

## SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE .....</b>	i
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	ii
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	iii
<b>LISTE DES PHOTOS .....</b>	iv
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	v
<b>INTRODUCTION .....</b>	1
<b>GENERALITES.....</b>	4
I- Les caféiers .....	5
I-1 Donnée Botanique et systématique des caféiers .....	5
I-2 Classification et description des espèces de caféiers étudiés.....	7
I-2-1 Classification.....	7
I-2-2 Description de la série <i>Verae (Mascarocoffea)</i> .....	7
I-3-1 Description de <i>Coffea arabica var Bourbon jaune</i> .....	8
II- Les endophytes : .....	8
II-2 Définition.....	8
II-2 Biologie des endophytes .....	8
II-3 Importances des endophytes .....	9
II-3-1 Endophytes et plantes .....	9
II-3-2 Endophytes et métabolites secondaires .....	9
II-3-3 Diversité des endophytes bactériens des caféiers.....	10
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	11
I-Matériels .....	12
I-1 Matériels végétaux .....	12
I-2 Milieux de culture.....	12
II- Preparation des caféiers hôtes .....	13
II-1 Pr��treatment des graines avant germination .....	13
II-2 Germination des graines des espèces de caféiers étudiées .....	13
III-Isolement et purification des endophytes.....	14
III-1 Sélection des matériels végétaux .....	14
III-2 Stérilisation en surface des explants .....	14
III-3 Ensemencement sur milieu de culture .....	15
III-4 Dénombrement des colonies.....	15

III-5 Purification des colonies.....	15
III-6 Conservation des souches .....	15
IV-Caracterisations des souches bactériennes .....	15
IV-1 Mise en évidence de la diversité morphologique et cytologique .....	15
IV-1-1 Examen macroscopique .....	15
IV-1-2 Examen microscopique .....	16
IV-2 Mise en évidence de la diversité métabolique.....	17
IV-2-1 Utilisation du mannitol et étude de mobilité .....	17
IV-2-2 Utilisation du citrate par les bactéries .....	17
IV-2-3 Recherche de la catalase .....	17
IV-2-4 Utilisation des oses par les bactéries .....	18
IV-2-5 Croissance sur milieu sélectif pour <i>Pseudomonas</i> .....	18
IV-3 Mise en évidence de la diversité physiologique .....	18
IV-3-1 Tolérance à la salinité .....	18
IV-3-2 Tolérance à la caféine .....	19
IV-3-3 Tolérance aux variations d'acidité/alcalinité .....	19
IV-3-4 Croissance à différentes valeurs de température.....	19
IV-3-5 Mode de respiration de la bactérie .....	19
IV-3-6 Solubilisation du phosphate .....	20
V-Méthodes d'analyse statistique .....	20
V-1 Analyse des variances .....	20
V-2 Analyses multivariées .....	20
<b>RESULTATS et INTERPRETATION.....</b>	<b>22</b>
I- Nombre d'endophytes isolés selon les cafiers hôtes .....	23
II- Caractéristiques des souches .....	24
II-1 Diversité morphologique des endophytes isolés.....	24
II-1-1 Examen macroscopique des colonies .....	24
II-1-2 Diversité microscopique des souches .....	27
II-2 Diversité métabolique .....	29
II-3 Diversité physiologique .....	30
II-3-1 Variation de la tolérance à la salinité (NaCl).....	30
II-3-2 Variation de la croissance aux différents pH.....	31
II-3-3 Comportement des endophytes face à la variation de températures .....	32
II-3-4 Diversité des réponses à différentes teneurs en caféine .....	32
II-3-5 Type respiratoire des souches .....	35
II-3-6 Solubilisation du phosphate .....	36

III- Regroupement des souches .....	37
III-1 Regroupement des souches par rapport aux caractères .....	37
III-2 Classification des souches .....	38
III-3 Regroupement des souches par rapport aux cafiers hôtes .....	39
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSION et PERSPECTIVES.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>51</b>
<b>ANNEXES</b>	

## GLOSSAIRE

**Bactériostatique:** Qui a une action d'inhibition de la prolifération bactérienne. La cellule n'est pas forcément tuée par le composé.

**Bactéricide :** Qui a une action létale sur une bactérie.

**Caféine:** alcaloïde du groupe des purines contenu dans de nombreuses plantes et leurs diverses préparation (café, thé, chocolat, cola, maté, guarana).

**Commensalisme :** C'est une relation au cours de laquelle l'un profite de la présence de l'autre sans le détruire.

**Déparcher :** enlever la parche qui couvre la graine.

**Endophytes :** microorganismes (bactéries, champignons) vivant dans la plante sans être pathogènes à celle-ci.

**Métabolites secondaires:** Ce sont des substances biologiques produites par les microorganismes (bactéries et champignons) et les plantes. Ils ne participent pas directement au fonctionnement cellulaire et au développement de la plante.

**Mutualistique :** relation bénéfique pour les deux partenaires. Les endophytes acquièrent des nutriments dans les plantes. En retour, ces dernières sont protégées contre les herbivores et les pathogènes via la production d'alcaloïdes.

**Parche :** tégument qui recouvre la graine des cafésiers.

**Pathogène latent :** les microorganismes deviennent pathogènes pour la plante hôte quand cette dernière est en stress. Ce type de relation est bénéfique pour ces endophytes mais dévastatrice pour la plante.

**Placentation “cofféenne” :** présence d'un sillon, plus ou moins invaginé, dans la partie ventrale de l'albumen des graines.

**Souche bactérienne :** est constituée par une succession de cultures dérivées d'une culture pure (le plus souvent une colonie parfaitement isolée).

**Stigmate exerte :** stigmate à style long

**Stomate :** Orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens des végétaux.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ACM : Analyse de correspondance multiple

AFD : Analyse factorielle discriminante

AS1: Antibiotic Selection

BJ : *Bourbon jaune*

CAH : Classification ascendante hiérarchique

DO : Densité optique

DRA : Département de Recherche Agronomique

ED : Eau Distillée

FOFIFA: Foibe Fikarohana ampiarina amin'ny Famipandrosoana ny eny Ambanivohitra

pH : Potentiel d'hydrogène

SZ : Soazanahary

TCP : Phosphate tricalcique

TSA : Tryptic Soya Agar

V/V : Volume à volume

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe d'un fruit de caféier ( <i>Coffea</i> sp) d'après De Castro et Marraccini, 2006.....	6
Figure 2 : Effets de différentes concentrations en NaCl sur le nombre de souches endophytiques isolées à partir des caféiers étudiés .....	31
Figure 3 : Courbe de croissance des souches isolées de la population <i>Bourbon</i> jaune (a), de SZ ( <i>C. homollei</i> ) (b), de A602 ( <i>C. kianjavatensis</i> ) (c) et de A213 ( <i>C. kianjavatensis</i> ) (d) à différentes concentrations en caféine (0 à 1 %). ....	33
Figure 4: Valeur moyenne de Densité Optique de croissance des souches au 3 <sup>ème</sup> et 5 <sup>ème</sup> jour d'incubation. Chaque colonne correspond à la moyenne des valeurs de DO de croissance des souches pour chaque population de caféiers .....	34
Figure 5 : Représentation graphique des caractères (c) et des souches (a) ( b) après Analyse de Correspondance Multiple. Les boules de couleurs différentes représentent les souches issues des caféiers étudiés (rouge pour BJ, bleu pour SZ, jaune pour A602 et vert pour A213) et les caractères étudiés (be : beige ; Inc : incolore ; Is : isolé ; Jo : jaune orangé; ov : ovale; ru : rugueux ; Sc : sèche .....	38
Figure 6: Classification des individus selon leurs caractères après Classification Ascendante Hiérarchique .....	39
Figure 7 : Représentation graphique de l'Analyse Factorielle Discriminant dans l'espace [F1, F2, F3] (100% d'inertie).....	39

**LISTE DES PHOTOS**

Photo 1 : Port d'un cafier (population A602).....	6
Photo2 : Fleurs blanches à inflorescence racémique.....	6
Photo 3 : Graines mûres de cafiers (population SZ).....	6
Photo 4 : Jeunes pousses de A213, A602, SZ pré germées dans des bocaux .....	13
Photo 5 : Jeunes pousses de A213, A602, SZ repiquées dans des pots en plastiques.....	13
Photo 6 : Aspect de quelques colonies isolées de : (a) A213 ((couleur blanche) ; (b) SZ (couleur jaunâtre) ; (c) A602 <i>coffea kianjavatensis</i> ) (couleur jaune et blanche) ; (d) A602 <i>coffea kianjavatensis</i> (couleur blanche) (Actinomycètes).....	26
Photo 7 : Formes microscopiques des bactéries de : (a) SZ ( <i>C.homollei</i> ) (coques groupés en amas) ;(b) A602 ( <i>C. kiajanvatensis</i> ) (bacilles gram négatifs) ; (c) A213 ( <i>C. kiajanvatensis</i> ) (coques gram positifs) ; (d) A602 (actinomycètes) vues au microscope optique à immersion (x 100).....	28

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Test de stérilisation en surface des feuilles de cafés étudiés.....	14
Tableau 2: Nombre de colonies des bactéries isolées avant et après purification.....	23
Tableau 3: Synthèse des caractères macroscopiques des souches endophytiques bactériennes des cafés étudiés .....	24
Tableau 4: Observation microscopique des souches endophytiques bactériennes de cafés étudiés.....	27
Tableau 5: Caractères métaboliques des souches endophytiques bactériennes des cafés étudiés.....	29
Tableau 6 : Nombre de souches endophytiques bactériennes pouvant croître sur pH différents.....	31
Tableau 7 : Classification des souches endophytiques bactériennes des cafés suivant leur exigence en pH .....	32
Tableau 8 : Type respiratoire des souches endophytiques bactériennes isolées des cafés étudiés.....	35
Tableau 9 : Solubilisation du phosphate des souches endophytiques bactériennes isolées des cafés étudiés .....	36
Tableau 10 : Reclassage des individus après Analyse Factorielle Discriminante .....	40
Tableau 11 : Probabilités d'appartenance et carrés des distances aux barycentres des groupes des souches mal classées .....	41

# INTRODUCTION

Madagascar vue sa biodiversité exceptionnelle par sa richesse floristique et faunistique présente une forte endémicité au niveau des espèces de cafiers. Avec les 124 espèces de *Coffea* (*Rubiaceae*) (Davis et al., 2010, 2011) originaires d'Afrique, des îles Mascareignes, des Comores, d'Asie et de l'Australie, Madagascar représente à elle seule presque la moitié soit: 61 espèces dont 53 lui sont tous endémiques (Davis et al., 2006). Ces cafiers de la région malgache sont groupés sous le nom de *Mascarocoffea*. Ils présentent une grande diversité génétique. Compte tenu de sa grande diversité, ces cafiers sont utiles pour l'amélioration des deux variétés cultivées (*Coffea canephora* et *Coffea arabica*). Chacune de ces espèces occupe dans son aire d'origine des écosystèmes différents et sont à l'origine des biomolécules, diversifiées souvent spécifiques, inexistantes chez les cafiers cultivés (Rakotomalala, 1993). Mais elles sont pourtant menacées. 76% d'entre elles sont sur la liste rouge de l'IUCN dû aux activités humaines (Davis et al., 2006).

Plusieurs études scientifiques ont été effectuées sur ces cafiers se rapportant à l'aspect biochimique (Rakotomalala, 1992 ; Ralalamoria, 1999 ; Rakotondravao, 2001 ; Campa et al., 2004), et génétique (Razafinarivo et al., 2013 ; Andrianasolo, 2013 ; Krishnan et al., 2013). Par contre, les recherches abordant le côté microbiologique et plus spécialement celles qui concernent les bactéries endophytiques sont presque inexistantes.

Et pourtant, il est prouvé que la plupart des plantes hébergent des microorganismes à l'intérieur de leur tissu. Ces microorganismes appelés endophytes peuvent être des bactéries ou des champignons (Welbaum et al., 2004). Ces endophytes établissent des relations perpétuelles avec leurs hôtes. Ils peuvent intervenir non seulement dans la protection de la plante hôte contre les stress dus aux facteurs biotiques et abiotiques via des molécules bioactifs qu'ils synthétisent, mais aussi dans l'apport de nutriments indispensables à la plante. (Rodriguez et al., 2009).

De nombreuses études rapportent la présence d'endophytes bactériens dans différentes plantes comme la vigne (West et al., 2010, Hudson et al., 2010), l'eucalyptus (Ferreira et al., 2008), le cacaoyer (Kebe et al., 2009).

Les études sur les endophytes bactériens du genre *Coffea* restent rares. Une seule publication concerne leur diversité chez *C. arabica* (Vega et al., 2005). Récemment, deux études: Andriamialiharisoa (2011) et de Ratsimbazafy (2011) rapportent la présence d'endophytes bactériens isolés à partir de feuilles de 2 espèces de *Mascarocoffea*.

Il est ainsi évident qu'une grosse lacune reste à combler sur l'investigation des endophytes dans le genre *Coffea*, et plus spécialement dans les espèces du groupe *Mascarocoffea*.

Ainsi notre contribution se focalisera sur l'isolement et la caractérisation des endophytes bactériens de deux espèces de la série *Verae*: *Coffea kianjavatensis* représenté par deux populations (A213 et A 602) marqué par la présence de trace de caféine (0,81 % et 0,13 % MS) dans leur graine et *Coffea homollei* une espèce sans caféine. *C. arabica* var Bourbon jaune, cafier à teneur relativement élevée en caféine (1,4% MS) sert de référence.

L'aboutissement de ce travail est de vérifier les hypothèses suivantes : (i) les endophytes varient qualitativement et quantitativement en fonction des cafiers hôtes; (ii) Il existe une relation entre cette variation et les compositions biochimiques des hôtes.

L'objectif est (i) de décrire la diversité des endophytes bactériens des deux espèces de la série *Verae* et (ii) de mettre en évidence l'existence de relations éventuelles entre cette diversification microbiologique et la variation des caractères entre cafiers appartenant à une même série botanique.

Dans cette étude les grandes lignes suivantes seront développées :

- 1- Un rappel bibliographique décrivant les généralités sur les endophytes et les cafiers ;
- 2- Les méthodes d'isolement des endophytes incluant la stérilisation en surface, l'ensemencement sur milieu solide et la purification des souches isolées ;
- 3- La caractérisation des souches purifiées s'appuyant sur leur description :
  - morphologique qui décrit la caractérisation macroscopique et microscopique des souches ;
  - métabolique qui trace l'utilisation des oses (mannitol, glucose, lactose), des citrates et la décomposition de l'eau oxygénée par les souches ;
  - physiologique qui étudie (i) le type respiratoire des souches ; (ii) l'effet de la température, du Na Cl, du pH, de la caféine sur les souches ; (iii) la capacité des souches à solubiliser ou non le phosphate inorganique afin d'optimiser les paramètres caractérisant les souches ;
- 4- les résultats et discussion
- 5- et enfin la conclusion et perspectives

L'analyse statistique des données collectées permettant d'une part de discerner ou de regrouper ces souches ; et d'autre part d'avoir une vue synthétique de leur diversité.

Le statut des souches bactériennes des espèces de cafiers avec caféine et sans caféine est discuté et par la suite les souches communes et/ou spécifiques des plantes hôtes seront déterminées.

# GENERALITES

## I- Les cafiers

### I-1 Donnée Botanique et systématique des cafiers

Les cafiers sont des arbustes à tronc monopodiale orthotrope (photo 1). Leurs feuilles sont opposées deux à deux. Leurs fleurs blanches petites odorantes groupées en glomérules à inflorescence racémique (photo 2) comportent des ovaires à deux loges contenant des ovules à placentation dite « cofféenne » caractérisée par la présence d'un sillon, plus ou moins invaginé, dans la partie ventrale de l'albumen (figure 1). Leurs fruits sont des drupes ovales de couleur vert (photo 3), rouge, jaune, violet ou noir à maturation selon les espèces. Les graines présentent un sillon ventral invaginé.

Les cafiers appartiennent à la famille des *Rubiaceae*, sous famille des *Ixoroidae*, tribu des *Coffeeae*.

Autrefois, cette tribu *Coffeeae* incluait plusieurs genres dont deux différenciés sur la base de caractéristiques florales :

- le genre *Coffea* à anthères et stigmates exsertes, à styles longs qui regroupait les sous genres *Coffea* et *Baracoffea*
- le genre *Psilanthes* regroupant *Psilanthes* et *Afrocoffea*; à anthères et stigmates inserts et à styles courts (Leroy, 1980).

Récemment, Davis et al. (2011) ont fusionné cette subdivision de Leroy en un seul genre, sur la base de similarité de leurs caractères morphologiques et moléculaires. L'obtention de descendances fertiles entre espèces de *Coffea* et *Psilanthes* (Couturon et al., 1998) conforte par ailleurs la logique de ce nouveau regroupement.

L'introduction du genre *Psilanthes* dans le genre *Coffea* accroît le nombre d'espèces de 104 (Davis et al., 2006, Davis et al., 2010) à 124 (Davis et al., 2011).

Dans cette étude, les subdivisions infra génériques proposées avant les travaux de Davis et al. (2011) ont été considérés. Selon la distribution géographique, le sous genre *Coffea* est subdivisé en trois sections :

- les *Eucoffea* : ce sont les cafiers spontanés inféodés à l'Afrique centrale et occidentale. Les espèces les plus cultivées (*C. arabica* et *C. canephora* et *C. liberica*) appartiennent à ce groupe ;
- les *Mozambicoffea* regroupent les cafiers spontanés de l'Afrique orientale. Ce sont les cafiers à faible teneur en caféine (Anthony, 1992). Par exemple : *C. racemosa* *C. pseudozanguebariae* et *C. salvatrix* ;
- les *Mascarocoffea* : groupent les espèces sauvages de Madagascar des îles Mascareignes et des Comores. Leurs graines sont généralement dépourvues de

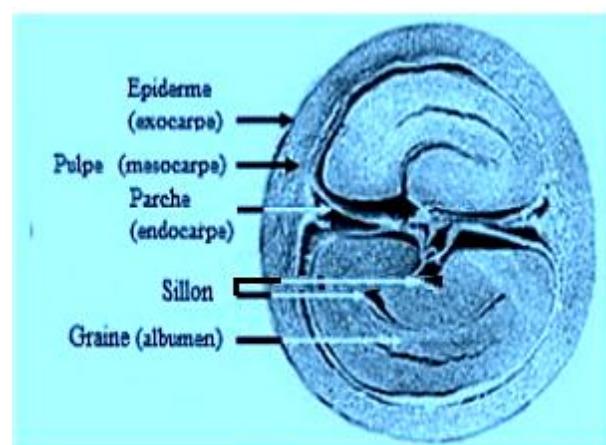
caféine. Cette section est subdivisée en séries (Chevalier, 1947) réduites à six par Charrier (1978) d'après leurs comportements phénologiques et leurs caractères morphologiques. Ces groupes sont : *les Verae*, *les Humboldtianae-Mauritianae*, *les Subterminales*, *le complexe Millotii*, *les Garcinoides* et *les Multiflorae*.



**Photo 2 : Fleurs blanches à inflorescence racémique**



**Photo 3 : Graines mûres de cafiers (population SZ)**



**Photo 1 : Port d'un cafier (population A602)**

**Figure 1 : Coupe d'un fruit de cafier (*Coffea* sp)  
d'après De Castro et Marraccini, 2006**

## I-2 Classification et description des espèces de cafiers étudiés

Trois populations de cafiers sont étudiées dans ce travail : deux espèces de la série *Verae* et une variété cultivée *Bourbon jaune* de l'espèce *C. arabica* qui sert de référence.

### I-2-1 Classification

Famille	:	<i>Rubiaceae</i>	Famille	:	<i>Rubiaceae</i>
Sous-famille	:	<i>Ixoroideae</i>	Sous-famille	:	<i>Ixoroideae</i>
Tribu	:	<i>Coffeeae</i>	Tribu	:	<i>Coffeeae</i>
Genre	:	<i>Coffea</i>	Genre	:	<i>Coffea</i>
Sous-genre	:	<i>Coffea</i>	Sous-genre	:	<i>Coffea</i>
Section	:	<i>Mascarocoffea</i>	Section	:	<i>Eucoffea</i>
Série	:	<i>Verae</i>	Espèces	:	<i>Coffea arabica</i>
Espèces	:	<i>Coffea kianjavatensis</i> <i>Coffea homollei</i>	Variété	:	<i>Bourbon jaune</i>

### I-2-2 Description de la série *Verae* (*Mascarocoffea*)

La série *Verae* comprend trois espèces *C. lancifolia*, *C. homollei*, *C. kianjavatensis*, dispersées dans le domaine phytogéographique de l'Est du Cap Masoala à Taolagnaro. Ces espèces connues par leurs caractères organoleptiques favorables ne contiennent pas ou seulement très peu de caféine dans leur graine (Rakotomalala, 1993).

Ces espèces ont des feuilles, plus ou moins acuminées, à limbe souple. Les fleurs en entonnoir de type cinq forment des inflorescences uniflores. Les fruits de petite taille, de forme oblongue à ovoïde, à pulpe fine comportent des petites graines à albumen jaune verdâtre. Leur période de croissance végétative dure six à huit mois par an.

Dans cette étude deux espèces : *C. homollei* et *C. kianjavatensis* sont considérées. Ces deux espèces sont représentées dans la collection vivante du FOFIFA à Kianjavato. Elles sont dotées d'un numéro d'accession propre en fonction de leur origine géographique. Une plante de même espèce provenant des endroits différents porte des numéros différentes ou noms différents. Pour *C. kianjavatensis*, il comporte deux populations portant les numéros d'accession A602 (population issue de Isaka - Ivondrozo à Fort Dauphin) et A213 (population originaire de Kianjavato). L'espèce *C. homollei* comporte trois populations : (i) SZ (abréviation de Soazanahary) ; (ii) A574 (population prélevée dans la réserve Ambodiriana à Toamasina) (iii) A945 (population provenant d'Ambatolahy à Ranomafana). Les caractères propres pour chaque espèce sont résumés dans l'annexe 7.

### I-3-1 Description de *Coffea arabica var Bourbon jaune*

*C. arabica* est l'espèce la plus cultivée dans le monde. Le café boisson qui en découle est plus aromatique et présente une teneur en caféine modérée (1 à 1,4%) comparée à celle de l'autre espèce *C. canephora* (2 à 3%).

C'est un arbuste de quatre à six mètres de hauteur. Les fruits de la variété *B. jaune*, de forme ovoïde-elliptique, souvent pédonculés, sont constitués d'un exocarpe de couleur verte au stade immature et de couleur jaune quand ils arrivent à la maturation.

## II- Les endophytes :

### II-2 Définition

Endophage, des mots grecs “endo” et “phyte”, signifie “dans la plante”. Ce sont des microorganismes vivant dans la plante sans causer des symptômes de maladie (Wilson, 1995). Il inclut les bactéries procaryotes et les champignons eucaryotes (Welbaum et al., 2004). Ces microorganismes peuvent être omniprésents dans toutes les plantes (Petrini, 1986) et colonisent leurs tissus internes. (Petrini, 1991).

### II-2 Biologie des endophytes

Les endophytes peuvent infecter et coloniser les espaces intercellulaires et intracellulaires des tissus vivants des plantes, fleurs, graines, feuilles, fruits, tiges et racines (Kobayashi et Palumbo, 2000). Ils sont localisés même dans les tissus morts ou sénescents (Schulz et Boyle, 2005)

Les endophytes peuvent être transmis :

- verticalement : de la graine vers les jeunes plantules (Hallmann et al., 1997)
- horizontalement via les ouvertures naturelles (émergence des racines secondaires, stomates) (James et Olivares, 1997, Dörr et al., 1998) ou sous l'action des enzymes par dégradation des cellules végétales (Hallmann et al., 1997, Compant et al., 2005).

Avec une densité très importante dans les racines, les endophytes diminuent progressivement en allant vers les tiges et les feuilles (Compant et al., 2005).

Les endophytes varient d'une variété de l'hôte à l'autre (De Matos Nogueira et al., 2001), selon l'âge ( Kriel et al., 2000) et aussi selon les conditions du milieu environnant (température, pH, oxygène, teneur en sel) (Schulz et Boyle, 2005).

## II-3 Importances des endophytes

### II-3-1 Endophytes et plantes

Les plantes sont incapables d'utiliser directement les composés organiques comme les lipides, les acides gras, les carbohydrates et les protéines. Les endophytes qui vivent en symbiose avec la plante jouent non seulement un grand rôle dans la nutrition de la plante par minéralisation de ces composés organiques mais aussi dans la physiologie de la plante en favorisant :

- La croissance : certains microorganismes ont la capacité (i) de fixer l'azote atmosphérique (Hurek et al., 2002; Iniguez et al., 2004) (ii) de solubiliser le phosphate assimilable (Zaidi et al., 2009, Castro-González, 2011, Jabaji, 2012) (iii) ou de produire des phytohormones (auxine) (Sziderics et al., 2007) afin de stimuler la croissance de la plante.
- La résistance aux stress biotiques ou abiotiques (Joost, 1995) : Par exemple, les endophytes induisent la production des substances comme les antibiotiques ou les antifongiques pour lutter contre l'infection et induisent la résistance systémique de l'hôte (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000). Les endophytes ont la capacité à tolérer les concentrations élevées en sel de l'environnement pour contrer les stress osmotiques (Sziderics et al., 2007).

### II-3-2 Endophytes et métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés de faible poids moléculaire. Contrairement aux métabolites primaires, ils ne sont pas des molécules de base pour un organisme vivant. Leur présence est souvent facultative et ils sont différents d'un organisme producteur à l'autre. La littérature mentionne même qu'ils sont spécifiques ou caractéristiques du groupe biologique qui les produit (Tiouabi, 2005).

Les origines de ces métabolites sont discutées. La théorie suppose que ces métabolites sont produits lors du métabolisme secondaire des plantes (Ravelomanantsoa, 2004). Selon les autres auteurs, ils résultent des microorganismes nichant dans ces plantes (Pimentel et al., 2011; Tan et Zou, 2001). La grande similarité des substances isolées à partir des microorganismes et de leurs plantes hôtes prouvent leurs origines microbiennes (Bérdy, 2005).

Actuellement, le nombre des métabolites secondaires produits par les microorganismes connus est d'environ 50.000, issus de bactéries (*Bacillus*, *Pseudomonas*), d'actinomycètes (*Streptomyces*, *actinomycètes*...) et de champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*...)

(Bérardy, 2005 ; Newman et Cragg, 2002). Depuis 1896, Gosio a découvert que ces métabolites étaient des acides phénoliques.

Ratsimbazafy (2011) et Andriamialiharisoa (2011) ont mis en évidence des acides phénoliques produits par les champignons et bactéries endophytiques de *C. perreri* et de *C. ankaranensis*.

Les microorganismes sont aussi dotés de capacités à métaboliser une large gamme de composés organiques carbonés ou azotés. Nombreux auteurs ont déjà étudié le rôle des microorganismes sur la décaféination :

- Perraud-Gaime (1995) a étudié l'effet des *Penicillium* et des bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus aeidilaetici*) issues des pulpes de café sur la décaféination ;
- Mazzafera, 2002 a rapporté la capacité de *Pseudomonas putida* issues des pulpes de café à dégrader la caféine,
- Roldàn (2005) a trouvé l'effet de *Pseudomonas putida* IF -3 (isolé à partir du sol) sur la décaféination du café
- Nayak et al., 2011 ont trouvé une bactérie *Brevibacterium* sp. isolée à partir de pulpe de café dégradant la caféine
- Ryan (2011) a démontré la capacité de *Pseudomonas putida* CBJ5 à dégrader la caféine.

### **II-3-3 Diversité des endophytes bactériens des caféiers.**

Les études portant sur la diversité des bactéries endophytiques des caféiers sont assez récentes et rares. L'étude de Vega et al. (2005) sur la diversité des endophytes bactériens dans différents organes de *C. arabica* L est la seule publiée. Elle valide l'existence de 19 genres, telles que *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cedeces*, *Chromobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacteraceae* ; *Escherichia*, *Girdania*, *Klebsiela*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* et *Yersinia*. Andriamialiharisoa (2011) et de Ratsimbazafy (2011) ont isolé 16 souches bactériennes non encore identifiées issues des feuilles de deux espèces de *Mascarocoffea* (*C. perreri* et de *C. ankaranensis*).

## MATERIELS ET METHODES

La mise en évidence de la diversité des endophytes bactériens au sein du genre *Coffea* a nécessité la mise en œuvre de nombreuses méthodes. Elles concernent (i) l'isolement des bactéries (ii) la caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des souches et (iii) l'application de différentes méthodes d'analyse statistique permettant de les discerner ou de les regrouper.

## I- MATERIELS

### I-1 Matériels végétaux

Les matériaux végétaux utilisés sont des feuilles de jeunes plantules âgées de 2 mois de :

- deux espèces de la série *Verae* issues de graines collectées le mois de février 2012 à Kianjavato: *Coffea kianjavatensis* (populations A602 et A213) et *Coffea homollei* (population SZ).
- une espèce cultivée servant de référence: *Coffea arabica* variété « Bourbon jaune » issues de graines collectées le mois de février 2012 à la serre du Département de recherche agronomique d'Ambatobe.

### I-2 Milieux de culture

#### ➤ Milieux pour la germination des cafiers

Des cotons hydrophiles sont utilisés pour la pré germination et des mélanges terreau et de sable (v/v) sont utilisés pour la germination.

#### ➤ Milieux pour l'isolement et la purification

Les milieux utilisés sont ceux disponibles au laboratoire. Il s'agit d':

- un milieu non sélectif : le Tryptic Soya Agar (TSA) contenant de l'antifongique destiné à inhiber la croissance d'éventuel contaminant;
- un milieu sélectif Antibiotic Selection (AS1) : milieu de sélection des actinomycètes. La composition des milieux se trouve dans l'annexe 1.

#### ➤ Milieux pour la caractérisation des souches

- Mannitol
- Citrate de Simons
- Hajna-Kligler
- King B
- Leifson et Hugh

## II- Préparation des cafiers hôtes

### II-1 Prétraitement des graines avant germination

Les graines des cafiers sont épluchées puis mises à fermenter dans un sachet en plastique. Après quatre jours de fermentation, elles sont lavées abondamment à l'eau du robinet puis elles sont déparcées pour faciliter la sortie de la radicule lors de la germination.

Les graines déparcées sont stérilisées à l'éthanol 70° pendant un minute, puis immergées dans de l'eau de javel 3% pendant cinq minutes et enfin dans de l'éthanol 70° pendant 30 secondes, afin d'éliminer les épiphytes.

### II-2 Germination des graines des espèces de cafiers étudiées

La germination des graines de cafiers est effectuée pour avoir les jeunes plantules utilisées dans le processus de l'isolement des endophytes. Les résultats de la germination ne seront pas donc détaillés dans cette étude.

Les graines stériles sont mises à pré-germer sur du coton hydrophile imbibé d'eau dans des bocaux (photo 4). Les jeunes pousses sont repiquées dans des pots en plastique contenant un mélange de sable et de terreau (v /v) préalablement stérilisé à 180°C pendant une heure afin d'éliminer tout éventuel microorganisme rhizosphérique (photo 5). L'arrosage se fait tous les deux jours avec de l'eau distillée stérile. La chambre de culture est régulièrement traitée avec de l'insecticide de marque Nuvan afin d'éradiquer les éventuelles contaminations apportées par les insectes. De même, la paillasse est lavée régulièrement avec de l'éthanol.



Photo 4 : Jeunes pousses d'A213, A602,  
SZ pré germées dans des  
bocaux



Photo 5 : Jeunes pousses âgées de 2 mois  
de A 213, A602, SZ repiquées  
dans des pots en plastique

### III- Isolement et purification des endophytes

#### III-1 Sélection des matériaux végétaux

Des jeunes feuilles âgées de deux mois apparemment saines sont sélectionnées pour l'isolement. Effectivement, les feuilles trop jeunes sont trop fragiles et ne supportent pas les réactifs utilisés pour la stérilisation en surface. Pour chaque population de cafiers étudiés, trois plantules sont considérées, à partir desquelles deux feuilles sont prélevées sur chacune.

#### III-2 Stérilisation en surface des explants

La stérilisation en surface des explants n'est pas une méthode universelle, elle diffère d'une plante à l'autre et dépend de l'état des matériaux végétaux utilisés (âge, épaisseur et texture des feuilles) (Schulz et al., 1993). Différents protocoles de stérilisation en surface rapportés par divers auteurs sont testés. Les doses et les durées d'immersion choisies les plus efficaces pour l'élimination complète des épiphytes sans pour autant causer la destruction de nos matériaux végétaux sont celles décrites dans la méthode III (tableau 1).

Les feuilles sont lavées avec de l'eau savonneuse puis rincer trois fois. Ensuite, elles subissent une série de désinfections à l'éthanol 70%, pendant une minute, dans de l'eau de javel 3%, pendant cinq minutes, puis dans de l'éthanol 70% et sont finalement rincées trois fois à l'eau distillée stérile.

Tableau 1: Test de stérilisation en surface des feuilles de cafiers étudiés

Méthode	Solution	Concentration	Temps d'immersion	Auteurs
I	Ethanol	70%	1min	Rijavec et al (2007)
	NaOCl	0,5%	2, ou 3, ou 4, ou 5 min	
	Ethanol	70%	30sec	
	Eau distillée stérile			
II	Ethanol	70%	1min	Ferreira et al (2008)
	NaOCl	1,75%	2, ou 3, ou 4, ou 5 min	
	Ethanol	70%	30 sec	
	Eau distillée stérile			
III	Ethanol	70%	1 min	Marquez-Santacruz (2010)
	NaOCl	3%	2, ou 3, ou 4, ou 5 min	
	Ethanol	70%	30 sec	
	Eau distillée stérile			

### **III-3 Ensemencement sur milieu de culture**

Les feuilles stérilisées découpées en morceaux sont broyées à l'aide d'un cône stérile dans un éppendorf. Le broyat est dilué avec 1000 µl de solution d'eau peptonée et de sel de sodium pour libérer les bactéries. Puis il est homogénéisé au vortex. 50µl d'extrait est ensuite ensemencé puis étalé sur le milieu de culture solide dans une boîte de Pétri.

Pour chaque population, quatre répétitions sont effectuées. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant un à trois jours. Et afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation en surface, la dernière eau de rinçage est également ensemencée.

### **III-4 Dénombrement des colonies**

Après incubation, le nombre de colonies est compté par observation macroscopique. Toutes les colonies dans les boîtes de Pétri sont considérées.

### **III-5 Purification des colonies**

La purification des bactéries isolées s'effectue par quatre repiquages successifs dans les milieux TSA et AS1 solides en faisant de stries jusqu'à l'épuisement. Une fois pure, chaque isolat est désigné par un numéro de code. Le numéro de code est précédé par la lettre B (Bactéries) suivie du nom de la population de cafier étudiée.

### **III-6 Conservation des souches**

Les colonies pures, sont transférées dans des cryotubes stériles, contenant 1ml de glycérol à 20% et sont conservées au congélateur à -20°C.

## **IV- Caractérisations des souches bactériennes**

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

### **IV-1 Mise en évidence de la diversité morphologique et cytologique**

#### **IV-1-1 Examen macroscopique**

Cette méthode consiste à noter la forme, l'aspect, l'allure des contours, la surface, la couleur, la transparence des colonies.

### IV-1-2 Examen microscopique

L'étude microscopique des souches est réalisée à l'état frais et après une coloration de Gram afin de déterminer leur morphologie (forme, groupement) et leur type (Gram négatif, ou Gram positif).

#### ❖ Observation à l'état frais

Elle permet de décrire la forme, le mode de regroupement des bactéries. Une colonie bactérienne pure prélevée à l'aide d'une anse stérilisée est diluée avec une goutte d'eau stérile sur une lame puis recouverte d'une lamelle. La préparation est observée sous microscope optique (objectif  $\times 100$  avec de l'huile d'immersion).

#### ❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique créée par Hans Christian Gram (1884) qui permet de classer les bactéries selon la propriété de leur paroi. Elle consiste à fixer et à colorer les bactéries. La paroi bactérienne est plus ou moins perméable à certains solvants. Le cytoplasme des bactéries est coloré en violet par le violet de gentiane puis en rose avec la safranine. Les bactéries Gram négatif qui ont des parois perméables à l'alcool, favorisent la décoloration totale du cytoplasme et ce dernier reprend la coloration rose du second colorant. Les bactéries Gram positif, qui ont des parois imperméables à l'alcool gardent la couleur violette du violet de gentiane.

#### ✓ La fixation

Une ansée bactérienne pure est mise en suspension avec une goutte d'eau distillée stérile sur une lame. La face de la lame opposée à l'étalement est exposée à 10 cm près de la flamme du bec bunsen, pour tuer les bactéries sans les carboniser.

#### ✓ La coloration

Le violet de gentiane est le premier colorant appliqué aux frottis, pendant une minute. Ce premier colorant est par la suite fixé par le lugol pendant une minute. L'alcool 90°C est ensuite coulé sur la lame afin de décolorer le cytoplasme jusqu'à disparition complète de la couleur violette. Le second colorant, la safranine, est ensuite déposé et laissé agir pendant une minute. Entre ces trois opérations la lame est rincée abondamment à l'eau du robinet. Le séchage complet du frottis par un court passage au-dessus de la flamme du bec Bunsen est nécessaire avant l'observation sous microscope au grossissement  $\times 100$ .

## IV-2 Mise en évidence de la diversité métabolique

L'identification des bactéries peut se faire en observant si elles sont capables d'utiliser tel ou tel substrat. Chaque famille de bactéries a des caractères propres, qui permettent de les classer facilement selon leur réaction en présence du glucose (avec ou sans oxygène), du citrate, du mannitol et du lactose. L'utilisation du substrat par la bactérie peut révéler par virage d'un indicateur coloré de pH, le bleu de bromotimol, dans le milieu. Le bleu de bromotimol vire au jaune dans un milieu acide et reste bleu dans un milieu basique.

### IV-2-1 Utilisation du mannitol et étude de mobilité

Le milieu de culture « mannitol mobilité » permet de mettre en évidence la mobilité des bactéries et l'utilisation par ces bactéries du mannitol comme seule source de carbone. Le milieu après avoir été coulé dans des tubes à essai vissés stérilisés est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. L'ensemencement par la culture bactérienne pure et jeune est effectué au fil droit par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine stérile. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h. La réaction positive est marquée par le virage de la coloration du milieu initialement rouge au jaune et les traces de migration bactérienne sur le milieu.

### IV-2-2 Utilisation du citrate par les bactéries

Le milieu « citrate de Simons » (annexe 1) qui ne contient que du citrate de sodium est coulé dans un tube à essai vissé puis incliné pour avoir une gélose pente. L'ensemencement est fait par stries longitudinales avec une ansée de la culture pure et jeune. Le bouchon n'est pas vissé à fond afin de permettre les échanges gazeux. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h.

Seules les bactéries possédant un citrate perméase peuvent se multiplier dans ce milieu. La dégradation du citrate par ces bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage de la coloration du milieu initialement vert au bleu. Ces bactéries sont dites bactéries citrate de Simmons (+). Par contre, pour les bactéries citrate de Simmons (-), la couleur du milieu ne change pas.

### IV-2-3 Recherche de la catalase

A partir de colonies pures prélevées de la gélose, un frottis est réalisé sur une lame. Une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3% y est déposée. La libération d'oxygène se matérialisant par la production de bulles de gaz, indique la présence de la catalase.

#### IV-2-4 Utilisation des oses par les bactéries

Le milieu « Hajna-Kligler » (annexe 1) est coulé dans un tube vissé puis incliné pour avoir une gélose pente. Le culot et la pente sont ensemencés avec une ansée de la culture pure et jeune, respectivement par piqûre centrale et par stries ascendantes. Ce milieu contient deux glucides, le glucose et le lactose qui sont utilisés par les bactéries selon la loi de la diauxie (utilisation de la source d'énergie la plus facilement dégradable). Pour ce cas-ci, le glucose est utilisé jusqu'à épuisement avant que les souches n'entament le deuxième glucide plus complexe (le lactose).

L'aspect du milieu se présente généralement comme suit après incubation des souches à 30°C pendant 24 heures :

- Bactérie de type fermentatif du glucose (+) et lactose (+) : culot jaune et pente jaune.
- Bactérie de type fermentatif du glucose (+) et lactose (-) : culot jaune et pente rouge.
- Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose (-) et lactose (-) : culot rouge et pente rouge.

#### IV-2-5 Croissance sur milieu sélectif pour *Pseudomonas*

Hormis les différents tests réalisés pour l'ensemble des souches, d'autres tests comme la production de fluorescence sur milieux sélectifs pour *Pseudomonas* sont effectués essentiellement, aux souches de formes bacilles et coccobacilles. Les souches jeunes âgées moins de 24 heures sont repiquées sur milieux « King B » et incubées à 30°C pendant 24 à 96 heures. Les colonies développant une pigmentation bleu-vert présentant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet à 360nm, sont considérées comme des *Pseudomonas* fluorescents.

### IV-3 Mise en évidence de la diversité physiologique

#### IV-3-1 Tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité est déterminée en milieu TSA liquide contenant des concentrations croissantes en Na Cl. Le principe consiste à cultiver les extraits des souches de bactéries en variant la concentration de NaCl dans le milieu liquide. Le but est d'observer les bactéries qui peuvent tolérer des concentrations allant normalement des plus faibles (0 ; 2,5%) aux plus élevées (5% ; 7,5% ; 10%). Les souches issues de quatre populations sont testées pour chaque concentration en Na Cl. Un témoin sans bactérie sert de référence pour chaque concentration. La lecture de la croissance par la mesure de la densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) permet de quantifier le seuil de tolérance des bactéries aux sels après 48 heures d'incubation.

### **IV-3-2 Tolérance à la caféine**

Les souches issues des quatre populations de cafiers sont cultivées dans des milieux TSA liquide contenant de la caféine variant de 0 à 1g l<sup>-1</sup>. Ceci permet de déterminer le seuil de tolérance à la caféine de chacune des souches, ainsi que leurs optima de croissance sur un milieu contenant de la caféine. L'utilisation de l'azote comme source d'énergie pour chaque souche est évaluée par la lecture journalière de la DO<sub>600</sub> pendant cinq jours d'incubation. L'absence de développement bactérien se manifeste par une vitesse de croissance nulle c'est-à-dire que la DO<sub>600</sub> est stable voire même inférieure à la valeur initiale du témoin. Les témoins sont des milieux non ensemencés par les microorganismes contenant les mêmes doses de caféine.

### **IV-3-3 Tolérance aux variations d'acidité/alkalinité**

Les souches isolées à partir des quatre populations de cafiers sont cultivées dans des cryotubes contenant le milieu TSA liquide à différent pH 5, 7, 9. La croissance est évaluée dans chaque cryotube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 48 heures d'incubation.

### **IV-3-4 Croissance à différentes valeurs de température**

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches issues de SZ, A602, A213 et BJ sont mises en culture sur le milieu solide et incubées à différentes températures : 4°C, 30°C, 40°C.

### **IV-3-5 Mode de respiration de la bactérie**

Le milieu de Leifson et Hugh (annexe 1) contenant le bleu de bromothymol comme indicateur coloré est utilisé comme milieu de culture de base pour la réalisation du test de fermentation des sucres. Les tubes vissés remplis avec 5ml de milieu sont stérilisés puis additionnés de 10% de glucose. Les tubes sont ensuite rapidement refroidis à l'eau froide. L'ensemencement se fait par stries longitudinales avec une ansée de la culture pure et jeune dans deux tubes contenant le milieu solide. L'autre tube est recouvert d'huile de paraffine sur une épaisseur de quatre à cinq mm pour le test d'oxydation. Les tubes ne sont pas revisssés à fond afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). L'incubation se fait à 30°C pendant 48h. Le résultat positif se traduit par la formation d'acide qui se manifeste par le virage de la couleur verte au jaune de l'indicateur de pH :

- la fermentation est caractérisée par le virage au jaune de l'indicateur de pH dans les deux tubes ;
- l'oxydation est caractérisée par le virage de l'indicateur uniquement dans le tube sans huile.

### IV-3-6 Solubilisation du phosphate

Ce test est effectué sur le milieu phosphate tricalcique (TCP) (annexe 1). C'est un milieu opaque à base de phosphate. Les souches sont repiquées sur ce milieu puis incubées jusqu'à apparition d'un halo translucide (résultat positif) sur le milieu. Le milieu reste opaque si la bactérie est incapable de solubiliser le phosphate.

## V- Méthodes d'analyse statistique

### V-1 Analyse des variances

Afin de déterminer les différences entre les moyennes des valeurs des densité optiques de croissance des souches pour chaque plante hôtes obtenues après culture à différentes concentrations en caféine , les données ont été traitées statistiquement par des analyses de variance (ANOVA) avec interaction (concentration en caféine et espèces hôtes). Les données sont soumises au test de Fisher au seuil de probabilité 5% en utilisant le logiciel Xlstat 7.2.

### V-2 Analyses multivariées

Les méthodes d'analyses multivariées ont été appliquées compte tenu de la multiplicité des variables caractérisant les souches. Ces méthodes ont pour objectif de condenser l'essentiel des informations apportées par un nombre élevé de variables interdépendantes, en un nombre restreint de variables fondamentales indépendantes.

Trois méthodes ont été appliquées :

- l'analyse de correspondance multiple (ACM),
- la classification ascendante hiérarchique
- l'analyse factorielle discriminante (AFD)

Le logiciel XLSTAT7.2 a été utilisé pour toutes les analyses.

#### ❖ L'analyse de correspondance multiple (ACM)

L'ACM a été utilisée afin de détecter les similarités et/ou les divergences entre les souches bactériennes en relation avec les variables étudiées. Elle permet de représenter dans un espace factoriel à trois dimensions l'ensemble des variations des caractères et celui des différents individus (souches bactériennes), de telle sorte que chaque individu ou groupe d'individus soient positionnés à proximité des caractères qui les discriminent, et inversement. Le tableau des données de base a été au préalable transformé en un tableau disjonctif complet, dont les lignes sont constituées par les n souches et les colonnes par les p variables. Les caractères qui ne varient point ont été éliminés des analyses.

❖ La classification ascendante hiérarchique (CAH)

Elle est utilisée afin de classer les groupes d'individus partageant les mêmes caractères, en se basant sur leur degré de proximité. Le degré de similitude entre les différentes souches est illustré par un dendrogramme issu de la CAH obtenue à partir des coordonnées des souches sur les trois premiers facteurs de l'ACM. De ce fait les souches sont réparties en groupes d'observations homogènes de telle manière que les souches d'un même groupe (classe) soient fortement similaires entre elles et fortement dissimilaires avec les souches des autres classes. La distance euclidienne et le critère d'agrégation selon la méthode de Ward ont été utilisés.

❖ L'analyse factorielle discriminante (AFD)

Cette méthode tente de résoudre le problème d'affectation de chaque souche parmi les cafiers. Les coordonnées des individus sur les 10 premiers facteurs de l'ACM (71,52 % d'inertie expliquée) selon la méthode DISQUAL (Saporta, 2006) ont servi de variables explicatives lors de cette étude. Les groupes à expliquer sont les quatre populations de cafiers étudiés. Ainsi un ensemble d'individus est donc représenté graphiquement par un nuage de points (groupe de plantes), subdivisé encore en un sous nuage de points (des souches bactériennes). Pour vérifier la différence entre les groupes, le test du Lambda de Wilks a été appliqué. Elle teste l'hypothèse d'égalité des vecteurs moyens des différentes classes. Plus la valeur du Lambda de Wilks est faible, plus les classes sont suffisamment différentes.

## **RESULTATS et INTERPRETATION**

A l'issue des différentes méthodes, il en résulte différents résultats qui évoqueront la diversité en nombre et les caractères morphologiques, métaboliques, et physiologique des endophytes bactériennes, ainsi que leur regroupement selon leurs caractères et cafiers hôtes.

### I- Nombre d'endophytes isolés selon les cafiers hôtes

L'isolement des bactéries sur les milieux TSA ainsi que sur le milieu sélectif AS1 a donné une bonne croissance des différentes colonies. L'absence de microorganismes sur la boite contenant la culture de l'eau de dernier rinçage confirme vraisemblablement l'efficacité de la méthode de stérilisation en surface des explants. Nos bactéries sont donc des endophytes.

Beaucoup des colonies (41,5 %), ne croissent plus lorsqu'on les repique. Ces bactéries sont dites viables mais non cultivables. La majorité des colonies isolées de *Coffea kianjavatensis* (A 602) (soit 73,3%) présentent ces caractères. En effet, le milieu synthétique n'arrive pas à fournir tous les besoins nécessaires pour le développement de certaines bactéries qui ne se trouvent nulle part ailleurs que dans son hôte. Ceci est vraisemblablement dû à la spécificité de la bactérie envers son hôte. De ce fait, le nombre définitif des souches bactériennes obtenues à la fin de la purification est réduit à 62 (Tableau 2)

Tableau 2: Nombre de colonies des bactéries isolées avant et après purification

Plantes hôtes	<i>Espèces sauvages</i>			<i>Espèces cultivées</i>	Total
	SZ	A213	A602	BJ	
Nombre de colonies avant purification	18	20	60	10	106
Nombre de souches isolées après purification	16	20	16	10	62
Pourcentage de souches viables non cultivables	11,1%	0,0%	73,3%	0,0%	41,5%

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Le nombre de colonies bactériennes isolées après la purification, à partir de *Coffea homollei* (*population SZ*) et *C. kianjavatensis* (*population A602*) est identique et égal à 16. Pour l'espèce *C. kianjavatensis* (*population A213*), ce nombre est élevé comparé à ceux des autres populations de cafiers. Comparé à l'espèce cultivée, le nombre de colonies isolées à partir des feuilles des espèces de *Mascarocoffea* est supérieur (Tableau 2). Lors de cette étude toutes les colonies apparues sont considérées, l'existence des doublons est fort probable.

## II- Caractéristiques des souches

La caractérisation des souches d'endophytes des cafiers a été essentiellement basée sur les critères morphologiques, ainsi que sur l'étude des caractères métaboliques et physiologiques

### II-1 Diversité morphologique des endophytes isolés

#### II-1-1 Examen macroscopique des colonies

Les observations des 62 colonies isolées sont rassemblées dans le tableau 3 (détails dans l'annexe 2).

Tableau 3: Synthèse des caractères macroscopiques des souches endophytiques bactériennes des cafiers étudiés

Caractères		Souches de SZ N=16	Souches de A213 N =20	Souches de A602 N=16	Souches de BJ N=10	Total N=62	Pourcentage
Couleur	Incolore	0	0	0	1	1	1,61%*
	Blanchâtre	6	15	13	5	39	62,90%
	Jaunâtre	7	5	1	0	13	20,95 %
	Rose	3	0	1	0	4	6,45%
	Beige	0	0	1	3	4	6,44 %
Contour	Régulier	4	20	1	5	30	48,4%
	Irrégulier	12	0	15	5	32	51,61%
Forme	Ovale	9	0	1	1	11	17,8%
	Arrondie	7	20	15	9	51	82,25%
Surface	Rugueuse	11	0	0	2	13	21,0%
	Lisse	5	20	13	8	46	74,2%
	Poudreuse	0	0	3	0	3	4,9%
Relief	Bombé	8	19	16	6	49	79,03%
	Plate	8	1	0	4	13	20,96%
Consistance	Crèmeuse	16	14	9	6	45	72,58%
	Gélatineuse	0	6	4	0	10	16,12%
	Dure	0	0	3	0	3	4,9%
	Sèche	0	0	0	4	4	6,7%
Transparence	Opaque	15	20	16	9	60	96,77%
	Translucide	1	0	0	1	2	3,2%
Taille	Petite	0	4	5	0	9	14,5%
	grande	16	16	11	10	53	85,5%

\* Pourcentage par espèce hôte

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

D'une manière générale, la grande majorité des colonies bactériennes isolées des cafiers sont de couleur blanchâtre (62,9%), de forme arrondie (82,25%) , à surface lisse (74,2%), à relief bombé (79,0%), à consistance crèmeuse (58,1%), opaque (94,8%) et de taille moyenne à grande (85,8%).

#### ❖ Couleur

Plus de la moitié des souches des quatre populations de cafiers étudiés (39/62) sont de couleur blanchâtre (photo 6a). Treize souches sur 52 issues des espèces sauvages sont de couleur jaunâtre (photo 6b), spécificité inexistante chez BJ. Les autres couleurs ne sont représentées que par très peu de souches et semblent aussi être typique des cafiers hôtes. Par exemple, la bactérie incolore unique de BJ ; la coloration beige qu'on ne trouve que dans A602 et BJ; et la coloration rose, caractéristique des cafiers à teneur faible ou nulle en caféine (A602 et SZ).

#### ❖ Contour

Globalement, la répartition de l'ensemble des souches inventoriées est de l'ordre de 50/50 (régulier/irrégulier). C'est le cas de celles de BJ. Cependant, la totalité de colonies bactériennes d'A213 sont à contour régulier, tandis que celles de SZ et A602 sont majoritairement à contour irrégulier (photo 6c).

#### ❖ Forme

Nos souches sont généralement de formes arrondies (82,3%). La forme ovale est surtout rencontrée chez SZ (9/16) et presque pas chez les autres cafiers (A213 : 0/20 ; A602 : 1/15 ; BJ : 1/9).

#### ❖ Surface

La majorité des souches ont une surface lisse (74,19%). La surface rugueuse se rencontre surtout chez SZ (11/16), aucune chez les deux *C. kianjavatensis* et 2/10 seulement chez BJ. La surface poudreuse est exclusivement typique de 3/16 souches d'A602 (photo 6 d).

#### ❖ Relief

Plus de 79% des souches isolées sont bombées. Mais la répartition entre relief bombé et plat varie selon les cafiers hôtes : SZ (8/8) ; A213 (19/1) ; A602 (16/0) ; BJ (6/4).

❖ Consistance

La majorité des souches étudiée sont à consistance crèmeuse (72,6%). La répartition d'autres types de consistances varie selon les cafériers : SZ n'a que des souches crèmeuses.

Les deux *C. kianjavatensis* abritent spécifiquement quelques colonies gélatineuses (6/20 pour A213 et 4/16 pour A602). La consistance dure une des caractères spécifiques des actinomycètes n'est répertoriée que chez A602 (3/16), alors que BJ ne possède que des souches à consistance sèche en plus des crèmeuses communes à tous les cafériers hôtes.

❖ Transparence

Presque toutes les souches sont opaques (94,8%), sauf deux de SZ et BJ.

❖ Taille

Plus de 85% des souches sont de tailles petites à grandes. Les colonies de petite taille se rencontrent uniquement chez les deux populations de *C. kianjavatensis*.

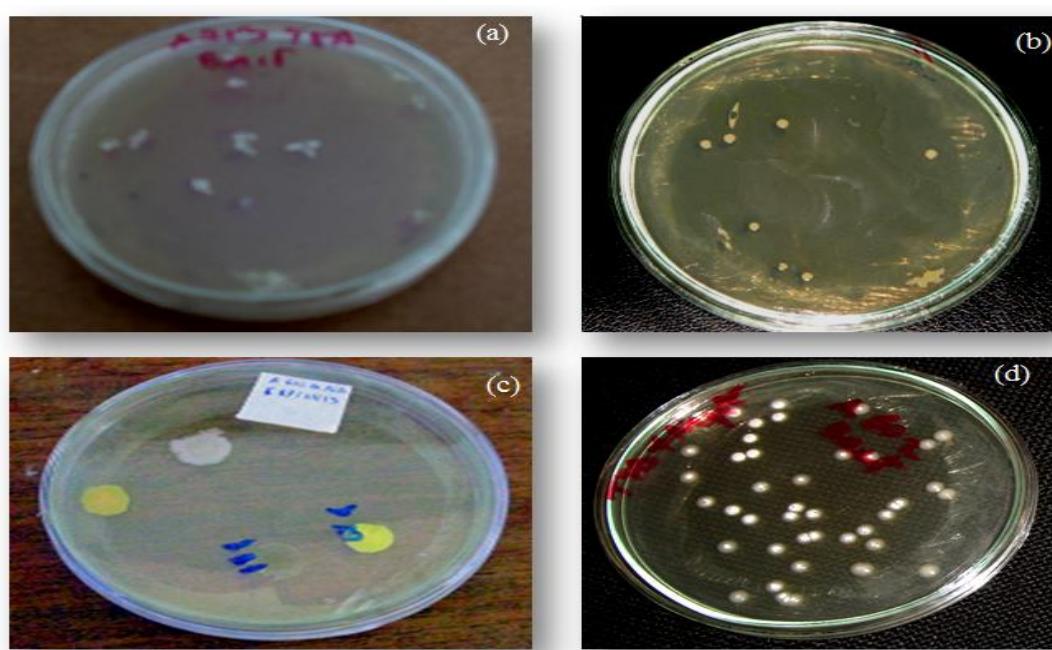


Photo 6 : Aspect de quelques colonies isolées de : (a) A213 ((couleur blanche) ;  
 (b) SZ (couleur jaunâtre) ; (c) A602 *Coffea kianjavatensis* (couleur jaune et blanche) ; (d) A602 *Coffea kianjavatensis* (couleur blanche)  
 (Actinomycètes)

## II-1-2 Diversité microscopique des souches

Les observations microscopiques des 62 souches après coloration sont rassemblées dans le tableau 4.

Tableau 4: Observation microscopique des souches endophytiques bactériennes de cafiers étudiés

Caractères morphologiques		Espèces sauvages			Espèces cultivées Souches de BJ N=10	Total N=62	Pourcentage
		Souches de SZ N= 16	Souches de A213 N=20	Souches de A602 N=16			
Forme	coque	16	20	11	6	53	85,58%
	coccobacille	0	0	0	3	3	4,83%
	bacille	0	0	2	1	3	4,83%
	Fin filament	0	0	3	0	3	4,83%
Regroupement	isolé	0	0	1	4	5	8,06%
	amas	9	15	6	1	31	50%
	chainette	2	0	3	3	8	12,91%
	grappe	2	0	0	0	2	3,22%
	Groupé par 2	0	0	0	2	2	3,22%
	Groupé par 4	0	5	6	0	11	17,74%
	Groupé par 6	1	0	0	0	1	1,62%
	Groupé par 7	1	0	0	0	1	1,62%
	Groupé par 8	1	0	0	0	1	1,62%
Mobilité	immobile	16	19	14	9	58	93,55%
	mobile	0	1	2	1	4	6,45%
Gram	positif	0	4	4	1	9	17,74%
	négatif	16	16	12	9	53	82,26%

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Les bactéries appartiennent à deux groupes selon les réponses aux réactions chimiques colorées : neuf bactéries Gram positif et 53 bactéries Gram négatif.

### ✓ Forme des bactéries

La majorité des souches sont des coques (83,88%) (photo 7a), et les espèces sauvages en présentent beaucoup plus (47/53) que de bacilles (2/53) (photo 7b). Par contre, pour l'espèce cultivée les trois formes sont présentes: coque (6/10), coccobacille (3/10) et bacille (1/10). Enfin, la forme “fin filament” caractère des actinomycètes paraît spécifique à l'espèce sauvage A602 (photo 7d).

✓ Regroupement des bactéries

Nos bactéries sont surtout groupées en amas (50%) ou en chaînette (12,91%) excepté celles d'A213. Les regroupements par six, sept, huit, et en grappe (photo 7a) apparaissent spécifique de SZ, tandis que les souches des deux populations de *C. kianjavatensis* sont toutes groupées par quatre, et celles de BJ, par deux.

✓ Mobilité

Les bacilles répertoriés dans BJ et A602 (photo 7b) sont mobiles comme on s'y attendait, alors que les coques qui représentent presque la totalité des bactéries de cafiers étudiés (93,55%) sont immobiles, sauf une d'A213.

✓ Gram

Plus de quatre-vingt-deux pourcent des bactéries isolées sont Gram- (photo 7a). Quelques individus Gram+ se rencontrent chez *C. kianjavatensis* (10/36) (photo 7c) et BJ (1/10), tandis que SZ n'en présente aucun.

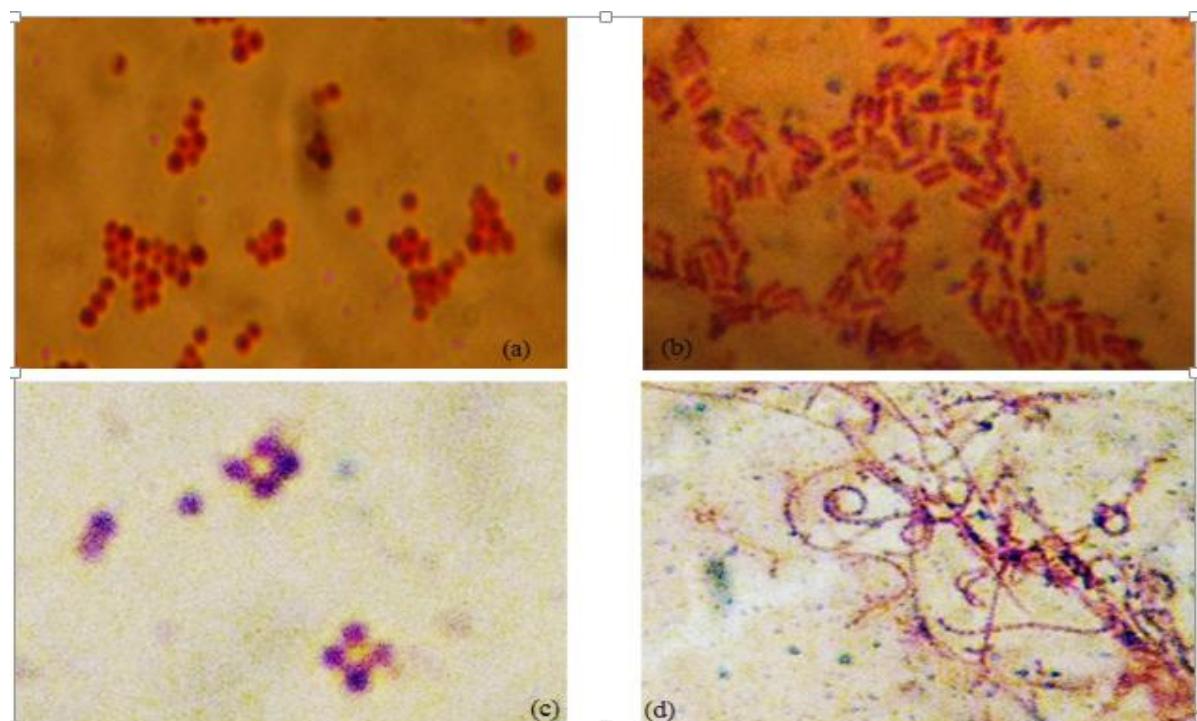


Photo 7 : Formes microscopiques des bactéries de : (a) SZ (*C. homollei*) (coques groupés en amas) ;(b) A602 (*C. kianjavatensis*) (bacilles gram négatifs) ; (c) A213 (*C. kianjavatensis*) (coques gram positifs) ; (d) A602 (actinomycètes) vues au microscope optique à immersion (x 100)

En plus de la confirmation de la présence d'actinomycètes chez A602, les examens microscopiques mettent également en évidence les caractéristiques particulières de quelques souches de SZ : absence de bactéries gram positif, absence de bactéries mobiles, bactéries groupées par 6, 7 ou 8.

## II-2 Diversité métabolique

Les résultats de l'étude de la variation du comportement des souches vis-à-vis de l'utilisation de différentes sources de carbone et la décomposition de l'eau oxygénée par les souches sont représentés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5: Caractères métaboliques des souches endophytiques bactériennes des cafiers étudiés

Souches	Citrate	Mannitol	Lactose	Glucose	Catalase	Plantes hôtes
A2B1 - A2B9- A2B2- A2B - A2B4- A2B5- A2B8 A6B4 - A6B5 - A6B6 - A6B12- A6B13	-	-	-	+	+	A213 - A602
A2B10 - A2B6 -A2B7 A6B1 - A6B2 - A6B3 - A6B10 SB14 - SB16	-	-	+	+	+	A213 - A602 - SZ
A2B11 - A2B12 - A2B13 - A2B14 - A2B15 - A2B16- A2B17 - A2B18 - A2B19 - A2B20 BJ8	-	+	-	+	+	A213 - BJ
A6B7 - A6B8 - A6B9 - A6B14 - A6B15 - A6B16 BJ1 - BJ2 - BJ3 - BJ4 - BJ5 - BJ6 - BJ7 - BJ9 - BJ10 SB13	+	-	-	+	+	A602 - BJ -SZ
SB11 - SB12	-	+	+	+	+	SZ
A6B11 SB1 - SB2 - SB3 - SB4 - SB5 - SB6 - SB15 - SB7 -SB8 - SB9 - SB10	+	+	+	+	+	A602 - SZ

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : *Bourbon jaune*

Toutes les souches sont « catalase positif » et utilisent le glucose comme source de carbone.

Sur l'ensemble des 62 endophytes isolés, 11 souches de SZ et une seule souche de A602 ont la capacité d'utiliser les trois autres composés organiques étudiés. Ceci montre la capacité des souches à métaboliser une large gamme de métabolites très importante de ces souches. C'est un des caractères qui les distingue des espèces de cafier à caféine (A213 et Bourbon jaune). De même, l'incapacité de toutes les souches bactériennes isolées de A213 à utiliser le citrate ou encore l'incapacité de toutes les souches de BJ à métaboliser le lactose sont fort probablement liées aux caractères spécifiques de ces cafiers hôtes.

Par ailleurs, pour l'ensemble des souches isolées, d'une part il en existe qui sont capables d'utiliser un (10 souches de A602, 13 souches de A213, neuf souches de *Bourbon jaune* et trois souches de SZ) ou deux substrats (deux souches de SZ) autres que le glucose.

D'autre part, il existe des souches qui ne dégradent qu'un seul substrat parmi les quatre étudiés. C'est le cas des souches de A 213 (7 souches) et de A602 (six souches) qui ne peuvent utiliser que le glucose. Un autre caractère commun est encore décelé chez les souches de deux populations de *C. kianjavatensis* vis-à-vis des préférences en sources d'énergie.

Concernant le test de croissance des bacilles négatifs sur milieu spécifique pour *Pseudomonas*, il est à signaler qu'aucune des bactéries croissant sur le milieu n'ont donné des fluorescences. Ceci indique que ces bactéries sont dans le groupe de *Pseudomonas* non fluorescents.

## **II-3 Diversité physiologique**

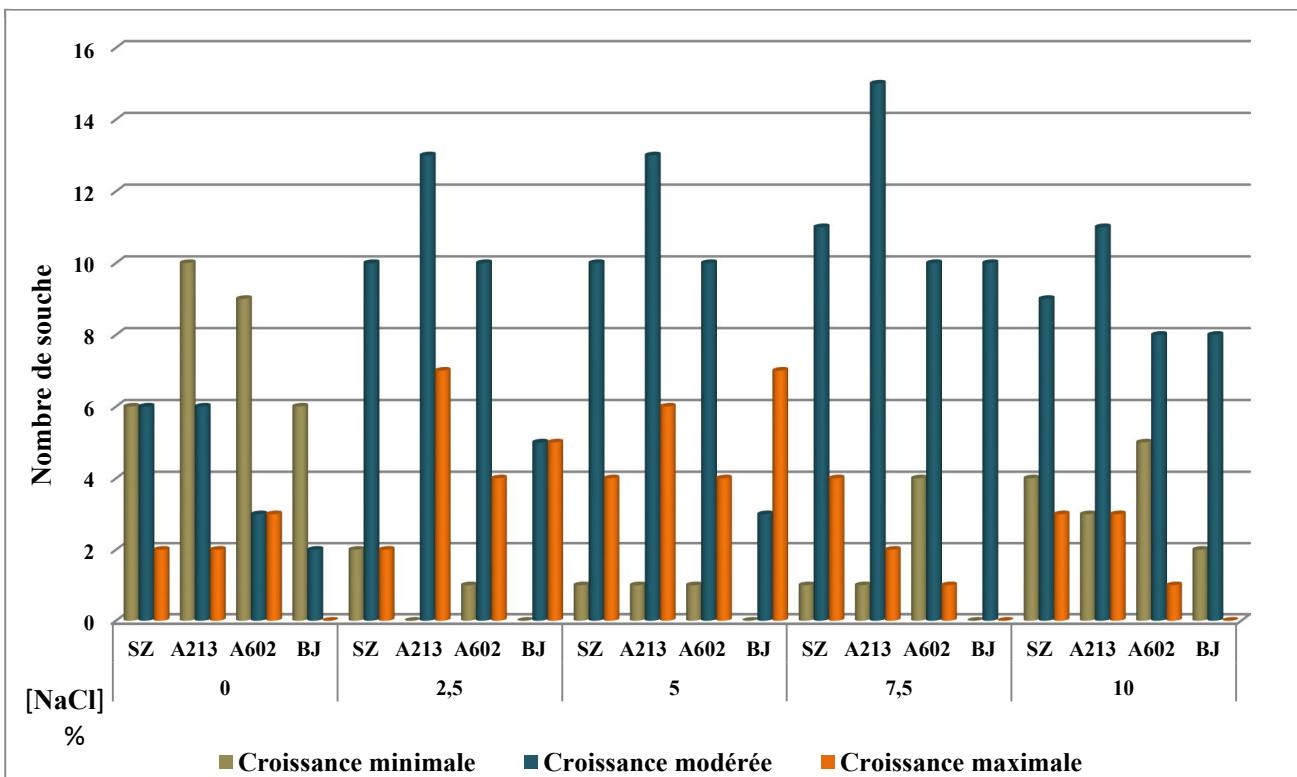
### **II-3-1 Variation de la tolérance à la salinité (NaCl)**

En général, toutes les souches croissent modérément à toutes les concentrations de NaCl étudiées. Les concentrations 2,5 et 5 % semblent être les teneurs en sel les plus favorables à la croissance de l'ensemble des souches.

La valeur critique ou seuil de tolérance en sel des souches de chaque population de cafiers étudiés est variable (figure 2). La majorité des souches ont une croissance minimale (DO faible environ à 0,200 nm) aux concentrations 0 et 10%. Ces dernières sont dites valeurs critiques. Par exemple pour A213, 10 souches ont une croissance minimale à 0% et 3 à 10%.

Par contre, aux concentrations 2,5 ; 5 et 7,5%, pour toutes les populations de cafiers hôtes, les nombres de souches à DO faible sont réduits tandis que ceux à croissance optimale augmentent. Ceci suggère que ces concentrations semblent être les plus favorables pour la croissance des endophytes de ces cafiers.

Pour les espèces sauvages, toutes les concentrations de sel testées sont favorables à au moins une souche. Pour l'espèce cultivée, par contre, l'optimum de croissance est réduit aux concentrations allant de 2,5 à 5%. La présence de souches issues des espèces de *Mascarocoffea* ayant des optima à doses élevées en sel (7,5 à 10%) montre que leurs endophytes bactériens sont plus halophiles que celles issues de l'espèce cultivée.



SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Figure 2: Effets de différentes concentrations en NaCl sur le nombre de souches endophytiques isolées à partir des caféiers étudiés

### II-3-2 Variation de la croissance aux différents pH

Le comportement des souches en croissance dans des milieux à différents pH (acide, neutre et alcalin) est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6 : Nombre de souches endophytiques bactériennes pouvant croître sur pH différents.

	SZ (N=16)	A213 (N=20)	A602 (N=16)	BJ (N=10)	Total N=62	Pourcentage
pH=5	0	5	2	3	10	16,13%
pH=7	11	6	8	4	29	46,8%
pH=9	4	5	5	2	16	25,81%
Indifférentes	1	4	1	1	7	11,3%

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Les souches se comportent de manière différente suivant leur exigence en pH. Les souches provenant d'A213, A602 et BJ se multiplient dans les trois milieux (acide neutre basique), seules les souches provenant de SZ, ne croissent que dans des milieux neutres ou basiques. Le milieu neutre paraît le plus favorable pour la majorité des souches, suivi du milieu alcalin. Le milieu acide semble être le plus défavorable. Chez les espèces de caféiers étudiés, la présence des souches indifférentes est remarqué (11,3%) vis-à-vis du pH (voir détails en annexe 5) c'est-à-dire elles se comportent de façon similaire quel que soit le type du milieu.

Les souches sont classées en quatre groupes suivant leur exigence en pH (Tableau 7).

Tableau 7 : Classification des souches endophytiques bactériennes des caféiers suivant leur exigence en pH

Groupe 1 : souches acidophiles			Groupe 2 : souches neutrophiles				Groupe 3 : souches basophiles				Groupe 4 : souches indifférentes			
A6B1 A6B14	A2B5 A2B6 A2B11 A2B15 A2B20	BJ4 BJ7 BJ10	SB1 SB3 SB4 SB5 SB6 SB9 SB10 SB12 SB13 SB14 SB15	A6B2 A6B5 A6B7 A6B8 A6B11 A6B12 A6B13 A6B15	A2B1 A2B10 A2B14 A2B17 A2B18 A2B19	BJ1 BJ2 BJ5 BJ6	SB2 SB7 SB8 SB11	A6B3 A6B4 A6B6 A6B10 A6B16	A2B2 A2B3 A2B12 A2B13 A2B16	BJ3 BJ8	SB16	A2B4 A2B7 A2B8 A2B9	A6B9 BJ9	
A602 – A213 - BJ			SZ – A602 – A213 -BJ			SZ – A602 – A213 -BJ				SZ – A602 – A213 -BJ				

Il est noté que vis-à-vis de plantes hôtes, les souches isolées des caféiers sans caféine (SZ et A602) sont surtout neutrophiles ou basophiles. Alors que pour les plantes à caféine (BJ, A213) les trois types existent. Les deux actinomycètes isolés dans *C. kianjavatensis* A602 sont neutrophiles (A602 B12 et A602 B13) alors que le troisième (A602 B14) est acidophile. Ceci montre que les trois actinomycètes soient encore différents.

### II-3-3 Comportement des endophytes face à la variation de températures

Toutes les souches ne sont pas tuées quand elles sont soumises à une température de 4°C. Elles se croisent normalement à une température de 30°C. Elles sont par contre toutes mortes à une température supérieure à 40°C.

### II-3-4 Diversité des réponses à différentes teneurs en caféine

Par souci de clarté deux figures sont considérées : les courbes de croissance caractéristiques des souches de chaque population de caféiers étudiés (Figure 3) et les histogrammes résumant le comportement des souches au 3<sup>ème</sup> et au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation (Figure 4).

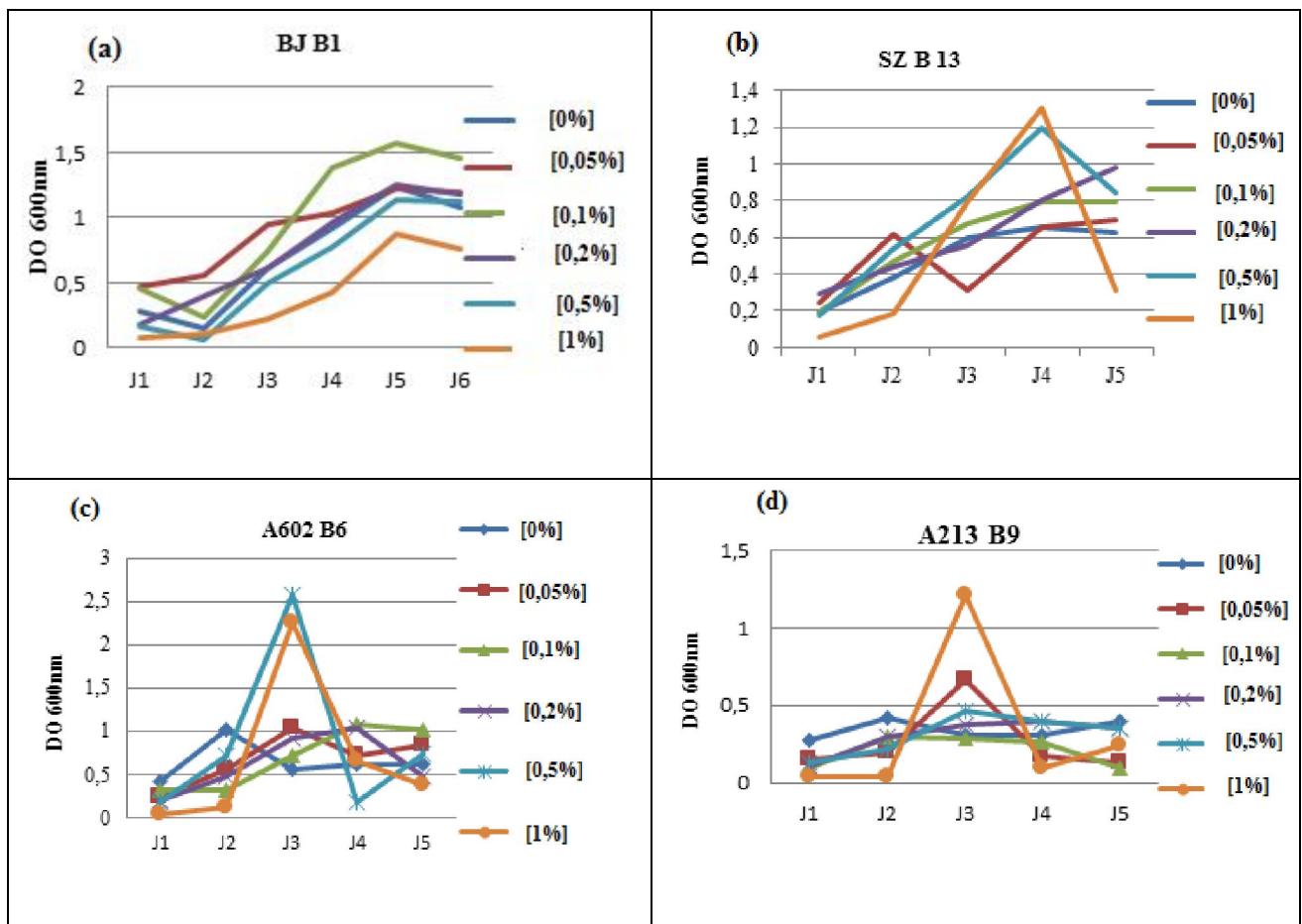


Figure 3: Courbe de croissance des souches isolées de la population *Bourbon jaune* (a), de SZ (*C. homollei*) (b), de A602 (*C. kianjavatensis*) (c) et de A213 (*C. kianjavatensis*) (d) à différentes concentrations en caféine (0 à 1 %)

La figure 3 est une synthèse des courbes de croissance bactérienne à différentes concentrations en caféine, évaluée par la valeur de la DO du milieu de culture en fonction du temps. D'une manière générale, pour chaque cafier hôte, les courbes diffèrent d'une souche à l'autre suivant les concentrations en caféine. Pour *C. arabica* (BJ B1) les courbes de croissance sont généralement de forme sigmoïde (figure 3 (a)). Pour celles issues des trois cafiers sauvages (SZ B13, A602 B6, A213 B9), la croissance ne suit pas toujours cette loi (phase de latence et/ou stationnaire absente pour quelques-unes). La plus fréquemment observée est une courbe caractérisée par une phase exponentielle suivie tout de suite par la phase de déclin (figure 3b, 3c, 3d). Ceci pourrait signifier que les souches microbiennes ont entamé directement la phase de multiplication maximale et meurent tout de suite après, suite à l'épuisement des sources de carbone ou d'azote dans le milieu. L'apparition de la phase de déclin juste après la phase exponentielle est aussi expliquée par le fait que la multiplication des bactéries soit accompagnée généralement par l'accumulation de déchets toxiques entraînant la lyse de la cellule. Ce fait est d'autant plus observé que les bactéries sont soumises à des concentrations élevées en caféine (0,5 et 1g/l) ; cas des souches des espèces de *Mascarocoffea* : SZ B3-SZ B4-SZ B6-SZ B13-

A602 B4-A602 B6-A602 B8-A213 B2-A213 B4-A213 B5-A213 B9-A213 B13-A213 B14-A213 B15 (Annexe 6).

Les résultats sur la capacité des souches à croître sur le milieu à concentration faible ou élevée en caféine indiquent que les souches sont capables d'utiliser la caféine comme source de carbone et d'azote. (Formule de la caféine dans l'annexe 10)

Les courbes quelles soient les formes sont comparées afin d'évaluer le comportement des souches vis-à-vis des concentrations en caféine. Pour les souches issues de *C. arabica*, il s'avère que la concentration à 1g/l est tolérée mais la multiplication des souches en cette concentration est largement inférieure aux autres. Pour *C. homollei*, certaines souches se comportent de manière similaire à celles de *C. arabica* (SZ B1, SZ B71, SZ B8, SZ B11, SZ B16). Par contre, certaines croissent abondamment à 1g/l. Les concentrations en caféine 0,2 et 0,5g/l semblent les plus favorables pour la croissance des souches de SZ. Néanmoins, l'atteinte de la croissance maximale (en nombre de jours) diffère suivant les souches pour une concentration donnée. Par exemple, les souches SZ B3 et SZ B13 qui se développent bien dans le milieu à 1g/l se différencient par un jour d'écart d'aboutissement à la croissance maximale. Il en est de même pour les souches SZ B11, SZ B6, SZ B4, SZ B8, SZ B7, SZ B413 (Annexe 6).

Pour *C. kianjavatensis*, les souches se comportent de manière similaire à celles issues de *C. homollei*. Pour A602, elles ont une meilleure croissance dans le milieu à 0,2g/l de caféine, tandis que celles de A213 se développent bien dans les milieux supérieurs à 0,2g/l.

La figure 4 ci-dessous résume les valeurs moyennes des DO des souches pouvant croître dans des milieux aux trois concentrations de caféine (0 g/l, 0,5 g/l et 1g/l) au 3<sup>ème</sup> et au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation.

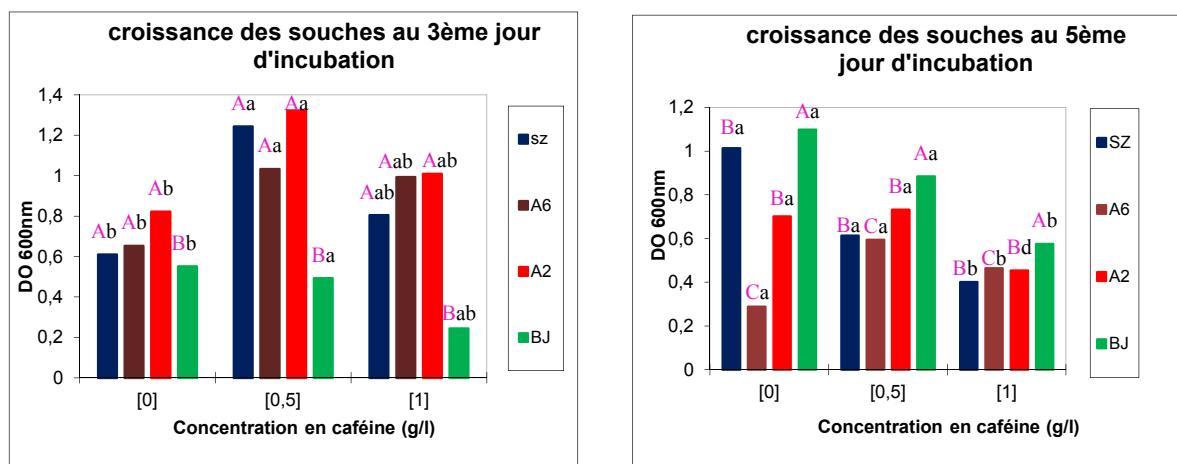


Figure 4 : Valeur moyenne de la Densité Optique (DO) de croissance des souches au 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour d'incubation. Chaque colonne correspond à la moyenne des valeurs de DO de croissance des souches pour chaque population de cafiers

D'après cette figure, il en ressort que :

- comparé aux souches du cafier cultivé, celles de *Mascarocoffea* ont des densités optiques maximales dépassant 0,5 lorsqu'elles sont soumises aux différentes concentrations en caféine, après seulement trois jours d'incubation.
- les densités optiques maximales des souches de SZ et A213 croissant dans le milieu à concentration élevée en caféine sont significativement plus élevées par rapport à ceux croissant dans le milieu sans caféine. Ceci montre que paradoxalement, les souches de ces deux *Mascarocoffea* se multiplient plus rapidement en présence de caféine à 0,5%.
- Les densités optiques maximales des souches de l'espèce cultivée sont plus élevées comparées à celle des *Mascarocoffea* après cinq jours d'incubation. Les souches ne sont pas tuées, leurs croissances sont seulement ralenties. L'effet de la caféine est donc bactériostatique et non bactéricide pour les souches de *C. arabica*.

### II-3-5 Type respiratoire des souches

Après 24 heures d'incubation, le virage du bleu de bromothymol est vérifié en présence des souches. Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Type respiratoire des souches endophytiques bactériennes isolées des cafiers étudiés

Souches Aérobies strictes		Souches Anaéobies strictes	Souches Anaérobies facultatives					Souches inertes		Souches alcalinisant le milieu
A6B1	BJ1	A2B1	A2B5	A6B2	SB1à SB16	BJ4	A6B6	A2B8	A6B10	
A6B7	BJ2	A2B3	A2B7	A6B3		BJ5		A2B2	A6B13	
A6B9	BJ3	A2B6	A2B9	A6B4		BJ6		A2B4	A6B14	
			A2B11àA2B20	A6B8		BJ7		A2B10		
				A6B11		BJ8				
				A6B12		BJ9				
				A6B15		BJ10				

Presque toutes les souches font virer la coloration initiale verte au jaune dans les deux tubes avec ou sans huile. Elles peuvent vivre en présence ou en absence d'oxygène. Tels types de souches sont dites aérobies ou anaérobies facultatives.

C'est le cas des souches de *SZ*, *A213* et *Bourbon jaune*. Quelques-unes ne pouvant dégrader le glucose qu'en présence d'oxygène (virage au jaune) sont dites aérobies strictes (*A6B1*, *A6B7*, *A6B9*, *BJ1*, *BJ2*, *BJ3*), contrairement aux anaérobies strictes qui ont la capacité de dégrader le glucose même en absence d'oxygène (*A2B1*, *A2B3*, *A2B6*). D'autres bactéries aérobies strictes utilisant la peptone comme source d'énergie alcalinisent le milieu qui vire au bleu. D'autres n'acidifient ni n'alcalinisent le milieu (maintien de la coloration verte). Ce sont les souches inertes.

### II-3-6 Solubilisation du phosphate

La capacité des souches à solubiliser le phosphate est marquée par la présence d'halos autour des colonies. Dans notre étude, ce phénomène n'est repéré qu'après 14 jours d'incubation. La répartition des souches pour la solubilisation du phosphate est présentée dans le tableau 9. La moitié des souches de *A602*, *SZ* et *BJ* participent à la solubilisation du phosphate. Pour *A213*, seule une souche présente un petit halo autour de sa colonie.

Tableau 9 : Solubilisation du phosphate des souches endophytiques bactériennes isolées des cafiers étudiés

Souches solubilisatrices de phosphate				Souches non solubilisatrices de phosphate			
SB1 - SB2	A6B2 - A6B4	A2B9	BJ1 - BJ2	SB3 - SB10	A6B1 - A6B3	A2B1 - A2B2	BJ3
SB4 - SB5	A6B7 - A6B8		BJ4 - BJ5	SB11 -	A6B5 - A6B6	A2B3 - A2B4	BJ6
SB6 - SB7	A6B9 - A6B12		BJ9	SB12	A6B10 -	A2B5 - A2B6	BJ7
SB8 - SB9	A6B11 - A6B15			SB13 -	A6B13	A2B7 - A2B8	BJ8
				SB14	A6B14 -	A2B10 - A2B11	BJ10
				SB15 -	A6B16	A2B12 - A2B13	
				SB16		A2B14 - A2B15	
						A2B16 - A2B17	
						A2B18 - A2B19	
						A2B20	

### III- Regroupement des souches

Les analyses précédentes indiquent l'extrême diversité des caractères des endophytes bactériens du point de vue morphologiques, biochimiques et physiologiques. Elles ne permettent pas la détermination complète, voire la distinction des communautés bactériennes associées aux cafiers étudiés. La seule certitude est la différenciation des souches d'actinomycètes.

Il est ainsi difficile de trancher sur les véritables caractères spécifiant chacune des souches répertoriées. De même, les relations éventuelles entre les souches isolées et les cafiers hôtes avec ou sans caféine ne sont pas très nettes à première vue. Effectivement, il est tout à fait possible qu'une souche désignée par un code pour un cafier donné soit exactement la même, ou du moins similaire à celle d'un autre. Par exemple, la souche A213B10 de couleur jaune isolée de A213 pourrait être la même que la souche A602B9 de A602.

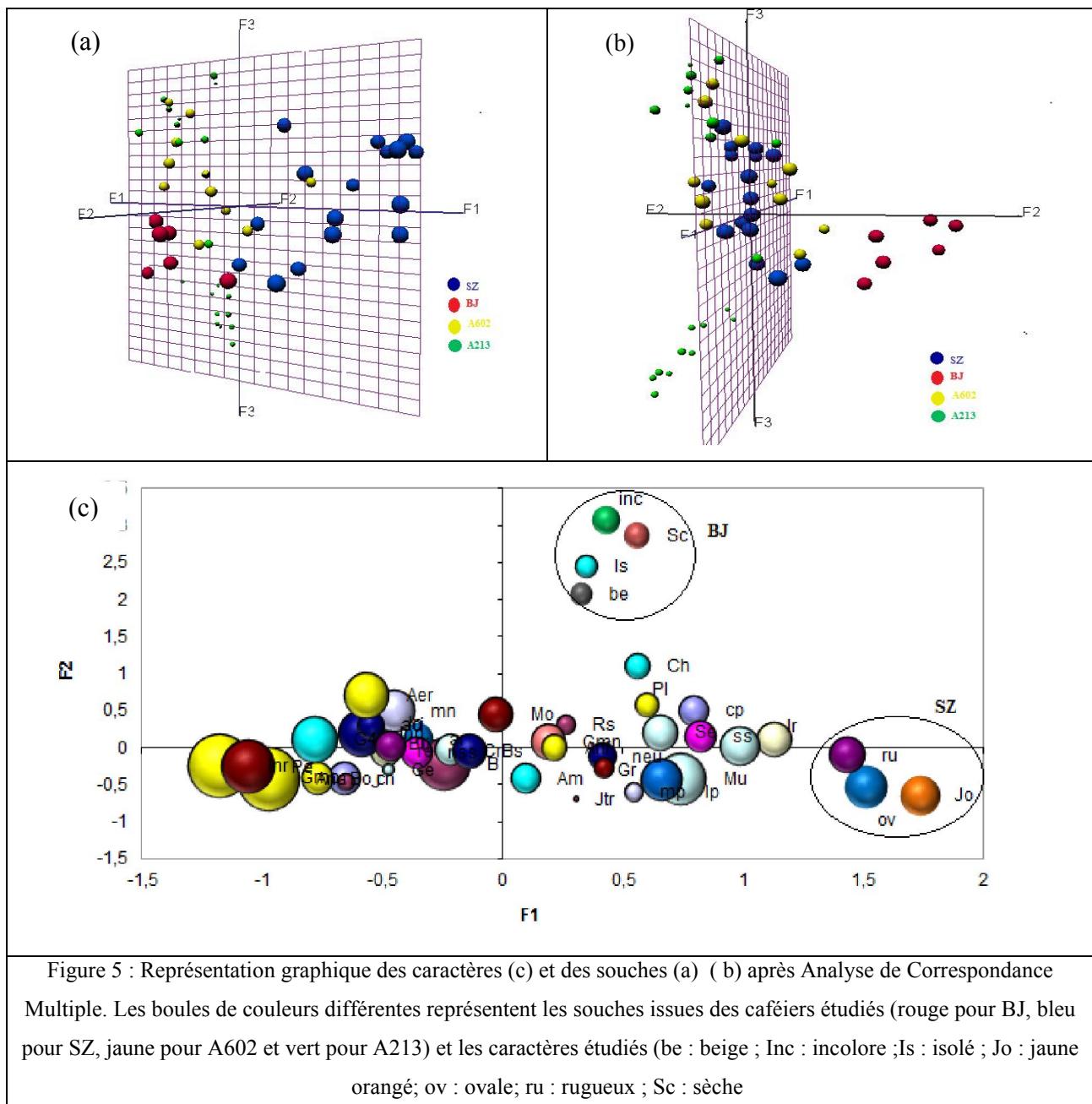
La complexité des résultats incite l'application des analyses statistiques multivariées afin d'entrevoir une vue synthétique du statut des souches en relation avec les cafiers hôtes.

#### III-1 Regroupement des souches par rapport aux caractères

Dans cette analyse, le but était de regrouper les souches partageant les caractères similaires. Les individus présentant des caractères rares ont été exclus du fait de leur influence négative sur la répartition de l'inertie totale sur les facteurs discriminants (trois souches d'actinomycètes et deux bacilles de A602, un bacille et trois coccobacilles de BJ).

Le résultat de l'Analyse de Correspondance Multiple (ACM) des 53 souches restantes sur les 47 caractères étudiés (annexe 9) est représenté dans l'espace formé par les trois premiers facteurs (37,2% d'inertie) (figure 5).

D'une part, le premier axe (F1) sépare ostensiblement les souches de SZ de celles des autres cafiers hôtes (figure 5a). D'autre part, le second axe (F2) distingue les souches de BJ de celles des autres cafiers (figure 5b). Par contre, les souches de A602 et A213, dont les contributions par rapport aux trois axes sont relativement faibles, ne sont pas bien individualisées dans cette analyse. Les caractères dominants qui ont permis la séparation des souches de SZ et BJ à celles des autres souches sont représentés dans la figure 5c. Les caractères : jaune orangé, ovale et rugueux qui contribuent fortement à l'axe F1 représentent les caractères des souches issues de SZ tandis que les caractères beige, incolore, isolé et sèche qui se trouvent sur l'axe de F2 sont celles des souches de BJ.



### III-2 Classification des souches

Les résultats de la Classification Ascendante Hiérarchique (figure 6) affirment les conclusions tirées de l'ACM. Une première troncature (42% d'indice de dissimilarité) sépare les souches de SZ de celles des trois autres caféiers. Une deuxième troncature (38% d'indice de dissimilarité) divise les bactéries en trois groupes : (i) les souches de SZ (ii) les souches des deux populations de *C. kianjavatensis* (iii) un groupe rassemblant un amalgame des autres souches des quatre caféiers hôtes. Une dernière troncature (30% d'indice de similarité) permet pourtant la séparation nette des souches de BJ au sein du groupe (iii). Les souches partageant des caractères similaires sont groupées dans une même classe. Les souches colonisant le caféier cultivé (*C. arabica*) se distinguent de celles des caféiers sauvages.

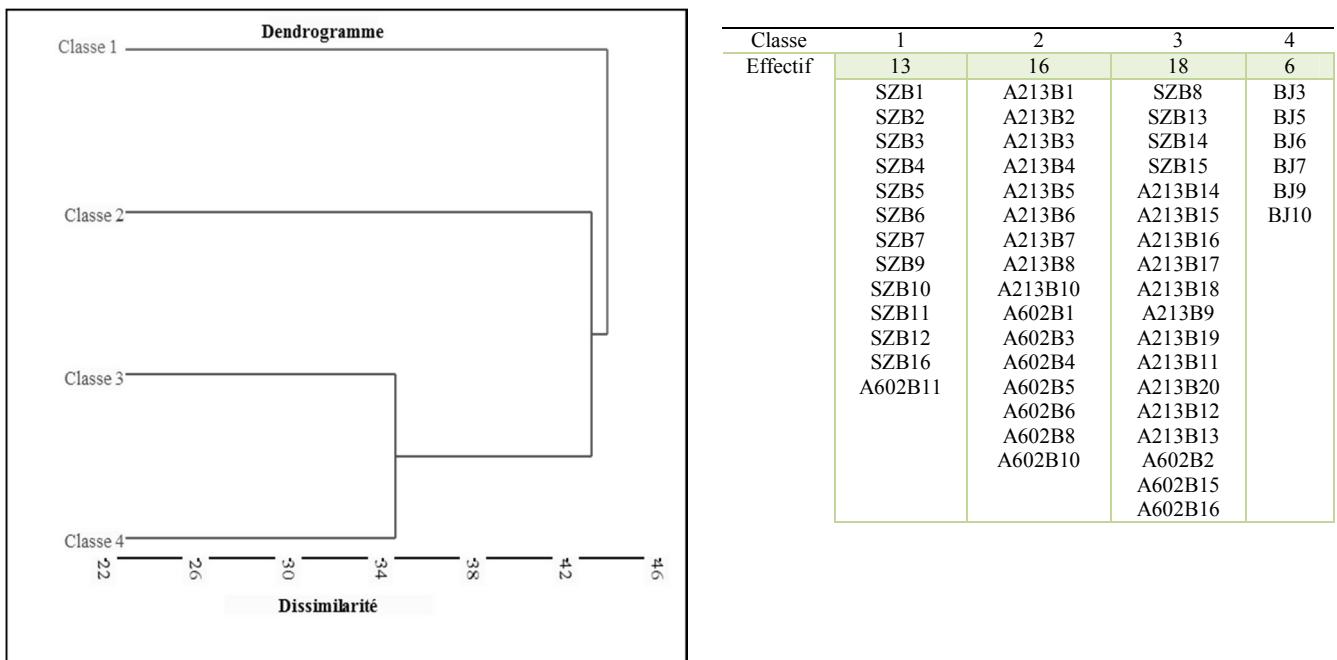
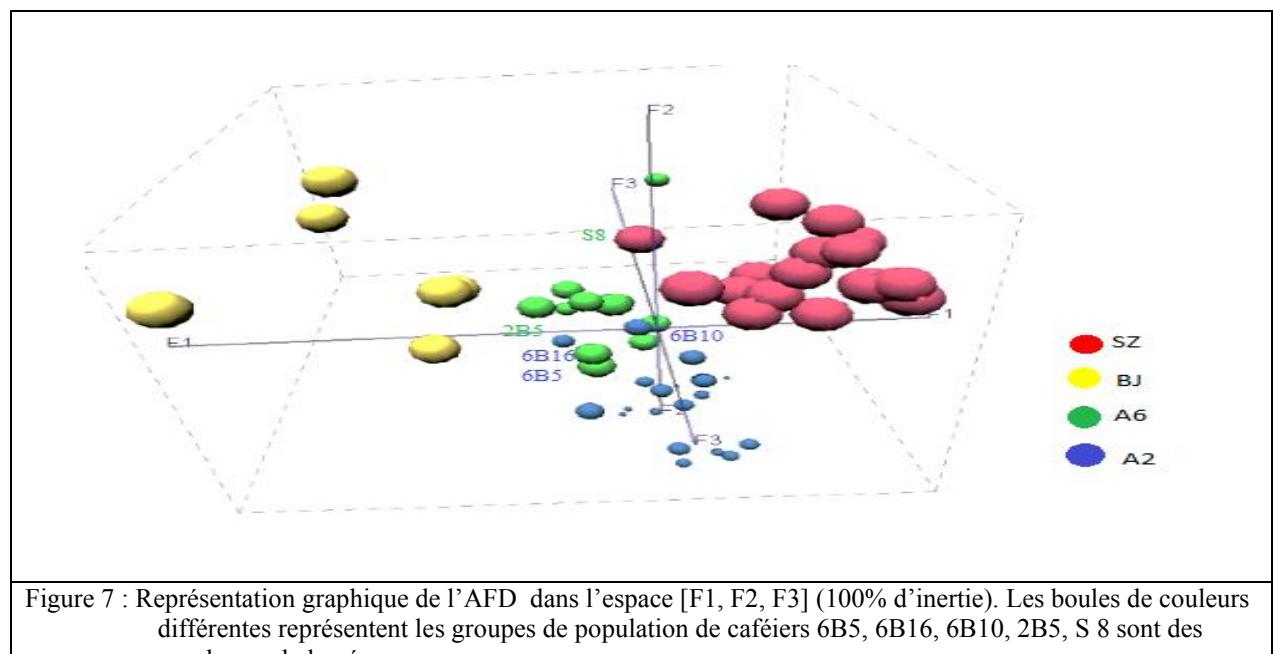


Figure 6: Classification des individus selon leurs caractères après Classification Ascendante Hiérarchique

Afin de vérifier une éventuelle répartition logique des souches parmi les cafiers hôtes, l'application de l'analyse factorielle discriminante à partir des 10 premiers facteurs de l'ACM (71,5 % d'inertie cumulée) est jugée utile.

### III-3 Regroupement des souches par rapport aux cafiers hôtes

Dans cette analyse, les quatre cafiers hôtes sont considérés comme groupe de classification à priori. La figure 7 ci-dessous représente la synthèse des résultats obtenus après analyse factorielle discriminante.



Cette figure présente les souches dans un espace à trois dimensions formé par les trois facteurs de l'Analyse Factorielle Discriminante. Le plan formé par les deux premiers axes (91% d'inertie) met bien en évidence la séparation nette des souches de SZ et de BJ. La distinction des souches des deux populations de *C. kianjavatensis* qui ne sont pas bien individualisées dans ce plan devient plus nette quand on considère en plus le troisième facteur.

Lors de cette analyse les souches sont rassemblées en quatre groupes en fonction de leur caféier hôte. La faible valeur du Lambda de Wilks (0,2) et la probabilité très hautement significative (inférieur à 0,0001) de rejet de l'hypothèse nulle (inexistence de groupes) confortent l'effectivité de ces quatre groupes.

Les quatre groupes étant :

- Groupe 1 formé par les souches isolées de SZ ( Caféier sans caféine):
- Groupe 2 formé par les souches isolées de A213( caféier à caféine)
- Groupe 3 formé par les souches isolées de A602 (caféier sans caféine)
- Groupe 4 rassemble toutes les souches de BJ (caféier à caféine)

Il existe par contre une divergence quant aux affiliations de quelques isolats. Des souches issues d'un caféier hôte ont été retrouvées réparties dans d'autres caféreries. Par exemple, la souche S8 (figure 6) s'écarte du groupe de SZ et se met près des souches de A602. Le tableau 10 ci-dessous explicite cette affectation. Effectivement les souches mal classées se sont migrées et sont reclassées vers d'autres groupes. C'est le cas de :

- une souche de A213 affectée vers A602
- trois souches de A602 migrée vers A213

Tableau 10 : Reclassassement des individus après Analyse Factorielle Discriminante

	Vers A213	Vers A602	Vers BJ	Vers SZ	Somme	Pourcentage des souches bien classées
de A213	19	1	0	0	20	95 %
de A602	3	8	0	0	11	72,72 %
de BJ	0	0	6	0	6	100%
de SZ	0	1	0	15	16	93,73%
Somme	22	10	6	15	53	

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Le tableau 11 suivant présentant les probabilités d'appartenance et les carrés des distances aux barycentres des groupes des souches mal classées explique leur nouvelle affectation. Par exemple la probabilité d'appartenance de la souche SZB8 de SZ au groupe A602 est hautement significative. Autrement dit, la probabilité à priori de SZB8 d'appartenir au groupe SZ est relativement faible comparé à la probabilité à postériori de se retrouver dans le groupe A602. Par contre, il faut être prudent dans l'acceptation de cette classification. Par exemple pour la souche 6B10, sa nouvelle affectation dans le groupe A213 est litigieuse (carré des distances aux barycentres et probabilités d'appartenance aux deux groupes relativement similaires).

Tableau 11 : Probabilités d'appartenance et carrés des distances aux barycentres des groupes des souches mal classées

Souches	Barycentre				Probabilité			
	A213	A602	SZ	BJ	A213	A602	BJ	SZ
SZB8	23,466	12,185	16,921	39,380	0,006	0,875	0,000	0,119
A213B5	11,001	7,834	32,542	32,536	0,272	0,728	0,000	0,000
A602B5	8,980	9,234	33,728	43,167	0,674	0,326	0,000	0,000
A602B10	14,540	13,879	30,741	53,694	0,566	0,434	0,000	0,000
A602B16	10,061	10,933	22,823	26,748	0,737	0,262	0,000	0,001

SZ : *Coffea homollei* ; A213 : *C. kianjavatensis* ; A602 : *C. kianjavatensis* ; BJ : Bourbon jaune

Cette étude met en évidence des inter-affectations au sein des espèces sauvages de la série *Verae*. Ceci indique probablement l'existence d'homologie entre ces souches et certaines bactéries endophytiques de son nouveau groupe d'affectation. Les souches sont distribuées en quatre groupes bien différenciés correspondant globalement aux quatre cafiers hôtes.

# DISCUSSION

Rapport-gratuit.com   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

L'objectif de cette étude a été (i) de décrire la diversité des endophytes bactériens de quatre populations cafiers et puis (ii) de mettre en évidence les relations entre cette diversification et la diversité de caractères des cafiers hôtes.

Dans cette étude, nos résultats montrent clairement que la communauté d'endophytes s'avère variée aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif.

Pour l'isolement, des broyats au lieu de morceaux de feuilles classiques sont déposés sur les milieux de culture. Il en résulte que les endophytes apparaissent en nombre plus élevé et se multiplient plus rapidement (deux à trois jours seulement). Effectivement, lors de cette étude le nombre de souches isolées passe du simple au double comparé à celui des études faites par Andriamialiharisoa (2011) et Ratsimbazafy (2011) qui ont utilisé des morceaux de feuilles. La trituration permettrait ainsi une meilleure libération des microorganismes de la cellule hôte.

Par ailleurs, le nombre de souches isolées diffère d'une espèce, voire d'une population à une autre. Par exemple, 16 souches chez *C. homollei* (SZ) et seulement dix chez *C. arabica* (BJ) sont recensées. Pour les deux populations de *C. kianjavatensis*, une vingtaine de souches ont été dénombrée chez A213 contre une soixantaine pour A602 lors de l'isolement.

Après purification, 20 souches ont pu être isolées chez A213, tandis qu'il n'en restait que 16 pour A602, du fait de la consistance dure et sèche de la plupart des colonies (ce qui rend leur repiquage difficile).

Nos résultats rejoignent ceux de Calheiros et al. (2009) et Sleytr et al. (2009) qui ont montré que la diversité microbienne était influencée par les plantes. Un cas extrême se rapporte à deux variétés de canne à sucre où Castro-González et al. (2011) ont pu isoler 398 souches bactériennes.

Compte tenu de l'âge de nos matériels végétaux, les nombres de bactéries isolées par caffier hôte sont tout à fait corrects. Effectivement, Ratsimbazafy (2011) et Randriamialiharisoa (2011) n'ont répertorié que 8 souches d'endophytes bactériens par cafiers hôtes à partir des feuilles âgées de cinq mois de deux autres espèces de *Mascarocoffea*. Par ailleurs, l'étude de Rijavec et al. (2007) sur l'isolement des bactéries des jeunes pousses de quatre variétés de maïs a donné 16 souches bactériennes. Néanmoins, selon Kriel et al. (2000), le nombre de bactéries dans une espèce est fonction de l'âge de la plante. Effectivement, l'étude de Vega et al. (2005), sur *C. arabica* montre que les bactéries endophytiques isolées à partir des feuilles de plants adultes sont deux fois plus nombreuses que celles issues des jeunes pousses.

Un autre facteur qui expliquerait le nombre réduit de colonies dans cette étude pourrait provenir du fait que les graines ont été prétraitées avant la germination ; ce qui aurait conduit à éliminer tous les épiphytes prédestinés à devenir des endophytes. De plus, les jeunes plantules ont été par la suite mises en culture dans des conditions contrôlées afin d'éviter l'intégration d'autres épiphytes de la biosphère. Par déduction, il se peut que les endophytes isolés des feuilles soient ceux se trouvant dans les graines et qu'ils aient été transmis verticalement.

Pour l'étude de la morphologie des endophytes isolés, deux caractéristiques sont utilisés : caractéristiques macroscopique et microscopique. Les caractéristiques macroscopiques des souches bactériennes sont des renseignements adéquats pour leur identification partielle. Par exemple, la morphologie, la coloration des colonies, la présence ou l'absence d'hyphes aériens peuvent déjà fournir une indication sur le genre de certaines bactéries (Saubolle et Sussland, 2003). C'est le cas des souches de A602. Effectivement, les colonies A602 B11, A602 B12, A602 B13 et A602 B14 apparues après 24 heures d'incubation ont une surface bombée, lisse à aspect dure. La colonie A602 B11 garde cet aspect tandis que les autres deviennent poudreuses après deux jours d'incubation. Cet aspect poudreux est particulier pour les souches développant un mycélium aérien. Des études réalisées sur le mécanisme de la morphogenèse par Sprusanky et *al.* (2003) ont montré que la formation du mycélium aérien était due à la libération de petites molécules une fois que les substances nutritives du milieu sont épuisées. Ces colonies à aspect dure qui développent des mycéliums aériens sont classées parmi les actinomycètes. La présence d'actinomycètes parmi les endophytes répertoriés jusqu'à ce jour chez les cafiers est rapportée ici pour la première fois. La première question qui vient à l'esprit par rapport à cette découverte est : existe-t-il une relation quelconque entre les actinomycètes de A602 et la composition biochimique particulière de cette population de *C. kianjavatensis* (teneur élevée en théacrine) (Rakotomalala, 1993).

Les caractères morphologiques des colonies à consistances dures et à surface poudreuse, ont été décrits par Petrosyan et *al.* (2003) et Cavalla et Eberlin (1994) comme étant des actinomycètes du genre *Streptomyces*. De plus, ces souches présentent un optimum de croissance à pH 7, une croissance minimale à 10% de sel. Elles sont « catalase et glucose positives » qui, selon Zerizer et *al.* (2006) sont des caractères exclusifs des Streptomycètes. Bien que le sol ait été certainement le réservoir le plus riche de ces microorganismes, les organes des plantes comme les feuilles dans cette étude peuvent être aussi leur logis. La présence de ces microorganismes dans les feuilles d'autres plantes a déjà été publiée par Araujo et *al.* (1999) chez le maïs (*Zea mays*) ; Kafur et Khan (2011) chez *Catharanthus roseus*.

Parmi les populations de cafiers étudiés, seule A602 présente ces microorganismes. Elle paraît la plus sujette à la diversité bactérienne par rapport aux autres populations de la série *Verae*. Ce fait est probablement relié à la présence dans cette plante d'une diversité importante de composés chimiques particuliers comme la théacrine, la théobromine (Rakotomalala, 1993, Campa et al. (2004). Deux cas sont possibles (*i*) soit la viabilité de ces microrganismes n'est pas affecté par ces composés chimiques, de telle sorte que ces souches les tolèrent et s'en adaptent ou en tirent avantage; (*ii*) soit ces endophytes sont responsables de la biosynthèse de ces molécules. Effectivement, Andriamialiharisoa (2011) a montré le rôle joué par les endophytes bactériens de type bacille et coque isolées des feuilles de *C. perrieri* sur la biosynthèse de molécules spécifique de ce cafier. Ainsi, la diversité microbiologique est vraisemblablement en relation avec la diversité biochimique de l'hôte.

Du point de vue cytologique, les résultats sont en accord avec les études antérieures qui ont montré que la majorité des espèces bactériennes isolées des plantes sont presque toutes Gram négatif. Effectivement, Ravelomanantsoa (2004) a pu isoler 28 souches Gram négatif et seulement 18 souches Gram positif dans les organes de *Eugenia jabolana*. Ratsimbazafy (2011) a obtenu six bactéries Gram négatif et deux bactéries Gram positif à partir des feuilles de *C. perrieri* A305.

La forme filamenteuse répertoriée que chez A602 est similaire à celle décrit par Zerizer et al. (2006) et Djaballah (2010) qui est un des caractères des actinomycètes.

En ce qui concerne les caractères métaboliques des souches, nos résultats sur l'utilisation du glucose et du catalase par les souches rejoignent ceux de Ratsimbazafy (2011) et Andriamialiharisoa (2011) relatifs aux souches bactériennes de deux autres espèces sauvages malgaches, *C. perrieri* et *C. alaotrensis*.

Il est à noter que la capacité à métaboliser une large gamme de métabolites des souches des cafiers sans caféine (A602 et SZ) laisse à penser que ces souches bactériennes interviennent éventuellement dans la chaîne du métabolisme de la caféine (spécifiques des hôtes à teneur en caféine très faible ou nulle).

Parallèlement à ces études de caractères morphologiques et métaboliques, les caractères physiologiques des souches sont aussi étudiés.

Le critère de tolérance spécifique des souches bactériennes lors de cette étude a été défini par rapport à leur comportement vis-à-vis des concentrations faibles ou élevées en NaCl. D'après la

bibliographie les souches bactériennes peuvent être subdivisées en trois groupes selon leur exigence en sel (Tiquia, 2006):

- Les souches halotolérantes qui peuvent se multiplier dans des milieux à concentrations faibles ou modérées en NaCl (2,5 et 10%), ou sans sel du tout. Elles sont représentées par la majorité des souches (87,1%).
- Les souches non halophiles, c'est-à-dire, ne pouvant vivre que dans un milieu sans sel (1,61% représenté par une seule souche de A602 (A6B9))
- les souches dites halophiles qui requièrent du NaCl pour leur croissance (9,67% des souches totales dont deux des souches de SZ ; deux de A213 et 2 de BJ). Il s'agit de (SB14, SB16, A2B9, A2B16, BJ3, BJ9) [Annexe 4].

Les résultats montrent par ailleurs qu'il existe une diversité pour la tolérance en sel des endophytes des cafiers. Plusieurs souches sont aptes à tolérer des doses élevées. Ces résultats sont en accord avec les études de Riva et al. (2002) sur le cotonnier. Certains auteurs mentionnent que les endophytes sont souvent plus tolérants que leur plante hôte (Zahran, 1999, Swaraj et Bishnoi, 1999 Vriezen et al., 2006, 2007). Cette faculté des bactéries à tolérer une large gamme de concentration en sel est due à l'accumulation intra cellulaire de solutés compatibles ‘osmoprotecteurs’ (Csonka et Hanson, 1991).

Effectivement, les souches des cafiers sauvages sont clairement plus tolérantes par rapport à celles issues de l'espèce cultivée. Cette tolérance pourrait amener la plante hôte à s'adapter aux conditions extrêmes de l'environnement. En effet, exposée au milieu salin une plante contourne l'intoxication causée par les excès de sels en les stockant dans la vacuole. Il s'en suit une augmentation de la pression osmotique qui par la suite favorise la déshydratation des cellules (consécutif à la succion importante de l'eau sur le cytosol). Cependant, les composés compatibles dits « osmoprotecteurs » produits par la plante ainsi que par les bactéries endophytiques permettant d'ajuster la pression osmotique entre le cytosol et la vacuole pourraient vraisemblablement faire face au stress hydrique de la plante.

Dans notre étude, nous nous sommes limités à la concentration maximale de 10g/l de NaCl rapportée par la littérature (Tiquia, 2006) pour la tolérance des endophytes à la salinité. Cependant, nos résultats suggèrent que beaucoup de souches semblent être capables de survivre à une concentration beaucoup plus élevée. Cette hypothèse devrait être liée à un phénomène de coévolution endophytes-plantes hôtes au cours des temps, et tels endophytes pourraient servir à d'intéressantes applications pratiques (inoculation de plantes utiles en vue d'adaptation à des milieux salins).

Sur le comportement des souches suivant le pH, nos résultats montrent que beaucoup de souches préfèrent le milieu basique ou neutre au milieu acide. Ce qui rejoint les observations faites par Davet (1996) sur l'étude des microorganismes du sol.

Les souches d'actinomycètes réagissent différemment selon le milieu acide ou neutre. Ces derniers résultats sont conformes aux études faites par Loqman (2009) et Djaballah (2010) sur les actinomycètes en général. Par déduction, ces actinomycètes sont probablement distincts.

Sur le test des bactéries solubilisatrices de phosphate, nos résultats montrent que la durée d'apparition de halos est trop lente par rapport aux observations (après 2 à 7 jours d'incubation) faites par Razakatiana (2010) sur les souches rhizosphériques et telluriques, et Randrianofidina (2012) sur les souches des sols termitières. Par ailleurs, nos expérimentations montrent que beaucoup de nos endophytes bactériens sont capables de solubiliser le phosphate. Jabaji (2012) a constaté le même phénomène lors de l'étude des endophytes bactériens de *Panicum virgatum*. Cette propriété serait un plus pour d'éventuelles applications en agriculture puisque le phosphore représente un élément capital pour la croissance et le développement de la plante.

Depuis 1978, la recherche de nouvelles variétés de caféier à faible teneur en caféine par hybridation interspécifique a été entreprise. Cependant, Baumann (1987) a trouvé que des bactéries mutantes peuvent dégrader la caféine *in vitro*. On peut également citer Roldàn (2005) qui a montré le rôle de *Pseudomonas putida* sur le catabolisme de la caféine. Dans notre cas, la caféine est rapidement utilisée par la majorité des souches issues des caféiers sauvages. Effectivement celles-ci atteignent leur optimum de croissance, après seulement trois jours d'incubation, dans un milieu contenant 0,5 à 1 % de caféine, contrairement à celles isolées du caféier cultivé. C'est vraisemblablement une des causes de la faible teneur en caféine de ces caféiers. Cette capacité des bactéries endophytiques isolées des feuilles à utiliser la caféine comme seule source de carbone est à notre connaissance rapportée pour la première fois dans cette étude. La capacité des bactéries à dégrader la caféine a déjà suscité de nombreuses études à savoir : Woolfolk (1975), Blecher et Lingens (1977), Perraud-Gaime (1995), Mazzafera (2002), Sarath babu et al. (2005), Ryan (2011).

L'ensemble des caractères morphologique, métabolique, et physiologique décrits précédemment ont servi à définir les coefficients de similarité entre les souches par des méthodes statistiques multivariées permettant ainsi leur regroupement. Cette méthode dite « taxonomie numérique » a été déjà utilisée par Roussos (1977) pour caractériser les espèces

bactériennes issues de l'eau et des sédiments marins et par Williams et al. (1983) pour redéfinir les espèces des *Streptomyces*.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) a permis la séparation des souches en deux groupes bien distincts, le premier isolant les souches du caféier cultivé (BJ) et l'autre correspondant à l'ensemble des bactéries des caféiers de la série botanique *Verae* établie par Chevalier (1947) et Charrier (1978).

L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) apporte plus de précision sur les isolats de la série *Verae* : séparation nette de souches de SZ caféier strictement sans caféine de celles des *C. kianjavatensis* (teneur en caféine appréciable).

Ces analyses statistiques qui ont donné la répartition des souches en quatre groupes bien nettes suivant les quatre groupes de caféiers étudiés permettent d'en déduire que : (i) les bactéries endophytiques des espèces sauvages n'appartiendraient pas à l'espèce cultivée, et que (ii) l'hypothèse d'une relation entre groupe de bactéries d'endophytes et teneur en caféine des caféiers hôtes est fort probable.

Grâce à la diversité des caractères morphologiques, métabolique et physiologique de nos bactéries et en nous référant aux travaux de Adingra (1998) et l'article de synthèse consulté sur internet ([www.techno-science.net](http://www.techno-science.net)), nous avons de fortes présomptions sur la détermination des familles et genres résumés dans l'annexe 8

## **CONCLUSION et PERSPECTIVES**

## Conclusion

Cette étude permet d'avoir une vue d'ensemble d'une partie de la biodiversité bactérienne endophytique associée aux espèces de cafiers.

Les cafiers sauvages et cultivés abritent une diversité de bactéries endophytiques. Soixante-deux (62) bactéries ont pu être isolées à partir des jeunes feuilles de quatre populations de cafiers dont trois appartenant au groupe des *Mascarocoffea*, et en référence, un cafier cultivé (*C. arabica*). Le nombre, les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques de ces souches varient en fonction des plantes hôtes. Effectivement, les résultats obtenus sur la caractérisation de ces bactéries sont d'un grand intérêt, même si on n'est pas arrivé jusqu'à la détermination de l'espèce. Les caractérisations ont permis (i) la mise en évidence de bactéries en forme de bacilles, coccobacilles et coques (ii) la subdivision des souches en types halophiles ou halotolérantes, solubilisatrices de phosphate ou non, aérobies ou aérobies facultatives. Mais ces tests n'ont pas permis la distinction des communautés bactériennes associées aux cafiers étudiés. La seule certitude concerne la présence des actinomycètes que l'on ne trouve que chez *C. kianjavatensis A602*. La présence de ces souches répertoriées chez A602 un cafier à composition chimique particulière (teneur élevée en théacrine) vérifie la spécificité d'hôte des endophytes.

Les analyses statistiques ont permis de discerner des souches communes et/ou spécifiques pour les quatre cafiers et leur distribution en quatre groupes en relation avec les quatre plantes hôtes étudiées. Les souches issues des cafiers sans caféine sont différentes de celles à caféine. Il existe alors une relation entre composition chimique des cafiers et distribution des souches. Le regroupement des souches correspond avec les regroupements effectués par les botanistes qui ont classé les cafiers en quatre groupes.

Par ailleurs nos résultats suggèrent que beaucoup d'endophytes contribuent à la nutrition et donc à la croissance des plantes du fait de leurs capacités à solubiliser le phosphate inorganique. Ces bactéries pourraient être développées comme biofertilisants à l'instar *Brachiaria*. D'autres, grâce à leur tolérance en sel indiquerait la possibilité de l'utilisation de leur plante hôte en croisements interspécifiques dans le but d'adaptation des hybrides sous d'autres conditions écologiques.

## Perspectives

- ✓ Dans cette étude nous avons répertorié 62 souches dans trois espèces de caféier. Ceci ne reflète pas la biodiversité globale naturelle associée à tous les caféiers (124 espèces). Les investigations devraient être effectuées sur les autres espèces.
- ✓ Les caractérisations des souches étudiées n'ont pas permis de réaliser une identification complète. Ils ne peuvent être utilisés que pour une identification préliminaire. Pour plus de précision, il est donc nécessaire d'identifier les espèces et la diversité infra-spécifique par des techniques plus pointues, notamment le séquençage moléculaire.
- ✓ Il serait aussi utile de tester l'aptitude des souches de *Mascarocoffea* à synthétiser des enzymes responsables de la dégradation de la caféine, et partant, exploiter éventuellement ces bactéries pour réduire la teneur en caféine des caféiers cultivés par inoculation.
- ✓ Grâce à la variabilité des métabolites secondaires que les endophytes bactériens peuvent synthétiser, leur exploitation dans le domaine pharmaceutique et agronomique devrait être envisagée comme c'est le cas de xyamicine.
- ✓ L'inoculation expérimentale dans le but de tirer profit du caractère solubilisatrice de phosphate est tout à fait envisageable. Effectivement, l'utilisation de ces souches pourrait constituer un bio-engrais susceptible de se substituer à l'application répétée d'engrais phosphatés solubles, chers, rapidement lessivés vers les nappes phréatiques et les rivières. Ce qui conduirait au développement d'une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.
- ✓ La considération des fonctions essentielles que ces endophytes jouent dans la physiologie des plantes est aussi capitale pour la compréhension des interactions entre plantes et endophytes.
- ✓ L'étude de coévolution plante - endophytes est à considérer afin de:
  - expliquer la diversité d'adaptation écologique des plantes hôtes
  - appréhender l'histoire évolutive des caféiers
  - prévoir les différentes alternatives permettant de faire face au changement climatique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adingra A. A., 1998. Monographie sur les microorganismes : bactéries et cyanobactéries de côte d'ivoire. *Centre de Recherches Océanologiques. BPV 18 Abidjan. Côte d'Ivoire.* 61p.
- Andriamafana., 2012. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et identification des communautés d'actinomycètes du sol forestier *de Pointe à Larrée (côte est de Madagascar. Mémoire de DEA. Biochimie. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo* 60p
- Andriamialiharisoa R. F., 2011. Métabolites secondaires particuliers des feuilles des cinq espèces de *Mascarocoffea* et endophytes de *Coffea* sp A315. *Mémoire de DEA. Biochimie. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo* 70p.
- Andrianasolo D.N., 2013. Génétique des populations et modèles d'architecture et de production végétale. Application à la préservation des ressources génétiques des *Mascarocoffea*. *Thèse de doctorat en cotutelle entre l'Université de Montpellier 2 et l'Université d'Antananarivo*, 183p.
- Anthony F., 1992. Les ressources génétiques des cafétiers. Collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. *Travaux et Documents de l'ORSTOM*. 18381. 320 p.
- Araujo J. M., A. C. Silva and J. L. Azevedo, 1999. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Braz Arch Biol Technol.* **43** : 447-451.
- Bérdy J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot.* **58** (1) : 1–26.
- Blecher R. and F. Lingens, 1977. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische.* **358** : 807-817.
- Calheiros C. S. C., A. f. Duque, A. Moura, I. S. Henriques, A. Correia, A. O. S. S. Rangel and P. M. L. Castro, 2009. Change in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology.* **100** : 3228-3235.
- Campa C., J. F. Ballester, S. Doulbeau, S. Dussert, S. Hamon and M. Noirot, 2004. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry.* **88** : 39-43
- Castro-González R., L. Martínez-Aguilar, A. Ramírez-Trujillo, P. Estrada-de los Santos, and H.J. Caballero-Mellado, 2011. Diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant Soil. [online]*.

- Cavaglier L., J. Orlando, M. I. Rodriguez, S. Chulze and M. Etcheverry, 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* **156** : 748-754.
- Cavalla M. et T. Eberlin, 1994. Isolement des *Streptomyces* du sol. *L'opéron XIX* : 13-17.
- Charrier A., 1978. La structure génétique des cafiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffeea*). Leurs relations avec les cafiers d'origine africaine (*Eucoffea*). *Café cacao thé*. **10** (4) : 245-250.
- Chevalier A., 1947. Les cafiers du globe. Fasc. III, Systématique des cafiers et faux cafiers. Maladies et insectes nuisibles. *Encycl. Boil.* XXVIII Tas. **III** : 1-356.
- Complant S., B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clement and E. Ait Barka, 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 1685-1693.
- Coombs J. T. and C. M. M. Franco, 2003. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 4260-4262.
- Couturon E., P. Lashermes and A. Charrier, 1998. First intergeneric hybrids (*Psilanthes ebracteolatus* Hiern × *Coffea arabica* L.) in coffee trees. *Canadian Journal of Botany*. **76** : 542–546.
- Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. *Paris, Collection Mieux Comprendre. Inra.* 383P.
- Davis A. P., 2010. Six species of *Psilanthes* transferred to *Coffea* (*Coffeeae, Rubiaceae*). *Phytotaxa*. **10** : 41–45.
- Davis A. P., J. Tosh, N. Ruch and M. F. Fay, 2011. Growing coffee: *Psilanthes* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data, implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Bot. J. Linn. Soc.* **167** : 357–377.
- Davis A. P., R. Govaerts, D. M. Bridson and P. Stoffelen. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Bot. J. Linn. Soc.* **152** : 465–512
- Debbab A., A. H. Aly, R. A. Edrada-Ebel, W E. G. Müller, M. Mosaddak, A. Hakiki, R. Ebel and P. Proksch, 2009. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus

*Chaetomium sp.* isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13** (2) : 229-234

Deckert R. J., L. Melville and R. L. Peterson, 2001. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life cycle in the foliage of *Pinus strobes*. *Mycological Research* **105** : 991 -997

De Matos Nogueira E., F. Vinagre, H. P. Masuda, C. Vargas, V.L. M. de Pádua, F. R. da Silva, R. V. dos Santos, J. I. Baldani, P. C. Gomes Ferreira and Hemerley, 2001. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genet. Mol. Biol.* **24** :199-206.

Denis S., 1996. Dégradation de la caféine par *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*, étude physiologique et biochimique. *Thèse de doctorat. Biochimie et biologie moléculaire. Univ. Montpellier.* 217p.

Djaballah C., 2010. Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la Sebkha de AIN M'LILA. *Memoire Magister en microbiologie Fac. Sciences.Univ. Mentouri Constantine.* 72p.

Dörr J., T. Hurek and B. Reinhold-Hurek, 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* **30** :7-17.

Ferreira A., M. C. Quecine, P. T. Lacava, S. Oda, J. Azevedo and W. L. Araujo, 2008. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett.* **287** : 8–14.

Gosio, 1896. In Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58 (1) : 1-26

Frommel M.I., J. Nowak and G. Lazarovits, 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberousum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas sp.* *Plant Physiol.* **96** : 928–936.

Roldàn J. G. D., 2005. Activity and stability of caffeine demethylases found in *Pseudomonas putida* IF -3. *Bibliothèque et archives de Canada.*77p.

Hallmann J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee and J. W. Kloepffer, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.

- Hudson A. O., N. H. Ahmad, R. Van Buren, and M. A. Savka, 2010. Sugarcane and grapevine endophytic bacteria: isolation, detection of quorum sensing signals and identification by 16s v3 RDNA sequence analysis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* : 801-806.
- Hurek T., L. L. Handley, B. Reinhold-Hurek and Y. Piche, 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15** :233-242.
- Iniguez A. L., Y. Dong, and E. W. Triplett, 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17** : 1078-1085.
- Jabaji S., P. Séguin, R. Samson and F. Gagné-Bourque, 2012. L'isolation et la caractérisation des endophytes du panic érigé (*Panicum virgatum*). *Agriculture et agroalimentaire Canada*. 3p.
- James E. K. and F. B. Olivares, 1997, Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17** : 77-119.
- Joost R.E., 1995. *Acremonium* in fescue and ryegrass : boon or bane? A review. *J Anim Sci.* **73** : 881-888.
- Kafur A. and A. B. Khan, 2011. Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity. *Iranian journal of biotechnology*. **9** (4) : 302-306.
- Kebe I. B., J. Mpika, K. F. N'guessan, P. K. Hebbar, G. S. Samuelsand et S. Ake, 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sci. Nat.* **6** (1) : 71 - 82
- Kobayashi, D.Y., and J.D. Palumbo, 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In *Microbial endophytes*. Edited by C.W. Bacon and J.F. White. *Marcel Dekker, Inc.*, New York : 199–233
- Kriel W. M., W.J. Swarts and P.W. Crous, 2000. Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnosperme. *Botanical recherche*. **33** : 1-29.

- Krishnan S., T. A. Ranker, A. P. Davis, J. J. Rakotomalala, 2013. An assessment of the genetic integrity of ex situ germplasm collections of three endangered species of *Coffea* from Madagascar: implications for the management of field germplasm collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, in press. [online]: <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-012-9898-3>
- Leroy J.F., 1980. Evolution de la taxogenèse chez les caféiers (*Coffea L.*, *Psilunthus* Hook. F. et *Nostoluchma* Durand). Hypothèse sur leur origine. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **291** :593-596.
- Loqman S., 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: isolement, caractérisation de souches de bactéries *actinomycétales* antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. *Thèse de doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Univ. Reims Champagne-Ardenne.* 217p.
- Marquez-Santacruz H. A., R. Hernandez-Leon, M. C. Orozco-Mosqueda, I. Velazquez-Sepulveda and G. Santoyo, 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research.* **9** (4) : 2372-2380.
- Nayak S., M. J. Harshitha, Maithili, C. Sampath, H. S. Anilkumar and C. Rao Vaman, 2011. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. *Indian Journal of Biotechnology.* **11** : 86-91.
- Mazzafera P., 2002. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Sci. agric.* **59** (4) : 815-821.
- McNeil M. M. and J. M. Brown, 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7** (3) : 357-417.
- Newman D. J. and G. M. Cragg, 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70** (3) : 461-477.
- Perraud-gaime I., 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamentueux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. *Thèse de doctorat en biochimie et biologie moléculaire. Univ Montpellier II.* Thèse et document microfiché. **154**. 210p.

- Petrini O., 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press : 175-187.
- Petrini O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag : New York. 179-197.
- Petrosyan P., M. Garcia-Varela, A. Luz-Madrigal, C. Huitron and M. E. Flores, 2003. *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. j. Syst. Evol. Microbiol.* **53** : 269-273.
- Pimentel M. R., G. Molina, A. P. Dionísio, M. R. Maróstica Junior and G. M. Pastore, 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*, Article ID: 576286. 11 p.
- Rakotomalala J. J. R., 1992. Diversité biochimique des cafiers : Analyse des acides hydroxycinnamiques, base puriques et diterpènes glycosidiques. Particularités des cafiers sauvages de la région malgache. Travaux et documents Microfichés: **99**. ORSTOM. 216p.
- Rakotomalala J. J., Crose., N. Clifford and Charriear., 1993. Caffeine and theobromine in green beans from *Mascarocoffea* . *Phytochemistry*: **26** : 273-279.
- Rakotondravao A., 2001. Contribution à l'étude de l'activité biologique de quelques constituants chimiques spécifiques des graines de *Mascarocoffea*. *Mémoire de DEA. Biochimie. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo*. 73p.
- Ralalamoria L., 1999. Etude des activités allélopathiques des acides phénols, des bases puriques et des diterpènes glycosidiques extraits des graines de *Coffea canephora*, et de deux *Mascarocoffea* : *C. A150 et C. sp A311*. *Mémoire de DEA. Biochimie. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo*. 77p
- Ratsimbazafy T., 2011. Relation entre spécificité chimique de *Coffea perrieri* population A305 (*Mascarocoffea*) et les endophytes de ses feuilles. *Mémoire de DEA. Biochimie. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo*. 71p.
- Ravelomanantsoa S. H., 2004. Les endophytes de *Eugenia jambolana* Lam. (MYRTACEES) : un modèle de relation plante-microorganismes. *Mémoire de DEA. Physiologie végétale. Fac Sciences. Univ.d'Anananarivo*. 60p.
- Razafinarivo N.J., R. Guyot, A.P. Davis, C. Couturon, S. Hamon, D. Crouzillat, M. Rigoreau, C. Dubreuil Tranchant, V. Poncet, A. De Kochko, J.J. Rakotomalala and P. Hamon,

2013. Genetic structure and diversity of coffee (*Coffea*) across Africa and the Indian Ocean islands revealed using microsatellites. *Ann Bot.* **111** : 229-248.
- Rijavec T., A. Lapanje, Dermatia and M. Rupnik, 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can J. Microbiol.* **53** : 802-808.
- Ryan, 2011. Les Scientifiques découvrent quatre bactéries différentes qui peuvent vivre sur la caféine. [online]. [www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx](http://www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx)
- Roussos S., 1977. In Mémoire de titres et travaux de Dr Sébastien ROUSSOS. 28 p
- Saporta G., 2006. Probabilité analyse des données et statistiques, Editeur Technip.
- Sarath Babu V. R., S. Patra , M. S. Thakur , N. G. Karanth and M. C. Varadaraj, 2005. Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Enzyme and microbial technology.* **37** (6) : 617-624.
- Saubolle M. A. and D. Sussland, 2003. Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J. Clin. Microbiol.* **41** : 4497– 4501
- Schulz B. and C. Boyle, 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109** : 661-686.
- Schulz B., U. Wanke, S. Draeger and H. J. Aust, 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* **97** (12) : 1447-1450
- Sessitsch A., J. G. Howieson, X. Perret, H. Antoun and E. Martínez Romero, 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21** : 323-378.
- Sleytr K., A . Tietz, G. Langergraber, R. Haberl and A. Sessitsch, 2009. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* **35** :1021-1025
- Sprusank O., L. Zhou, S. Jordan, J. White and J. Westpheling, 2003. Identification of a new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185** (20) : 6147-6157.
- Sturz A. V., B. R. Christie and J. Nowak, 2000. Bacterial endophytes : Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19** : 1-30.
- Sziderics A.H., F. Rasche, F. Trognitz, A. Sessitsch, and E. Wilhelm, 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaption in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Can. J. Microbiol.* **53** : 1195–1202.

- Tan R. X. and W. X. ZOU, 2001. Endophytes : a rich source of functional métabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18** : 448–459.
- Tiouabi. M. 2005. Synthèse de dérivés d'isocoumarines naturelles, métabolites du champignon pathogène *Ceratocystis fimbriata* sp. *Thèse de doctorat en Sciences. Fac. Sciences. Univ. Neuchâtel.* 209 p.
- Tiquia S.M., D. Davis, H. Hadid, S. Kasparian, M. Ismail, R. Sahly, J. Shim, S. Singh and K.S. Murray, 2006. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow ground water along the rogue river of southeastern Michigan. *Environmental technology.* **28** : 297-307.
- Vega F.E., M. Pava-Ripoll, F. Posada and J.S. Buyer, 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica L.* *J Basic Microbiol.* **45** : 371–380.
- Verza M., N. S. Arakawa and N. P. Lopes, 2009. “Biotransformation of a tetrahydrofuran lignan by the endophytic fungus *Phomopsis* sp,” *Journal of the Brazilian Chemical Society.* **20** ( 1) : 195–200.
- Vriezen JAC., F.J. De Bruijn and K. Nusslein, 2006. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Lett. Appl. Microbiol.* **42** : 172-178.
- Vriezen JAC., F.J. De Bruijn and K. Nusslein, 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3451-3459.
- Welbaum G., A.V. Sturz., Z. Dong and J. Nowak, 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev in Plant Sci.* **23**: 175-193.
- West E.R., E.J. Cother, C.C. Steel and Ash. 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* **56** : 209–216.
- William S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vicker., G. Aldrson, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin and A.M. Mortimer, 1983. A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **129** : 1815-1830.
- Wilson D. 1995. Endophyte the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.* **73** : 274–276.

Woolfolk C. A., 1975. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *Journal of Bacteriology*. **123** : 1088-1106.

Zaidi A., M. S. Khan, M. Ahemad and M. Oves, 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **56** : 263-284.

Zahran H.H., 1999. *Rhizobium* legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Molec. Rev.* **63** (4) : 968-989.

Zerizer H., L. Oulmi, F. Boughachiche, S. Reghioua, A. Boudemagh, M. Kitouni et A. Boulahrouf, 2006. Identification d'une actinomycetale, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de Biskra. *Sciences and Technologie*. **24** : 17-22.

[www.biokar-diagnostics.com](http://www.biokar-diagnostics.com)

[www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx](http://www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx)

[www.techno-science.net](http://www.techno-science.net)

[www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx](http://www.news-medical.net/news/20110608/12229/French.aspx)

## ANNEXES

## Annexe 1: Milieux de cultures

### Milieu d'isolement:

**TSA(Tryptic soya agar)** ([www.biokar-diagnostics.com](http://www.biokar-diagnostics.com))

Caséine hydrolysate 10g

Peptone ..... 5g

Nacl ..... 5g

Agar ..... 20g

Eau distillée qsp..... 1000ml

**AS1 (Antibiotic selection) pH = 7,0** (Andriamafana, 2012)

Extrait de levure ..... 1g

Arginine..... 0,2g

Alanine..... 0,2g

Asparagine monohydrate..... 0,5g

Amidon soluble..... 5g

NaCl..... 2,5g

Sulfate de sodium Anhydre..... 10g

Eaudistillée..... 1000ml

Agar..... 20g

### **Les antibiotiques**

Pour 500ml de milieu AS1, on ajoute :

5ml de Cycloheximide (0,05g dilué dans 5ml de DMSO)

5ml de Triméthoprime (0,02g dilué dans 5ml d'ED)

5ml d'acide nalidixique (0,05g dilué dans 5ml d'ED)

### Milieux de caractérisation

**Milieu citrate de Simmons (pH=7,1±0,2)** (Randrianofidina, 2012)

Sulfate de magnésium..... 0,2 g

Phosphate monoammoniaque..... 1 g

Phosphate bipotassique..... 1 g

Chlorure de sodium..... 5 g

Citrate de sodium..... 1 g

Bleu de bromothymol..... 0,08 g

Agar ..... 15 g

Eau distillée qsp..... 1000 ml

**Milieu mannitol mobilité nitrate (pH=7,6±0,2)** (Randrianofidina, 2012)

Hydrolysat trypsique de caséine.....10 g  
 Nitrate de potassium.....1 g  
 Mannitol.....7,5 g  
 Rouge de phénol 10%.....0,04 g  
 Agar.....3,5 g  
 Eau distillée stérile qsp.....1000ml

**Milieu Hajna Kligler(pH=7,5±0,2)** (Randrianofidina, 2012)

Peptone.....15 g  
 Extrait de viande.....3 g  
 Extrait de levure.....3 g  
 Peptone pepsique de viande.....5 g  
 NaCl.....5 g  
 Sulfate ferreux.....0,2 g  
 Thiosulfate de sodium.....0,3 g  
 Lactose.....10 g  
 Glucose.....1 g  
 Rouge de phénol.....0,24 ml  
 Agar.....11 g  
 Eau distillée stérilisée qsp.....1000 ml

**Milieu de Hugh et Leifson : (pH :7,1 +2)** (Ratsimbazafy 2011)

Peptone : .....2g  
 NaCl : .....5g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : .....0,3g  
 Bleu de bromothymol (1%) : .....3ml  
 Agar : .....3g  
 E D qsp .....1000ml  
 Glucose : .....10%

**Milieu TCP (phosphate tricalcique) pH=7** (Randrianofidina, 2012)

NH<sub>4</sub>Cl.....5g  
 NaCl.....1g  
 MgSO<sub>4</sub> .....1g  
 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> .....4g  
 Glucose.....10g  
 Agar.....20g  
 Eau distillée stérile qsp .....1000ml

## Annexe 2 : Caractères macroscopique des souches endophytiques bactériennes issues de cafiers étudiés

Espèces	Couleur	Contour	Forme	Surface	Relief	Consistance	Opacité	Taille
SB1-SB2	Jaune -orangé	irrégulier	ovale	Rugueuse	semi-bombé	muqueuse	opaque	moyenne
SB3	blanche	régulier	arrondie	Rugueuse	plate	muqueuse	opaque	moyenne
SB4	jaunâtre	régulier	arrondie	rugueuse	semi-bombé	muqueuse	opaque	moyenne
SB5	jaunâtre	irrégulier	ovale	rugueuse	semi-bombé	crèmeuse	opaque	grande
SB6	blanche	irrégulier	ovale	rugueuse	semi-bombé	muqueuse	opaque	grande
SB7	Jaune -orangé	irrégulier	ovale	Rugueuse	plate	crèmeuse	opaque	grande
SB8	jaunâtre	régulier	arrondie	Lisse	plate	crèmeuse	opaque	grande
SB9	Jaune orangé	régulier	arrondie	Rugueuse	bombé	crèmeuse	opaque	grande
SB10	blanche	irrégulier	ovale	Rugueuse	semi-bombé	muqueuse	opaque	grande
SB11-SB12	blanche	irrégulier	ovale	Rugueuse	plate	crèmeuse	opaque	grande
SB13-SB14- SB15	rose	irrégulier	arrondie	Lisse	plate	crèmeuse	opaque	grande
SB16	blanche	irrégulier	ovale	Lisse	semi-bombé	crèmeuse	translucide	grande
A2B1-A2B2- A2B3-A2B4	blanche	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	crèmeuse	opaque	petite
A2B5-A2B6	blanche	régulier	Arrondie	lisso	semi-bombé	muqueuse	opaque	moyenne
A2B7-A2B8	blanche	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	crèmeuse	opaque	moyenne
A2B9	jaune	régulier	Arrondie	lisso	plate	crèmeuse	opaque	grande
A2B10	blanche	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	muqueuse	opaque	moyenne
A2B11-A2B12	blanchâtre	régulier	Arrondie	lisso	semi-bombé	gélatineuse	opaque	moyenne
A2B13	blanchâtre	régulier	Arrondie	lisso	bombé	crèmeuse	opaque	moyenne
A2B14- A217	blanchâtre	régulier	Arrondie	lisso	bombé	crèmeuse	opaque	grande
A2B15	blanchâtre	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	gélatineuse	opaque	grande
A2B16	jaune	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	gélatineuse	opaque	grande
A2B18 -A2B20	jaunâtre	régulier	Arrondie	lisso	bombé	gélatineux	opaque	grande
A2B19	jaunâtre	régulier	Arrondie	lisso	bombé	crèmeuse	opaque	grande
A6B1	blanche	régulier	Arrondie	lisso	bombé	gélatineuse	opaque	petite
A6B1	blanchâtre	régulier	Arrondie	lisso	bombé	gélatineuse	opaque	petite
A6B3-A6B4- A6B5	blanche	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	crèmeuse	opaque	petite
A6B6 A6B7- A6B8 A6B9	blanche	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	crèmeuse	opaque	moyenne
A6B10	jaune	régulier	Arrondie	Lisse	bombé	crèmeuse	opaque	grande
A6B11	blanche	irrégulier	Arrondie	lisso	semi-bombé	dure	opaque	grande
A6B12-A6B13- A6B14	blanche	régulier	Arrondie	poudreuse	bombé	dure	opaque	grande
A6B15	beige	régulier	Ovale	lisso	semi-bombé	Gélatineuse	opaque	moyenne
A6B16	rose	régulier	Arrondie	lisso	semi-bombé	gélatineuse	opaque	moyenne
BJ1	blanchâtre	régulier	arrondie	lisso	semi-bombé	crèmeuse	opaque	grande
BJ2- BJ4	blanchâtre	régulier	arrondie	lisso	semi-bombé	crèmeuse	opaque	moyenne
BJ3-BJ5	beige claire	irrégulier	arrondie	lisso	plat	sèche	opaque	grande
BJ6	incolore	régulier	arrondie	rugueux	semi-bombé	sèche	translucide	moyenne
BJ7	blanchâtre	irrégulier	arrondie	lisso	plat	crèmeuse	opaque	moyenne
BJ8	beige claire	irrégulier	ovale	rugueux	plat	sèche	opaque	grande
BJ9	blanchâtre	régulier	arrondie	lisso	semi-bombé	Crèmeuse	opaque	moyenne
BJ10	beige	régulier	arrondie	lisso	semi-bombé	crèmeuse	opaque	moyenne

**Annexe 3: Morphologie microscopique des souches endophytiques bactériennes issues de caféiers étudiés**

Espèces	Mobilité	Forme	Regroupement	Gram
SZB1	Immobile	Coque	Amas	-
SB2- SB3- SB4 S-B5	Immobile	Coque	Amas	-
SB6- SB8	Immobile	Coque	Chainette	-
SB7 -SB9 - SB11-SB12-SB13 -SB14- SB15- SB16	Immobile	Coque	Amas	-
A2B1- A2B2- A2B3-A2B7-A2B6- A2B8 A2B10 A2B11 A2B12- -A2B15 A2B17-A2B19- A2B20	Immobile	Coque	Amas	-
A2B4 -A2B5-A2B9	Immobile	Coque	Groupé Par 4	-
A2B14- A2B16	Immobile	Coque	amas	+
A2B13-A2B18	Immobile	Coque	Groupé Par 4	+
A6B2	Immobile	Coque	amas	-
A6B1- A6B3-A6B4- A6B5- A6B6 A6B8	Immobile	Coque	Groupé Par 4	-
A6B7	Mobile	Bacille	Isolé	-
A6B9	Mobile	Bacille	Amas	+
A6B10	Immobile	Coque	Amas	-
A6B11	Immobile	Coque	Amas	-
A6B12-A6B13- A6B14	Immobile	Fin Filament+Coque	En Chainette	+
A6B15- A6B16	Immobile	Coque	Amas	-
BJ1- BJ4	Immobile	Coccobacille	Groupé Par 2	-
BJ2	Immobile	Coccobacille	Amas	-
BJ3	Immobile	Coque	En Chainette	-
BJ5	Immobile	Coque	Isolé	-
BJ6- BJ7	Immobile	Coque	Isolé	-
BJ8	Mobile	Bacille	En Chainette	+
BJ9	Immobile	Coque	Isolé	-
BJ10	Immobile	Coque	En Chainette	-

**Annexe 4: Croissance des souches endophytiques bactériennes issues de cafiers étudiés à différentes concentrations de NaCl.**

Espèces	NaCl [0]	NaCl [2.5]	NaCl [5]	NaCl [7.5]	NaCl [10]
SB1	++	++	+++	+	+
SB2	+++	+++	++	++	++
SB3	++	++	++	++	+
SB4	++	++	++	+++	++
SB5	+	++	++	+++	++
SB6	+	++	+++	++	++
SB7	++++	+++	+++	++	++
SB8	+	+	+++	++	++
SB9	++	++	+++	++	+
SB10	+	++	++	++	+++
SB11	++	+++	++	++	++
SB12	+	++	+++	++	++++
SB13	+	++	++	+++	++
SB14	-	-	-	++	++
SB15	++	++	++	++	+++
SB16	-	+	+	++	+
A6B1	+	+++	+++	++	++
A6B2	+	++	++	++	+++
A6B3	+	++	++	++	++
A6B4	+	++	+++	++	++
A6B5	++	+++	+++	++	++
A6B6	+++	++	++	++	++
A6B7	++	++++	+++	++	++
A6B8	+	++	++	++	++
A6B9	++	-	-	-	-
A6B10	+	++	++	++	++
A6B11	++++	++	++	+	+
A6B12	+	++	++	++	-
A6B13	++	++	++	+	+
A6B14	+	++	++	+	+
A6B15	+++	+++	++	+	+

Espèces	NaCl [0]	NaCl [2.5]	NaCl [5]	NaCl [7.5]	NaCl [10]
A6B16	+	+	+	+++	+
A2B1	++	+++	+++	++	++
A2B2	+	++	+++	+++	+++
A2B3	++	+++	++	++	++
A2B4	++++	++	++	++	++
2A2B5	+	++	++	++	++
A2B6	+	+++	+++	+++	++++
A2B7	+	++	+	+	-
A2B8	++++	++	+++	++	++
A2B9	-	++	++	+++	+
A2B10	+	++	++	++	+++
A2B11	+	++	+++	++	++
A2B12	+	++	++	++	++
A2B13	+	+++	++	-	-
A2B14	++	++	+++	++	+
A2B15	++	+++	++	-	-
A2B16	-	+++	+++	++	++
A2B17	+	++	++	++	++
A2B18	++	++	++	++	+
A2B19	++	+++	+++	++	++
A2B20	+	++	++	++	++
BJ1	++	++	+++	++	++
BJ2	+	++	+++	++	+
BJ3	-	++++	++	+++	++
BJ4	+	++++	++++	+++	++
BJ5	++	+++	+++	++	++
BJ6	+	++++	++	+++	++
BJ7	+	+++	++++	+++	++
BJ8	+	++	++	++	++
BJ9	-	++++	++++	++	++
BJ10	+	+++	+++	++	+

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modérée, (+++) croissance abondante, (++++) croissance plus abondante.

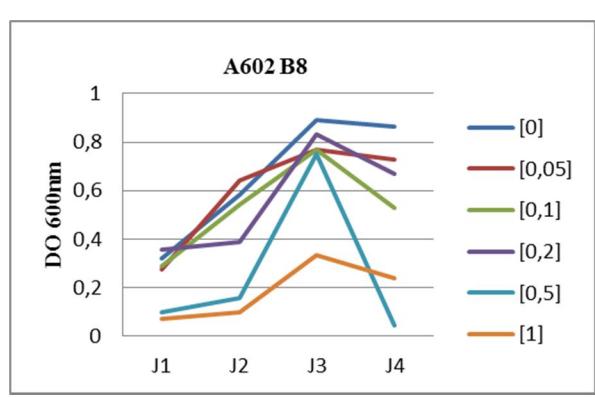
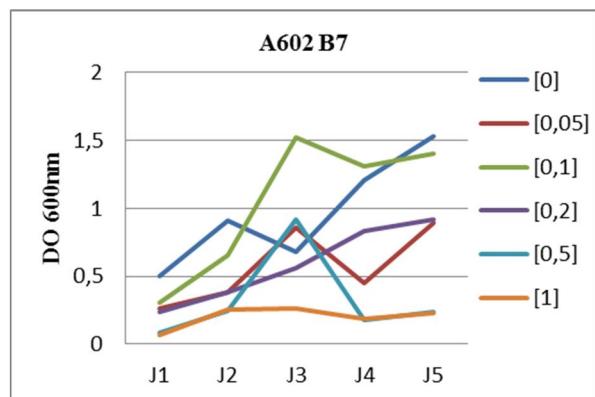
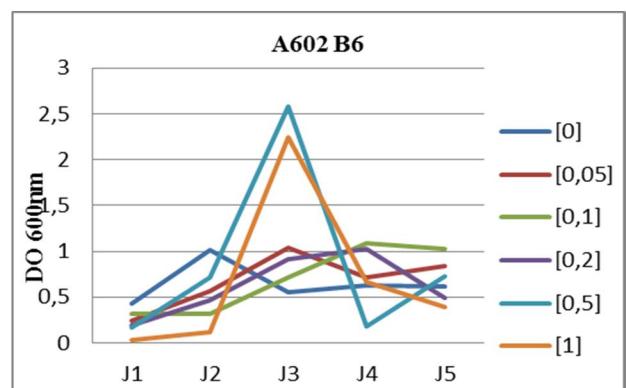
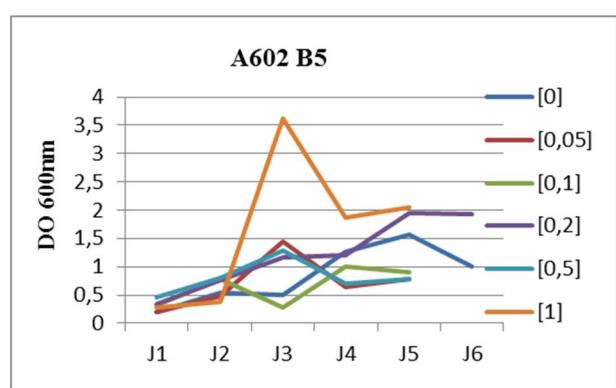
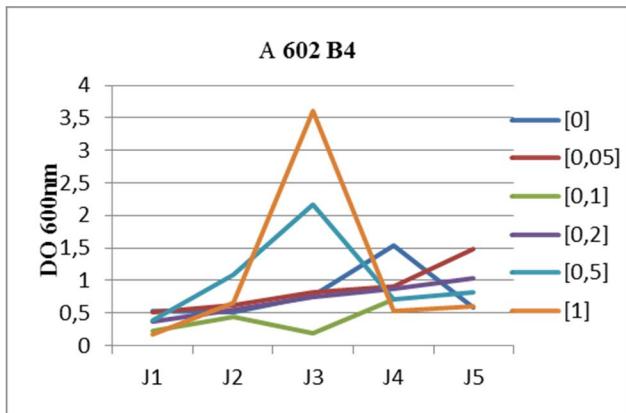
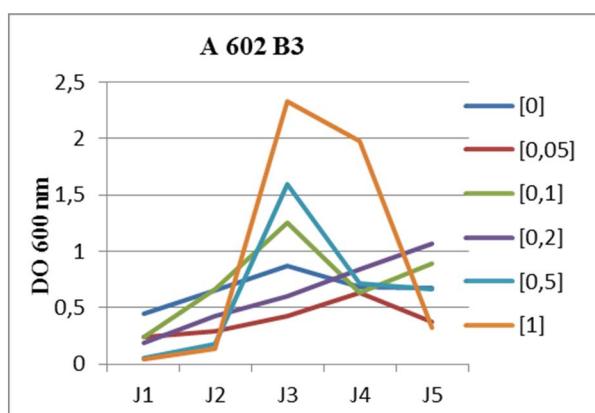
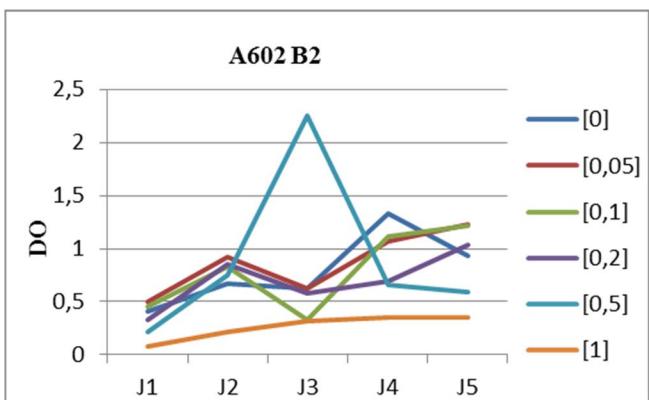
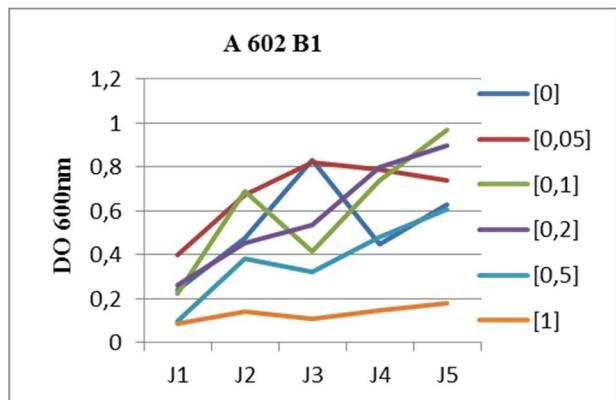
**Annexe 5 : Effet du pH sur la croissance des souches endophytiques bactériennes issues de cafiers étudiés**

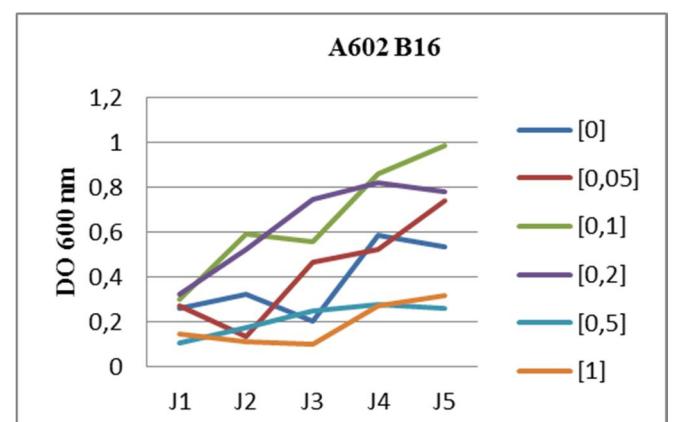
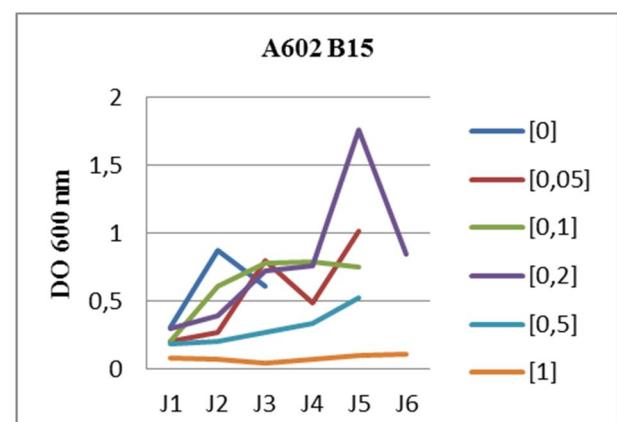
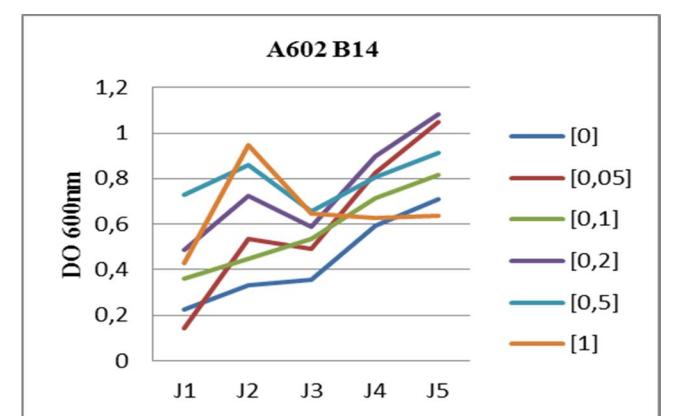
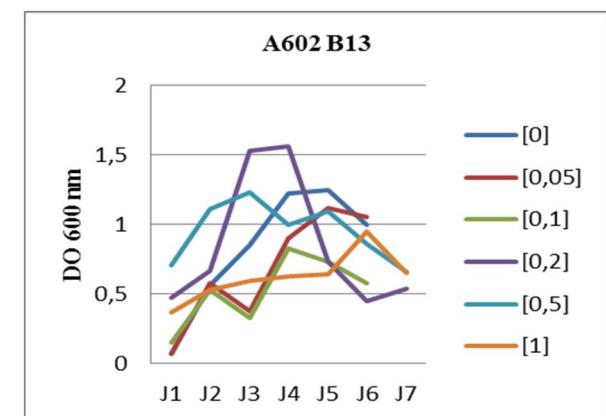
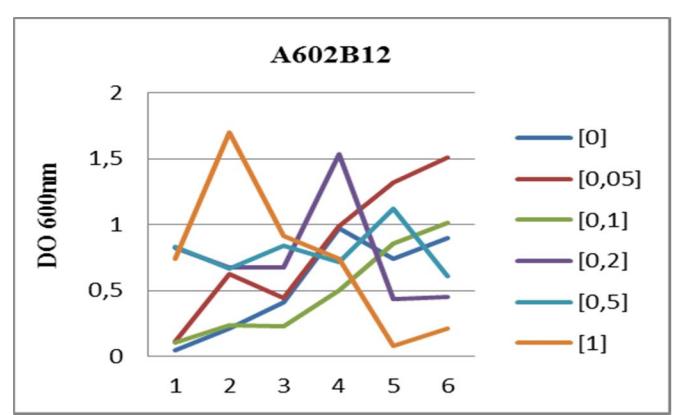
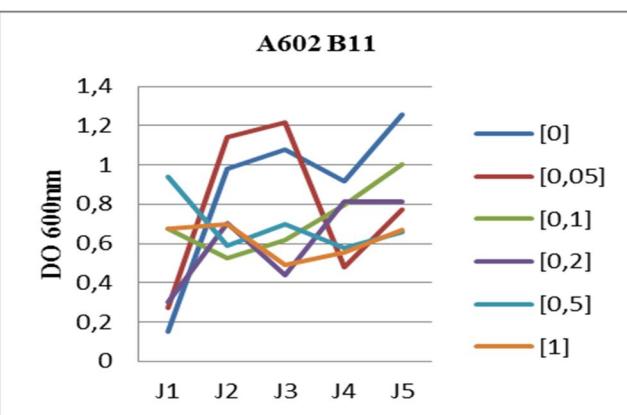
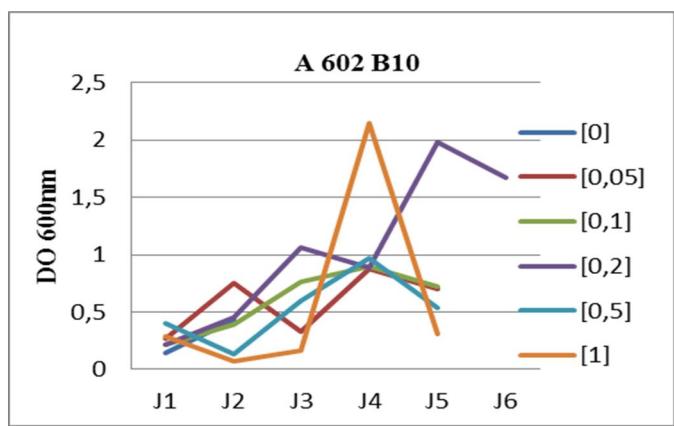
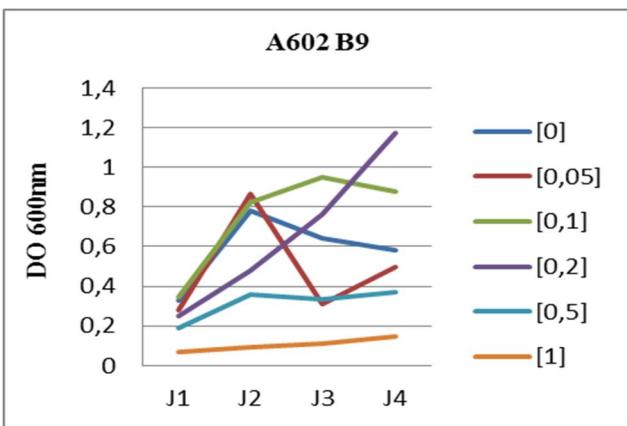
Espèces	pH=5	pH=7	pH=9
SB1	+	+++	++
SB2	+	++	+++
SB3	-	+++	++
SB4	-	++++	++
SB5	+	++++	+++
SB6	+	+++	++
SB7	+	+++	++++
SB8	++	+++	++++
SB9	+	+++	++
SB10	-	++	+
SB11	+	++	+++
SB12	+	+++	++
SB13	++	+++	++
SB14	++	+++	++
SB15	++	+++	++
SB16	++	++	++
A6B1	+++	++	+
A6B2	+	+++	++
A6B3	+	+++	++++
A6B4	++	++	+++
A6B5	++	++++	++
A6B6	++	++	+++
A6B7	++	++++	++
A6B8	+++	++++	++
A6B9	+++	+++	+++
A6B10	+	++	+++
A6B11	+++	++++	+++
A6B12	+	++	+
A6B13	+	++	+
A6B14	++++	+++	++
A6B15	+	++++	+++
A6B16	+	+	+++
A2B1	++	+++	++
A2B2	++	++	+++
A2B3	++	++	+++
A2B4	++	++	++
A2B5	+++	++	++

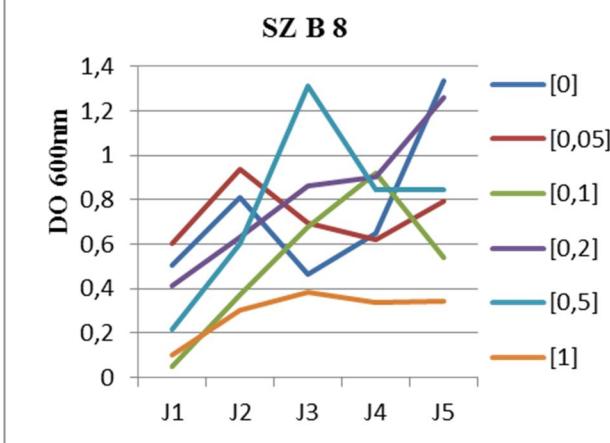
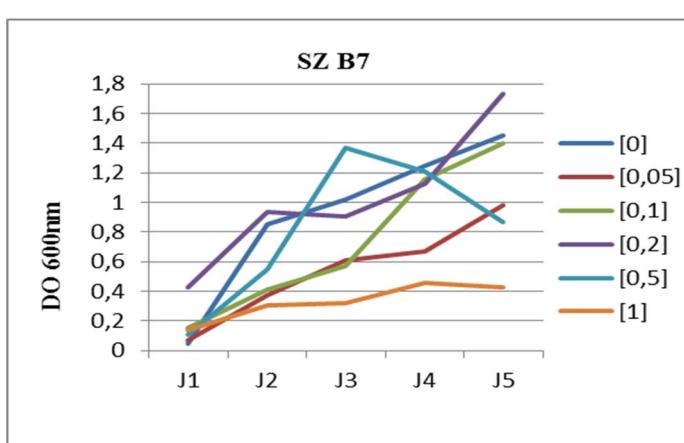
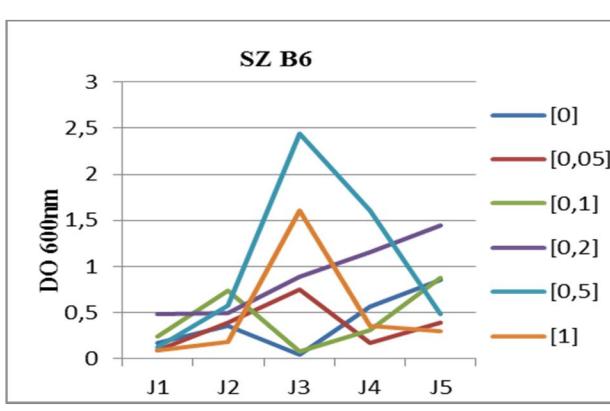
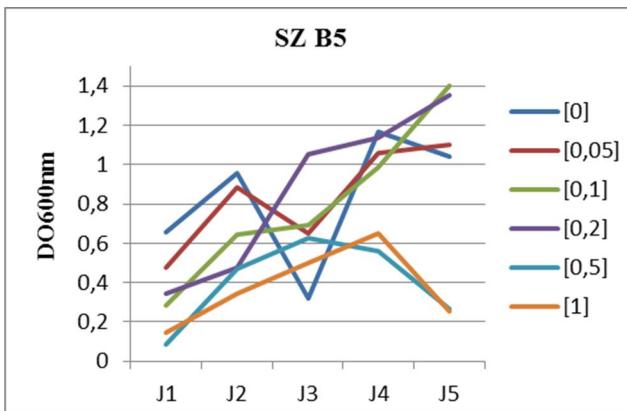
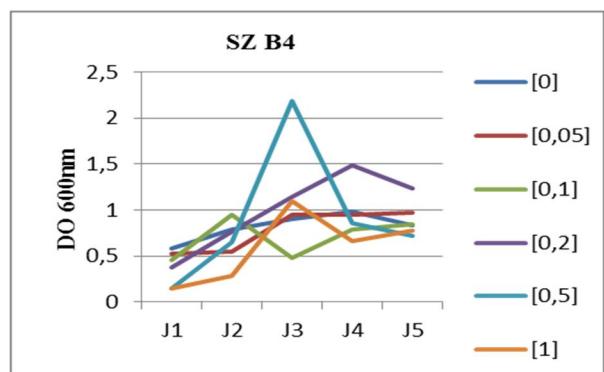
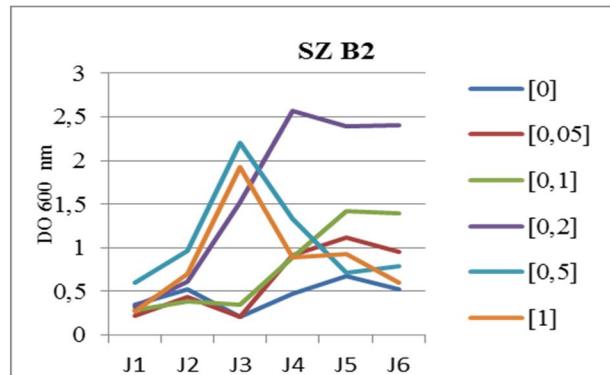
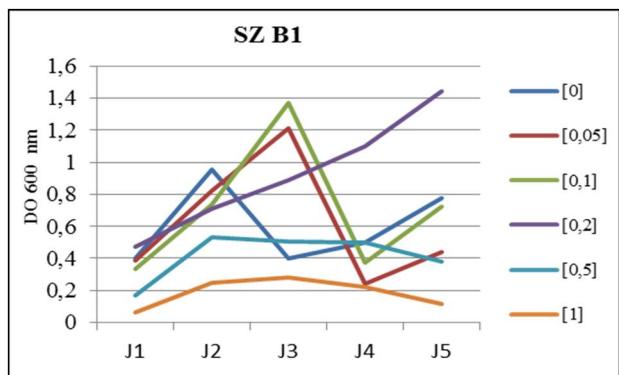
Espèces	pH=5	pH=7	pH=9
A2B6	++++	+++	++
A2B7	++	++	++
A2B8	++	++	++
A2B9	+	+	++
A2B10	+	++	+
A2B11	+++	++	++
A2B12	++	++	+++
A2B13	++	++	+++
A2B14	+	+++	++
A2B15	+++	++	+
A2B16	+++	+++	++++
A2B17	++	+++	+
A2B18	++	+++	++
A2B19	+	+++	++
A2B20	+++	++	+
BJ1	++	++++	+++
BJ2	+++	++++	++
BJ3	+++	++	++++
BJ4	++++	+++	++
BJ5	+++	++++	++
BJ6	++	+++	+
BJ7	++++	+++	++
BJ8	++	++	+++
BJ9	+++	+++	+++
BJ10	++++	++	+++

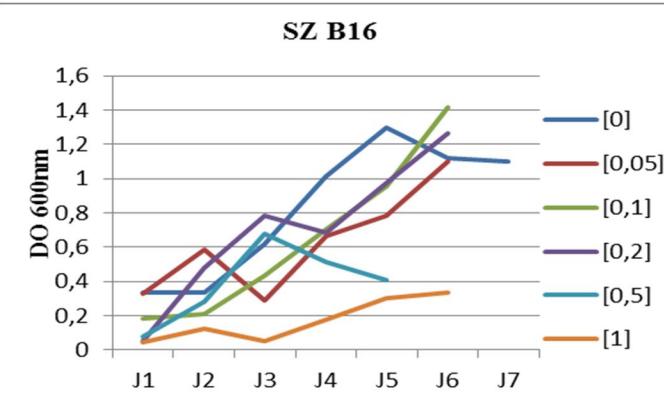
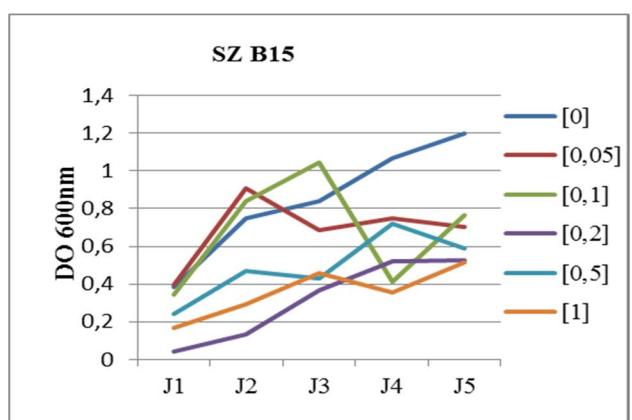
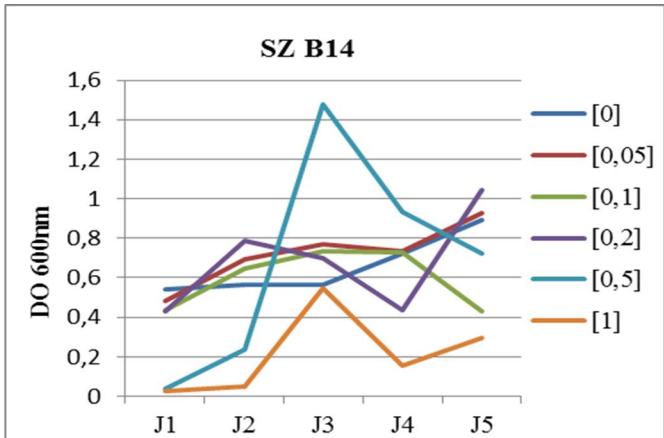
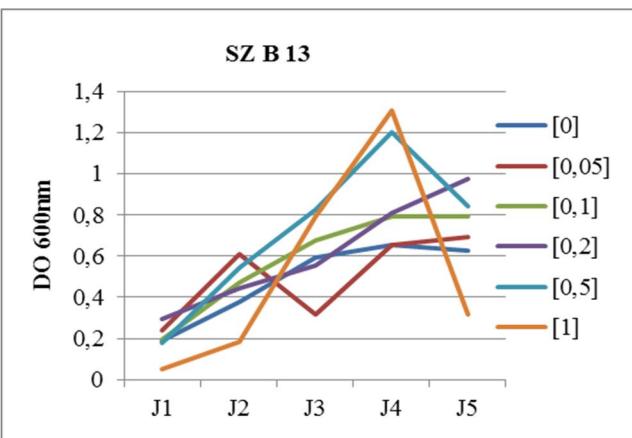
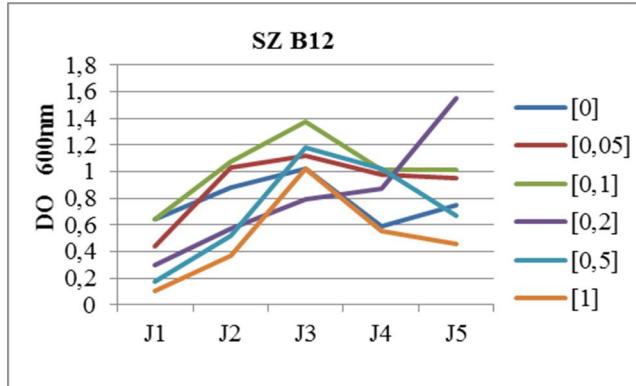
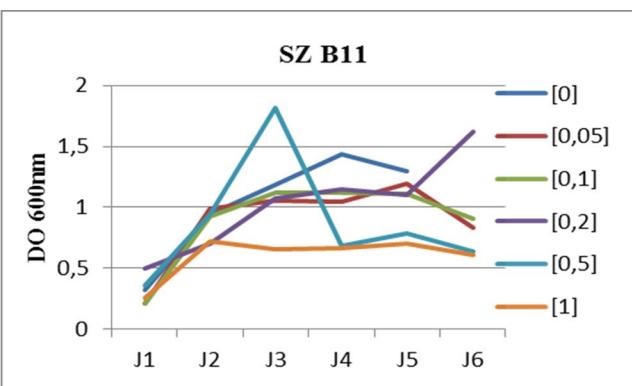
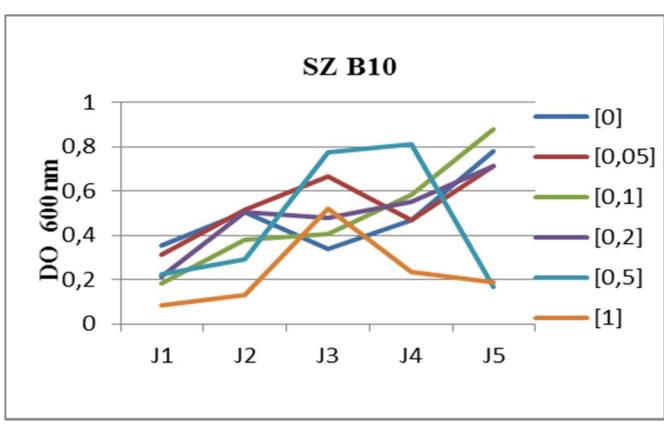
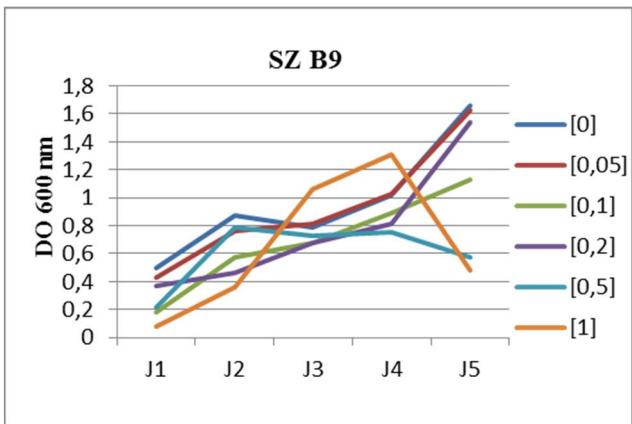
(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante, (++++) croissance plus abondante

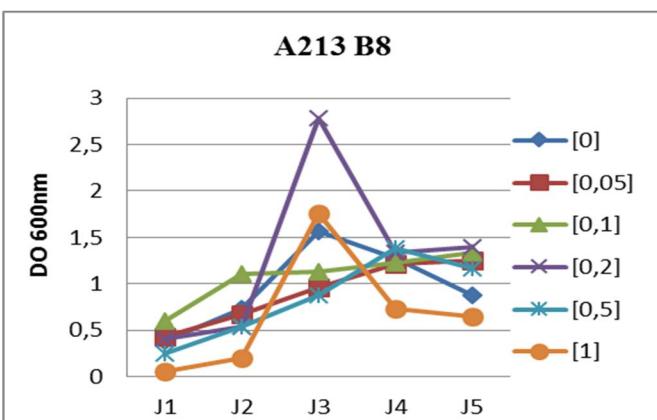
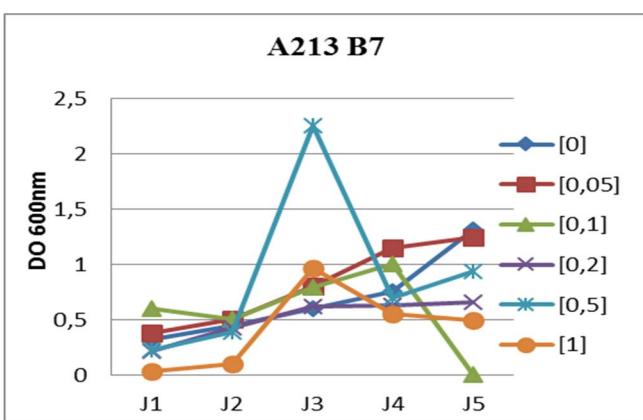
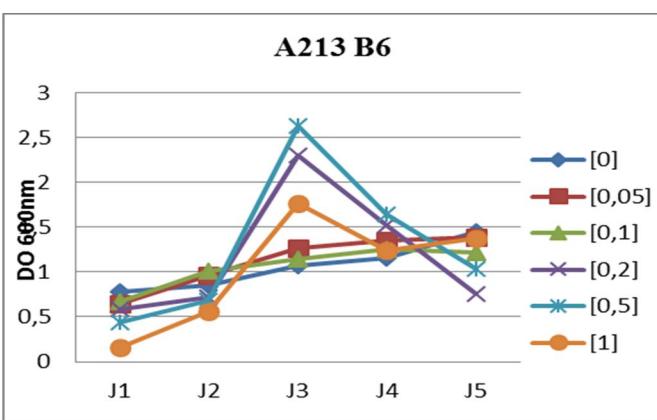
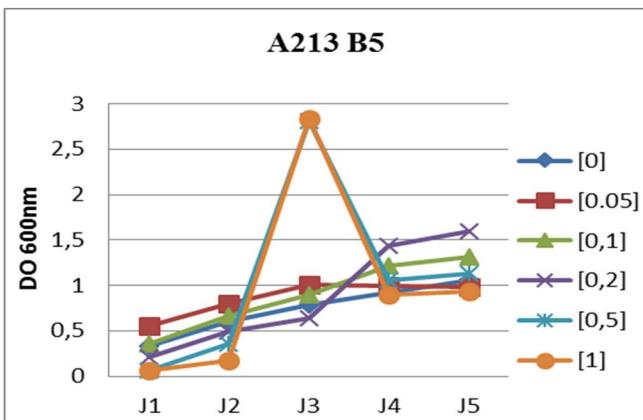
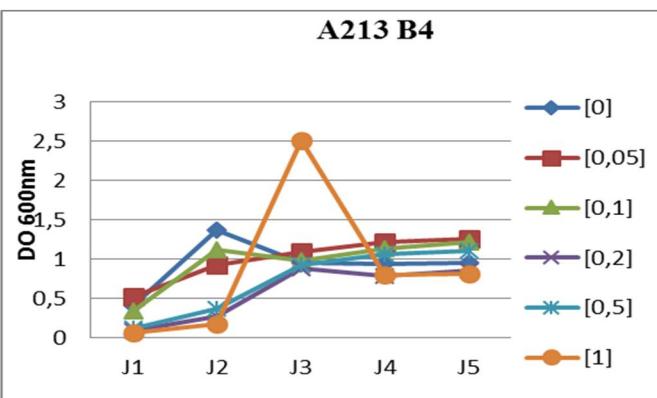
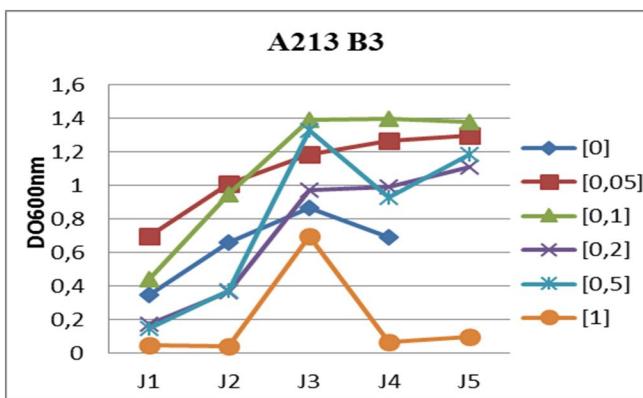
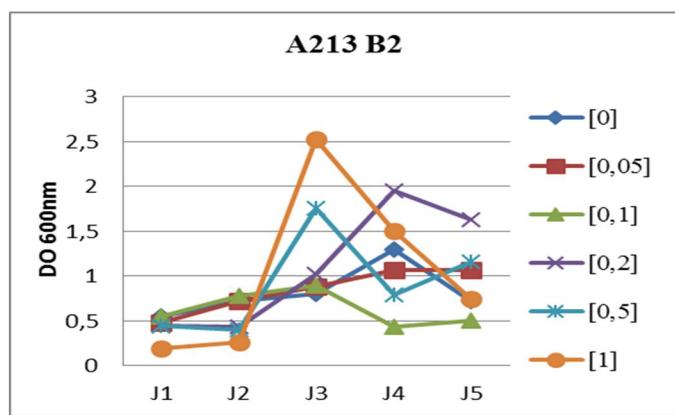
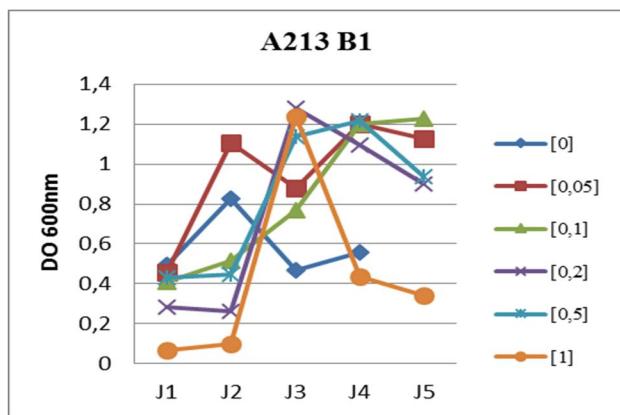
**Annexe 6 : Comportement des souches endophytiques bactériennes des caféiers étudiés vis-à-vis des teneurs en caféine (0 à 1 %)**

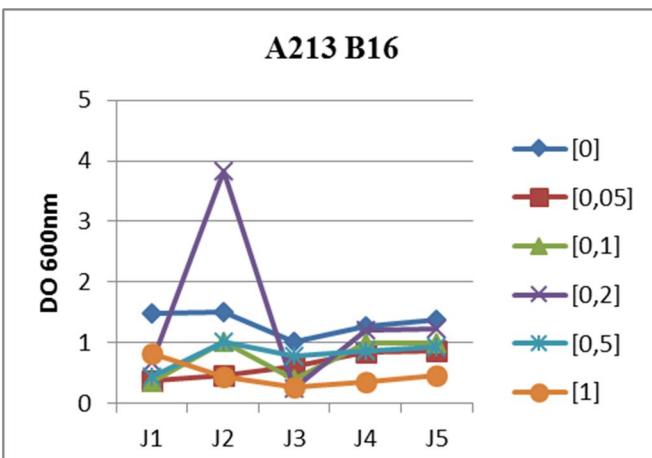
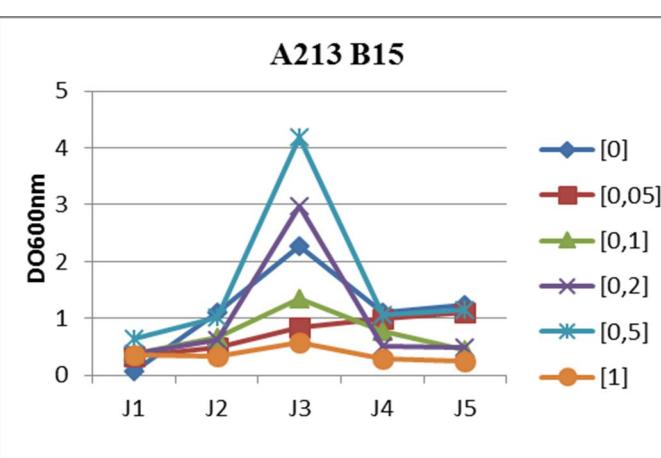
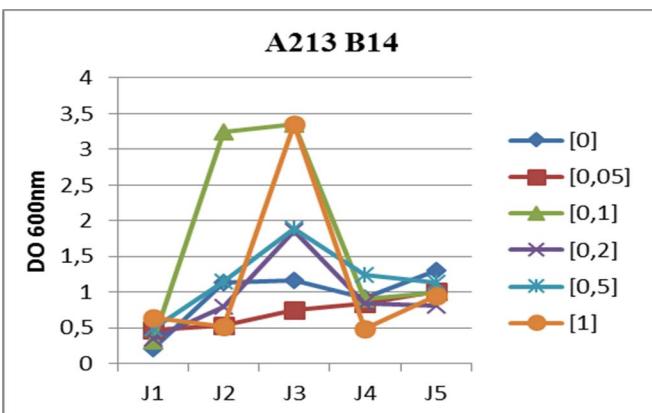
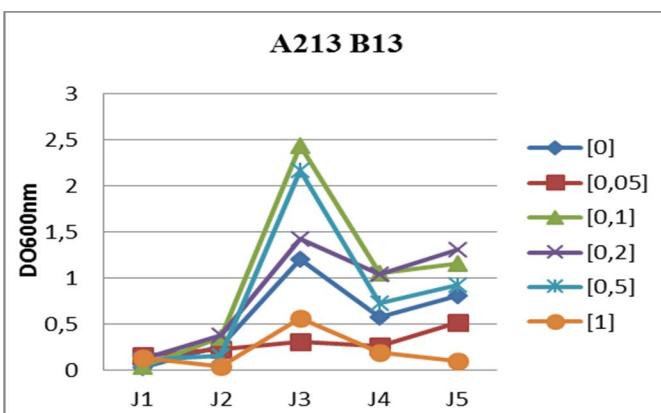
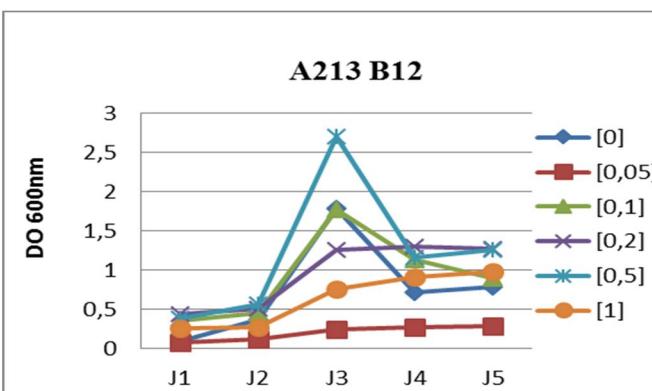
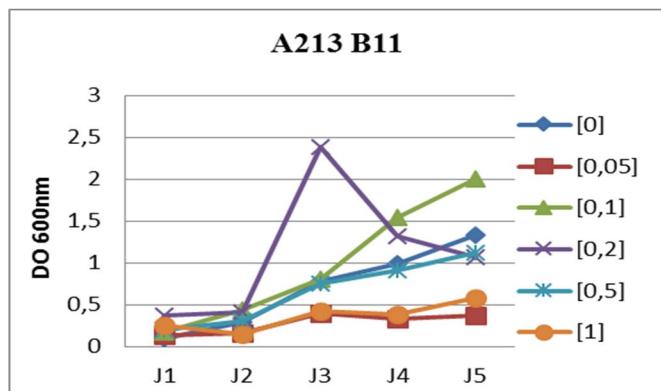
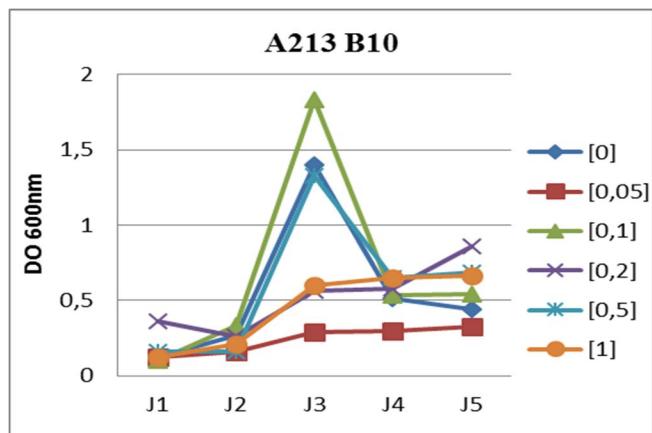
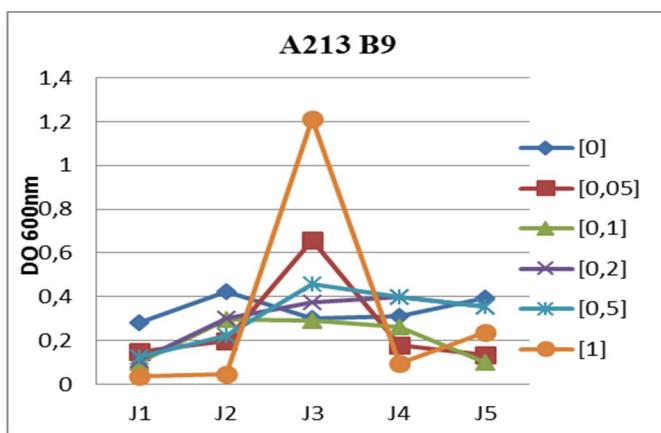


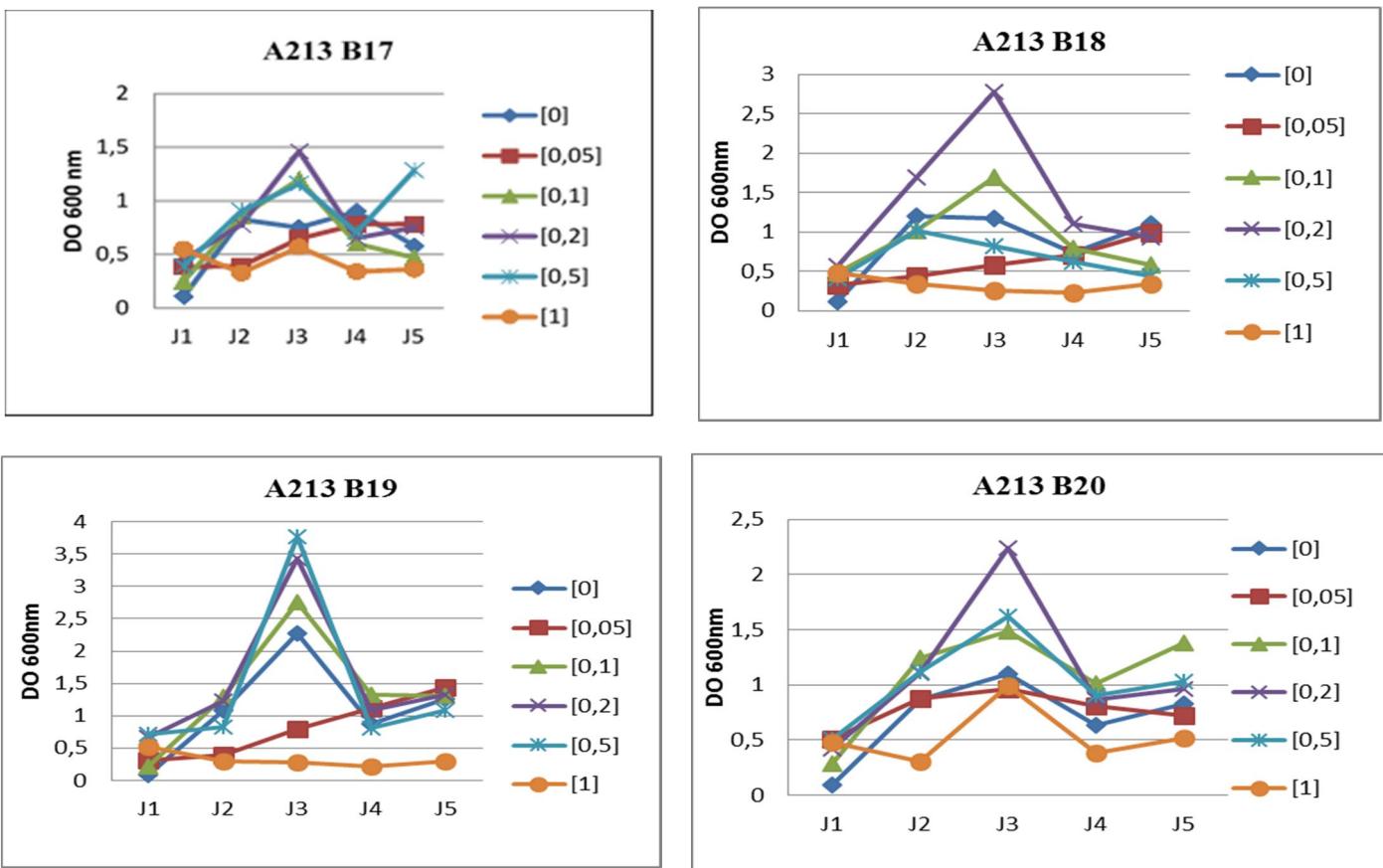










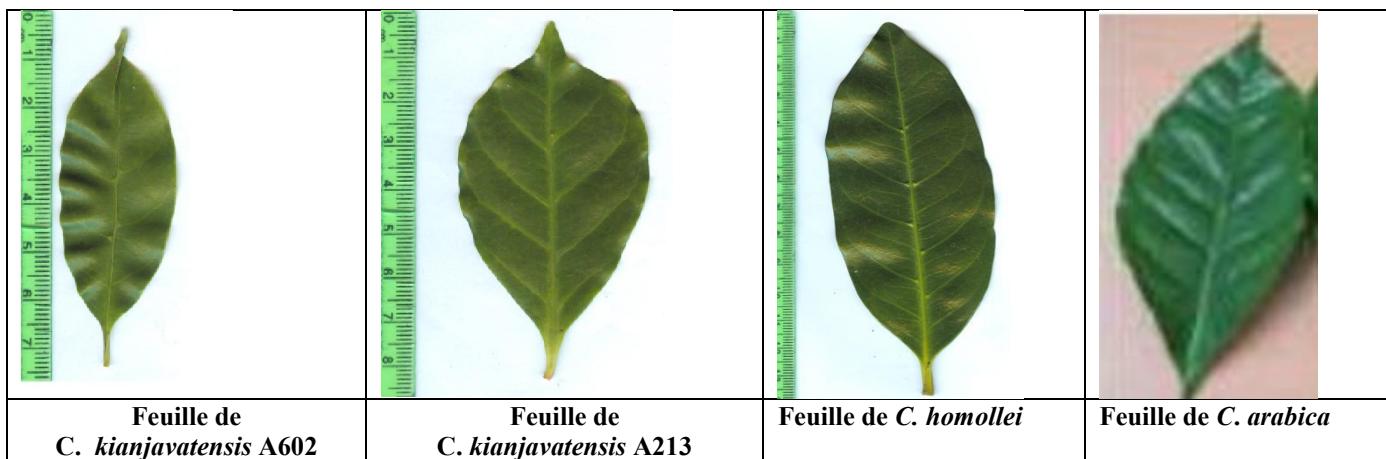


## Annexe 7 : Description des cafiers étudiés

### ❖ Résumé des caractères morphologiques et biochimiques de la Série *Verae* en comparaison avec *C. arabica*

Caractères		<i>Coffea homollei</i>	<i>C. kianjavatensis</i> (A213)	<i>C. kianjavatensis</i> (A602)	<i>C. arabica</i>
<b>Port</b>		En fuseau	Pyramidal	Pyramidal	Arbustif,
Feuilles	<b>Forme</b>	Lancéolé	Elliptique ovale	Oblongue	Ovales
	<b>Taille</b>	Moyenne	Moyenne	Petite	Moyenne
	<b>Couleur</b>	Vert-olive à l'état jeune	Cuivre –rouge à l'état jeune	Cuivre –rouge à l'état jeune	Vert
Fleurs	<b>Taille</b>	Petite	Petite	Petite	Petites
	<b>Couleur</b>	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche
Fruits	<b>Forme</b>	Ovoïde	Ovoïde à disque crénelé	Ovoïde à disque crénelé	Elliptiques
	<b>Taille</b>	Petite	Petite	Petite	Moyenne
	<b>Couleur</b>	Vert pâle	Orangé	Orangé	Jaune
Ploïdie		Diploïde 2n=22	Diploïde 2n=22	Diploïde 2n=22	Tétraploïde (2n=44)
Métabolites secondaires	<b>Acide monocaféylquinque</b>	Faible teneur (0.69 à 0.85% MS)	Teneur moyenne (3,76% MS)	Forte teneur (7.54% MS)	Teneur moyenne (3,17 à 4,05% MS)
	<b>Caféine</b>	Sans caféine	Teneur modérée (0,81% MS)	Faible teneur (0,13% MS)	teneur élevée (1 à 1,4% MS)
	<b>Théacrine</b>	-	Sans théacrine	Forte teneur (1.46% MS)	-
	<b>Théobromine</b>	-	Faible teneur (inférieur à 0,1% MS)	Forte teneur (0,36% MS)	-

### ❖ Diversité des formes de feuilles des cafiers étudiés



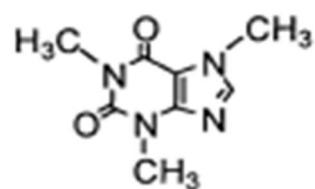
**Annexe 8 : Familles et genres probables des souches d'endophytes bactériennes des cafiers étudiés**

Gram -		Gram +		
Coque	Bacille	Coque	Bacille	
-Immobile -Catalase positif -Aérobiose facultative	-Mobile -Catalase positif -Aérobiose	-Catalase positive -Aérobiose facultative		
<i>Neisseriaceae</i>	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>		
		En amas asymétrique	En amas symétrique	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Bacillus</i>
SB1- SB2- SB3- SB4- SB5- SB6- SB7 SB8- SB9- SB10- SB11- SB12- SB13 SB14- SB156 SZ16	6B7	A2B14 A2B16	A2B13 A2B18	<i>A6B9</i>
A2B5- A2B7- A2B9- A2B11- 2B12 2B13- 2B17- 2B19- A2B20				
A6B2- A6B3- A6B4- A6B8- A6B11 A6B15				
BJ3- BJ5- BJ6 -BJ7 -BJ9-BJ10				

**Annexe 9 : Liste des 47 caractères des souches d'endophytes des cafiers étudiés, utilisés lors des analyses multivariées**

1	B	Blanc
2	Bl	Blanchâtre
3	J	Jaune
4	Jo	Jaune orangé
5	Jtr	Jaunâtre
6	Rs	Rose
7	be	Beige
8	inc	Incolore
9	Ir	Irégulier
10	re	Régulier
11	ar	Arrondie
12	ov	Ovale
13	li	Lisse
14	ru	Rugeux
15	Bo	Bombé
16	Pl	Plat
17	Se	Semi-bombé
18	Cr	Crémeux
19	Du	Dure
20	Ge	Gélatineux
21	Mu	Muqueux
22	Sc	Sèc
23	Gr	Grand
24	Mo	Moyenne
25	Pe	Petit
26	Am	Amas
27	Ch	Chainette
28	G4	Groupé par 4
29	Is	Isolé
30	Gmn	Gram -
31	Gmp	Gram+
32	cn	Citrate négatif
33	cp	Citrate positif
34	mn	Manitol négatif
35	mp	Manitol positif
36	ln	Lactose négatif
37	lp	Lactose positif
38	Aer	Aérobie
39	Ana	Anaérobie
40	Anf	Anaérobie facultatif
41	Inr	Indifférente (respiration)
42	Bs	Basique
43	Inp	Indifférente (ph)
44	aci	Acide
45	neu	Neutre
46	nss	Non solubilisatrice de phosphate
47	ss	Solubilisatrice de phosphate

**Annexe 10 : Formule chimique de la caféine**



Caféine

DEA en Biologie et Ecologie Végétales

Option : Physiologie végétale

Titre : « Diversité des endophytes bactériens des cafiers sauvages Malgaches de la série botanique *Verae (Mascarocoffea)* : relation entre leur distribution et la teneur en caféine des cafiers hôtes »

Auteur : MIASAMALAZA Mampionona Yvette

### Résumé

Les « *Mascarocoffea* » cafiers sauvages de Madagascar et des îles de l’Océan Indien sont connues par leur grande diversité morphologique, génétique et biochimique. Ils représentent presque la moitié de la totalité des espèces de cafiers existant dans le monde (61 sur 124 espèces, dont 53 endémiques de Madagascar). Les études microbiologiques restent fragmentaires pour ce groupe. Notre investigation concerne l’analyse de la diversité des endophytes bactériens de trois cafiers sauvages (*Coffea homollei*, *C. kianjavatensis population A213 et A602*) et *C. arabica* en relation avec les particularités biochimiques de l’hôte.

Les souches isolées à partir de l’extrait de jeunes feuilles sont purifiées puis caractérisées selon leur morphologie et leur comportement métabolique et physiologique. 47 variables représentant les différents caractères répertoriés ont été analysées par les méthodes statistiques multivariées afin de permettre le regroupement des souches identiques ou spécifiques des cafiers hôtes.

Soixante-deux souches d’endophytes ont été isolées à partir des feuilles broyées: 16 issues de *C. homollei* (sans caféine), 16 chez *C. kianjavatensis A602* (teneur en caféine faible (0,13% MS)), 20 chez *C. kianjavatensis A213* (teneur en caféine modérée (0,81% MS)) et 10 souches pour *C. arabica* variété *Bourbon jaune* (teneur en caféine relativement élevée (1,4% MS)). Les observations macroscopiques et microscopiques ont permis de découvrir des différents types de bactéries tels les actinomycètes, les bacilles, coccobacilles et coques. Les analyses statistiques ont permis outre la mise en évidence des souches similaires et/ou spécifiques. Les regroupements de ces souches mettent en évidence leur regroupement par rapport aux cafiers hôtes et vérifient les subdivisions taxonomiques établies par les botanistes. Les endophytes bactériens peuvent être utilisés à des fins pratiques agronomiques, compte tenu de leur caractère solubilisatrice de phosphate.

Mot clés : *Mascarocoffea*, *Coffea homollei*, *C. kianjavatensis*, *C. arabica*, diversité, endophytes bactériens, caféine

Encadreurs : Docteur RALAMBOFETRA Eliane  
Docteur RAKOTOMALALA Jean Jacques

DEA in Plant Biology and Ecology

Option: Plant Physiology

Title: « Diversity of the bacterial endophytes of the wild coffee from Madagascar of the *Verae* (*Mascarocoffea*) botanical series: relation between their distribution and the content in caffeine of the coffee hosts»

Author: MIASAMALAZA Mampionona Yvette

### Abstract

The "Mascarocoffea" wild coffee from Madagascar and Indian Ocean islands are known for their great morphological, genetic and biochemical diversity. They represent almost half of all existing coffee species in the world (61 out of 124 species, including 53 endemic to Madagascar). Microbiological studies remain fragmented for this group. Our investigation concerns the analysis of the diversity of bacterial endophytes of three wild coffee (*Coffea homollei*, *Coffea kianjavatensis* A213 and A602 population) and *Coffea arabica* in relation with the biochemical characteristics of the host.

Strains isolated from the extract of young leaves were purified and characterized according to their morphology, metabolic and physiological behavior. 47 variables representing different listed characters were analyzed by multivariate statistical methods to allow grouping of identical or specific strain hosts.

Sixty-two endophytic strains were isolated from the leaves extracted: 16 from *C. homollei* (without caffeine), 16 in *C. kianjavatensis* A602 (low caffeine content (0,13% MS)), 20 in *C. kianjavatensis* A213 (moderate caffeine content (0,81% MS)) and 10 strains of *C. arabica* variety Bourbon jaune (relatively high content in caffeine (1,14% MS)). Macroscopic and microscopic observations led to find out different types of bacteria such as actinomycetes, bacilli, coccobacilli andocco type. Statistical analysis also allowed the identification of similar and / or specific strains. Regrouping of these strains demonstrates their grouping according to host coffee plants and confirm taxonomic subdivisions established by botanists.

The bacterial endophytes can be used to agronomic practice, considering their phosphate-solubilizing character.

Keywords: *Mascarocoffea*, *Coffea homollei*, *C. kianjavatensis*, *C. arabica*, diversity, bacterial endophytes, caffeine

Advisors : Docteur RALAMBOFETRA Eliane  
Docteur RAKOTOMALALA Jean Jacques