

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Relations entre l'inhibition par la caféine de la croissance des embryons de Caféiers et leur teneur en phénols totaux.* Note (*) de M. **Henri Rabéchault** et M^{me} **Geneviève Cas**, présentée par M. Lucien Plantefol.

La caféine *stimule* la croissance des embryons de Caféiers en culture *in vitro* pour des concentrations inférieures à $1 \cdot 10^{-4}$ et *l'inhibe* proportionnellement au-dessus de cette concentration ; il n'existe pas de « seuil de toxicité ». Entre $2,5$ et $7,5 \cdot 10^{-4}$ l'inhibition est inversement proportionnelle à la teneur de l'espèce en alcaloïde. Ce caractère, la disparition progressive de l'inhibition associée à la variation de la teneur en phénols et le fait que la synthèse des phénols est d'autant plus importante que le milieu de culture est plus riche en caféine, militent en faveur de l'existence d'un système de désintoxication : phénols-caféine chez le Caféier.

Les teneurs des Caféiers en caféine sont très diverses. Certains Caféiers sauvages de Madagascar n'en renferment pas, tandis que chez les espèces cultivées la caféine représente de 0,80 (*Coffea excelsa*) à 3,5 % (*C. robusta*) de la matière sèche [Coste (4)]. Nous nous sommes demandés si le Caféier est vraiment insensible à son alcaloïde et dispose d'une résistance naturelle. Dans ce cas est-ce que les espèces qui renferment peu de caféine sont plus sensibles que celles qui en renferment beaucoup ?

A la suite de la mise au point dans notre laboratoire d'une technique de culture *in vitro* des embryons de Caféiers (3), Colonna (2) a tenté, à notre suggestion, d'apporter, à Madagascar, une réponse à ces questions. Malheureusement il signale que son matériel était très hétérogène et qu'il a eu des difficultés pour la désinfection des graines. D'ailleurs, les photographies des plus beaux spécimens de plantules témoins de ses expériences montrent que leur racine principale ne s'est pas développée.

Les résultats, ainsi obtenus par cet auteur, l'ont amené à conclure à l'existence d'un « seuil de toxicité » très élevé $1 \cdot 10^{-2}$ (10 g/litre) qui n'a donc rien de spécifique. Il a observé des différences de sensibilité entre les espèces et a émis l'hypothèse d'une zone de stimulation de la croissance que nous avons cherché à vérifier et à délimiter chez les espèces *Coffea robusta*, *C. arabica* et *C. excelsa*.

Pendant si le Caféier est sensible au-delà d'une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ (0,2 % de la matière fraîche), comment peut-on imaginer qu'il puisse synthétiser et stocker sans dommages dans ses graines des quantités de caféine 5 à 30 fois supérieures ? Rabéchault (12) a suggéré l'existence d'un processus de désintoxication au moyen des polyphénols : l'acide chlorogénique, en particulier, formerait avec la caféine des complexes inoffensifs.

Nous nous proposons donc de vérifier ici ces diverses hypothèses concernant la toxicité de la caféine et ses relations avec la teneur des embryons en phénols.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les semences ont été récoltées à la Station de l'Institut français de recherches sur le café et le cacao (IFCC) de Bingerville (Côte-d'Ivoire) et utilisées 15 jours seulement après leur récolte afin de limiter le plus possible leur déshydratation. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le tableau I.

La méthode de désinfection des graines et de prélèvement aseptique des embryons ainsi que le milieu et les conditions de culture ont été décrits précédemment (3).

1. FEV. 1974

O. R. S. T. O. H.

Collection de Référence

6653 Bio Israel

Après désinfection nous avons augmenté le temps de trempage dans la quatrième eau de rinçage (48 h), ce qui a facilité l'extraction des embryons.

Nous avons effectué 2 expériences en vue de déterminer les *effets de la caféine sur la croissance*. Elles portaient sur les 3 espèces précitées et comprenaient 7 traitements. Au milieu de base ⁽³⁾ nous avons ajouté de la caféine selon les concentrations suivantes : traitements : 0 = Témoin ; 1 = $2,5 \cdot 10^{-5}$ (25 mg/litre) ; 2 = $5 \cdot 10^{-5}$ (50 mg/litre) ; 3 = $1 \cdot 10^{-4}$ (100 mg/litre) ; 4 = $2,5 \cdot 10^{-4}$ (250 mg/litre) ; 5 = $5 \cdot 10^{-4}$ (500 mg/litre) ; 6 = $1 \cdot 10^{-3}$ (1 000 mg/litre).

Les relations entre la toxicité de la caféine et la teneur des embryons en phénols ont été appréciées à l'aide d'une troisième expérience pour les besoins de laquelle nous n'avons retenu que le *C. robusta* et le *C. excelsa*, très différents quant à leurs teneurs naturelles en caféine et à leurs systèmes tanniques ⁽¹²⁾, et seulement trois doses de caféine dans les milieux : 0, 250 et 1 000 mg/litre. La concentration 250 mg/litre a été choisie parce qu'elle ne provoque qu'une inhibition temporaire, et la concentration 1 000 mg/litre parce qu'à cette dose l'inhibition est persistante.

La teneur en caféine a été déterminée selon la méthode de Kum-Tatt ⁽⁶⁾. Les phénols ont été dosés à l'aide du réactif de Folin et Ciocalteu selon la méthode de Bray et Thorpe ⁽¹⁾ préconisée par Tanguy ⁽¹⁴⁾.

RÉSULTATS. — a. *Effets de la caféine sur la croissance (pl. I et II)*. — La caféine inhibe la croissance de la plantule (pl. I ; pl. II, fig. A), mais cette inhibition ne se réalise pas de la façon subite qui caractériserait l'existence d'un « seuil de toxicité » comme l'a signalé Colonna ⁽²⁾. Elle a été graduelle et proportionnelle à la concentration entre 1 mg/litre et 1 000 mg/litre chez le *C. arabica* dans les conditions de l'expérience. Chez les *C. robusta* et *C. excelsa* l'inhibition proportionnelle fait suite à une zone de stimulation qui s'étend de 1 à 100 mg/litre ; cette inhibition porte surtout sur la racine. Entre 250 et 750 mg/litre la sensibilité était plus grande pour *C. arabica* et *excelsa* que pour *C. robusta*. Elle était donc inversement proportionnelle à la richesse naturelle de ces espèces en alcaloïde (tableau I). La figure A (pl. II) (longueurs moyennes après 15 jours de culture) montre que naturellement la racine est plus sensible à l'inhibition que l'hypocotyle. La caféine ralentit ou inhibe la formation des poils absorbants et des racines adventives aux plus fortes doses.

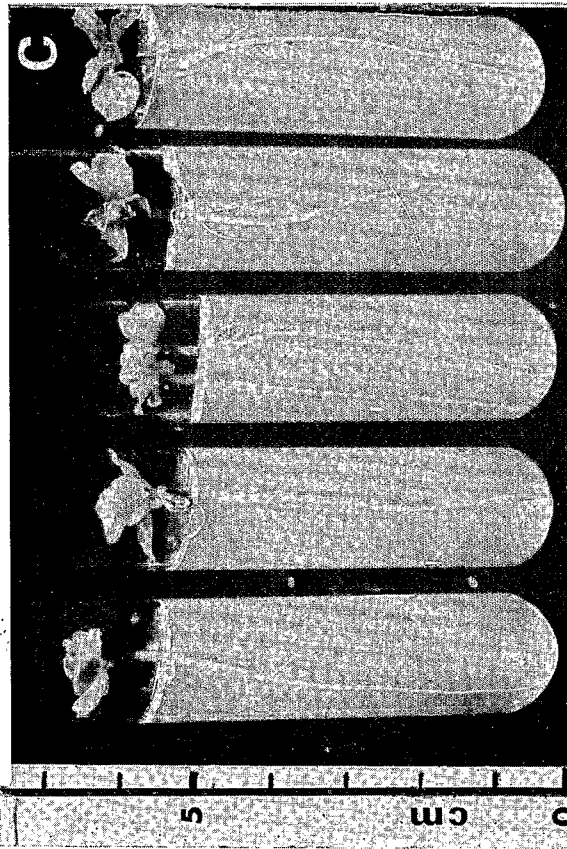
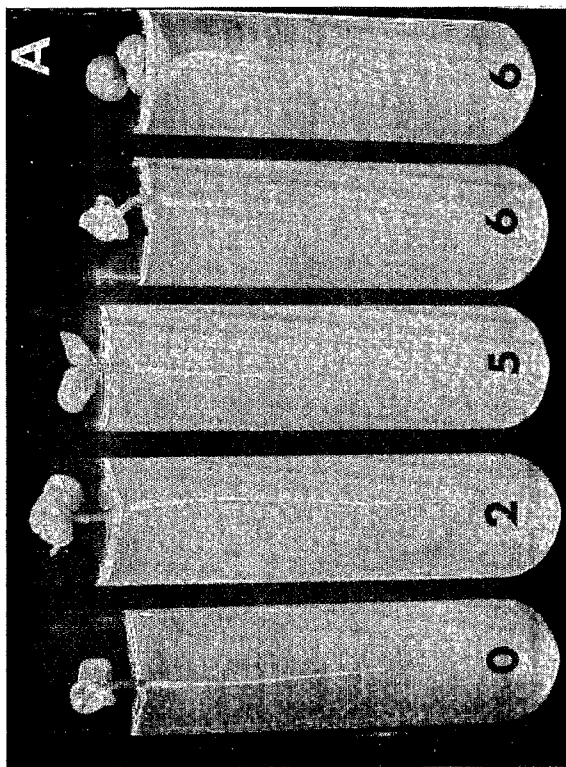
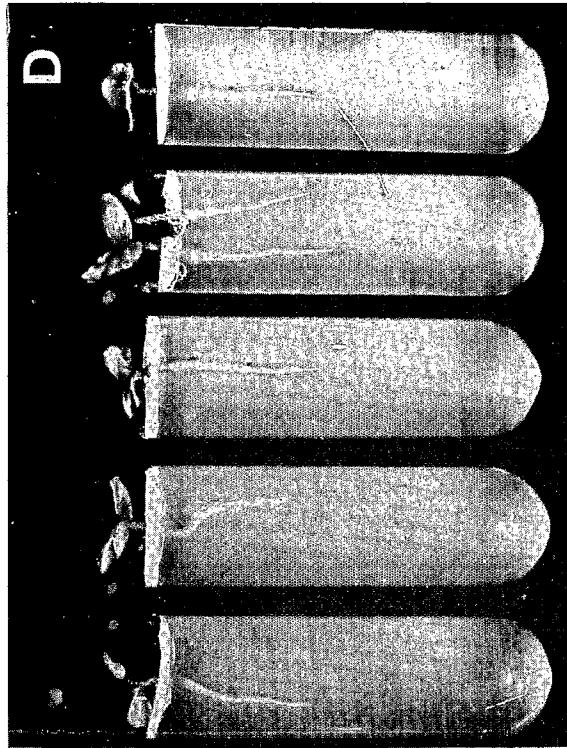
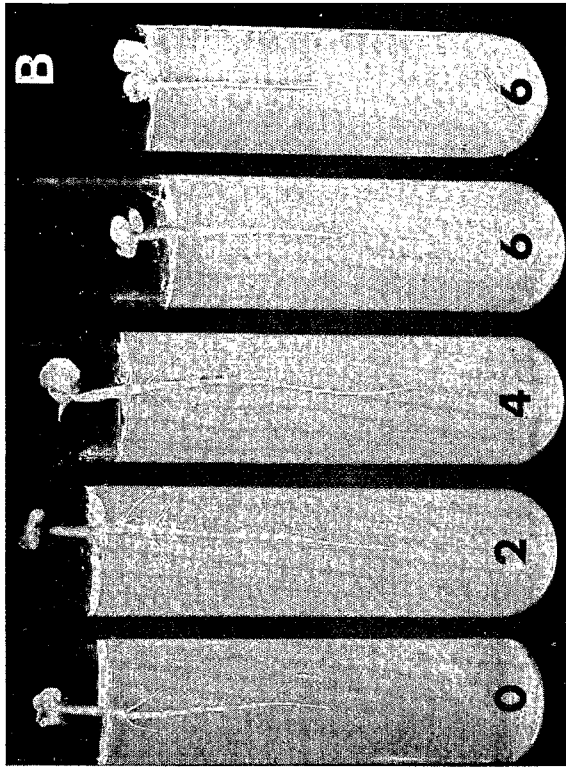
Enfin l'inhibition porte aussi sur l'augmentation de la surface des cotylédons et des feuilles ; mais il nous est difficile de rendre exactement compte de cet effet, les récipients utilisés n'ayant pas permis de poursuivre l'expérience pour obtenir un développement normal de ces organes.

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche I. — Culture *in vitro* d'embryons de Caféiers en présence de caféine

Fig. A : Embryons de *Coffea arabica* et Fig. B : Embryons de *C. robusta* après 28 jours de culture. Teneurs des milieux en caféine : 0. Témoin ; 2. 50 mg/litre ; 4. 250 mg/litre ; 5. 500 mg/litre ; 6. 1 000 mg/litre. On remarque l'inhibition progressive des racines et des cotylédons.

Fig. C et D. — Embryons de *C. arabica* des traitements 4 (250 mg/litre de caféine) et 6 (1 000 mg/litre de caféine) (culture de 41 jours). Phénomène de désintoxication : l'inhibition persiste dans le traitement 6, tandis que la croissance a repris dans le traitement 4.



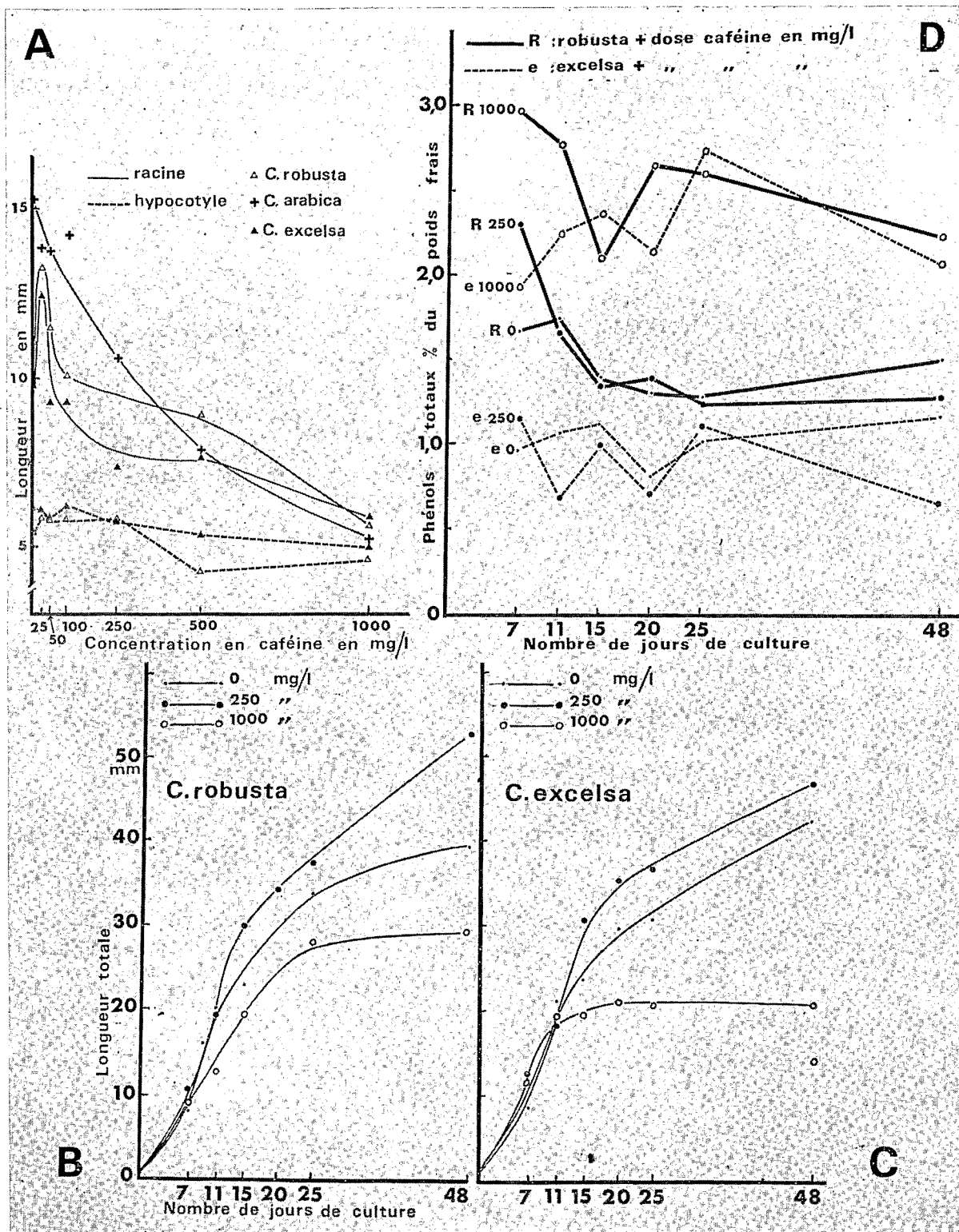


Planche II

Fig. A. — Longueur moyenne de la racine et de l'hypocotyle de plantules de Caféiers après 15 jours de culture, en fonction de la concentration du milieu en caféine.

Fig. B et C. — Longueur moyenne des plantules de Caféiers cultivées en présence de 3 doses de caféine.

Fig. D. — Teneurs des plantules précédentes en phénols totaux.

Avec ce milieu qui n'est pas renouvelé, le ralentissement de la croissance par les doses les plus faiblement inhibitrices (100 à 250 mg/litre) n'a pas persisté (*pl. I*). Sur les figures B et C (*pl. II*) on remarque que la croissance des embryons du traitement 250 mg/litre, d'abord inférieure à celle des témoins, l'a égalée vers le 7^e jour, puis l'a dépassée largement à partir du 11^e jour. Pour le traitement 1 000 mg/litre, l'inhibition a été plus importante et plus précoce chez le *C. excelsa*, naturellement moins riche en caféine, que chez le *C. robusta*.

TABLEAU I. — Caractéristiques des graines utilisées

Espèces	Poids de 100 graines (g)	Caféine de la graine % du		Phénols totaux des embryons % du poids sec
		poids sec	poids frais	
<i>C. robusta</i> ..	15,04	3,25	2,81	8,24
<i>C. arabica</i> ..	25,04	0,93	0,88	5,12
<i>C. excelsa</i> ..	18,45	0,98	0,88	5,46

TABLEAU II. — Phénols totaux % de la matière fraîche des plantules après 7 jours de culture

Espèces	Teneurs des milieux en caféine		
	0	250 mg/litre	1 000 mg/litre
<i>C. robusta</i>	1,67	2,50	2,98
<i>C. excelsa</i>	0,97	1,15	1,86

b. Relations entre la concentration en caféine des milieux de culture et la teneur en phénols totaux des plantules. — Il existe en général une corrélation positive entre la teneur des grains en caféine et leur teneur en phénols. Ce caractère est très net chez les graines et les embryons des deux espèces utilisées (tableau I). Au premier prélèvement, après 7 jours de culture (tableau II), les pourcentages en phénols totaux des plantules étaient d'autant plus importants que la dose de caféine dans les milieux était plus élevée. Entre les deux espèces utilisées, la moins riche naturellement en caféine était celle qui synthétisait le moins de phénols en présence des 3 doses de caféine mises en expérience.

Pendant toute la durée de la culture et pour les diverses concentrations en caféine, la teneur en phénols est restée plus élevée chez les embryons de *C. robusta* que chez ceux de *C. excelsa* : les différences constatées étaient très significatives. Les embryons des deux espèces cultivés en présence de 1 000 mg/litre de caféine avaient des teneurs très hautement supérieures à celles des deux autres traitements (tableau II ; *pl. II*, *fig. D*).

Au cours des 9 premiers jours de culture la teneur, très élevée chez le *C. robusta*, a baissé et la synthèse s'est ensuite maintenue à un niveau à peu près constant. Celle du traitement 250 mg/litre a rejoint le niveau du témoin, comme s'il y avait eu une mobilisation des phénols pour la formation de complexes insolubles. C'est au cours de ces premiers jours que nous avons vu aussi la courbe de croissance du traitement 250 mg/litre rejoindre puis dépasser celle des témoins, reflétant peut-être en partie le processus de désintoxication.

Chez le *C. excelsa* la teneur en phénols du traitement 250 mg/litre s'est maintenue au niveau du témoin, mais pour faire face à la dose élevée de caféine 1 000 mg/litre, la teneur en phénols s'est élevée progressivement pendant les 15 premiers jours.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — La caféine *stimule* la croissance des embryons de Caféiers pour des concentrations inférieures ou égales à 1.10^{-4} (100 mg/litre). Au-dessus de cette dose *la croissance est inhibée* proportionnellement à la concentration ; il n'existe pas de « seuil de toxicité ». La racine est l'organe qui a la réaction la plus nette. Entre 250 et 750 mg/litre l'inhibition est d'autant plus importante (*C. excelsa* > *C. arabica* > *C. robusta*) que l'espèce est moins riche naturellement en alcaloïde et en phénols.

L'effet disparaît au cours des 15 premiers jours de culture en présence des doses les plus faiblement inhibitrices. A partir de 500 mg/litre de caféine l'inhibition devient irréversible. La synthèse des phénols s'établit à un niveau d'autant plus élevé que le milieu renferme plus de caféine.

Ces observations et le fait que pendant les premiers jours de culture en présence de la caféine la teneur en phénols solubles des plantules baisse, comme s'ils étaient mobilisés jusqu'à atteindre des niveaux correspondant aux doses de caféine des milieux, militent en faveur de l'existence d'un processus de désintoxication chez le Caféier et de l'hypothèse d'une participation des phénols qui formeraient avec la caféine des complexes inoffensifs. Ces complexes pourraient être les chlorogénates et hémichlorogénates de potassium (ou de calcium) et de caféine découverts par Payen [(10), (11)] et étudiés ensuite par Gorter (7), Fischer (5) et Freudenberg (6).

Pour les concentrations les plus faiblement inhibitrices la reprise de la croissance correspondrait à une mobilisation des phénols libres pour la formation de ces complexes, d'où la diminution de la teneur observée pendant les premiers jours chez le *C. robusta*, tandis que le *C. excelsa* qui renferme naturellement peu de phénols doit en accélérer la synthèse pour faire face à la forte dose d'alcaloïde. Le fait que dans ce cas la croissance ne peut reprendre pourrait signifier que le système de désintoxication est saturé et que la limite des possibilités de synthèse des phénols est atteinte.

(*) Séance du 19 novembre 1973.

(1) H. C. BRAY et W. V. THORPE, in : D. GLICK, *Methods in Biochemical analysis*, 1, 1954, p. 27-57.

(2) J.-P. COLONNA, *Café, Cacao, Thé*, 26, 3, 1972, p. 193-203.

(3) J.-P. COLONNA, G. CAS et H. RABÉCHAULT, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 60-63.

(4) R. COSTE, *Les caféiers et les cafés dans le monde*, Larose, Paris, 1 et 2, 1955, 1959, 1961.

(5) E. FISCHER, *Untersuchungen über Depside und Gerbstoffe*, Berlin, 1919, p. 811.

(6) K. FREUDENBERG, *Tanin, Cellulose, Lignin*, 1933, p. 25.

(7) K. GORTER, *Annalen d. Chemie*, 358, 1908, p. 327-328 ; 359, p. 217-244.

(8) L. KUM-TATT, *Analyst*, 86, 1961, p. 825.

(9) R. R. PARIS, *Comptes rendus*, 275, Série D, 1972, p. 1617-1619.

(10) C. PAYEN, *Comptes rendus*, 22, 1846, p. 724-737.

(11) C. PAYEN, *Précis de Chimie industrielle*, Hachette, Paris, 1851, p. 569.

(12) H. RABÉCHAULT, in : H. JACQUES FÉLIX, *Contributions à l'étude du caféier en Côte-d'Ivoire*, *L'Agron. Trop., Bull. Scient.*, n° 5, contr. 3, 1954, p. 181-219 ; contr. 5, p. 282-286.

(13) H. RABÉCHAULT et H. CAMBRONY, *Cahiers ORSTOM, Physiologie des plantes tropicales cultivées*, 1, 1, 1964, 63 pages.

(14) J. TANGUY, *Thèse Doct. ès Sc.*, Univ. Paris, ORSTOM, 1970.

(15) M. VAILLANT, *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1937.

Laboratoire de Physiologie Végétale,
Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM,
70, route d'Aulnay, 93140 Bondy.