

EFFETS DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET DES DEPSIDES SUR LES ORGANISMES VIVANTS.

III : EFFETS DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS DE CAFÉIERS EN PRÉSENCE D'AUXINE (Acide Indolyl-acétique)

par Jean-Paul COLONNA

Docteur ès sciences

1. INTRODUCTION

La participation de l'acide chlorogénique et des depsides présents chez le caféier à la vie et au fonctionnement de la plante semble bien établie (COLONNA, 1978).

Par ailleurs, les effets reconnus de ces composés sur la physiologie humaine, animale et végétale paraissent non négligeables (COLONNA, 1979, 1980a, 1980b).

Enfin, les actions entrevues et possibles font l'objet de confirmations et de recherches actuellement en cours. D'autres actions pourraient se révéler.

J'ai voulu examiner, ici, l'influence éventuelle du depside mono-caféyl-3-quinique sur *la croissance des embryons de caféiers*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

L'influence des depsides sur la croissance et le développement des embryons de caféiers a pu être étudiée sur plusieurs espèces, variétés ou clones. Il s'agissait pour le *Coffea arabica* L. de plusieurs pieds fournissant un mélange de graines ; pour le *Coffea canephora* Pierre s. var. *robusta* Linden des clones K43 ou K44 ; pour le *Coffea dewevrei* de Wild. et Durand, race *C. excelsa* Chev. de la série n° 859 ; pour le *Coffea dewevrei* race *C. néo-arnoldiana* du plant n° A14. Le choix de ces deux races de *C. dewevrei* se justifie, car elles apparaissent comme assez différentes au sein du groupe de caféiers regroupés par CHEVALIER (1940, 1942) sous le nom « d'exceisoïdes ». En effet, sur une plantation de cinq

hectares, issue de semences provenant d'un seul caféier *excelsa* typique (n° Fodé 301) j'ai pu montrer que la variabilité des dimensions correspondant à cette race recouvre les chiffres donnés par CHEVALIER (1942) pour les « excelsoïdes », sauf en ce qui concerne les races *dybowskii* et *néo-arnoldiana*, plus grandes, puis *ituriensis*, plus petite (COLONNA, 1973).

Ce matériel végétal a été récolté à l'état soit *mûr* soit *immature*, sur les stations caféières de la côte est de Madagascar à Kianjavato ou à Ilaka. Lors de la mise au point des méthodes de culture *in vitro*, j'ai aussi disposé de semences sélectionnées provenant de Centrafrique, tant pour le caféier *robusta* que pour le caféier *excelsa*.

2.2. Désinfection des graines

Dans le but de rechercher le meilleur équilibre entre l'efficacité de la désinfection et le maintien des possibilités de développement, quatre traitements furent comparés :

- 1. Trempage de 15 minutes dans le chlorure mercurique à 1 pour mille auquel on a ajouté comme mouillant du « Tween 80 » à 1 pour mille, après application d'un vide de 30 millimètres de mercure pendant 5 minutes ;
- 2. Trempage de 5 minutes dans le chlorure mercurique en utilisant les mêmes conditions que ci-dessus, l'application du vide ne durant qu'une minute ;
- 3. Trempage de 5 minutes dans une solution de « Tween 80 » à 1 pour mille, après application d'un vide de 30 millimètres de mercure durant une minute, puis trempage de 5 minutes dans le chlorure mercurique à 1 pour mille ;
- 4. Trempage dans l'éthanol à 95° G.L. durant 3 minutes, après application du vide pendant une minute, suivi d'un trempage de 5 minutes dans l'hypochlorite de calcium (200 degrés chlorométriques, 70 grammes dans un litre d'eau distillée).

Le trempage s'effectue évidemment sur des graines nues. L'augmentation du temps de désinfection à 30 ou 45 minutes n'apporte aucune amélioration. Par contre, il convient absolument de faire pénétrer le désinfectant dans le sillon du grain, grâce à l'application d'un vide d'environ 30 millimètres de mercure. Cette simple opération permet de faire progresser le pourcentage de non-contamination d'une façon considérable : dans l'exemple du traitement n° 1 il passe de 30 à 95 pour cent.

Les résultats du tableau n° 1 montrent l'efficacité des traitements n° 1 et n° 4. Par rapport au nombre d'embryons mis en culture, le pourcentage d'embryons réellement *utilisables*, c'est-à-dire le nombre d'embryons non contaminés et se développant d'une façon normale, en réalisant leur photosynthèse, atteint une valeur satisfaisante pour le traitement n° 4 et, à

un degré moindre, pour le traitement n° 1. Une évaluation de la régularité du développement fait ressortir un caractère moins traumatisant pour les traitements n° 2 et 4; ceci mérite d'être pris en considération dans le cas des embryons immatures qui semblent moins bien protégés que les embryons à maturité; par ailleurs on obtient avec ces deux traitements une meilleure homogénéité des cultures. Le traitement n° 4 a donc été généralement retenu. La désinfection se termine toujours par trois rinçages aseptiques à l'eau distillée autoclavée.

Traitements	P. 100 de non-contamination	P. 100 d'embryons utilisables	Indice de développement et d'homogénéité
1	95	75	++
2	60	50	+++
3	85	60	++
4	90	85	+++

Tableau n° 1: Influence des divers protocoles de désinfection.

2.3. Extraction de l'embryon

Sur graines mûres (COLONNA, CAS et RABECHAULT, 1971), la nécessité de repérer l'embryon pour l'extraire et la dureté de l'albumen imposent un trempage aseptique de 36 à 48 heures dans l'eau distillée. Ce trempage se fait dans une quatrième eau de rinçage. L'extraction de l'embryon et son passage sur milieu de culture sont réalisés sous « tunnel » vitré, aseptisé par pulvérisation d'éthanol à 95° G.L. La graine désinfectée, sortant du trempage stérile, est débarassée de la fine pellicule argentée qui la recouvre, puis immédiatement plongée, durant quelques instants, dans l'éthanol à 95° G.L. L'embryon, situé dans un plan inclus dans l'un des deux feuillets de l'albumen, est alors visible par transparence. Tenant la graine entre deux doigts, le sillon vers le bas, on effectue au moyen d'un scalpel stérile, une entaille transversale, profonde d'un à deux millimètres, vers le milieu de la graine à l'extrémité et au ras des deux cotylédons accolés de l'embryon. On pratique ensuite sur le côté une seconde entaille longitudinale, dans le plan et au niveau de l'embryon. La portion du feuillet supérieur ainsi délimitée et découpée est soulevée délicatement avec la pointe du scalpel, de façon à dégager en premier l'extrémité radiculaire de l'embryon, puis l'axe hypocotylé et les cotylédons. L'embryon entièrement découvert, reposant sur le feuillet inférieur auquel il adhère relativement peu, sauf parfois par les cotylédons, est soulevé sur la pointe du scalpel et introduit dans le tube de culture stérile.

Cette méthode n'a été que peu employée puisque j'ai utilisé le plus souvent possible des embryons immatures. Dans ce cas (COLONNA, 1972); l'albumen présente une dureté très inférieure à celle de l'albumen des graines mûres: le trempage préalable dans l'eau stérile n'est pas

nécessaire. L'extraction se trouve facilitée par la faible adhérence, constatée à ce stade, de l'embryon à l'albumen. A la limite l'embryon immature pourrait, dans certains cas, s'extraire par simple pression sur la graine.

2.4. — Milieux et conditions de cultures

Un certain nombre de données de la littérature en ce qui concerne les cultures de tissus (LUTZ, 1928 ; MOREL, 1948 ; HELLER, 1953 ; VAN HOFF, 1971 ; etc...) ou les cultures d'embrs (NARAYANASWAMI et NORSTOG, 1964 ; HALPERIN, 1970 ; THEVENOT et COME, 1971 ; etc...), comme certains essais personnels (COLONNA et al., 1971 ; COLONNA, 1972) m'ont conduit à choisir les conditions de milieu et de culture indiquées ci-après.

Un litre de milieu de culture de base contient :

- | | | |
|--|---|---------------------------------|
| — 9 000 milligrammes de « Bacto agar Difco », | } | macro éléments
selon HELLER, |
| — 20 000 milligrammes de saccharose, | | |
| — 750 milligrammes de KCl, | | |
| — 600 milligrammes de NO_3Na , | | |
| — 250 milligrammes de $\text{SO}_4\text{Mg}.7\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 125 milligrammes de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}.2\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 75 milligrammes de $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$, | } | cligoéléments
selon HELLER, |
| — 1 milligramme de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 1 milligramme de $\text{SO}_4\text{Zn}.7\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 1 milligramme de BO_3H_3 , | | |
| — 0,1 milligramme de $\text{SO}_4\text{Mn}.\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 0,03 milligramme de $\text{SO}_4\text{Cu}.\text{H}_2\text{O}$, | | |
| — 0,03 milligramme de AlCl_3 , | | |
| — 0,03 milligramme de $\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, | } | substances
complémentaires. |
| — 0,01 milligramme de IK, | | |
| — 200 milligrammes de méso-inositol, | | |
| — 3 milligrammes de glycine, | | |
| — 2 milligrammes de cystéine HCl, | | |
| — 1 milligramme d'acide nicotinique, | | |
| — 1 milligramme d'adénine, | | |
| — 1 milligramme de thiamine HCl, | | |
| — 0,8 milligramme de pyridoxine HCl, | } | |

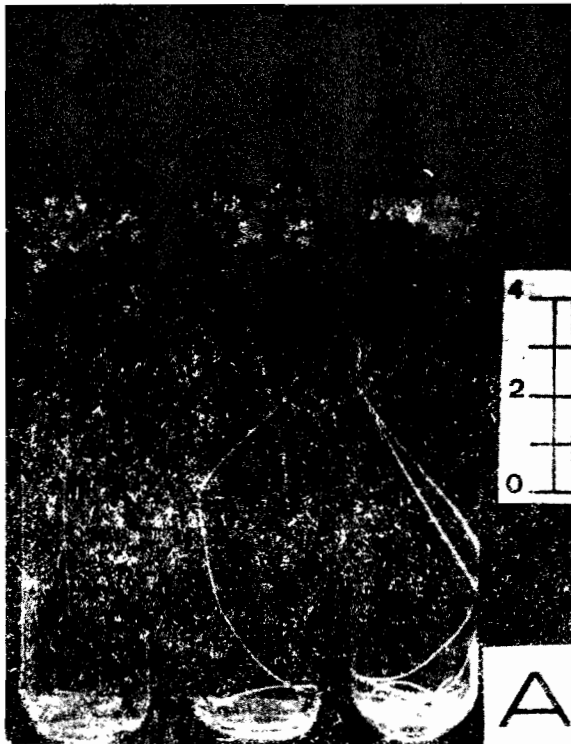
Les tubes de culture reçoivent en général 15 à 20 millilitres de milieu gélosé et un embryon. Les concentrations du milieu de culture en acide chlorogénique sont les suivantes selon les traitements: $0.1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ et même $1 \cdot 10^{-2}$ dans au moins un cas. Ces traitements sont appliqués en absence d'AIA ou en présence de ce composé à la concentration de $2 \cdot 10^{-6}$. Il en est de même dans le cas des autres depsides.

On soumet les embryons à un cycle nycthéral, reproduit en salle climatisée. Les périodes d'éclaircissement et d'obscurité se succèdent sur un rythme de 12 heures. La température varie de 20° C environ au milieu de la période obscure, à 28° C à peu près, au milieu de la période d'éclaircissement. Celui-ci est fourni par des tubes « lumière du jour » et dépasse 4 000 lux.

3. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

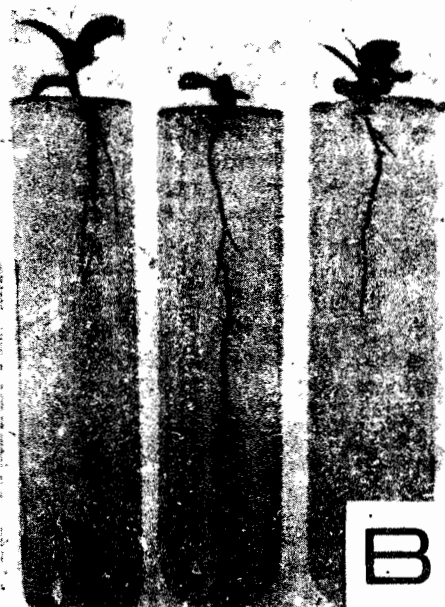
3.1. Croissance comparée des embryons en milieu gélosé et liquide

Les meilleurs développements furent obtenus en milieu liquide, certains embryons dépassent 15 centimètres de long, dont 12 centimètres pour l'axe racinaire, avec trois paires de feuilles bien formées au-dessus des cotylédons (photographie A). Pour les essais en milieu liquide en absence de gélose l'embryon, fiché dans une maille d'un manchon de tulle (photographie A), lui-même ligaturé sur un tube de verre intérieur, se trouve maintenu à hauteur constante ; le niveau est rétabli périodiquement



Photographie A : Embryons de caféiers ayant poussé aseptiquement sur milieu liquide, après plusieurs mois (croissance et développement entretenus par renouvellements aseptiques du milieu).

et aseptiquement. La croissance, bien qu'inférieure (photographie B), fut toutefois plus régulière sur milieu gélosé. Aussi, ai-je retenu ce dernier milieu pour étudier l'action des despsides sur la germination de l'embryon.



Photographie B: Embryons de caféiers ayant poussé aseptiquement sur milieu gélosé, après plusieurs mois (croissance et développement arrêtés par épuisement du milieu non renouvelable).

3.2. — Influence de l'âge des semences

Le travail réalisé ici gagnait évidemment beaucoup à être effectué en pays de production caféière. En effet, le pouvoir germinatif des semences de caféiers diminue généralement d'une façon assez rapide chez les diverses espèces et variétés du genre *Coffea* (COSTE, 1955). Aussi l'âge des semences pouvait avoir une grande importance pour le succès de ces expériences et il convenait tout d'abord de vérifier de quel laps de temps l'on disposait entre la récolte et la mise en culture aseptique de l'embryon ; ceci surtout lorsqu'il s'agissait de graines à maturité.

La faculté de se développer a diminué rapidement chez les embryons de caféiers *robusta* : de 90 pour cent à quatre semaines, elle est descendue à 6 pour cent dès la dixième semaine. L'embryon de caféier *excelsa* a par

contre beaucoup mieux conservé cette faculté qui était encore acceptable au bout de onze semaines. Un essai de germination conduit en serre, en fonction de l'âge des semences a donné des résultats du même ordre. J'ai donc systématiquement travaillé sur des graines *très récemment récoltées* et jamais sur du matériel végétal collecté depuis plus de quatre semaines.

Je n'ai pu obtenir de développement sur des lots d'embryons provenant de semences vieillissantes à faible pouvoir germinatif; l'embryon extrait d'une graine à pouvoir germinatif diminué n'a pas poussé: il semble donc que l'embryon « vieillissant » ait lui-même subi des modifications vraisemblablement irréversibles, empêchant son développement avant même qu'il ne soit freiné ou arrêté par les substances éventuellement issues, au moment de la germination, d'un albumen périmé.

Pour expliquer cette perte assez rapide du pouvoir germinatif chez le caféier, on a pu invoquer (COLONNA, 1972) les effets de la lumière ou le rôle d'un dessèchement trop important; la circulation des gaz et des liquides nécessaires à la germination pourrait être entravée par les déformations, dues à une dessiccation trop intense des plasmodesmes entre cellules de la graine; enfin, la libération d'acides gras, après l'activation de la lipolyse en présence d'oxygène de l'air, entraînerait l'inhibition partielle puis totale du développement de l'embryon. La culture d'embryons de caféiers *in vitro* pourrait peut-être permettre d'aborder l'étude de ce problème.

3.3. Croissance comparée « in vitro » des embryons de diverses variétés de caféiers

La première expérience porte sur des *semences* sélectionnées de caféier *robusta* et de caféier *excelsa* originaires d'Afrique Centrale, ayant subi le traitement désinfectant n° 1 et placées sur milieu gélosé. L'embryon avec ses cotylédons mesurait, au moment de la mise en culture, 6,4 millimètres de long pour le caféier *excelsa* et 5,5 millimètres pour le *robusta*; les longueurs respectives sans les cotylédons se situant à 4,7 et 4,0 millimètres (Tableau n° 2). La longueur a sextuplé en 100 jours pour le caféier *robusta* alors qu'il n'a fallu que 75 jours pour l'*excelsa*. Les racines grandissent plus vite que l'axe hypocotylé. Les feuilles cotylédonnaires se développent deux fois plus rapidement chez le caféier *excelsa*. Dans les conditions de l'expérience, leur développement cesse presque totalement entre le 60° et le 70° jour: la transplantation sur un nouveau milieu devrait alors nécessaire. La première paire de feuille au-dessus des cotylédons apparaît vers le 45° jour pour les deux variétés et se développe rapidement; elle peut apparaître plus tôt et s'accroître à la place des cotylédons si ceux-ci ont été abîmés au moment de la mise en culture stérile. Au 75° jour de culture, on observe la naissance d'une seconde paire de feuilles chez le caféier *excelsa*.

Nombre de jours de cultures	Caféier <i>robusta</i>					Nombre de jours de cultures	Caféier <i>excelsa</i>				
	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V
1	4,0	1,0	3,0	3,0	0	3	4,7	0,5	4,2	3,4	0
18	8,2	3,4	4,8	3,7	0	10	7,6	2,0	5,6	4,1	0
24	10,9	5,6	5,3	3,8	0	21	15,1	7,7	7,4	6,6	0
31	13,5	7,5	6,0	4,1	0	32	19,0	10,9	8,1	8,8	0
39	15,9	9,2	6,7	4,6	0	48	20,9	12,3	8,6	10,1	0
48	17,1	10,1	7,0	4,9	0,2	61	23,1	14,3	8,9	10,8	0,7
59	18,8	11,5	7,3	4,6	1,1	75	25,8	16,6	9,2	10,7	4,1
97	43,0	14,8	8,2	4,6	3,5	-	-	-	-	-	-

Tableau n° 2: Croissance en longueur des diverses parties d'embryon de caféiers *robusta* et *excelsa* cultivés *in vitro* sur milieu gélosé (semences provenant d'Afrique Centrale).

- I : Longueur en millimètres du total racine + axe hypocotylé + tige ;
 II : Longueur en millimètres de la racine ;
 III : Longueur en millimètres de la somme axe hypocotylé + tige ;
 IV : Somme de la longueur des deux cotylédons, en millimètres ;
 V : Somme de la longueur des deux feuilles de rang 1 au-dessus des cotylédons, en millimètres.

	Caféiers		
	<i>Robusta</i>	<i>Néo-Arnoldiana</i>	<i>Excelsa</i>
Longueur des racines en millimètre	5,2	8,1	11,3
Longueur de l'hypocotyle en millimètre	2,6	4,2	4,8
Longueur du total en millimètre ..	10,0	14,2	18,7
« Diamètre » moyen d'un cotylédon	3,7	4,1	4,1
Poids de matière fraîche en milligramme	11,8	24,0	30,0

Tableau n° 3: Croissance et développement d'embryons de trois variétés de caféiers cultivés *in vitro* sur milieu gélosé pendant 90 jours (graines immatures provenant de Madagascar).

Conduite sur des graines immatures de caféiers *robusta*, *excelsa* et *néo-arnoldiana* ayant poussé à Madagascar, la seconde expérience confirme les résultats précédents pour l'ensemble du développement et de la croissance des embryons (Tableau n° 3). Au bout de quatre-vingt-dix jours de culture *in vitro*, le poids frais moyen atteignait pour le caféier *robusta* 40 pour cent et pour le caféier *néo-arnoldiana* 80 pour cent de celui du caféier *excelsa* (différences significatives, avec un coefficient de sécurité de plus de 99 %), de même la longueur de l'hypocotyle se situait à 54 pour cent et 87 pour cent (significatif à plus de 99 %), la longueur totale à 53 pour cent et 76 pour cent (non significatif).

4. ACTION DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE EN PRÉSENCE D'ASA

Sur chaque embryon, les mensurations effectuées au bout d'une cinquantaine de jours concernant les paramètres suivants

- hauteur totale de l'embryon en millimètres, depuis l'extrémité caulinaire jusqu'à la pointe de l'axe racinaire, qui est généralement la racine la plus longue (paramètre 1) ;
- hauteur de l'axe hypocotylé et de la tige en millimètres, depuis le collet jusqu'à l'extrémité caulinaire (paramètre 2) ;
- longueur en millimètres de l'axe racinaire, c'est-à-dire généralement de la racine la plus longue, depuis le collet jusqu'à l'extrémité radiculaire (paramètre 3) ;

Variétés et races de caféiers	Acide chlorogénique dans le milieu	1	2	3	4	5
<i>Robusta</i>	0 1.10 ⁻⁶ 1.10 ⁻⁴ 1.10 ⁻³	10,5 13,8 15,5 5,7	5,5 6,0 6,2 2,8	5,0 7,8 9,3 2,8	5,7 12,5 12,2 2,8	3,6 3,7 4,0 2,7
<i>Néo-Arnoldiana</i>	0 1.10 ⁻⁶ 1.10 ⁻⁴ 1.10 ⁻³	14,8 16,7 16,1 9,3	7,2 8,7 8,3 4,5	7,7 8,0 7,8 4,8	16,3 24,5 17,3 9,0	5,7 5,7 6,1 4,0
<i>Excelsa</i>	0 1.10 ⁻⁶ 1.10 ⁻⁴ 1.10 ⁻³	19,0 19,7 21,8 7,0	9,7 10,0 10,7 3,7	9,3 9,7 11,2 3,3	17,0 17,2 26,8 7,3	5,6 5,7 6,2 4,1
F calculé pour la variation due à l'acide chlorogénique.....		16,1 (***)	17,5 (***)	9,3 (***)	5,5 (**)	6,8 (**)
F calculé pour la variation due aux « variétés »		7,2 (**)	13,8 (***)	2,2	5,6 (**)	17,1 (***)
F calculé pour l'interaction « acide chlorogénique X variétés »		1,0	1,0	0,8	0,8	0,2
Plus petite différence significative (P = 0,05)		5,7	2,6	4,0	11,7	1,5

Tableau n° 4: Effets de doses croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture sur la croissance d'embryons de trois types de caféiers, en présence d'AIA à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$.

1 = hauteur totale en millimètres; 2 = Hauteur en millimètres de l'axe hypocotylé et de la tige; 3 = Longueur en millimètres de l'axe racinaire principal; 4 = Longueur totale du système racinaire en millimètre; 5 = Diamètre moyen d'un cotylédon en millimètre; *** Très largement significatif; ** Largement significatif.

- longueur totale en millimètres du système racinaire, c'est-à-dire longueur de l'axe principal augmenté des longueurs ajoutées des racines secondaires (paramètre 4) ;
- diamètre moyen en millimètres d'un cotylédon (paramètre 5) ; cette valeur provient de quatre mesures par embryon.

4.1. Evolution d'embryons de caféiers issus de graines mûres en présence de doses croissantes d'acides chlorogénique et d'AIA (2.10^{-6})

La première expérience porte sur les trois variétés ou races de caféiers déjà citées : *robusta*, *néo-arnoldiana* et *excelsa*, selon les modalités décrites ci-dessus (§ 2). Six répétitions représentent chaque traitement. Ceux-ci correspondent aux concentrations du milieu en acide chlorogénique (purissimum), à savoir : 0, 1.10^{-6} , 1.10^{-4} et 1.10^{-2} . Avec six répétitions, quatre traitements et trois variétés, l'expérience comporte soixante-douze degrés indépendants pour l'interprétation statistique d'ensemble. Les résultats de cette interprétation, comme les valeurs moyennes de chaque paramètre pour chaque traitement figurent au tableau n° 4.

On constate tout d'abord que l'interaction « *concentration en acide chlorogénique x variété* » n'est jamais significative ; les embryons des trois types de caféiers étudiés réagissent de la même façon à des doses croissantes d'acide chlorogénique dans leur milieu de culture.

L'effet « *variété* » est toujours largement significatif, sauf toutefois pour la longueur de l'axe racinaire (paramètre 3). Cela veut dire que si les réactions à l'acide chlorogénique en présence d'AIA ont toujours la même allure elles se situent à des niveaux différents pour les divers caféiers. Ce sont les embryons de caféiers *excelsa* qui possèdent en général le meilleur développement.

L'effet « *acide chlorogénique en présence d'AIA* » apparaît comme largement à très largement significatif. Les différences significatives se situent entre le traitement 1.10^{-3} , qui amène une *inhibition* de la croissance et le traitement 1.10^{-4} qui correspond à une *probable stimulation* de la croissance. Cette stimulation débiterait dès que la concentration du milieu en acide chlorogénique atteindrait 1.10^{-6} ; entre les traitements 0 et 1.10^{-6} le seuil de signification n'est pas atteint pour les différences que l'on enregistre.

Les résultats correspondants au traitement 1.10^{-3} , ne figurent pas ici car ils manquaient pour le caféier *néo-arnoldiana*. J'indiquerai qu'ils sont très proches de ceux relatifs aux traitements 1.10^{-6} et 1.10^{-4} . Leur prise en considération ne modifierait pas l'interprétation d'ensemble de ces expériences.

Une seconde expérience, conduite sur caféier *arabica* dans des conditions identiques, mais avec quatre répétitions seulement et les traitements 0, 1.10^{-6} , 1.10^{-3} et 1.10^{-4} , complète et confirme ces données : les traitements 1.10^{-6} , 1.10^{-3} et 1.10^{-4} correspondent bien à une probable stimulation de la

croissance par rapport au témoin sans acide chlorogénique. Pour le traitement 1.10^{-4} il n'y a pas d'inhibition; celle-ci ne débiterait, comme pour les autres caféiers, qu'à des concentrations plus élevées (Tableau n° 5).

Acide chlorogénique dans le milieu	1	2	3	4	5
0	16,5	5,8	10,8	16,5	3,0
1.10^{-3}	26,5	7,8	18,8	26,5	3,0
1.10^{-3}	24,5	8,2	16,3	20,8	3,3
1.10^{-4}	19,0	8,0	11,0	13,5	3,5

Tableau n° 5: Effets de doses croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture sur la croissance d'embryons de caféier *arabica*. Les mesures sont exprimées en millimètres. 1, 2, 3, 4, et 5: voir tableau n° 4).

4.2. -- Confirmation, dès les premiers stades du développement de l'embryon, des caractères spécifiques des quatre types de caféiers étudiés; maintien de ces caractères en présence d'acide chlorogénique

L'ensemble des expériences ci-dessus font ressortir que, dès le début du développement de l'embryon, apparaissent les caractères morphologiques que l'on retrouvera chez les quatre types de caféiers ci-dessus, à l'état adulte.

En effet, si l'on considère le traitement témoin, sans acide chlorogénique, on constate que « l'axe hypocotylé et la tige » (paramètre 2) sont plus longs pour les *excolsoïdes* (8,5 mm) que pour les caféiers *arabica* (5,8) et *robusta* (5,5); de même, le « diamètre des cotylédons », qui n'est que de 3,0 et 3,6 millimètres pour ces deux derniers types de caféiers, atteint au moins 5,6 millimètres pour les *excolsoïdes*: ceci préfigure bien le fait que les *excolsoïdes* deviennent des arbres et les deux autres caféiers des arbustes (Tableau n° 6).

Peu d'études portent finalement sur le système racinaire adulte des diverses espèces de caféiers et il ne me semble pas que l'on puisse indiquer actuellement quel caféier, de l'*arabica* ou du *robusta* ni même des *excolsoïdes* présente le meilleur développement dans ce domaine. L'importance de ce caractère mériterait peut-être que l'on tente d'obtenir quelques précisions à ce sujet. Deux indications apparaîtraient ici: le caféier *arabica* posséderait le meilleur enracinement vertical avec, dans le même temps, production d'un axe racinaire principal (10,8) deux fois plus long que le caféier *robusta* (5,0); cette dernière variété ne développerait qu'un système racinaire (5,7) moins ramifié et moins important que les *excolsoïdes* (16,7) et l'*arabica* (16,5).

Si l'on tient compte maintenant des valeurs obtenues après application des traitements 1.10^{-6} et 1.10^{-4} , présents pour les quatre types de caféiers dans les expériences précédentes, on remarquera que la stimulation qu'ils entraînent ne modifie pas les constatations précédentes ; j'ai déjà signalé en effet, que l'interaction « acide chlorogénique x variété » n'est pas significative.

Types de caféiers	Hauteur de l'axe hypocotyle	Diamètre moyen des cotylédons	Longueur de la racine principale	Longueur totale des racines	Hauteur de l'embryon
Valeurs pour le traitement témoin sans acide chlorogénique					
<i>Robusta</i>	5,5	3,6	5,0	5,7	10,5
<i>Arabica</i>	5,8	3,0	10,8	16,5	16,5
<i>Néo-Arnoldiana</i>	7,2	5,7	7,7	16,3	14,8
<i>Excelsa</i>	9,7	5,6	9,3	17,0	19,0
Valeurs moyennes pour les traitements 1.10^{-3} et 1.10^{-4}					
<i>Robusta</i>	6,1	3,9	8,6	12,4	14,7
<i>Arabica</i>	7,9	3,3	14,9	20,0	22,8
<i>Néo-Arnoldiana</i>	8,5	5,9	7,9	20,9	16,4
<i>Excelsa</i>	10,4	6,0	10,5	22,0	20,8

Tableau n° 6: La présence d'acide chlorogénique dans le milieu de culture, à doses relativement faibles, ne modifie pas les caractères morphologiques des embryons, qui annoncent ceux des plants adultes pour les divers types de caféiers étudiés. (Les valeurs sont indiquées en mm).

4.3. Evolution d'embryons de caféiers issus de graine immatures, en présence de doses croissantes d'acide chlorogénique et d'AIA à la concentration de 2.10^{-6}

Cette expérience qui concerne le caféier *excelsa* comporte six répétitions et six traitements constitués par six concentrations différentes d'acide chlorogéniques (purissimi) dans le milieu gélosé de culture: 0, 1.10^{-7} , 1.10^{-6} , 1.10^{-5} , 1.10^{-4} et 1.10^{-3} . La croissance est suivie par la détermination des paramètres cités précédemment au bout d'une cinquantaine de jours.

L'effet des traitements sur ces paramètres apparaît sur la figure n° 1 ; l'interprétation statistique avec indication de la valeur calculée de F (SNEDECOR, 1934, 1946), de son degré de signification (asterisques) et de la plus petite différence significative entre deux traitements à $P = 0.05$, est donnée au tableau n° 7.

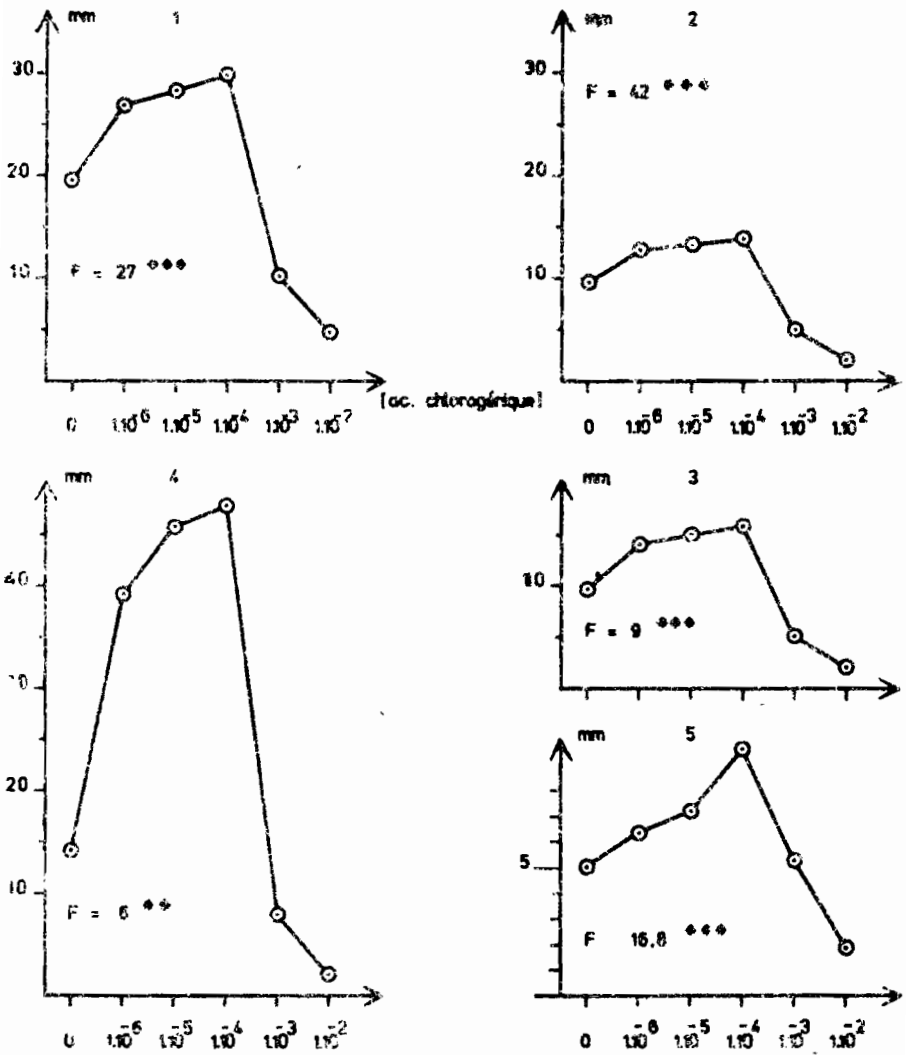


Figure n° 1. Effets de concentrations croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture sur la croissance et le développement d'embryons immatures de caféiers *excelsa*, en présence d'AIA à la concentration de 2.10^{-4} .

1. Hauteur totale de l'embryon ;
 2. Hauteur de l'axe hypocotylé et de la tige ;
 3. Longueur de la racine la plus longue ;
 4. Longueur totale de racines ;
 5. Diamètre moyen d'un cotylédon ; $F = s^2/s'^2$ (Snedecor).
- *** Très largement significatif,
 ** Largement significatif.

Si l'on considère le traitement 0, on remarque qu'en absence d'acide chlorogénique, les embryons de caféiers *excelsa* mûrs ou immatures, provenant à des époques différentes de la même population, grandissent à peu près de la même façon pendant le même laps de temps: il y a en effet une bonne *concordance* pour la hauteur totale de l'embryon (19,0 et 19,5 mm), pour la hauteur de l'axe hypocotylé (9,7 et 9,7 mm), pour la hauteur de l'axe circulaire principal (9,3 et 9,0 mm), pour la longueur totale de racines (17,0 et 14,0 mm) comme pour le diamètre moyen d'un cotylédon (5,6 et 5,0 mm), entre l'expérience précédente (Tableau n° 4, *excelsa*, traitement 0) et celle-ci (Tableau n° 7, figure n° 1), (Photographies C, E, F).

Cette concordance veut dire que, si l'embryon de taille normale et achevée mais encore immature présente des potentialités de développement plus complètes que l'embryon à maturité, ces potentialités ne se sont pas révélées ici, en absence d'acide chlorogénique. Par contre, ces potentialités de l'embryon immature sembleraient révélées par les traitements 1.10^{-6} , 1.10^{-3} et 1.10^{-1} pour lesquels on obtient une meilleure croissance ici, que dans l'expérience précédente. Cette remarque paraît compatible avec les considérations déjà émises au sujet de l'influence de l'âge des semences sur la germination et la croissance de l'embryon: celui-ci, en effet, subirait en vieillissant, et dès la maturation, des modifications irréversibles conduisant en quelques semaines à la perte du pouvoir germinatif.

4.3.1. Stimulation de la croissance des embryons immatures de caféiers *excelsa* par des concentrations de 1.10^{-6} à 1.10^{-1} d'acide chlorogénique dans le milieu de culture, en présence d'AIA

En présence d'AIA, pour la hauteur totale de l'embryon (paramètre 1), une *stimulation de la croissance* (Figure n° 1.), *significative par rapport au témoin* (Tableau n° 7), apparaît nettement pour les traitements 1.10^{-6} , 1.10^{-3} et 1.10^{-1} , qui ne sont pas significativement différents entre eux. Il en est exactement de même pour la hauteur de l'axe hypocotylé et de la tige (paramètre 2). Le même fait se retrouve pour la longueur de l'axe racinaire (paramètre 3) comme pour la longueur totale du système racinaire (paramètre 4): la stimulation est toutefois légèrement insuffisante pour que les valeurs correspondant au traitement 1.10^{-6} soit significativement différentes de celles relatives au traitement sans acide chlorogénique. On se trouve aussi dans ce dernier cas, pour le diamètre moyen d'un cotylédon (paramètre 5). La stimulation de la croissance paraît donc ici certaine pour les traitements 1.10^{-3} et 1.10^{-1} : il y a toujours différences significatives avec le témoin pour ces deux objets; cette stimulation commence avec la concentration de 1.10^{-6} d'acide chlorogénique dans le milieu (différences significatives pour deux paramètres sur cinq, s'approchant du seuil de signification pour les trois autres). Il résulte de ceci que *l'acide chlorogénique de la graine* peut, à côté d'autres rôles, avoir un *effet positif au moment de la germination*.

Trait.	Trait.		0	1.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	1.10 ⁻²
	M	M	19,5	26,8	28,3	29,7	10,2	4,7
1.10 ⁻² ...	4,7		+	+	+	+	—	
1.10 ⁻³ ...	10,2		+	+	+	+	F = 27***	
1.10 ⁻⁴ ...	29,7		+	—	—	PPDS = 5,7		
1.10 ⁻⁵ ...	28,3		+	—				
1.10 ⁻⁶ ...	26,8		+					
0	19,5		<i>Paramètre 1 : Hauteur totale en millimètre.</i> De l'embryon.					

Trait.	Trait.		0	1.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	1.10 ⁻²
	M	M	9,8	14,2	15,2	15,8	5,2	2,2
1.10 ⁻⁴ ..	2,2		+	+	+	+	—	
1.10 ⁻³ ..	5,2		+	+	+	+	F = 8,9***	
1.10 ⁻⁴ ...	15,8		+	—	—	PPDS = 5,4		
1.10 ⁻⁵ ...	15,2		+	—				
1.10 ⁻⁶ ...	14,2		—					
0 ...	9,8		<i>Paramètre 3 : Longueur en millimètre de l'axe racinaire (racine la plus longue).</i>					

Trait.	Trait.		0	1.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	1.10 ⁻²
	M	M	5,0	6,3	7,2	9,6	5,3	1,9
1.10 ⁻² ...	1,9		+	+	+	+	+	
1.10 ⁻³ ..	5,3		—	—	+	+	F = 17***	
1.10 ⁻⁴ ...	9,6		+	+	+	PPDS = 1,8		
1.10 ⁻⁵ ...	7,2		+	—				
1.10 ⁻⁶ ...	6,3		—					
0 ...	5,0		<i>Paramètre 5 : Diamètre moyen en millimètre d'un cotylédon.</i>					

Trait.	Trait.		0	1.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	1.10 ⁻²
	M	M	9,7	12,7	13,2	13,8	5,0	2,3
1.10 ⁻² ..	2,3		+	+	+	+	+	
1.10 ⁻³ ..	5,0		+	+	+	+	F = 42***	
1.10 ⁻⁴ ...	13,8		+	—	—	PPDS = 2,1		
1.10 ⁻⁵ ...	13,2		+	—				
1.10 ⁻⁶ ...	12,7		9,7					
0 ...	+		<i>Paramètre 2 : Hauteur en millimètre de l'axe hypocotylé et de la tige.</i>					

	Trait.		0	1.10^{-6}	1.10^{-5}	1.10^{-4}	1.10^{-3}	1.10^{-2}
Trait.	M	M	14,0	39,3	45,8	47,8	8,0	2,2
1.10^{-3} ..	2,2		—	+	+	+	—	
1.10^{-2} ..	8,0		—	+	+	+	F = 6**	
1.10^{-4} ...	47,8		+	—	—	PPDS = 25,8		
1.10^{-5} ...	45,8		+	—				
1.10^{-6} ...	39,3		—					
0 ..	14,0							

Paramètre 4 : Longueur totale en millimètre du système racinaire.

Tableau n° 7: Signification des différences entre paramètres rendant compte de la croissance des embryons *immatures* de caféier *excelsa*, soumis à des concentrations croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture, en présence d'AIA (2.10^{-6}).

+ = différences significatives entre deux traitements;
 — = différences non significatives.

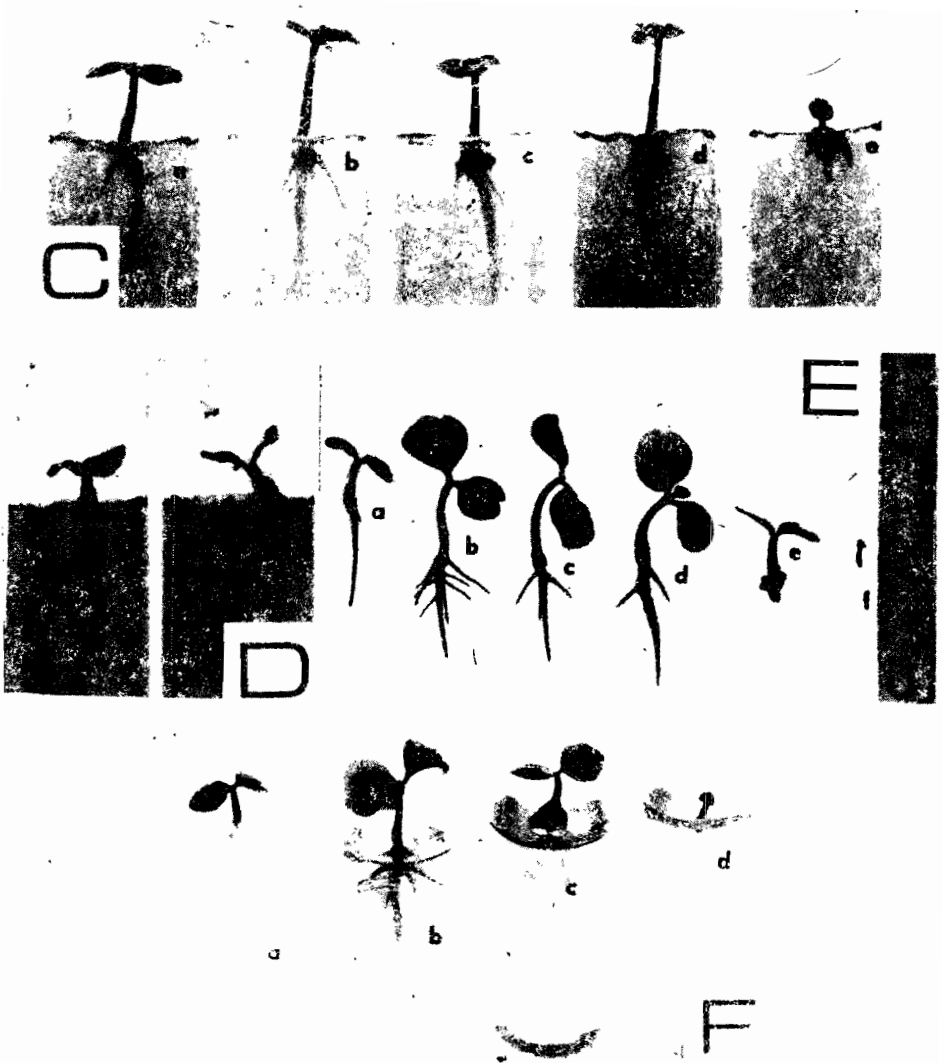
4.3.2. Inhibition de la croissance des embryons immatures de caféiers *excelsa* par des concentration de l'ordre de 1.10^{-5} d'acide chlorogénique dans le milieu de culture, en présence d'AIA

Pour tous les paramètres considérés, sauf la longueur totale du système racinaire, les valeurs atteintes pour les traitements 1.10^{-5} sont significativement inférieures à celles qui correspondent au témoin: il y a *inhibition* de la croissance des embryons à cette concentration élevée de depsides caféyl-3 quinique dans le milieu de culture. Il en est de même pour le traitement 1.10^{-2} pour lequel l'embryon ne subit pratiquement pas de développement. Il n'y a pas de différences significatives entre ces deux traitements.

4.4. Les fortes concentrations en acide chlorogéniques (1.10^{-2} du milieu de culture provoquent, en présence d'AIA, l'apparition de « tumeurs » au niveau racinaire

Une production importante d'embryons croissant, en présence d'AIA, sur un milieu de culture atteignant la concentration de 1.10^{-2} en acide chlorogénique présente des symptômes remarquables. Ces embryons montrent en effet:

- un raccourcissement du système racinaire (photographies C et D) pouvant aller jusqu'à la disparition totale des racines (photographies E et F d);
- un épaississement du collet et de la partie supérieure des racines en une sorte de *tumeur* de couleur brune d'aspect nodulaire et de dimensions souvent importantes (photographies E et F c).



Photographies C, D, E et F: Effets de concentrations croissantes d'acide chlorogénique (a, b, c, d, e et f) dans le milieu de culture, en présence d'AIA ($2 \cdot 10^{-2}$), sur la croissance et le développement d'embryons de caféiers

- C caféier *excelsa*, a = 0, b = $1 \cdot 10^{-4}$, c = $1 \cdot 10^{-3}$, d = $1 \cdot 10^{-2}$, e = $1 \cdot 10^{-1}$
- D caféier *néo-arnoldiana*, $1 \cdot 10^{-3}$;
- E caféier *excelsa*, a = 0, b = $1 \cdot 10^{-3}$, c = $1 \cdot 10^{-2}$, d = $1 \cdot 10^{-1}$, e = $1 \cdot 10^0$, f = $1 \cdot 10^1$;
- F, caféier: *excelsa*, a = 0, b = $1 \cdot 10^{-3}$, c = $1 \cdot 10^{-2}$, d = $1 \cdot 10^{-1}$;

on remarquera le raccourcissement et l'épaississement des racines provoqués par le traitement à $1 \cdot 10^{-3}$; on remarquera l'inhibition totale de la croissance entraînée par le traitement $1 \cdot 10^{-1}$.

Ces « tumeurs » apparaissent surtout chez les *excelsoides*, sur embryons mûrs comme sur embryons immatures. De formes grossièrement cubique ou isodiamétrique, elles peuvent être assez grosses et atteindre des dimensions de l'ordre de 5 à 6 millimètres en hauteur comme en épaisseur chez le caféier *néo-arnoldiana* ou même un peu plus grandes chez le caféier *excelsa*. Ces dimensions sont inférieures chez le caféier *arabica* pour lequel le traitement 1.10^{-3} n'a d'ailleurs pas pu être appliqué. Ce phénomène est beaucoup moins net chez le caféier *robusta*, du moins au cours de ces expériences.

Les pourcentages d'apparition de ces « tumeurs » dans les différents cas étudiés, figurent au tableau n° 8. Pour le traitement 1.10^{-2} , la racine ne subit pratiquement aucun développement mais prend l'aspect brun et parfois un peu granuleux correspondant à ces massifs cellulaires. On compte un certain nombre de « tumeurs » dès le traitement 1.10^{-3} , sans que les racines disparaissent pour autant. Ainsi, l'effet stimulateur de ce traitement sur la croissance des cotylédons, de l'axe hypocotylé et des racines s'accompagne d'autres manifestations moins positives ; on atteint là probablement la limite supportable par les embryons pour le taux d'acide chlorogénique dans le milieu.

Bien qu'ayant pu les fixer et les inclure dans la paraffine, selon les méthodes habituelles, je n'ai pas disposé du temps nécessaire pour examiner l'organisation interne de ces massifs cellulaires.

Acide chlorogénique dans le milieu	Embryons à maturité des caféiers :				Embryons immatures de caféier
	<i>Robusta</i>	<i>Néo- Arnol- diana</i>	<i>Excelsa</i>	<i>Arabica</i>	
	P. 100	P. 100	P. 100	P. 100	P. 100
0	0	0	0	0	0
1.10^{-6}	0	0	0	0	0
1.10^{-5}	0	0	0	0	0
1.10^{-4}	0	20	45	30	38
1.10^{-3}	10*	60	88		65

Tableau n° 8: Apparition de « tumeurs » au niveau racinaire, en présence d'AIA, pour les fortes concentrations du milieu en acide chlorogénique (* = peu net).

5. CONCLUSIONS

La mise au point d'une méthode d'isolement et de culture *in vitro* d'embryons de caféiers constitue le premier acquit de ces travaux.

Devant la fragilité et la taille réduite de cet embryon enfoui entre les couches de l'albumen très dur du grain de café mûr, la réussite dans ce domaine apparaissait comme aléatoire.

On signalera quelques résultats méthodologiques décisifs.

- tout d'abord, le traitement qui répond le mieux à la nécessité de désinfecter la graine consiste en « un trempage dans l'éthanol à 95° GL durant trois minutes, après application d'un vide de 30 millimètres de mercure pendant une minute, suivi d'un second trempage de cinq minutes dans l'hypochlorite de calcium (200 degrés chlorométriques) ».

-- ensuite, la possibilité d'utiliser des graines de taille adulte mais encore immatures facilitera l'isolement de l'embryon.

Il convient de noter qu'au passage, ces expériences établissent que la perte rapide du pouvoir germinatif du grain de café provient non seulement d'une éventuelle modification biochimique défavorable de l'albumen, mais aussi d'une évolution négative, très probable, de l'embryon lui-même.

En tout cas, l'étude de ces changements, survenant chez l'embryon dans les quelques semaines qui suivent la récolte, apparaît maintenant possible en culture *in vitro* et en absence de l'albumen.

Pour en arriver aux résultats principaux de cette étude, correspondant aux objectifs initialement fixés, nous dirons que trois séries de faits sont nettement établis.

En premier, on peut affirmer que les embryons des divers types de caféiers, mis en comparaison, réagissent de la même façon aux concentrations croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture. En effet, l'interaction « variétés X concentrations en acide chlorogénique » n'est jamais significative.

La seconde série de faits montre que l'effet « variétés » est significatif. Dès les premiers stades de développement de l'embryon, on constate que les caféiers *excelsoides*, qui deviendront des arbres, présentent un meilleur développement de l'appareil végétatif aérien que les caféiers *robusta* et même *arabica*, qui resteront des arbustes. De plus, l'axe racinaire vertical et principal du caféier *arabica* croîtrait plus rapidement que celui des autres caféiers, conférant à cette espèce un avantage certain. Enfin, le caféier *robusta* ne posséderait qu'un système racinaire moins ramifié. Une étude de l'enracinement des divers types de caféiers paraît souhaitable.

Il ressort, sans aucun doute, de la troisième et dernière série de faits, que l'effet « traitement » est aussi significatif, c'est-à-dire que, en présence

d'AIA, les doses croissantes d'acide chlorogénique dans le milieu de culture provoquent :

- d'une part, une *stimulation* de la croissance de l'embryon de caféier aux doses de 1.10^{-6} à 1.10^{-4} et,
- d'autre part, une inhibition de cette croissance débutant pour des doses de 1.10^{-3} puis devenant totale à la concentration de 1.10^{-2} .

Ainsi, l'acide chlorogénique aurait une action sur la croissance des embryons de caféiers. Cette action peut être attribuée, ici, au rôle protecteur de l'acide chlorogénique vis-à-vis de l'auxine; rôle qu'il exercerait par l'intermédiaire de son action inhibitrice sur l'activité auxine-oxydasique.

Il reste à vérifier maintenant l'existence d'une éventuelle action spécifique de l'acide chlorogénique sur la croissance. La recherche de cette éventuelle action directe du depside fait l'objet de mes travaux actuels.

BIBLIOGRAPHIE

- CHEVALIER (A.), 1940. — Nouveau groupement des espèces du genre *Coffea* et spécialement de celles de la section *Eucoffea*. *C.R. Acad. Sc.*, **210**, 357-361.
- CHEVALIER (A.), 1942. — Les caféiers du globe. II: Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des rubiacées pries pour des caféiers. *Paul Lechevalier Ed.*, Paris, 1942, 36 pp.
- COLONNA (J.-P.), 1972. — Contribution à l'étude de la culture *in vitro* d'embryons de caféiers. Action de la caféine. *Café, cacao, thé*, **16 (3)**, 193-203.
- COLONNA (J.-P.), 1973. — Contribution à l'étude des caféiers cultivés en République Centrafricaine et de leur alimentation minérale (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta* et *Coffea dewevrei* de Wildeman et Durand, race *C. excelsa*) *Thèse Doct. Spéc.*, Toulouse, 1973, 143 pp.
- COLONNA (J.-P.), 1978. — L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches: leur participation au métabolisme et leur signification. *Thèse Doct. Etat*, Toulouse, 20 octobre 1978, 210 pp.: *Travaux Doc. ORSTOM*, **102**, 210 pp.
- COLONNA (J.-P.), 1979. — L'acide chlorogénique et les depsides, composés phénoliques naturels des caféiers: leur signification biologique; leur intérêt scientifique, économique et pratique. *Acad. Malgache*, Comm. 18 janvier 1979, 16 pp.
- COLONNA (J.-P.), 1980a. — Effets de l'acide chlorogénique et des depsides sur les organismes vivants. I: Actions comparées de la caféine et de l'acide chlorogénique sur la physiologie humaine et animale. *Ann. Univ. Madagascar*, en cours de parution.

- COLONNA (J.-P.), 1980b. — Effets de l'acide chlorogénique et des depsides sur les organismes vivants. II : Actions sur le fonctionnement des végétaux. *Ann. Univ. Madagascar*, en cours de parution.
- COLONNA (J.-P.), CAS (G.) et RABECHAUULT (H.), 1971. — Mise au point d'une méthode de culture *in vitro* d'embryons de caféiers. Applications à deux variétés de caféiers cultivés. *C.R. Acad. Sc.*, **272**, 60-63.
- COSTE (R.), 1955. — Les caféiers et les cafés dans le monde. I : Les caféiers. *Larose Ed.*, Paris, 1955.
- HALPERIN (W.), 1970. — Embryos from somatic plant cells. *Symp. Intern. Soc. All. Biol. (USA)*, **9**, 169-191.
- HELLER (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11^e sér., **14 (1)**, 1-291.
- LUTZ (L.), 1928. — Sur le rôle biologique du tanin dans la cellule végétale. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **75 (1-2)**, 9-18.
- MOREL (G.), 1948. — Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. *Ann. Epiphytes, sér. Path. Vég.*, **14 (5)**, 1-112.
- NARAYANASWAMI (S.) et NORSTOG (K.), 1964. — Plant embryo culture. *Bot. Rev.*, **30 (4)**, 233-239.
- SNEDECOR (G.-W.), 1934. — Calculation and interpretation of analysis variance et co-variance. *Collegiate Press, Ames Iowa, USA*, 1934.
- SNEDECOR (G.-W.), 1946. — Statistical methods applied to esperiment in agriculture and biology: *Collegiate Press, Ames Iowa, USA*, 1946.
- THEVENOT (C.) et COME (D.), 1971. — Germination des embryons de pommier (*Pirus malus L.*) dormants amputés d'une partie plus ou moins importante de leurs cotylédons. *C.R. Acad. Sc.*, **272**, 1240-1243.
- VAN HOFF (P.), 1971. — Méthodes de culture *in vitro* de méristèmes pour l'obtention d'œillets non virosés. *Parasitica*, **27 (2)**, 27-35.