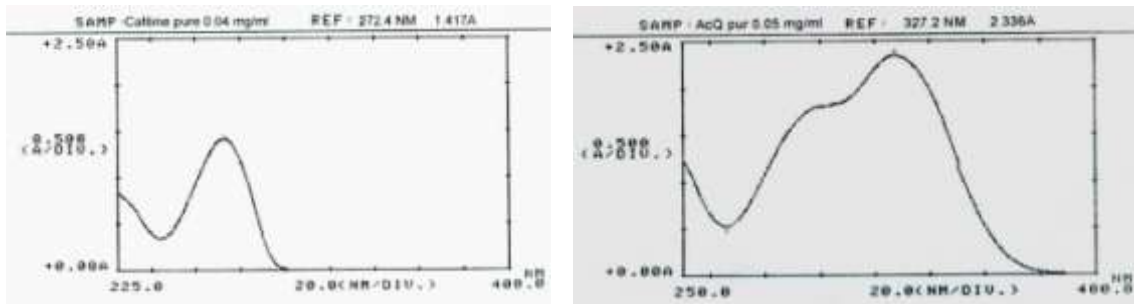
Source: ASHIHARA et al. (2008)

ANNEXE 3 : Voie du catabolisme de la caféine



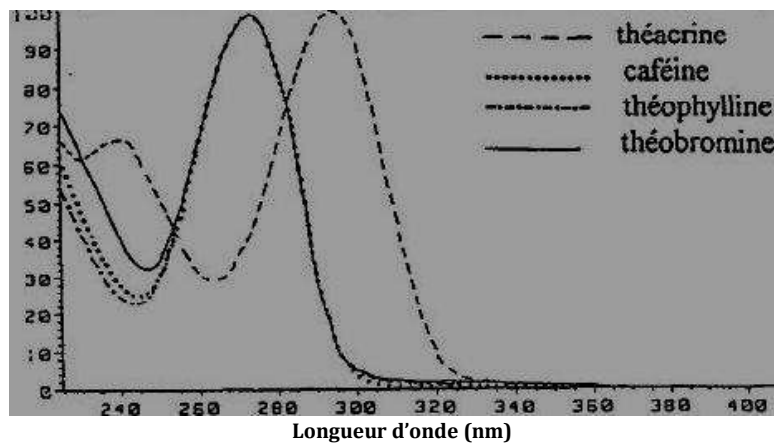
Source : ASHIHARA et al. (2008)

ANNEXE 4 : Profils des spectres d'absorption de quelques composés étudiés



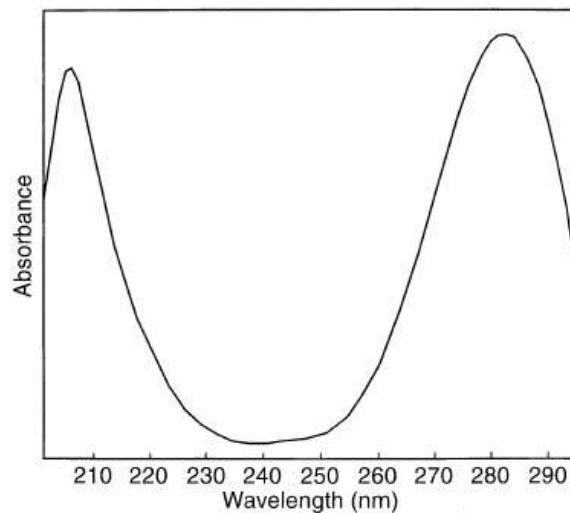
Source : ANDRIANADISON, 2001

Figure 21 : Spectre d'absorption de la caféine pure et de l'AC5Q pure



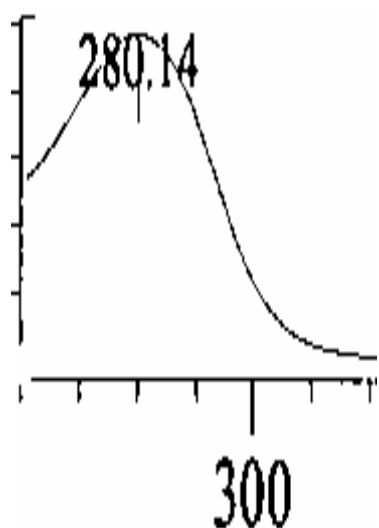
Source : RAKOTOMALALA, 1992

Figure 22 : Spectre UV des bases puriques mises en évidence chez les caféiers sauvages

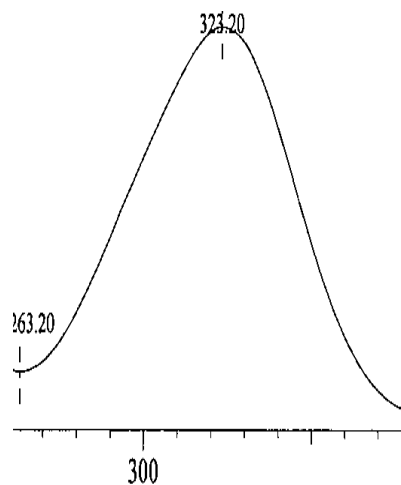


Source : BARRE et al. (1998)

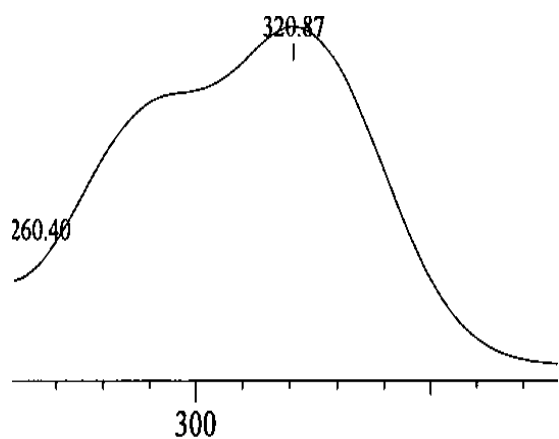
Figure 23 : Spectre UV de l'hétéroside diterpénique spécifique à *C. pseudozanguebariae*



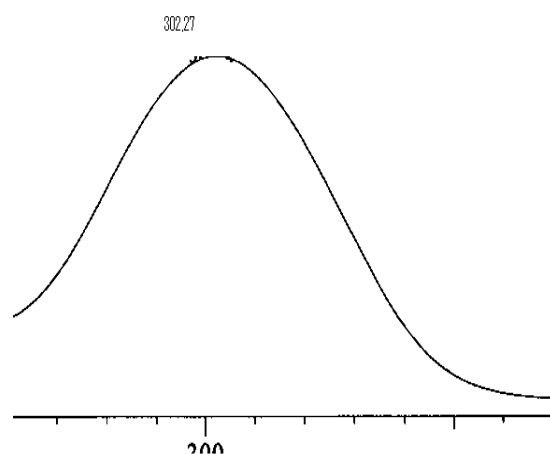
(a) Diterpène glycosidique



(b) acide sinapique



(c) Acide 3-4 diméthoxycinnamique

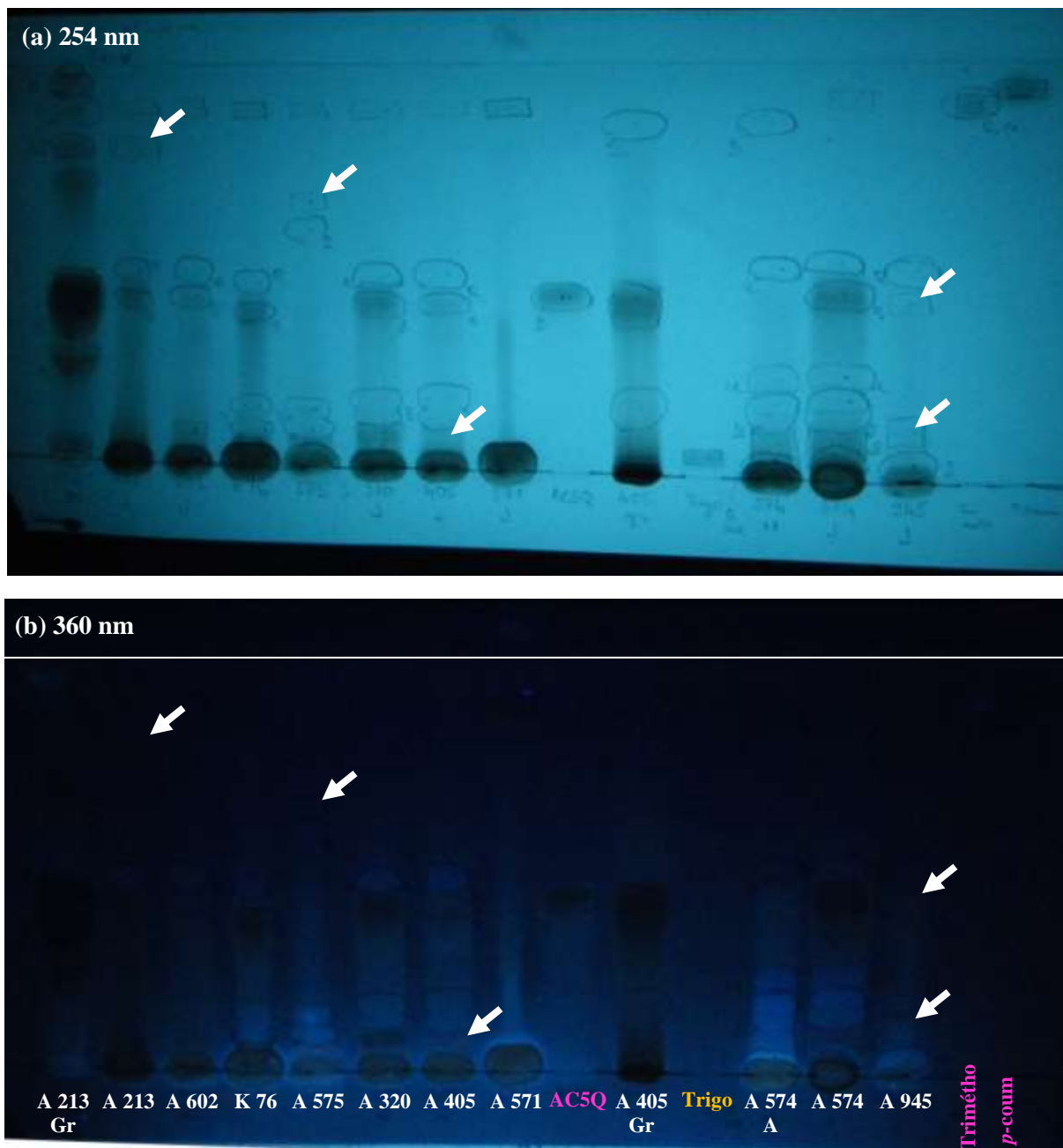


(d) Acide 3-4-5 triméthoxycinnamique

Source : RAKOTONDRAVAO, Communication personnelle

Figure 24 : Spectre UV de quelques composés standards

ANNEXE 5 : Chromatogrammes sur couche mince



Gr : graines

p-coum : acide *p*-coumarique

Trigo: Trigonelline

A : feuilles Adultes

Trimétho : acide 3,4,5-triméthoxycinnamique


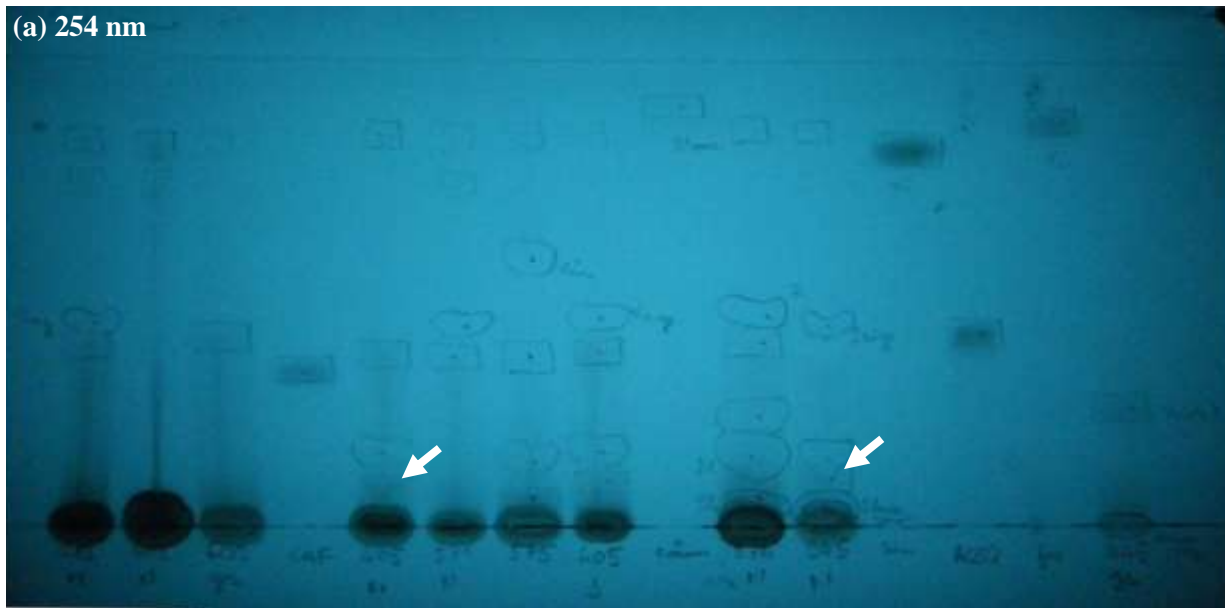
 : Diterpènes glucosidiques présumés

Figure 25 : Chromatogrammes des extraits aqueux des jeunes feuilles, migrés avec le solvant MFE,
a) observé à 254 nm b) à 360 nm



Gr : graines

J : Jeunes feuilles

Caf : Caféine

ac. cou : acide *O*-coumarique

ac. sin : acide sinapique

ac. fer : acide férulique


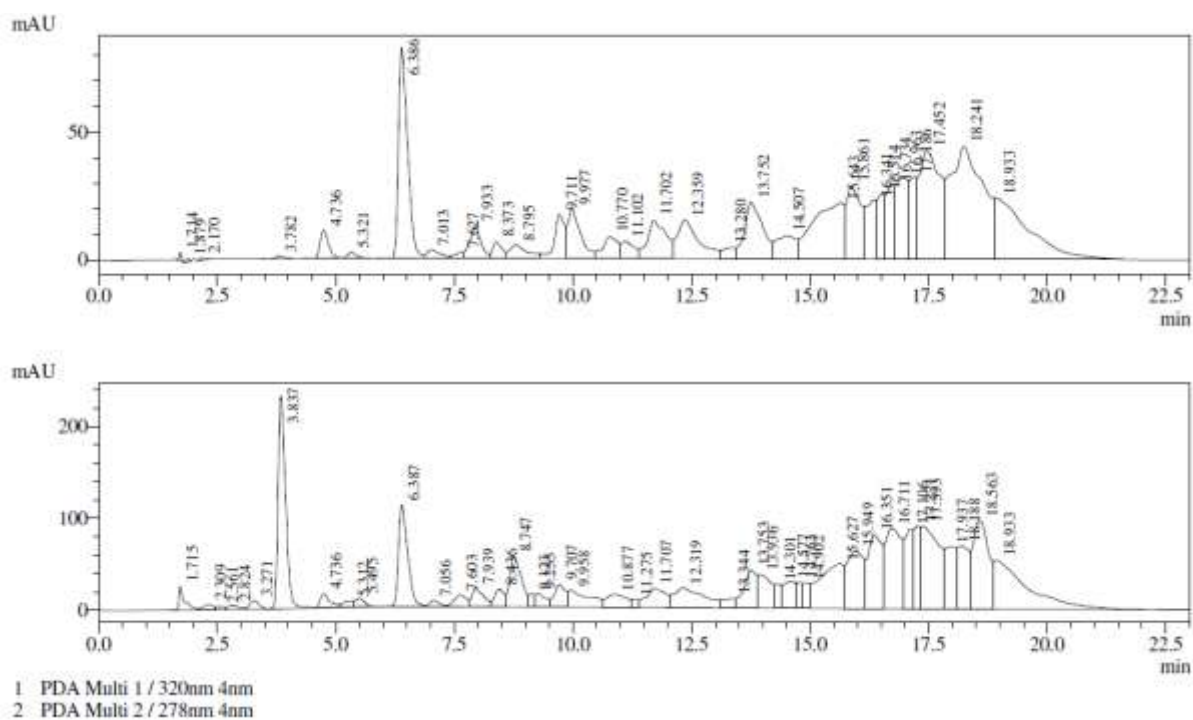
 : Diterpènes glucosidiques presumés

Figure 26 : Chromatogrammes des extraits aqueux des feuilles adultes, migrés avec le solvant MFE,

a) observé à 254 nm b) à 360 nm

ANNEXE 6 : Profils HPLC et spectres d'absorption

Les spots $R_f = 0,66$ et $0,76$ de l'extrait chloroformique des feuilles adultes de *C. homollei* A 574 (Tableau 6 et Figure 15) ont été grattés, puis analysés sur HPLC (Shimadzu DGU-20A) en phase reverse sur une colonne C18 d'une granulométrie de $3,5 \mu\text{m}$ et 100 mm de longueur. L'éluion a été effectuée avec un débit de $0,8 \text{ ml/min}$ pendant 23 minutes par un gradient non linéaire. Les solvants utilisés sont : (A) Méthanol, eau, acide acétique ; (B) Eau, acide acétique.



Peak# : 6
Retention Time : 3.837

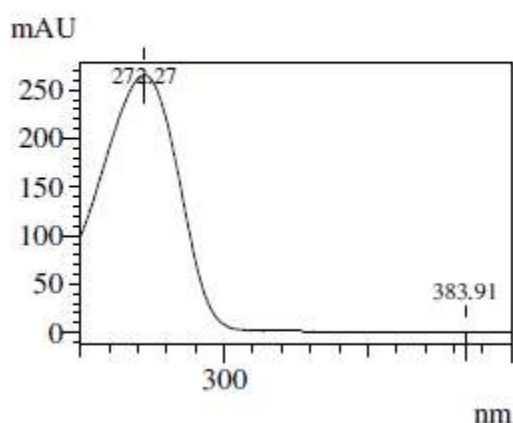
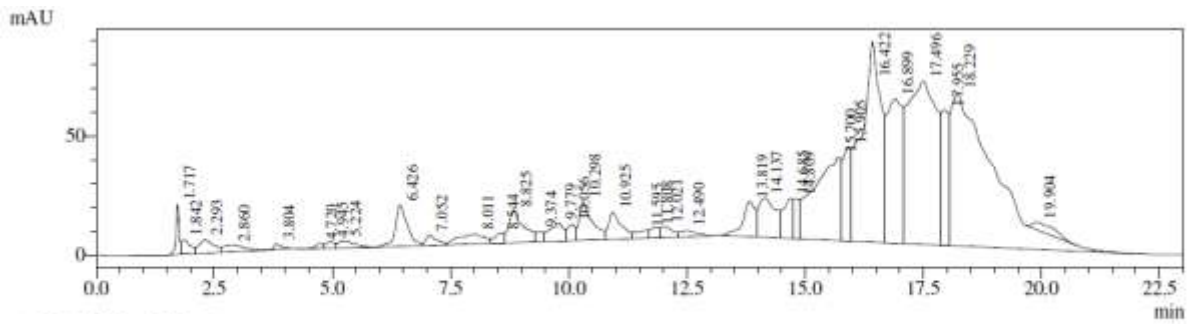
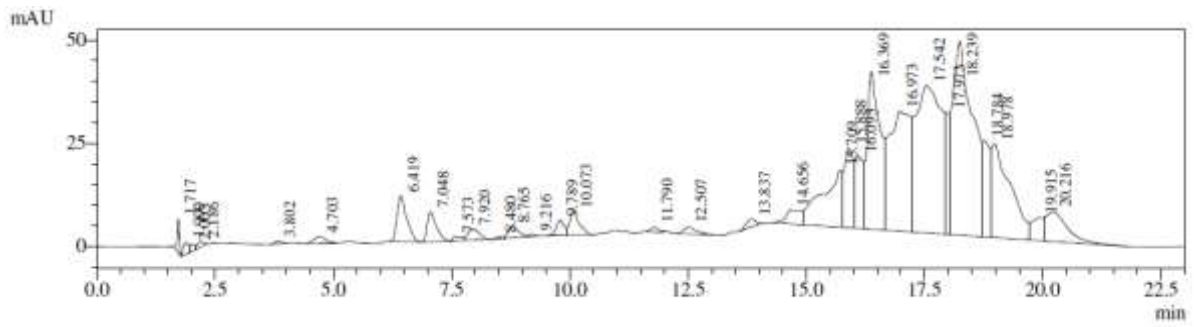


Figure 27 : Profils chromatographiques et spectre d'absorption du composé majeur du spot à $R_f = 0,66$ de l'extrait chloroformique des feuilles adultes de la population *C. homollei* A 574



1 PDA Multi 1 / 320 nm 4 nm
 2 PDA Multi 2 / 278 nm 4 nm

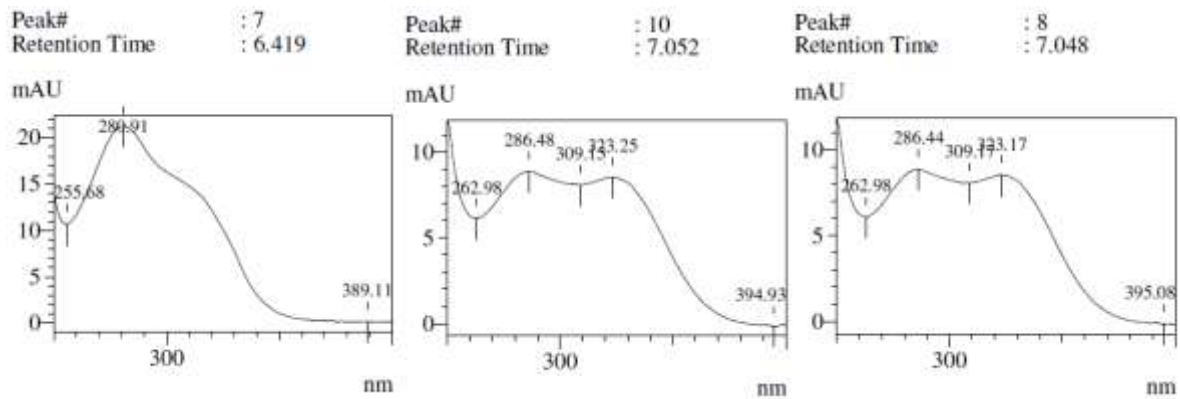


Figure 28 : Profils chromatographiques et spectres d'absorption des composés majeurs du spot à Rf = 0,76 de l'extrait chloroformique des feuilles adultes de la population *C. homollei* A 574

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DES EAUX ET FORETS

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du
Diplôme d'Etudes Approfondies en
Foresterie - Développement - Environnement

Rapporteur : Dr. RAKOTOMALALA Jean Jacques

Organisme d'accueil :



Partenaire :



Auteur : RANARIVELO Njakarinala Dimbiniaina
Promotion : TAHALA
Année : 2009-2010
Date de soutenance : 21 décembre 2011



**Variabilité de la composition chimique des caféiers spontanés de la région malgache
(*Mascarocoffea* Chev.) : cas de *Coffea homollei*, *C. kianjavatensis*, *C. lancifolia* de la série *Verae***

RESUME

Les caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) sont marqués par une grande diversité de leurs caractères morphophysologiques et phénologiques, de leur adaptation pédoclimatique, de leurs contenus chimiques.

L'étude a été initiée pour évaluer la variabilité de la composition chimique des caféiers de la série *Verae* et de caractériser la distribution des composés du métabolisme secondaire dans les autres parties de la plante, notamment dans les feuilles.

Des analyses de la composition chimique des feuilles et des graines ont été réalisées, avec la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM), sur 7 populations représentatives des 3 espèces de la série *Verae* dont *C. Kianjavatensis* (2), *C. homollei* (2) et *C. lancifolia* (3).

Les analyses chromatographiques ont révélé une variabilité des composés chimiques entre les trois espèces. Pour la composition en méthylxanthines, les trois populations de *C. lancifolia* diffèrent des populations de *C. homollei* par la présence marquée de la théobromine (3,7-diméthylxanthine) dans leurs feuilles. Les feuilles des populations de *C. kianjavatensis* n'ont présenté aucune des bases puriques majeures. Quant à la composition en acides hydroxycinnamiques, l'acide chlorogénique ou acide caféyl-5 quinique est le seul composé formellement identifié. L'ensemble des échantillons analysés ont tous présenté cette substance dans leurs feuilles. Les feuilles adultes de *C. lancifolia* sont marquées par l'absence de la théobromine. La comparaison entre la composition chimique des feuilles et celle des graines montre une distribution différente des bases puriques entre ces deux organes. Pour les caféiers à caféine (*C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*), les feuilles se distinguent des graines par l'absence de la caféine (1,3,7-triméthylxanthine). Et, pour *C. kianjavatensis*, notamment la population A 602, la théacrine (acide 1,3,7,9-tétraméthylurique) fortement présente dans les graines n'est pas perceptible dans les feuilles.

Mots clés : *Coffea*, *Mascarocoffea*, diversité biochimique, méthylxanthines, acides chlorogéniques, diterpènes glucosidique, *Coffea kianjavatensis*, *C. lancifolia*, *C. homollei*, région malgache, CCM, Madagascar

ABSTRACT

The wild Madagascar and Mascarene coffee trees (*Mascarocoffea*) are characterized by a huge diversity of their morphophysiological and phenological traits, of their pedoclimatical adaptation and of their chemical contents.

The aim of the study is to apprehend the variability of chemical compound between coffee trees of the serie *Verae* and to characterize the distribution of the secondary metabolites in the other parts of the plant, notably in the leaves.

The chemical composition of the leaves and seeds analysis were carried out, with the chromatography on thin layer method (TLC), on 7 populations belonging to 3 species of the serie *Verae*: *C. Kianjavatensis* (2), *C. homollei* (2) and *C. lancifolia* (3).

The chromatographic analysis revealed a variability of the chemical compound between these three species. As for the composition of methylxanthine, the three populations of *C. lancifolia* differ from populations of *C. homollei* by the noted presence of the theobromine content (3,7-dimethylxanthine) in their leaves. The leaves of the populations of *C. kianjavatensis* showed no major purine alkaloid. Considering the composition of hydroxycinnamic acids, the chlorogenic acid or cafeyol-5 quinic acid is the only compound formally identified. All samples analyzed were shown this compound in their leaves. The adult leaves from *C. lancifolia* are marked by the absence of theobromine content. The comparison between the chemical composition of the leaves and the seeds shows a differing distribution of the purine alkaloids, between both organs. For the caffeine-containing coffee trees (*C. lancifolia* and *C. kianjavatensis*), the leaves distinguish themselves seeds by the absence of caffeine content (1,3,7-trimethylxanthine). And, for *C. kianjavatensis*, particularly the population A 602, the théacrine content (1,3,7,9-tetramethyluric acid) the main compound present in the seeds, is not perceptible in the leaves.

Key words: *Coffea*, *Mascarocoffea*, biochemical diversity, méthylxanthines, chlorogenic acids, glycosidic diterpenes, *Coffea kianjavatensis*, *C. lancifolia*, *C. homollei*, TLC, Madagascar