



**HAL**  
open science

# Recherche de marqueurs biochimiques et génétiques de l'adaptation des caféiers cultivés aux variations climatiques

Ialy Rojo Vestalys

► **To cite this version:**

Ialy Rojo Vestalys. Recherche de marqueurs biochimiques et génétiques de l'adaptation des caféiers cultivés aux variations climatiques. Biologie végétale. Université Montpellier; Université d'Antananarivo, 2018. Français. NNT : 2018MONTG054 . tel-02010572

**HAL Id: tel-02010572**

**<https://theses.hal.science/tel-02010572>**

Submitted on 7 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO

En Ecophysiologie et Adaptation des Plantes

École doctorale GAIA- Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche IPME

En partenariat international avec l'Université d'Antananarivo, Madagascar

École doctorale SVE – Sciences de la Vie et de l'Environnement

Equipe d'accueil de doctorants - Biotechnologie

## RECHERCHE DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES DE L'ADAPTATION DES CAFEIERS CULTIVES AUX VARIATIONS CLIMATIQUES

Présentée par Ialy Rojo VESTALYS

Le 30 novembre 2018

Sous la direction de Claudine CAMPA  
Et Marson RAHERIMANDIMBY

Devant le jury composé de

Doll Aurore Danielle RAKOTO, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Marc LEMAIRE, Professeur émérite, Université Claude Bernard Lyon 1

Sahondramalala RANOMENJANAHARY, Directeur de recherche émérite, FOFIFA Antananarivo

Pierre CZERNIC, Professeur, Université de Montpellier

Bakolinirina ANDRIAMIHAJA, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Claudine CAMPA, Directeur de recherche, IRD Montpellier

Marson RAHERIMANDIMBY, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER





# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO

En Ecophysiologie et Adaptation des Plantes

École doctorale GAIA- Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche IPME

En partenariat international avec l'Université d'Antananarivo, Madagascar

École doctorale SVE – Sciences de la Vie et de l'Environnement

Equipe d'accueil de doctorants - Biotechnologie

## RECHERCHE DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES DE L'ADAPTATION DES CAFEIERS CULTIVES AUX VARIATIONS CLIMATIQUES

Présentée par Ialy Rojo VESTALYS

Le 30 novembre 2018

Sous la direction de Claudine CAMPA  
Et Marson RAHERIMANDIMBY

Devant le jury composé de

Doll Aurore Danielle RAKOTO, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Marc LEMAIRE, Professeur émérite, Université Claude Bernard Lyon 1

Sahondramalala RANOMENJANAHARY, Directeur de recherche émérite, FOFIFA Antananarivo

Pierre CZERNIC, Professeur, Université de Montpellier

Bakolinirina ANDRIAMIHAJA, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Claudine CAMPA, Directeur de recherche, IRD Montpellier

Marson RAHERIMANDIMBY, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



*Je dédie ce manuscrit à ma famille,  
à mon chéri Zo Rakotoson et à Fy*

# REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les organismes et institutions qui ont financé mes travaux de recherche durant les trois années de préparation de ma thèse :

- **Le programme KITE / Erasmus mundus**, qui m'a octroyé une bourse de 22 mois me permettant de réaliser mes travaux au sein de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier avec l'équipe CoffeeAdapt de l'UMR IPME
- **L'UMR IPME** qui a pris en charge les séjours supplémentaires dont j'ai pu bénéficier lors de ma troisième année de thèse afin de compléter mes analyses.
- **L'équipe CoffeeAdapt** qui a financé toutes mes manipulations, les missions d'enquête et de collecte à Madagascar.
- **Le gouvernement français** qui m'a accordé une bourse « BGF » pour finaliser ma thèse.

J'exprime mes sincères remerciements :

- à l'IRD Montpellier, l'IRD Madagascar, les Facultés des Sciences de l'Université de Montpellier et de l'Université d'Antananarivo pour leur collaboration, les suivis et aides administratives qu'ils m'ont procurés afin que je puisse mener à terme ma thèse.
- aux membres de l'UMR IPME et de l'équipe qui m'ont accueillie. Je suis reconnaissante envers **Mme Valérie Verdier** et l'équipe administrative de l'UMR IPME pour leur professionnalisme et leurs précieuses aides durant ces trois années de thèse.
- à l'équipe CoffeeAdapt qui m'a transmise leur passion du café et m'a inculquée leurs méthodes de travail.

Mes remerciements vont tout particulièrement aux personnes suivantes :

- **M. Hervé Etienne**, Chef de l'équipe CoffeeAdapt, **M. Benoit Bertrand** et **M. Olivier Bonato** pour leurs recommandations et conseils dans le traitement de données et les méthodes de recherche ;
- **M. Jean-Christophe Breitler** et **Mme Sophie Leran** pour leurs enseignements des techniques, leurs attentions et leurs explications très claires ;
- **Mme Evelyne Deschamps**, **M. Luc Villain** et **M. Frederic Georget** pour l'immense apport sur le terrain, en serre et pour le traitement de données.

Ma profonde reconnaissance va droit à :

- **Mme Claudine Campa, ma Directrice de thèse**, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour et n'aurait pas abouti. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en me réservant ce thème de recherche. Malgré vos multiples responsabilités, vous n'avez pas ménagé votre temps en m'offrant vos soutiens démesurés que ce soit sur le plan personnel que professionnel. Je vous remercie infiniment pour votre patience et pour le savoir que vous m'avez transmis durant ses trois années. Vous m'avez encadré avec une rigueur scientifique remarquable.
- **M. Marson Raherimandimby, mon Co-Directeur de thèse, Doyen de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo**, qui malgré la distance et ses nombreuses occupations, a toujours trouvé du temps à me consacrer. Je vous remercie pour vos suggestions constructives et vos conseils tout au long de cette thèse.
- **Mme Noronirina Victorine RAKOTOARISOA et Mr Jean Michel LEONG POCK TSY**, co-encadrants. Un grand merci pour la confiance, le soutien et les conseils depuis ma troisième année universitaire jusqu'à ce jour.

J'adresse tous mes remerciements à toutes les équipes de laboratoire qui m'ont accueillie lors de cette thèse et à toutes les personnes que j'y ai rencontré :

- L'UMR Ecologie Microbienne de l'Université Claude Bernard Lyon I, particulièrement **Mr Laurent Legendre et Mr Serge Michalet** qui m'ont formée à la LC/MS et au traitement de données. Merci pour votre aide lors de la rédaction.
- L'équipe du Laboratoire de Biologie Moléculaire d'Ambatobe, pour m'avoir permis d'utiliser ses matériels lors des récoltes.

Il est impossible de ne pas remercier :

- Les membres de mes comités de thèse : **Mr Luc Bidel, Mr Éric Lacombe, Mme Laurence Marques et Mme Marie Geneviève Dijoux-Franca** pour les recommandations afin de mieux recadrer mes travaux de thèse.
- Les membres de jury : **Mme Doll Danielle Aurore Rakoto**, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de la soutenance, **Mr Marc Lemaire, Mme Bakolinirina Andriamihaja, Mr Pierre Czernic, et Mme Sahondramalala Ranomenjanahary** qui ont bien voulu accepter d'évaluer cette thèse.

Mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse :

- **Mme Sylvie Doubeau** et **Mme Isabelle Rochette** qui m'ont formée et ont contribué au dosage des sucres ;
- **Mlle Morgane Pace** qui m'a aidée pour le dosage de l'amidon
- **Mme Odile Fossati**, qui m'a aidée dans les analyses statistiques et **Mr Alexis Dereeper** pour les analyses transcriptomiques ;
- **Mme Claude-Anne Gauthier**, représentante de l'**IRD Madagascar** et **Mme Hary-liva Ravelontajovo** qui m'ont soutenue lors de mes missions d'enquête et de collecte réalisées sur la Grande Île.

J'exprime ici mes reconnaissances envers toutes les personnes que j'ai rencontrées durant cette thèse que ce soit pour leurs aides et leurs gentillesse : **Lucile, Rémi, Mathilde, Eoghan, Charlie, Cyril, Cécile, Felana, Mr Rasolo et Mr Raymond, Benjamin et Teerarat.**

Merci aux personnes que j'ai pu oublier, avec toutes mes sincères excuses

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. La caféiculture	6
I.1. Origine des caféiers cultivés	6
I.1.1. <i>Coffea arabica</i> : Origine et conditions optimales de culture	6
I.1.2. <i>Coffea canephora</i> : Origine et conditions optimales de culture	6
I.1.3. La caféiculture à Madagascar	7
I.2. Diversité des caféiers	7
I.2.1. Classification botanique des caféiers	7
I.2.2. Description morphologique des caféiers	8
I.3. Amélioration des caféiers	11
I.3.1. Amélioration de <i>Coffea arabica</i>	12
I.3.2. Amélioration de <i>Coffea canephora</i>	12
I.3.3. Amélioration variétale liée aux changements climatiques	13
II. Changement climatique et capacité adaptative des plantes	14
II.1. Mécanismes généraux de réponses des plantes aux stress liés aux changements climatiques	15
II.2. Exemples de réponse des plantes au stress	17
II.2.1. Quelques définitions	17
II.2.1.1. « Reactive oxygen species » ou espèces réactives de l'oxygène (ROS)	17
II.2.1.2. « Heat shock proteins » ou protéines de choc thermique (HSP)	18
II.2.2. Réponses au stress thermique	19
II.2.2.1. La chaleur	20
II.2.2.1.1. Réponses morphologiques	20
II.2.2.1.2. Réponses physiologiques	20
II.2.2.1.3. Transduction du signal	21
II.2.2.1.4. Réponses métaboliques	23
II.2.2.2. Le froid et le gel	24
II.2.3. Réponses au stress lumineux	24
II.2.3.1. Réponses morphologiques	25
II.2.3.2. Réponses physiologiques	25
II.2.3.3. Transduction du signal	26
II.2.3.4. Réponses métaboliques	27
II.2.4. Notion de stress combiné ou stress multiple	28

III.	Caféiers et changement climatique	29
III.1.	Voie de biosynthèse commune aux phénylpropanoïdes	31
III.2.	Voie de biosynthèse de la lignine	32
III.3.	Voie de biosynthèse des flavonoïdes	34
	MATERIEL ET METHODES	36
I.	Le dispositif expérimental au Mexique	36
II.	Zone de collecte à Madagascar	37
III.	La collecte des données météorologiques	37
IV.	Matériel végétal	37
V.	Méthodologie de collecte et de conservation des feuilles	38
VI.	Mesures morphologiques	40
VII.	Les analyses biochimiques	40
VII.1.	Dosages des composés phénoliques	41
VII.1.1.	Extraction des composés phénoliques	41
VII.1.2.	Analyse biochimique quantitative	41
VII.1.2.1.	Préparation des standards	41
VII.1.2.2.	Caractéristiques de l'appareil chromatographique et dosage	41
VII.1.2.3.	Analyse des données	42
VII.1.2.4.	Méthode de calcul des concentrations en composés	42
VII.1.3.	Annotations des composés par LC-MS	43
VII.2.	Analyses des sucres libres par chromatographie d'échanges d'ions	44
VII.2.1.	Extraction des sucres libres	44
VII.2.2.	Analyse biochimique	44
VII.2.2.1.	Préparation de la gamme étalon	44
VII.2.2.2.	Caractéristiques de l'appareil et dosage	45
VII.2.2.3.	Méthode de calcul des concentrations en sucres	45
VII.3.	Analyse de la teneur en amidon par un kit enzymatique	45
VII.3.1.	Principe du kit « total starch GOPOD »	45
VII.3.2.	Dosage de l'amidon	46
VII.3.3.	Méthode de calcul de la teneur en amidon	47
VIII.	Analyses transcriptomiques	47
VIII.1.	Contrôle qualité des reads	48
VIII.2.	Cartographie des reads sur le génome de référence	49
VIII.3.	Comptage des reads pour chaque gène	50
IX.	Traitement des données	51
IX.1.	Données climatiques	51
IX.2.	Données morphologiques	51

IX.3.	Analyses statistiques	51
IX.3.1.	Analyses morphologiques et biochimiques	51
IX.3.2.	Analyse de l'expression différentielle	53
RESULTATS		56
I.	Effets de l'altitude sur <i>C. arabica</i> var. Marsellesa	55
I.1.	Caractérisation climatique du dispositif altitudinal pour les trois ans d'études	55
I.2.	Variations morphologiques de <i>C. arabica</i> en fonction de l'altitude	56
I.3.	Variations biochimiques des feuilles jeunes et matures de <i>C. arabica</i>	58
I.3.1.	Identification des composés	58
I.3.2.	Quantification des composés phénoliques dans les feuilles matures	61
I.3.3.	Relation entre la teneur en composés et les paramètres climatiques	64
I.3.4.	Comparaison des teneurs en composés des feuilles jeunes et des feuilles matures	67
I.4.	Variations de l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes	69
I.4.1.	Comparaison de l'expression des gènes en fonction de l'altitude dans les feuilles matures	69
I.4.2.	Comparaison de l'expression des gènes en fonction de l'âge des feuilles	74
I.5.	Discussion et conclusion	76
II.	Effets de l'ombrage sur <i>Coffea arabica</i> var. Marsellesa cultivé à deux altitudes extrêmes	79
II.1.	Réponses morphologiques des caféiers à l'ombrage	79
II.2.	Réponses biochimiques des caféiers à l'ombrage	80
II.2.1.	Effets de l'ombrage sur le contenu foliaire en sucres	80
II.2.2.	Effets de l'ombrage sur les teneurs en composés phénoliques	81
II.3.	Réponses transcriptomiques à l'ombrage	83
II.3.1.	Gènes surexprimés en plein soleil aux deux altitudes	84
II.3.2.	Gènes différentiellement exprimés uniquement à basse altitude	89
II.3.3.	Gènes différentiellement exprimés uniquement à haute altitude (1250 m)	90
II.4.	Discussion et conclusion	91
III.	Impacts du greffage sur la réponse de <i>C. arabica</i> à l'altitude	96
III.1.	Réponses morphologiques comparées	96
III.2.	Réponses biochimiques comparées	97
III.3.	Réponses transcriptomiques comparées	98
III.3.1.	Expressions comparées chez les individus cultivés à haute altitude (1250 m)	99
III.3.2.	Expressions comparées chez les individus cultivés à l'altitude intermédiaire (1050 m)	99
III.3.3.	Expressions comparées chez les individus cultivés à basse altitude (650 m)	100
III.4.	Discussion et conclusion	103
IV.	Essai de validation des marqueurs biochimiques chez les caféiers	104

IV.1. Variation des contenus phénoliques des feuilles de <i>C. canephora</i> en fonction de l'altitude	104
IV.2. Variation des contenus phénoliques des feuilles de <i>C. arabica</i> malgache en fonction du mode de culture	106
IV.3. Discussion et conclusion	108
DISCUSSION GENERALE	106
I. Les marqueurs potentiels en réponse aux rayonnements solaires	110
II. Marqueurs potentiels en réponse à la température	111
III. Marqueurs potentiels en réponse au stress hydrique	112
IV. Validation des marqueurs biochimiques chez d'autres espèces	113
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXE	I
ARTICLE	IV

# LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Pays producteurs de café et leur production en 2018 .....	1
Figure 2	: Production mondiale de café par continent en 2018 .....	2
Figure 3	: Evolution de la température moyenne (A) et des précipitations moyennes (B) entre 1986-2005 et 2081-2100 .....	3
Figure 4	: Organigramme de la taxonomie du genre <i>Coffea</i> .....	8
Figure 5	: Diversité dans le sous-genre <i>Coffea</i> .....	9
Figure 6	: Représentation morphologique de <i>Coffea arabica</i> .....	10
Figure 7	: Représentation morphologique de <i>Coffea canephora</i> .....	11
Figure 8	: Réponses communes des plantes aux stress abiotiques .....	15
Figure 9	: Schématisation des différentes étapes conduisant à la tolérance à un stress .....	16
Figure 10	: Diagramme représentant la transduction du signal lors d'un stress à haute température chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
Figure 11	: Modèle simplifié montrant les différentes voies de transduction du signal de rayonnement UV dans les plantes et la mémoire épigénétique conduisant à l'acclimatation ou à l'adaptation .....	27
Figure 12	: Représentation de la réponse transcriptionnelle d' <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Triticum aestivum</i> et <i>Solanum bicolor</i> aux stress chaleur et sécheresse, appliqués de manière individuelle ou combinée .....	29
Figure 13	: Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la lignine .....	33
Figure 14	: Schéma représentant les différentes branches de la voie de biosynthèse des flavonoïdes d'après une étude sur plusieurs espèces .....	35
Figure 15	: Plan d'une parcelle expérimentale du dispositif altitudinal installé au Mexique, région de Xalapa (Veracruz, Mexique) .....	36
Figure 16	: Aspect des différents stades de feuilles de caféiers récoltés .....	38
Figure 17	: Etapes des réactions enzymatiques du dosage de l'amidon par le kit GOPOD .....	46
Figure 18	: Qualité des séquences par base pour les différents cycles .....	48
Figure 19	: Description de l'algorithme TopHat2 .....	49
Figure 20	: Comptage des reads avec HTseq-count .....	50
Figure 21	: (A) Exemple de spectre de masse en mode d'ionisation négatif ; (B) exemple de spectre UV de l'acide 5-O-caféoylquinique .....	61
Figure 22	: Exemple de chromatogrammes d'extrait méthanolique des feuilles .....	61
Figure 23	: Co-inertie décrivant la réponse entre paramètres climatiques et composés phénoliques pour les trois années de récolte .....	67
Figure 24	: Diagramme représentant les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes exprimés en RPKM avec les teneurs en composés exprimées en pourcentage de matière sèche .....	71
Figure 25	: Heatmap représentant les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes exprimés en logRPKM avec les diagrammes de la teneur en composés exprimée en pourcentage de matière sèche des individus récoltés en 2015 sur les feuilles jeunes et matures .....	75
Figure 26	: Diagramme de Venn des gènes mettant en évidence le nombre de gènes différentiellement exprimés chez les individus cultivés à 650 m (violet), 1250 m (jaune) considérés à part ou ensemble et aux deux altitudes (intersection) .....	84
Figure 27	: Histogramme de l'expression des gènes communs surexprimés en plein soleil aux deux altitudes .....	87

Figure 28	: Expression différentielle des gènes retenus pour l'identification d'une réponse à l'ombrage.....	90
Figure 29	: Evolution de la température journalière à basse (650) et haute (1250) altitudes pour les plantes cultivées en plein soleil (Sun) ou sous ombrage (Shade).....	92
Figure 30	: Diagramme de Venn mettant en évidence le nombre de gènes différentiellement exprimés chez les individus cultivés à 650 m (violet), 1050 m (jaune) et 1250 m (vert) considérés à part ou ensemble.....	99
Figure 31	: Comparaison de l'expression différentielle (Log <sub>2</sub> FC) des 3 gènes retenus entre les feuilles de <i>C. arabica</i> var. Marsellesa greffés (GR) ou pieds francs (PF) à l'altitude intermédiaire (GR/PF) .....	100
Figure 32	: Chromatogramme de <i>C. canephora</i> cv Nemaya obtenu à trois longueurs d'onde égales à 280 nm, 320 nm et 360 nm.....	104

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Taille, fonction et localisation cellulaire des différentes classes des protéines de choc thermique .....	19
Tableau 2	: Teneurs en composés phénoliques, exprimées en pourcentage de matière sèche, dans des feuilles matures de <i>C. arabica</i> var. <i>laurina</i> et <i>C. canephora</i> .....	31
Tableau 3	: Résumé des nombres de feuilles et d'individus étudiés par caféiers et selon les conditions de culture en fonction des analyses. Nb. ind : Nombre d'individus récolté à chaque altitude ou station; Nb. feuilles/ind : Nombre de feuilles prelevées par individu ; H : Heure de récolte après le lever du soleil. ....	39
Tableau 4	: Gradient de concentration des solvants A et B lors d'un dosage HPLC .....	42
Tableau 5	: Gradient de concentration des solvants A et B par LC-MS .....	44
Tableau 6	: Evolution des paramètres climatiques durant trois années consécutives sur chaque station de récolte. ....	56
Tableau 7	: Mesures réalisées avant chaque récolte, chaque année de 2014 à 2016, à chaque station sur cinq individus. ....	57
Tableau 8	: Corrélations de Pearson entre les paramètres climatiques et les mesures morphologiques (N=90). ....	58
Tableau 9	: Liste des composés analysés par LC-MS selon leur ordre d'élution, avec leur temps de rétention (TR), leur masse en Da, leur formule brute, les longueurs d'onde auxquelles les maximas ont été observés, leur nom proposé, leur masse après la fragmentation en ion positif et négatif, et les fragments générés. * : individu confirmé par un standard. ....	59
Tableau 10	: Moyennes des teneurs en acides chlorogéniques et en xanthones exprimées en pourcentage de matière sèche sur les trois stations altitudinales durant les trois années de récolte. ....	62
Tableau 11	: Moyennes des teneurs en flavonoïdes exprimées en pourcentage de matière sèche sur les trois stations altitudinales durant les trois années de récolte. ....	64
Tableau 12	: Corrélations de Pearson entre les paramètres climatiques et les teneurs en composés phénoliques. ....	65
Tableau 13	: Comparaison des moyennes des teneurs en composés phénoliques dans les feuilles très jeunes et matures des individus cueillis en 2015 à 1050 m. feuille jeune (FJ) ; feuille mature (FM). ....	68
Tableau 14	: Moyennes du niveau d'expression, exprimées en « Reads Per Kilobase and per Million » (RPKM), des différents homologues des gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans les feuilles matures de <i>C. arabica</i> cv <i>Marsellesa</i> cultivé aux trois altitudes et valeurs de <i>p</i> de la comparaison deux à deux des moyennes (N = 3) dans le logiciel EdgeR (notées en bleu lorsque la valeur est inférieure à 0,05). Annotation des gènes réalisée en utilisant le séquençage de <i>C. canephora</i> .....	72
Tableau 15	: Tailles des plants de <i>Coffea arabica</i> var. <i>Marsellesa</i> et des feuilles matures cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de la lumière PS : plein soleil, SO : sous ombrage. Mesures effectuées en 2015. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ ) .....	80
Tableau 16	: Surfaces foliaires, poids secs, poids spécifiques et densités stomatiques des feuilles matures de <i>C. arabica</i> var. <i>Marsellesa</i> cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de la lumière. ....	80

Tableau 17	: Teneurs en sucres libres et amidon, exprimées en pourcentage de matière sèche, des feuilles matures de <i>C. arabica</i> var. Marsellesa cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de lumière. ....	81
Tableau 18	: Ratios des concentrations en composés phénoliques majeurs dans les feuilles matures de plants de <i>Coffea arabica</i> var, Marsellesa cultivés sous ombrage (SO ; à 50% d'exclusion) comparés aux individus cultivés en plein soleil (PS) à deux altitudes différentes, 650 m et 1250 m. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05, *$ ).....	83
Tableau 19	: Processus biologiques, numéros d'accession, fonctions moléculaires, compartimentations et niveaux d'expression moyen des gènes surexprimés à la fois à basse et haute altitude dans les feuilles de <i>C. arabica</i> var. Marsellesa cultivés en plein soleil. ....	86
Tableau 20	: Liste des gènes différentiellement exprimés dans les feuilles de <i>C. arabica</i> var. Marsellesa cultivés à basse altitude selon les conditions d'ombrage (50 % d'exclusion ou non) .....	88
Tableau 21	: Gènes sélectionnés pour leur intérêt potentiel en tant que marqueurs de la réponse adaptative à la lumière à basse altitude. Numéros d'accession, fonctions et différentiels d'expression entre les arbres au soleil et à l'ombre .....	90
Tableau 22	: Liste des gènes différentiellement exprimés dans les feuilles de <i>C. arabica</i> var. Marsellesa cultivés à haute altitude selon les conditions d'ombrage (50 % d'exclusion ou non) .....	91
Tableau 23	: Mesure de la croissance de <i>Coffea arabica</i> cv. Marsellesa greffé à trois altitudes. PF : Pieds Francs ; GR : Greffés. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ ).....	96
Tableau 24	: Ratio des concentrations en composés phénoliques des feuilles matures de <i>Coffea arabica</i> var. Marsellesa greffés (GR) comparés aux individus non greffés (pieds franc (PF)) à trois altitudes différentes. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05, *$ ).....	98
Tableau 25	: Nombre de gènes surexprimés dans les feuilles des individus cultivés à basse altitude (650 m) regroupés selon leur fonction, en excluant la réponse stricte aux stress biotiques .....	101
Tableau 26	: Fonctions et expressions comparées des gènes impliqués dans la réponse au stress et surexprimés chez les individus pieds francs à basse altitude.....	102
Tableau 27	: Fonctions et expressions comparées des gènes impliqués dans la réponse au stress et surexprimés chez les individus greffés à basse altitude.....	103
Tableau 28	: Moyennes des teneurs en acides chlorogéniques et xanthones, évaluées sur deux années de récolte et exprimées en pourcentage de matière sèche, de feuilles matures de <i>C. canephora</i> cultivés à trois altitudes différentes.....	105
Tableau 29	: Moyennes des teneurs en flavonoïdes, évaluées sur deux années de récolte et exprimées en pourcentage de matière sèche, de feuilles matures de <i>C. canephora</i> cultivés à trois altitudes différentes. ....	105
Tableau 30	: Moyennes des teneurs en composés phénoliques (%MS) dans les feuilles des caféiers malgaches en culture irriguée ou non (N = 10). Test statistique : Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) .....	107

# ABREVIATIONS

3,4-diCQ	Acide 3,4- <i>O</i> -dicaféoylquinique
3,5-diCQ	Acide 3,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique
4,5-diCQ	Acide 4,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique
4CL	4-coumaroyl CoA ligase
4CQA	Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique
5CQA	Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique
ABA	Acide abscissique
ACS1	Acétyl-CoA synthétase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHP4	Phosphotransfert contenant de l'histidine
ANS	Anthocyanidine synthase
APX	Ascorbate Peroxydase
ASPG1	Protéase aspartique des cellules de garde
ATP	Adénosine triphosphate
C3'H	Coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase
C4H	Cinnamate 4-hydroxylases
CAD	Cinnamoyl alcool déshydrogénase
CAT	Catalase
Catechin	Catéchine
CAX1	Echangeur de Ca <sup>2+</sup>
CBF	C-repeat-binding factors ou facteurs de transcription à répétition C
CBL1	Calcineurine
CCoAOMT	Caféoyl CoA 3- <i>O</i> -méthyltransférase
CCR	Cinnamoyl-CoA réductase
CDPK	Calcium Dependent Protein Kinase
CHI	Chalcone isomérase
CHR	Chalcone réductase
CHS	Chalcone synthase
CNCC	Comité National de la Commercialisation du Café
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COMT	Acide caféique <i>O</i> -méthyltransférase
COP1	Constitutively photomorphogenic 1 ou photoorphogénique constitutif 1
COR	Cold regulated gene ou gène régulé par le froid
CPL3	ARN polymérase II
CQA ou CQAs	Acide chlorogénique
DFR	Dihydroflavonol 4-réductase
DHK	Dihydrokaempférol
diCQs	Acides dicaféoylquiniques
DMID	7,2'-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavanol déshydratase

DREB1	Dehydration-responsive element binding factors 1 ou facteurs de transcription des éléments sensibles à la déshydratation 1
Epicat	Epicatéchine
F3'5'H	Flavonoïde 3'5'-hydroxylase
F3H	Flavanone 3-hydroxylase
F3'H	Flavonoïde 3'-hydroxylase
F5H	Férulate 5-hydroxylase
F-dihex	Flavone-di-C-hexose
FOFIFA	Centre National de la Recherche pour le Développement rural
FQA	Acide féruloylquinique
FSI et FSII	Flavone synthase
GES	Gaz à effet de serre
GIEC	Groupe Intergouvernemental sur l'évolution du climat
GRP2	Protéine de liaison aux ARN
H <sub>2</sub> O	Eau
HCT	Shikimate hydroxycinnamoyl transférase
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HQT	Quinate hydroxycinnamoyl transférase
HSF ou Hsf	Heat shock factor
HSP ou Hsp	Heat shock protein ou protéine de choc thermique
I2'H	Isoflavone 2'-hydroxylase
IFR	Isoflavone réductase
IFS	Isoflavone synthase
IOMT	Isoflavone <i>O</i> -methyltransférase
IPCC	Intergouvernemental panel climate change
IPME	Interaction Plante-Microorganisme-Environnement
IRD	Institut de recherche pour le développement
IRD	Institut de Recherche pour le développement
kDa	KiloDalton
K-dihex-dhex	Kaempférol 3- <i>O</i> -dihexose-déoxyhexose
KIN	Cold induced gene ou gène induit par le froid
LC-MS	Chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse
LCR	Leucoanthocyanidine réductase
LDOX	Leucoanthocyanidine dioxygénase
LEA	Late embryogenesis abundant gene ou gènes abondants en embryogenèse tardive
LTI	Low temperature induced gene ou gène induit à basse température
MADR4	Monodéshydroascorbate réductase
Mang	Mangiférine
Mang-OHbenz	<i>p</i> -hydroxybenzoate de mangiférine
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MSRB3	Peptide méthionine sulfoxyde réductase
NADK2	Nicotinamide adénine dinucléotide kinase
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OCA	Opération Café Arabica
OMT	<i>O</i> -méthyltransférase
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PAP17	Phosphatase acide pourpre
PAR	Photosynthetically active radiation ou rayonnement photosynthétiquement actif
POX	Péroxydase
PSII	Photosystème II
Q-diglu	Quercétine 3,4-di- <i>O</i> -glucoside
Q-dihex-dhex	Quercétine 3- <i>O</i> -dihexose-déoxyhexose
RAIN	Précipitation
RCP	Profils représentatifs d'évolution de concentration
RD	Responsive to dehydration gene ou gène en réponse à la déshydratation
RD22	Gène en réponse à la déshydratation
RE	Réticulum endoplasmique
RH	Humidité relative
RH42	ARN hélicase
ROS	Reactive oxygen species ou espèce réactive de l'oxygène
RT	Rhamnosyl transférase
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
RUP	Répresseur de la photomorphogénèse UV-B
Rutin	Rutine
sHSP	Small heat shock protein ou petite protéine de choc thermique
SI	Rayonnement solaire
SOD	Superoxyde dismutase
STABEX	Stabilisation des Recettes d'Exportations
STS	Stilbène synthase
T	Température
UFGT	UDPG flavonoïde glucosyle transférase
UV	Ultra-violet
UVR8	UV-resistance locus 8
VR	Véstitone réductase
WEB1	Protéine en réponse à la lumière bleue

# VALORISATION

## **Communication orale (RFMF)**

Vestals I. R., Villain L., Breitler J.-C., Georget F., Etienne H., Raherimandimby M., Rakotoarisoa N. V., Campa C., (2016) Biochemical markers of *Coffea arabica* adaptability to environmental changes. X<sup>ème</sup> congrès RFMF, juin 2016, Montpellier

## **Article accepté (Annexe)**

Vestals I. R., Michalet S., Villain L., Breitler J.-C., Fossati-Gaschignard O., Severac D., Georget F., Dereeper A., Benoit B., Rakotoarisoa N. V., Bonato O., Raherimandimby M., Etienne H., Campa C. « Environmental conditions and leaf age impact phenolic content and biosynthesis in leaves of field-grown *Coffea arabica* L. », *Tree Physiology*

# **INTRODUCTION GENERALE**

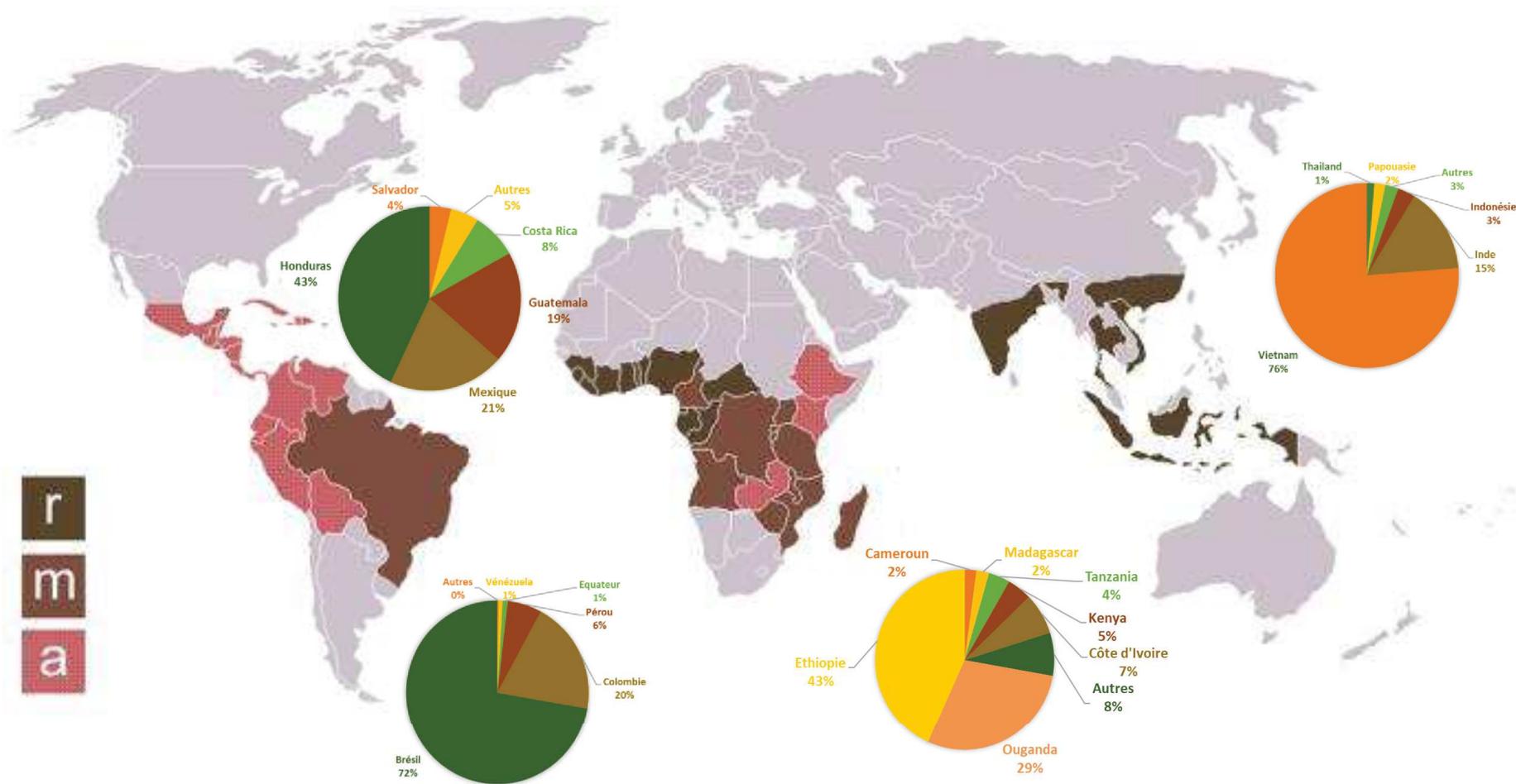


Figure 1 : Pays producteurs de café et leur production en 2018  
 Source : <http://www.ico.org>.

Le café est l'une des boissons les plus populaires au monde. *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner sont les deux espèces exploitées à grande échelle pour obtenir le café à partir de grains verts torréfiés. Les grains de *C. arabica* donnent le café **Arabica**, ceux de *C. canephora* donnent le café **Robusta**. Actuellement, Arabica et Robusta représentent respectivement 60% et 40% de la production mondiale de café (<http://www.ico.org>). Ces deux cafés se distinguent par leur goût, le café arabica ayant un goût fruité et acidulé généralement plus apprécié par les consommateurs que le café robusta qui est plus amer. La filière café représente un enjeu considérable au niveau économique, avec des échanges mondiaux estimés à plus de 25 millions de dollars en 2017 et une consommation mondiale à plus de 9 millions kg/jour (<http://www.ico.org>). Le café est essentiellement produit dans les zones tropicales d'Amérique, d'Afrique, d'Asie pour lesquelles le Honduras, le Brésil, l'Éthiopie et le Vietnam sont, respectivement, les pays les plus producteurs (Figure 1). L'Amérique du Sud est le producteur principal (44%), suivi par l'Asie, l'Océanie (31%) puis le Mexique et l'Amérique centrale (14%) et enfin l'Afrique (11%) (Figure 2). Environ 125 millions de personnes dans le monde dépendent de la production de café et la plupart sont uniquement caféiculteurs (<https://www.fairtrade.org.uk>). Depuis quelques années, une baisse de la production et de la qualité des grains a été notée et fortement attribuée au changement des conditions climatiques. Pour maintenir les revenus des caféiculteurs, l'économie des pays exportateurs et la production d'un café de bonne qualité, il est urgent de rechercher des solutions pour adapter la caféiculture aux changements climatiques.

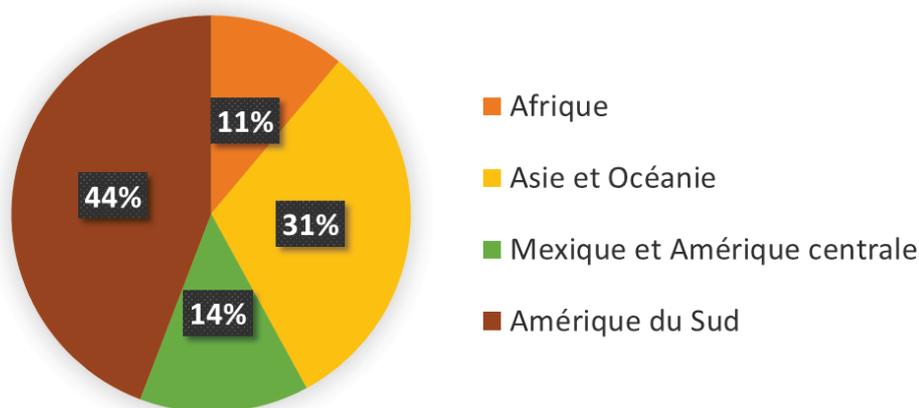


Figure 2 : Production mondiale de café par continent en 2018  
Source : <http://www.ico.org>

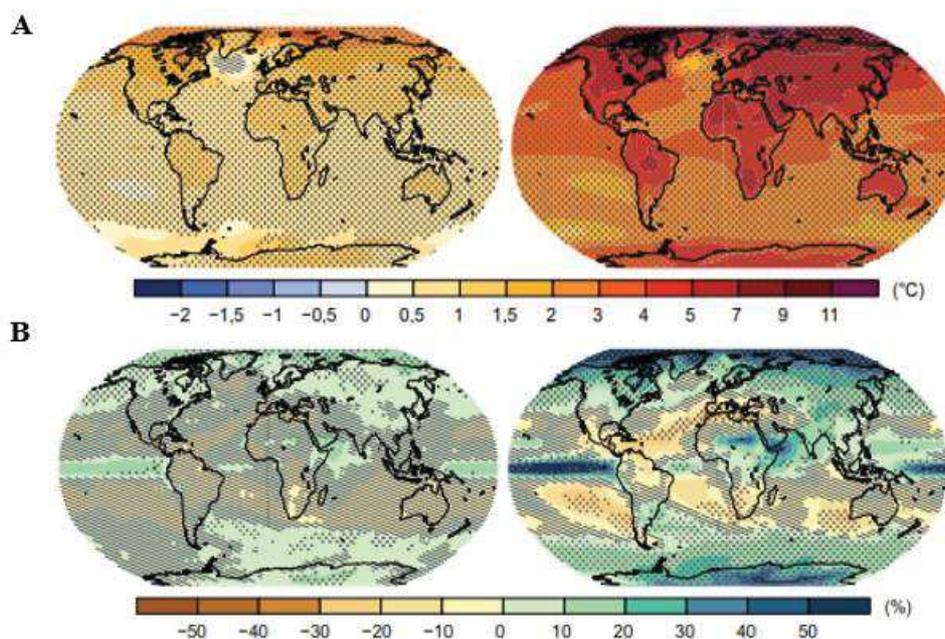


Figure 3 : Evolution de la température moyenne (A) et des précipitations moyennes (B) entre 1986-2005 et 2081-2100  
Source : IPCC, 2014

Selon le groupe d'experts Intergouvernemental sur l'évolution climatique (GIEC), l'augmentation de la teneur en gaz à effet de serre va entraîner une hausse des températures de 1,8 à 4°C d'ici la fin du siècle (IPCC, 2014) (Figure 3A) et des modifications du régime pluviométrique de manière annuelle mais également saisonnière (GIEC, 2013) (Figure 3B). Les projections futures les plus défaitistes pour la caféiculture prévoient, d'ici 2050, une diminution de plus de 50% des surfaces consacrées à la culture de *C. arabica*, en particulier au Brésil. D'ailleurs, les premiers effets des changements climatiques ont déjà été notés par les producteurs. La hausse des températures moyennes de 1°C en Amérique se traduit déjà par une baisse des rendements et une augmentation de la prolifération des pathogènes. Il devient donc urgent de trouver des solutions pour maintenir la culture du café. Pour *C. arabica*, le déplacement de la culture vers des zones de plus haute altitude, la culture dans des systèmes agroforestiers et la sélection variétale sont trois propositions qui sont actuellement à l'étude. Le déplacement des cultures en haute altitude permettrait d'atténuer la hausse de température engendrée par le réchauffement climatique. Un système d'ombrage offert par l'agroforesterie fournirait simultanément une réduction de la température journalière de 2 à 3°C et des amplitudes de température plus faibles entre le jour et la

nuît, paramètres qui influent, avec la sécheresse, sur la période de floraison et de fructification et limitent les rendements (Camargo, 2010). Le greffage de *C. arabica* (greffon) sur une autre espèce de caféier porte-greffe est une technique qui a déjà été utilisée vers les années 1990 pour réduire les dommages causés par les nématodes. Dans le cadre du réchauffement climatique et de ses conséquences sur la disponibilité en eau dans la rhizosphère, la méthode peut être envisagée pour apporter aux caféiers une tolérance au stress hydrique, à condition de choisir un porte-greffe capable d'améliorer l'absorption des éléments minéraux et d'eau (DaMatta et Ramalho, 2006 ; Novaes *et al.*, 2011).

D'une manière générale, les perturbations environnementales entraînent chez les plantes la mise en place d'une réponse adaptative permettant de les protéger. Cette protection est assurée, entre autres, par des composés antioxydants parmi lesquels figurent les composés phénoliques. Ainsi, il a été montré que, sous une forte luminosité, les flavonoïdes s'accumulent dans les tissus des feuilles de plantes jouant un rôle majeur dans la filtration des rayonnements UV. De même, des changements climatiques saisonniers (avec pour paramètres majeurs l'évolution de la température et de la durée de l'éclairement) peuvent entraîner des modifications des teneurs foliaires en acides chlorogéniques, composés phénoliques intermédiaires dans la voie de biosynthèse de la lignine.

Les caféiers étant des plantes fortement accumulatrices d'acides chlorogéniques (jusqu'à 6% de la matière sèche des jeunes feuilles de *C. canephora* (Mondolot *et al.*, 2006)), il semblait intéressant de cibler notre étude sur ces métabolites, et sur les composés phénoliques plus généralement, pour rechercher des marqueurs de la capacité adaptative de ces plantes à différents stress abiotiques.

Nos travaux pour cette étude ont été effectués à Montpellier (France) pendant les deux premières années de thèse, puis à Antananarivo (Madagascar). Les études biochimiques ont été réalisées à Montpellier sur des feuilles jeunes et matures lyophilisées récoltées au Mexique. Elles ont porté sur les composés phénoliques en ce qui concerne les métabolites secondaires et sur les sucres pour les métabolites primaires. Les données transcriptomiques ont été analysées en France, en exploitant les données fournies par la plateforme MGX et les outils d'analyse bioinformatique mis en place à l'IRD Montpellier. Elles ont permis de comparer et de quantifier le niveau

d'expression génique entre différents stades de croissance des feuilles et différentes conditions de culture. Le séquençage du génome de *C. arabica* n'étant pas disponible, le génome de *Coffea canephora* a été utilisé pour l'annotation afin de connaître les fonctions des gènes. L'objectif de nos travaux consiste à mettre en évidence les composés phénoliques associés spécifiquement à l'adaptation aux différents stress abiotiques ainsi que les gènes pouvant être considérés comme marqueurs et servir de cibles en amélioration.

Des études morphologique et métabolique ont été également menées, d'une part, sur *C. canephora* var. Nemaya et sur *C. arabica* cv Marsellesa greffés sur cette variété. Ces derniers sont cultivés sur les mêmes parcelles au Mexique. D'autre part, des analyses biochimiques ont été effectués sur *C. arabica* cultivés à Madagascar, sous irrigation ou non. La comparaison des variations inter et intraspécifiques du métabolisme des composés phénoliques, selon les différentes conditions de culture devrait permettre de valider les composés majeurs mis en évidence dans l'adaptation des caféiers *C. arabica* var. Marsellesa aux conditions environnantes.

A Madagascar, la filière café a occupé la cinquième place des produits de l'agriculture les plus exportés en 2016 (Randrianarisoa, 2016). Alors que ces dix dernières années, Madagascar a connu une baisse importante dans la production du café Robusta. A l'heure actuelle, les solutions envisagées portent généralement sur l'amélioration variétale (en termes de rendement et de qualité des grains de café). Mais les résultats de cette étude, tester sur les espèces exploitées malgaches sur le plan métabolique pourrait valider les marqueurs préalablement identifiés sur les variétés mexicaines et de proposer des marqueurs de sélection pour la caféiculture malgache.

Ce manuscrit s'articule en trois grandes parties. La première partie, introductive, expose les généralités sur les caféiers, sur les changements climatiques et sur la capacité adaptative des plantes et des caféiers aux changements climatiques. La deuxième développe les méthodologies utilisées durant les études et la troisième présente les résultats obtenus en appliquant différentes conditions environnementales de culture à plusieurs caféiers cultivés. Une conclusion générale et des perspectives termineront le manuscrit.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. La caféiculture

### I.1. Origine des caféiers cultivés

#### I.1.1. *Coffea arabica* : Origine et conditions optimales de culture

Ce sont les forêts tropicales éthiopiennes qui ont abrité les premiers *Coffea arabica* à des altitudes allant de 1600 à 2800 m. Au XIV<sup>ème</sup> siècle, à l'origine de sa culture, *C. arabica* se trouve donc en condition ombragée, dans cette région où la température de l'air se caractérise par de faibles fluctuations saisonnières, atteignant en moyenne environ 20°C. Les précipitations sont bien réparties, variant de 1600 à plus de 2000 mm, avec une saison sèche de 3-4 mois coïncidant avec les mois les plus frais. Dans ces conditions, l'espèce *C. arabica* semble très sensible aux variations de température (DaMatta, 2004a). Ainsi, des températures supérieures à 23°C entraînent une accélération du développement et de la maturation des fruits qui se traduit par une perte de la qualité du café. L'exposition continue à des températures aussi élevées que 30°C entraîne non seulement une croissance réduite mais également des anomalies telles que le jaunissement des feuilles et la croissance de tumeurs à la base de la tige, alors qu'une température annuelle moyenne inférieure à 18°C réduit considérablement la croissance générale de l'arbre. *C. arabica* a été cultivé au moins durant cinq siècles au Yémen avant d'être propagé à travers le monde. Quelques pieds de *C. arabica* sont à l'origine des plantations actuelles de caféiers. En effet, au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle, par le biais des échanges commerciaux hollandais et des campagnes de colonisation françaises, espagnoles et portugaises, quelques individus ont été introduits en Indonésie, en Amérique Latine et vers l'île Bourbon (actuellement appelée l'île de la Réunion) puis vers les régions actuellement productrices. Ces caféiers du Yémen ont ainsi permis la propagation de deux variétés : « Typica », qui a été le premier caféier cultivé en Asie et en Amérique latine et « Bourbon », qui est arrivée en Amérique du Sud en passant par l'île de La Réunion (Anthony *et al.*, 2002 ; Adler, 2014).

#### I.1.2. *Coffea canephora* : Origine et conditions optimales de culture

*Coffea canephora* est originaire des forêts africaines qui s'étendent du fleuve Congo jusqu'au lac Victoria en Ouganda. L'altitude de cette vaste région peut atteindre 1200 m en Ouganda et la température moyenne est comprise entre 24 et 26°C, sans grandes oscillations, avec des précipitations supérieures à 2000 mm réparties sur une période de 9 à 10 mois et avec une forte humidité de l'air. Les hautes températures ne sont pas favorables au développement de cette espèce de caféier, notamment lorsque l'air est sec (DaMatta, 2004a). C'est au début du XX<sup>ème</sup> siècle, suite à une attaque généralisée d'un champignon, *Hemileia vastatrix*, responsable

de la rouille orangée dévastatrice des plantations d'Arabica, que sa culture a commencé, plus particulièrement en Afrique.

### **I.1.3. La caféiculture à Madagascar**

Sur la Grande Île, la caféiculture a commencé au début du XX<sup>ème</sup> siècle, à l'époque coloniale. Plusieurs espèces ont été cultivées dont *C. arabica*, *C. congensis*, *C. canephora* et l'hybride issu du croisement de ces deux dernières espèces nommé *C. congusta*. A cause de sa faible productivité, la culture de *C. congensis* a été abandonnée. *C. congusta* quant à lui, par sa résistance aux maladies telles que la rouille orangée, a connu une forte expansion sur toute la côte Est de l'île (Antalaha, Fénérive, Tamatave, Brickaville, Vatomandry, Mananjary, Manakara, Vohipeno, Farafangana). Il est utilisé dans les zones inondables en tant que porte-greffe pour *C. canephora* (Chevalier, 1946).

Selon les dernières statistiques, la production de café à Madagascar a baissé de plus de 60% de 1960 à 2010. De plus, la qualité des grains a régressé. Pourtant, le café constituait le premier produit d'exportation malgache dans les années 1950. A cette époque, 80% des revenus des ménages de la partie Est de Madagascar provenaient de la vente des grains de *C. canephora*. Ce dernier constitue aujourd'hui 95 % de la production estimée à 40 000 tonnes environ dont seulement 10 000 tonnes répondent aux exigences des importateurs. Quant aux *C. arabica*, il est cultivé dans les Hautes Terres, sur quelques localités. Des projets de plantation de *C. arabica* ont été lancés à plusieurs reprises sur les hauts plateaux malgaches (Soavinandriana (Lac Itasy), Betafo, Faratsiho, Fianarantsoa, Ambositra) tels que l'Opération Café Arabica (OCA), le Système de Stabilisation des Recettes d'Exportations (STABEX), le Comité National de la Commercialisation du Café (CNCC), mais les surfaces adaptées à sa culture se restreignent aux Hautes Terres où le taux de rendement est faible, les conditions optimales de production n'étant sans doute pas adaptées (Rakotomalala, 2018). Actuellement, le FOFIFA développe une nouvelle variété nommée « Ratelo » issue d'un trihybride (croisement des trois espèces *C. arabica*, *C. canephora* et *C. eugenioides*) qui pourrait constituer un nouvel espoir pour la caféiculture malgache (Rakotomalala *et al.*, 2016).

## **I.2. Diversité des caféiers**

### **I.2.1. Classification botanique des caféiers**

La classification des caféiers est schématisée sur la figure 4. Les caféiers appartiennent à la famille des Rubiacées qui comporte plus de 6000 espèces. Dans cette famille, les caféiers constituent la tribu *Coffeae* incluant deux genres : le genre *Psilanthus spp*, subdivisé en deux

sous-genres, *Psilanthus* et *Afrocoffea*, et le genre *Coffea* L., subdivisé en deux sous-genres, *Coffea* et *Baracoffea*. Parmi les 124 espèces répertoriées à ce jour dans le genre *Coffea*, *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, sont les deux espèces principalement exploitées pour fournir le café (Davis *et al.*, 2011). Toutes les espèces *Coffea* sont diploïdes, exceptée *C. arabica* qui est allélotétraploïde. Cette espèce proviendrait du croisement spontané entre *C. eugenioides* (parent femelle) et *C. canephora* (parent mâle) (Lashermes *et al.*, 1999).

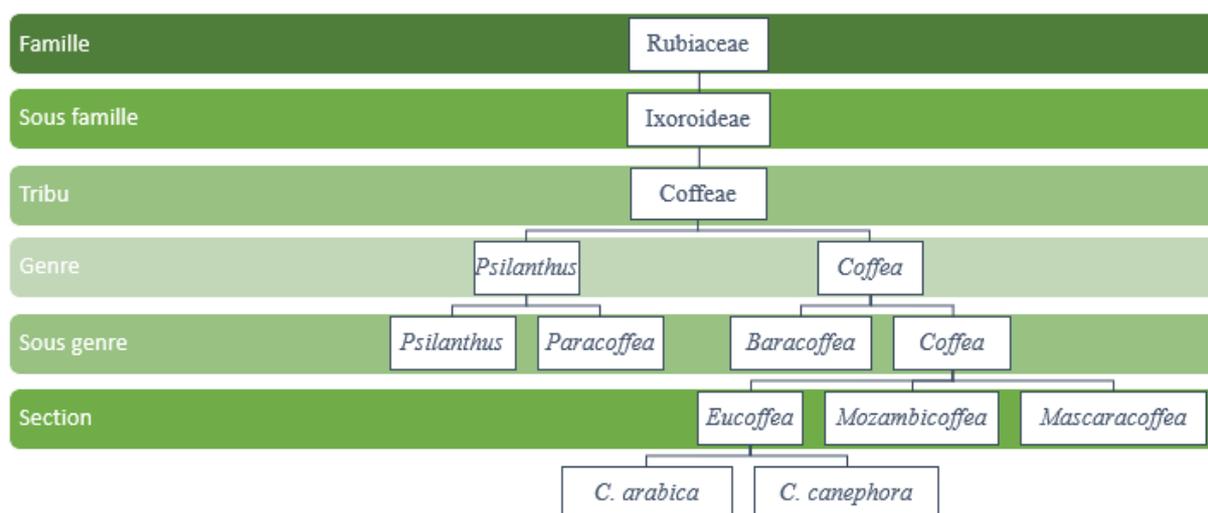


Figure 4 : Organigramme de la taxonomie du genre *Coffea*

### I.2.2. Description morphologique des caféiers

Les caféiers sont des plantes pérennes dont la hauteur et le diamètre diffèrent en fonction des espèces. Les plus grands peuvent atteindre jusqu'à 18 mètres alors que les plus petits constituent des buissons. Toutes les espèces possèdent un tronc monopodial, orthotrope et régulièrement ramifié de deux rameaux plagiotropes opposés sur chaque nœud du tronc. Les rameaux latéraux (primaires) forment les branches florifères et peuvent porter un deuxième (secondaire) voire troisième (tertiaire) axe plagiotrope. Les feuilles sont simples, opposées et persistantes. Une grande diversité de la taille et de la forme des feuilles existe (Figure 5A). Les inflorescences apparaissent généralement à l'aisselle des feuilles des axes plagiotropes et sont pluriflores. Les fleurs sont tubuleuses, de couleur blanche ou rosée lorsqu'elles se fanent (Figure 5B). Leur nombre par inflorescence montre une variation interspécifique et peut aller de 5 à 36 fleurs par nœud. Les fruits, connus aussi sous le nom de « drupe » ou « cerise » sont des faux fruits<sup>1</sup>. Leur forme et leur taille varient selon les espèces (Figure 5C) et la couleur

<sup>1</sup> Faux fruits : fruit résultant de la combinaison de plusieurs organes florale et non pas du développement d'un ovaire d'une fleur.

change en fonction du stade de maturité. Ces fruits renferment deux graines qui sont accolées par leur face plane à invagination « cofféenne » (Figure 5D).

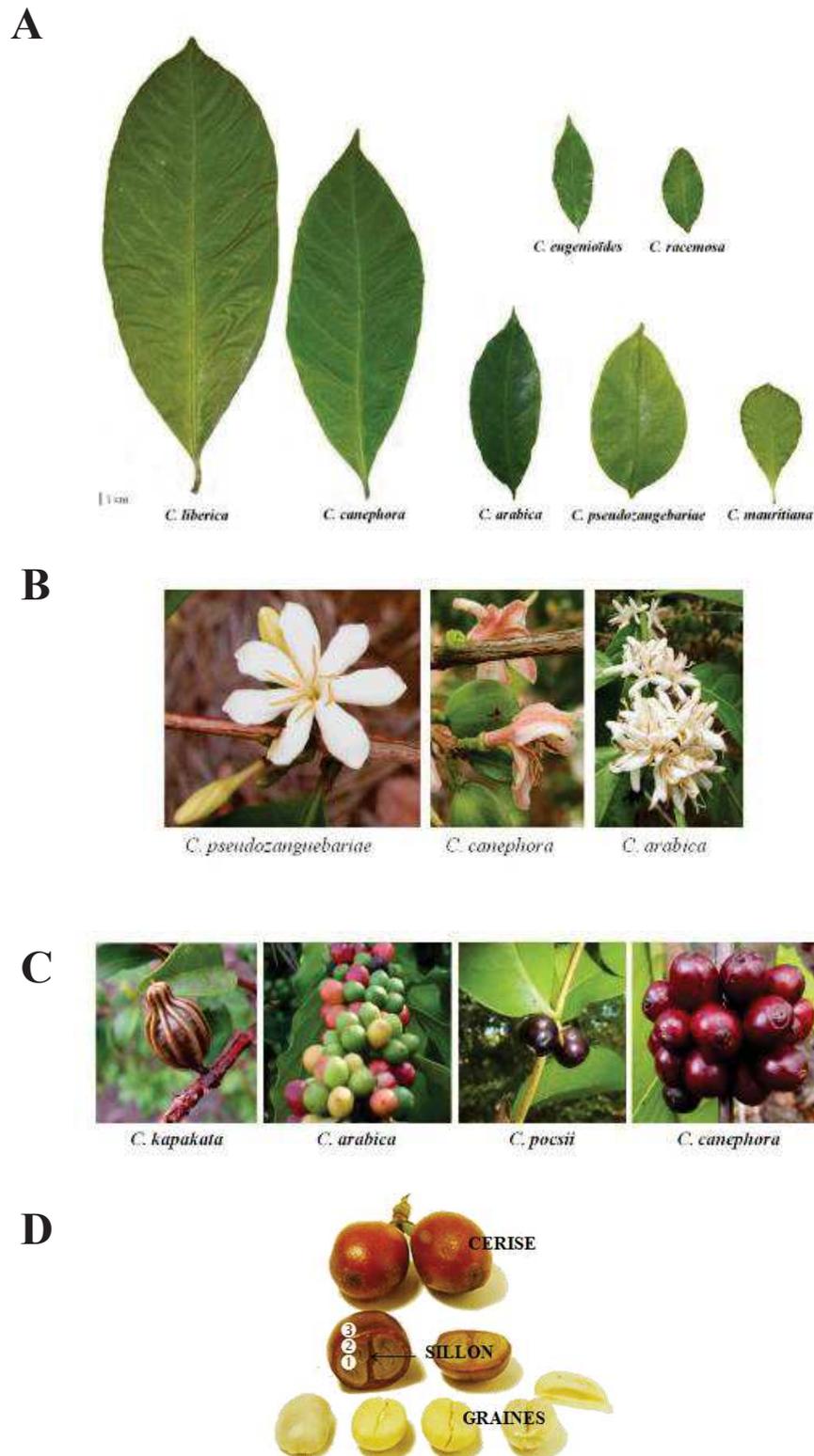


Figure 5 : Diversité dans le sous-genre *Coffea*. Feuilles de différentes espèces de caféiers (A). Fleurs de différentes espèces de caféiers (B) ; Fruits illustrant la diversité des formes, tailles et couleurs (C) ; Drupe ouverte ou « cerise » montrant l'invagination cofféenne des graines (D), Epicarpe (1), Mésocarpe (2), Endocarpe (3). (Adler, 2014)

*C. arabica* présente une taille d'environ 5 à 6 m de hauteur et un tronc de 7 cm de diamètre. Ses feuilles mesurent généralement entre 8 à 20 cm de long et 3 à 7 cm de large (Figure 6). Elles sont munies d'un pétiole court et d'une stipule interpétiole. Elles sont glabres, brillantes et de couleur vert foncé. Les inflorescences blanches sont au nombre de 4 à 18 à l'aisselle des feuilles. Elles sont pentamères, c'est-à-dire formées de 5 sépales et pétales. Les fruits ovoïdes sont rouges à maturité.

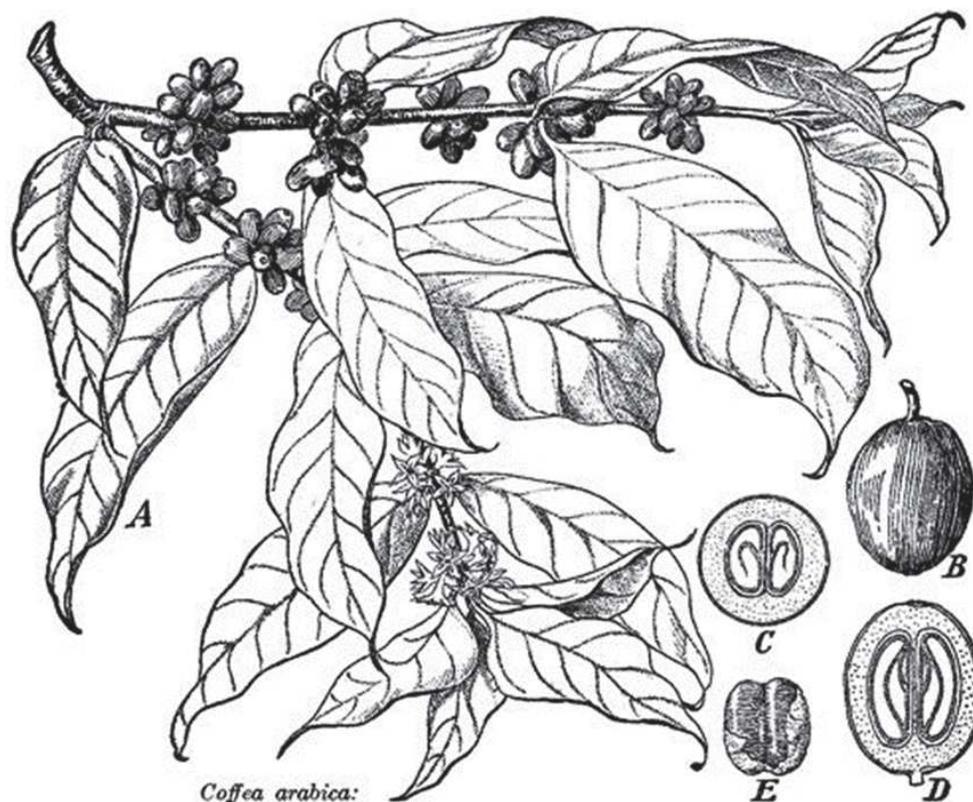


Figure 6 : Représentation morphologique de *Coffea arabica*.

Rameau florifère (A), fruit (B, C, D, E).

Source : [www.swwbm.com/illustrations/illust.html](http://www.swwbm.com/illustrations/illust.html)

*C. canephora* mesure entre 8 à 15 m de hauteur, avec un diamètre de tronc allant jusqu'à 15 cm. Les feuilles mesurent 15 à 25 cm de long et 5 à 12 cm de large (Figure 7). De forme allongée ou lancéolée, elles sont de couleur vert luisant. Les inflorescences sont au nombre de trois (03) à cinq (05) et comportent jusqu'à douze (12) fleurs blanches de grande taille, constituées de cinq (05) pétales soudés. Les fruits sont ovoïdes, de couleur rouge à maturité et rassemblés en glomérules denses. (Louarn, 1976 ; Hailu, 2011 ; Adler, 2014).

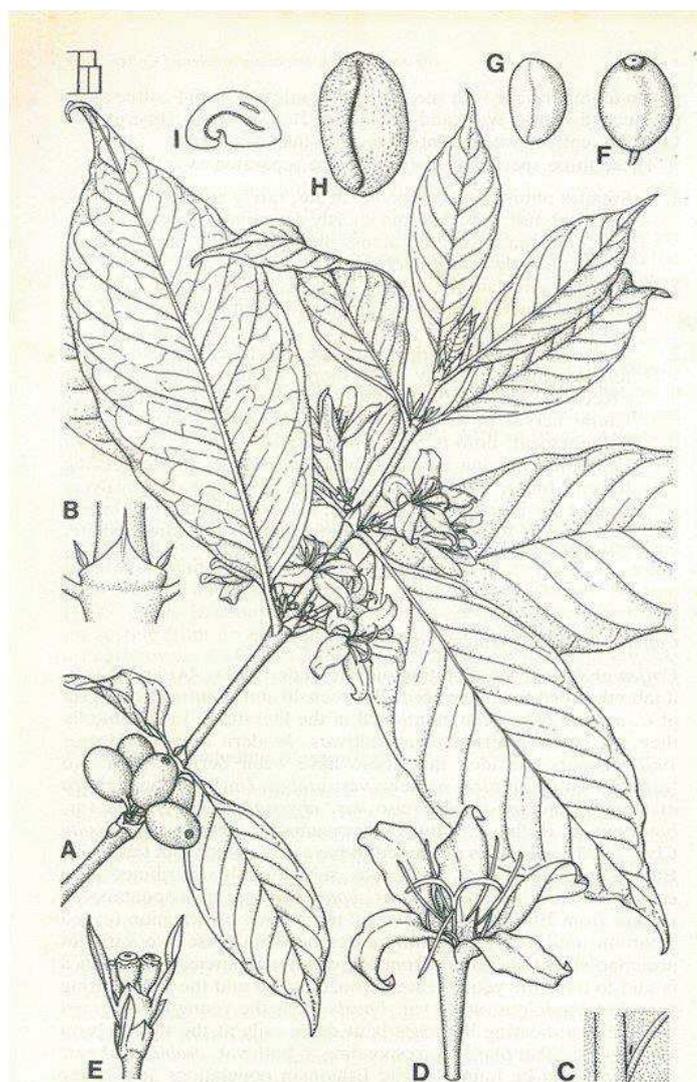


Figure 7 : Représentation morphologique de *Coffea canephora*.

Rameau florifère (A), Nœud (B, C) : Nœud ; Inflorescence (D, E) ; Fruit : (I, H, G, F)

Source : Wrigley, 1988

### I.3. Amélioration des caféiers

Dans un contexte de surproduction et de prix mondiaux durablement bas, la qualité du café produit est devenue un critère primordial et incontournable de la sélection, qui doit pourtant continuer d'assurer un progrès génétique en matière de résistance, d'adaptation et de productivité, afin de contribuer à diminuer les coûts de production (Doré et Varoquaux, 2006). Les objectifs de sélection diffèrent entre *C. arabica* et *C. canephora*. En effet, si d'un côté, l'Arabica est apprécié pour son goût, la faible base génétique (quelques individus à l'origine de la plantation mondiale) sur laquelle repose la diversité des variétés cultivées peut expliquer la forte sensibilité de l'espèce aux maladies. Aussi, les travaux d'amélioration sur *C. arabica* ont été principalement focalisés sur la résistance aux pathogènes et la production associée à la qualité. De l'autre côté, *C. canephora* est plus résistant aux pathogènes et aux ravageurs mais

son café présente un goût plus astringent<sup>2</sup>. Les objectifs de l'amélioration variétale de cette espèce ont essentiellement porté sur la qualité de son café. Au cours des dernières décennies, les programmes d'amélioration sur les deux espèces n'ont pas ciblé les mêmes axes. Et face à l'augmentation de la température et aux variations pluviométriques engendrées par le changement climatique, les caféiculteurs ont orienté la sélection variétale vers la recherche d'individus plus adaptés aux nouvelles conditions climatiques.

### **I.3.1. Amélioration de *Coffea arabica***

La méthode de sélection de *C. arabica* a été une sélection généalogique. Autrement dit, la sélection a eu pour objectif d'obtenir de nouvelles lignées pures à partir de parents afin de fixer les caractères qui ont été jugés intéressants et complémentaires, en réalisant des croisements sur plusieurs générations. *C. arabica* a été sélectionné de manière à donner du café de qualité et de bons rendements (forte productivité et résistance aux ravageurs et aux maladies) lorsque sa culture a été réalisée en plein soleil, en culture intensive. Dans un premier temps, il s'est agi d'obtenir, à partir des *C. arabica*, plante sciaphile de la forêt éthiopienne, des variétés à port nain productives adaptées aux conditions en plein champ. Puis, de 1930 à 1980, il a été visé d'améliorer la qualité des grains et d'augmenter le rendement. Cependant, cette espèce est apparue très sensible aux maladies et aux ravageurs, certainement à cause de la faible base génétique qui a servi à développer les variétés cultivées (seulement quelques grains à l'origine des plantations mondiales). Une deuxième vague de sélection a alors eu pour but, dans les années 1970, de produire des variétés résistantes aux maladies et aux ravageurs. La majorité des variétés résistantes actuellement commercialisées (IAPAR59®, Castillo® et Marsellesa®) dérive de l'hybride de Timor (Sarchimor et Catimor), variété issue d'un croisement spontané entre *C. arabica* et *C. canephora*, et hautement résistante à la rouille (Bertrand *et al.*, 2006).

### **I.3.2. Amélioration de *Coffea canephora***

Le programme d'amélioration variétale de *Coffea canephora* se base sur une sélection massale. Elle consiste à augmenter la valeur moyenne de la population en choisissant les individus les plus intéressants phénotypiquement et en prenant leurs graines comme semence pour la culture suivante. La sélection est effectuée de génération en génération. Les premiers travaux ont commencé en Indonésie au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, ensuite en République Démocratique de Congo et en Ouganda dans les années 1960, puis à Madagascar, en

---

<sup>2</sup> Astringent : substance qui resserre les tissus vivants et a un goût ou une odeur âpre.

République Centrafricaine et en Côte d'Ivoire entre les années 1960 à 1970. Les efforts de ces pays se sont portés sur la création variétale. L'originalité des recherches en Côte d'Ivoire réside sur la production des clones à partir d'hybrides. Les variétés sélectionnées à travers ces programmes ont été l'unique source pour la sélection adaptative de la majorité des pays producteurs de café (Montagnon *et al.*, 1998).

### **I.3.3. Amélioration variétale liée aux changements climatiques**

Les changements climatiques tels qu'ils sont prévus représentent une menace sérieuse, en particulier pour les pays mésoaméricains en raison des multiples impacts qu'ils auront sur les populations, soit directement soit au travers de l'altération de divers secteurs de l'économie dont l'agriculture (Baca *et al.*, 2014). L'augmentation des températures et l'apparition de périodes de sécheresse de plus en plus extrêmes devraient sérieusement affecter la production de café (DaMatta et Ramalho, 2006). Des études de modélisation récentes, basées pour la majorité sur les données du groupe intergouvernemental sur l'évolution du climat, montrent que les sécheresses et les températures élevées favorisent la prolifération des ravageurs et des agents pathogènes (Jaramillo *et al.*, 2011 ; Avelino *et al.*, 2015 ; Magrach et Ghazoul, 2015). Les projections climatiques pour le prochain siècle en Amérique latine indiquent un effet très négatif sur les rendements des cultures en général et plus particulièrement pour *C. arabica* (GIEC, 2007 ; Camargo, 2010). En effet, il a été montré plusieurs fois que *C. arabica* réagit fortement aux variations de température saisonnières et apprécie des températures relativement stables, contenues dans une fourchette assez étroite (Gay *et al.*, 2006 ; Hagggar, 2007). De même, la sécheresse se révèle être un facteur fortement limitant pour les caféiers. Affectant la floraison et le développement des graines ainsi que leur composition chimique, le manque d'eau a pour conséquences des baisses de rendement et de la qualité finale de la boisson (DaMatta et Ramalho, 2006). Les événements climatiques actuels, caractérisés par une augmentation de 1°C de la température moyenne, affectent déjà la production de café et vont modifier les zones propices à la caféiculture (Davis *et al.*, 2012 ; Bunn *et al.*, 2015 ; Craparo *et al.*, 2015). Filho (2010) estime que les conditions optimales de culture de *C. arabica* en Mésoamérique<sup>3</sup>, actuellement situées entre 800 et 1400 m d'altitude, passeraient de 1 200 à 1 600 m d'ici 2050. De la même façon, des études en Éthiopie et au Kenya prévoient des impacts significatifs du changement climatique sur la distribution des caféiers sauvages et sur la prolifération des parasites du caféier (Jaramillo *et al.*, 2011 ; Davis *et al.*, 2012). Cependant,

---

<sup>3</sup> Mésoamérique : ensemble de zones géographiques occupées par des ethnies qui partageaient de nombreux traits culturels communs avant la colonisation espagnole du continent américain.

des études plus récentes montrent que l'augmentation de CO<sub>2</sub> qui accompagne les changements climatiques devrait limiter l'impact négatif des températures sur la caféiculture. Ainsi, la modélisation de Verhage et ses collaborateurs (2017) montre que dans des conditions de culture irriguée, l'augmentation de CO<sub>2</sub> liée aux changements climatiques favoriserait la thermotolérance des caféiers. Sous des conditions de températures élevées, la présence d'une forte concentration en CO<sub>2</sub> permettrait le maintien de l'activité photosynthétique et une atténuation des dommages causés par la température grâce à la production de molécules protectrices telles que les protéines de choc thermique (HSP70, chaperonines), l'ascorbate peroxydase (APX) ou le raffinose (DaMatta *et al.*, 2016 ; Martins *et al.*, 2016). Cette capacité d'acclimatation à la température n'est cependant notée que chez les feuilles matures et non chez les feuilles en cours de développement (DaMatta *et al.*, 2018).

En conséquence, face au changement climatique, la modification des pratiques culturales doit être envisagée pour *C. arabica*. Trois solutions ont été proposées : la première consiste à cultiver les caféiers en système agroforestier dans les zones de production de basse altitude (600-800 m). Cette technique permettrait de limiter l'augmentation de la température et de remettre les caféiers dans leurs conditions ancestrales de croissance. La deuxième proposition repose sur la culture des caféiers à plus forte altitude. La troisième et dernière solution prévoit d'apporter à *C. arabica* une plus grande résistance aux stress biotiques et abiotiques en le greffant sur *C. canephora*, par exemple, pour les caféicultures à basse altitude.

## II. Changement climatique et capacité adaptative des plantes

Des changements notables du climat sont constatés depuis quelques décennies sur notre planète. Ce phénomène, communément appelé réchauffement climatique, est causé par l'augmentation de la teneur de l'atmosphère en gaz à effet de serre (GES) essentiellement issus de l'activité humaine (GIEC, 2007). Ainsi, depuis 1950, il a été constaté un réchauffement progressif de l'atmosphère et des océans (0,8°C en moyenne), une diminution de plus en plus accélérée de la couverture de neige et de glace entraînant une élévation du niveau des mers (0,15 m actuellement). En se basant sur les études du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, les températures atmosphérique et océanique augmenteraient de 2 à 4,8°C aux cours du siècle (d'ici 2100). Si aucune mesure de réduction des émissions de GES n'était mise en place, les conséquences du réchauffement climatique seraient irréversibles et désastreuses pour les populations et les écosystèmes (IPCC, 2014). Ces modifications demanderont aux systèmes naturels, y compris la population humaine, de faire preuve d'une forte capacité d'adaptation.

Chez les plantes, les changements climatiques ont déjà et auront une forte influence sur leur développement saisonnier, ayant des conséquences sur la biodiversité terrestre et sur la croissance et la physiologie de chaque individu y compris sa capacité reproductrice. En effet, l'élévation de la température ou la variation des rythmes des précipitations déclenche un état de « stress » chez ces organismes qui n'ont d'autre alternative que de s'adapter s'ils veulent survivre, car ils sont incapables de se déplacer pour fuir les conditions défavorables. Cependant, la sensibilité des plantes aux stress environnementaux est complexe à déterminer car la réponse varie en fonction de l'espèce végétale et, pour une même espèce, selon le type de stress, sa durée et son intensité.

### II.1. Mécanismes généraux de réponses des plantes aux stress liés aux changements climatiques

Les plantes sont continuellement exposées aux modifications de l'environnement qui les entoure et qui ne leur sont pas forcément favorables. Elles sont donc constamment soumises à des stress. Afin d'assurer leur pérennité, les plantes ont développé des mécanismes afin de faire face à ces différents stress dits abiotiques et qui rassemblent toutes les modifications chimiques ou physiques engendrées par des facteurs climatiques (sécheresse, froid extrême ou chaleur, forte luminosité, ...), modifiés isolément ou ensemble (Madhava Rao *et al.*, 2006 ; Blum, 2016). En réponse à ces stress, les plantes ajustent l'expression de leurs gènes de manière à modifier leurs mécanismes métaboliques et physiologiques et leur croissance (Figure 8).

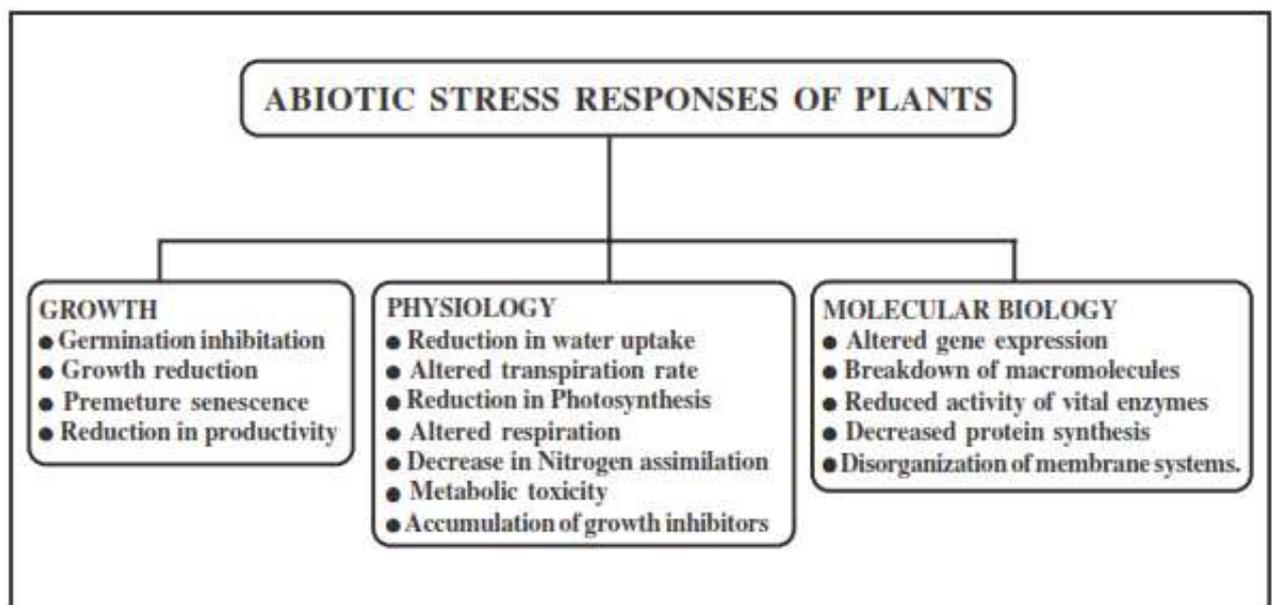


Figure 8 : Réponses communes des plantes aux stress abiotiques  
Source : Madhava Rao *et al.*, 2006

Cette adaptation des plantes peut être transitoire ou héritable. Dans le premier cas, les plantes modifient leur phénologie, leur structure et/ou leur métabolisme pour atténuer les effets du stress ; les changements peuvent avoir lieu en l'espace de quelques secondes ou progressivement pendant toute une saison de croissance. Ce processus est communément appelé l'acclimatation et constitue un passage obligé afin que la plante soit qualifiée de tolérante. Dans le deuxième cas, la modification est d'origine génétique, héritable et pouvant éventuellement mener à l'évolution de la descendance et à la spéciation. Il est à noter que toutes les modifications provoquées par un stress abiotique ne constituent pas forcément une adaptation. Ils peuvent être engendrés par une perturbation ou un déséquilibre des processus métaboliques. Enfin, il semble que l'exposition aux stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, soit mémorisée par les plantes grâce à des mécanismes épigénétiques (Müller-Xing *et al.*, 2014).

Les mécanismes de la réponse au stress sont décomposés en plusieurs étapes dont la perception du stress qui est suivie de la production de messagers secondaires conduisant ensuite à l'expression ou à la régulation des gènes impliqués dans la protection cellulaire. Les voies de transduction du signal<sup>4</sup> jouent un rôle crucial dans l'induction de la réponse et de la tolérance au stress (Madhava Rao *et al.*, 2006) (Figure 9).

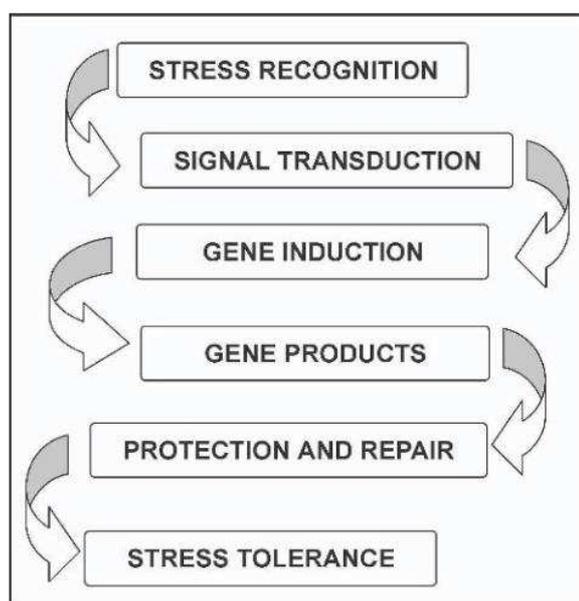


Figure 9 : Schématisation des différentes étapes conduisant à la tolérance à un stress  
Source : Madhava Rao *et al.*, 2006

<sup>4</sup> La transduction de signal désigne le mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit, par des agents chimiques ou autres signaux.

La régulation de l'expression est classiquement opérée au niveau de la séquence du génome, mais des modifications épigénétiques basées essentiellement sur la méthylation de l'ADN, la modification des histones ou des interactions avec des petits ARN non codants, peuvent contribuer séparément ou ensemble à la modification du phénotype en réponse au stress. Des études récentes réalisées sur les plantes modèles ont permis d'obtenir plus d'information sur le rôle des modifications épigénétiques dans l'adaptation des plantes (Grativol *et al.*, 2012). Il apparaît que ces modifications épigénétiques participent à la plasticité phénotypique et sont héréditaires à travers les générations favorisant la mémorisation de la réponse au stress et donc son adaptation (Kinoshita et Seki, 2014 ; Crisp *et al.*, 2016).

Pour décrire ces mécanismes de réponse aux stress abiotiques, nous prendrons l'exemple de la réponse des plantes à des modifications de température et de lumière.

## II.2.Exemples de réponse des plantes au stress

### II.2.1. Quelques définitions

#### II.2.1.1.« Reactive oxygen species » ou espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont un groupe de radicaux libres, de molécules réactives et d'ions dérivés de l'O<sub>2</sub> (Sharma *et al.*, 2012). Dans les cellules végétales, ils sont formés lors de la fuite inévitable d'électrons sur l'O<sub>2</sub> au cours des activités de transport d'électrons. Ils peuvent aussi être des sous-produits de diverses voies métaboliques localisées dans différents compartiments cellulaires (chloroplastes, mitochondries, membranes plasmiques, peroxysomes, réticulum endoplasmique, apoplastes, ou parois cellulaires). Les types de ROS les plus courants sont l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle (<sup>•</sup>OH) (Sharma *et al.*, 2012).

En fonction de leur concentration dans les plantes, les radicaux libres peuvent jouer un rôle délétère ou bénéfique. À forte concentration, les ROS endommagent les biomolécules (lipides, protéines, ADN, ...) tandis qu'à concentration faible ou modérée, ils interviennent en tant que messagers secondaires dans les cascades de signalisation intracellulaire induites lors de la réponse des plantes aux stress. Ainsi, ils sont retrouvés dans les phénomènes de fermeture stomatique (induction par l'acide abscissique (ABA)), d'apoptose, de gravitropisme et lors de l'acquisition de la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Joo *et al.*, 2001 ; Neill *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2002 ; Mittler, 2002 ; Kwak *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2007).

Dans des conditions physiologiques stables, ces radicaux sont récupérés par différentes molécules antioxydantes de défense, souvent confinées dans des compartiments cellulaires particuliers (Alscher *et al.*, 1997). L'équilibre entre la production et la détoxification des ROS

peut être perturbé par un certain nombre de facteurs environnementaux défavorables. À la suite de ces perturbations, les niveaux intracellulaires de ROS peuvent augmenter rapidement (Apel et Hirt, 2004). Lorsque le niveau de ROS excède le seuil permettant la mise en place des mécanismes de défense, la cellule se trouve alors en état de « stress oxydatif » (Sharma *et al.*, 2012 ; Hussain *et al.*, 2018).

Afin d'éliminer les ROS et de lutter contre le stress oxydatif, les plantes possèdent un système de défense antioxydant complexe comprenant des composants non enzymatiques et enzymatiques. Les composants non enzymatiques comprennent les principaux tampons redox cellulaires ascorbate (AsA) et glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine, GSH) ainsi que le tocophérol, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Pinto *et al.*, 2004). Les principales enzymes intervenant dans la détoxification des ROS sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), les enzymes de l'ascorbate-glutathion (AsA-GSH), l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéshydroascorbate réductase (MDHAR), la déshydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR) (Noctor et Foyer, 1998).

#### II.2.1.2. « Heat shock proteins » ou protéines de choc thermique (HSP)

Les HSP sont des protéines dont la principale fonction consiste à agir en tant que tampon pour limiter le repliement des protéines et résoudre leurs agrégations, phénomènes observés lors de la dénaturation des protéines sous l'effet de la chaleur.

En réalité, tout stress biotique ou abiotique conduisant à l'agrégation des protéines fait appel aux HSP. Ainsi, ces protéines interviennent dans la réponse aux stress tels que le froid, l'osmose, la sécheresse, la salinité, les UV, la lumière, le stress oxydatif et l'infection par des agents pathogènes (Swindell *et al.*, 2007).

Les HSP sont regroupées en six classes en fonction de la similarité de leur séquence nucléotidique, de leur réactivité immunologique croisée et de leur localisation intracellulaire et en cinq classes, selon leur poids moléculaire approximatif : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et les petites protéines de choc thermique (sHSP) (Sun *et al.*, 2002) (Tableau 1). Les HSP sont généralement indétectables dans les tissus végétatifs en condition de croissance normale et sont induites par des stress environnementaux et ou par des stimuli. Leur synthèse est sous la dépendance de l'expression des facteurs de stress thermique (Hsf) responsables de la transduction du signal et de la régulation de l'expression (Baniwal *et al.*, 2004 ; Al-Wahaibi, 2011).

Tableau 1 : Taille, fonction et localisation cellulaire des différentes classes des protéines de choc thermique  
 Source : (Wang *et al.*, 2004 ; Tariq *et al.*, 2010 ; Al-Whaibi, 2011)

Classe	Taille (kDa)	Fonction	Localisation cellulaire
HSP100	97-120	Protection contre la dénaturation et l'agrégation des protéines	Cytosol, mitochondrie, chloroplaste
HSP90	82-90	Transduction du signal	Cytosol, chloroplaste, mitochondrie, réticulum endoplasmique
HSP70	66-78	Empêche l'agrégation, facilite le repliement, l'importation et la translocation des protéines, la transduction du signal et l'activation transcriptionnelle	Cytosol, chloroplaste, mitochondrie, réticulum endoplasmique
HSP60	58-65	Facilite le repliement	Cytosol, chloroplaste, mitochondrie,
sHSP	12-42	Prévention de l'agrégation, stabilisation des protéines non natives	Cytosol, chloroplaste, réticulum endoplasmiques, mitochondrie, membrane

### II.2.2. Réponses au stress thermique

Le stress thermique est un stress causé par une température excédant les conditions optimales de croissance. Pour les cultures céréalières, les températures élevées entraînent des effets néfastes qui varient en fonction de la saison, de la durée et de la sévérité du stress thermique (Fahad *et al.*, 2016).

Pour les plantes poussant sous les tropiques, les radiations excessives et les températures élevées sont, avec les privations en eau, les facteurs limitants majeurs pour la croissance et la production. La modification de ces facteurs climatiques entraîne des réponses de la plante au niveau morphologique et physiologique par transduction d'un signal qui peut être général ou spécifique au stress.

### II.2.2.1. La chaleur

#### II.2.2.1.1. Réponses morphologiques

La chaleur peut provoquer des modifications phénotypiques telles que les brûlures, la décoloration des feuilles et des fruits, la sénescence des feuilles, jusqu'à l'inhibition généralisée de la croissance de la plante pouvant également toucher la racine (Prasad *et al.*, 2008 ; Hasanuzzaman *et al.*, 2013b ; Fahad *et al.*, 2017). Ainsi, une réduction de la photosynthèse (baisse de l'assimilation nette) et une diminution significative du taux de croissance ont été observées chez le maïs (*Zea mays*) et la canne à sucre (*Saccharum officinarum* L.) sous stress thermique (Alscher et Hafeez, 2004 ; Wahid et Close, 2007). D'autre part, des températures fortement élevées peuvent affecter le rendement et la reproduction de certaines plantes cultivées, comme le riz, en induisant une réduction du nombre de pointes et du nombre de fleurons par plante ou comme chez le sorgho, en réduisant le nombre de grains (Prasad *et al.*, 2006 ; Fahad *et al.*, 2016). De plus, la pollinisation peut être affectée par la forte sensibilité des anthères et pollens aux températures élevées à l'intérieur de la fleur. Chez les plantes pérennes, l'exposition au stress thermique limite la production de fruits causée par des perturbations du processus de pollinisation. Par exemple, chez les pommiers, les chaleurs intenses diminuent la fermeté des fruits, alors que chez les citronniers, elles causent directement une abscission des fruits (Hatfield et Prueger, 2015).

#### II.2.2.1.2. Réponses physiologiques

Le premier constituant cellulaire touché par le stress thermique est la membrane plasmique. Les températures élevées affectent sévèrement la fonction et la structure membranaire en provoquant la dénaturation des protéines impliquées dans la thermostabilité de la membrane et en conséquence des fuites d'électrolytes organiques ou inorganiques. Ces effets ont été observés chez le soja et le pois chiche. Le système photosynthétique est également touché par le stress thermique. Chez *Agrostis stolonifera*, il a été montré que le photosystème II, responsable du transport des électrons de la réaction lumineuse et la RuBisCO activase intervenant dans le cycle de fixation de carbone, sont très sensibles à la chaleur (Crafts-Brandner et Salvucci, 2000 ; Heckathorn *et al.*, 2002 ; Kaushal *et al.*, 2013). Tout comme chez *Phaseolus vulgaris* et le pois chiche, les fortes températures induisent la formation de formes réactives de l'oxygène (ROS) responsables de la dégradation des pigments photosynthétiques et donc de l'activité photosynthétique (Petkova *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2013).

Le stress thermique est également souvent associé à une perte rapide d'eau à la surface de la plante, entraînant une déshydratation (Koini *et al.*, 2009). Cela est dû à l'épuisement plus

rapide de l'eau du sol (par évaporation) par augmentation de la température du sol et à la forte transpiration de la plante (évapotranspiration). Le stress produit par des températures élevées influe indirectement sur les ajustements osmotiques par une photosynthèse altérée (en particulier les dommages au PSII), une respiration accrue, des potentiels osmotiques réduits et une diminution des concentrations de sucres totaux chez *Populus tremula* (Hüve *et al.*, 2006 ; Prasad *et al.*, 2008).

### II.2.2.1.3. Transduction du signal

Grâce à des mutants d'*Arabidopsis thaliana*, les études sur la tolérance à la chaleur ont mis au clair les voies de signalisation telles que la signalisation hormonale et les mécanismes régulateurs (Larkindale *et al.*, 2005 ; Sita *et al.*, 2017) (Figure 10). Les plantes peuvent ressentir même de légères augmentations de température par la présence de mécanismes de détection au sein de leurs membranes (Wise *et al.*, 2004). Sous contrainte, à haute température, les membranes présentent une augmentation de la fluidité qui est détectée par des capteurs membranaires entraînant des changements conformationnels et des événements de phosphorylation / déphosphorylation (Kaushal *et al.*, 2016 ; Sehgal *et al.*, 2016). Quatre capteurs perçoivent un stimulus thermique (Mittler *et al.*, 2012) comprenant les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  liés à la membrane plasmique chez *Physcomitrella patens* (Saidi *et al.*, 2009), deux capteurs protéiques dépliés chez *Arabidopsis thaliana*, un dans le réticulum endoplasmique (RE) (Deng *et al.*, 2011 ; Srivastava *et al.*, 2014) et un autre dans le cytosol (Sugio *et al.*, 2009) et un capteur d'histone dans le noyau (Kumar et Wigge, 2010).

La plupart des études ont révélé que des augmentations modérées de température sont détectées initialement par la membrane plasmique conduisant à l'activation des canaux à calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce qui provoque l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules activant la réponse au choc thermique (HSP) (Bokszczanin *et al.*, 2013). Ainsi, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  est un important indicateur du stress thermique et conduit à l'activation de plusieurs protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK) et des protéines de la famille des MAP kinases (MAPK) (Sangwan *et al.*, 2002).

Par ailleurs, une protéine, la calmoduline *AtCaM3*, assure la signalisation du stress thermique chez *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009). Elle induit divers facteurs transcriptionnels tels que *WRKY39* (Li *et al.*, 2010) et les facteurs de transcription du choc thermique (HSF) (Liu *et al.*, 2011).

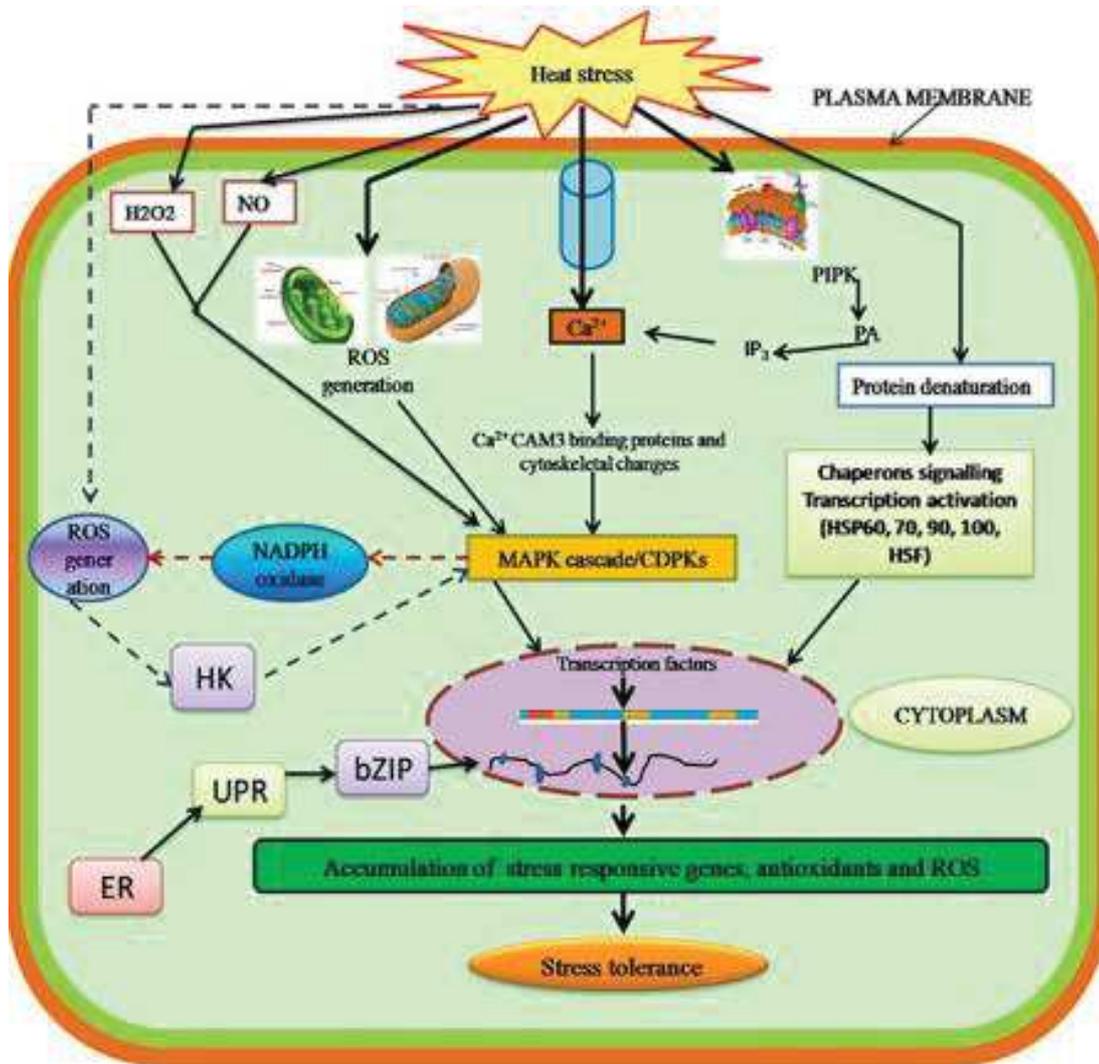


Figure 10 : Diagramme représentant la transduction du signal lors d'un stress à haute température chez *Arabidopsis thaliana*

$H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène, NO : monoxyde d'azote, bZIP : facteur de transcription, MAPK : protéine kinase activée par des agents mitogènes, HSP : protéine de choc thermique, HSF : facteur de transcription au choc thermique, CDPK : protéines kinases dépendantes du calcium, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, ROS : espèce réactive de l'oxygène, HK : histidine kinase, UPR : réponse au dépliement des protéines, ER : réticulum endoplasmique, CAM3 : calmoduline,  $IP_3$  : inositol triphosphate, PIPK : phosphatidylinositol phosphate kinases, PA : Acide phosphatique

Source : Sita et al., 2017

Diverses phytohormones (acide abscissique (ABA), brassinostéroïdes, etc.) ainsi que de nombreuses molécules de signalisation (oxyde nitrique, etc.) joueraient également un rôle important dans la thermotolérance des plantes (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a ; Asthir, 2015). Les effets interactifs de l'ABA et des osmolytes ont été étudiés chez le pois chiche. Et il a été démontré que l'augmentation de la teneur en ABA en cas de forte chaleur, favorise l'accumulation d'osmolytes impliqués dans la réponse aux stress oxydatifs (Kumar *et al.*, 2012). Des plants de *Phragmites communis* traités à l'ABA ont présenté moins de

dommages oxydatifs que leurs homologues non traités grâce aux accrus en enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (*SOD*), la catalase (*CAT*), l'ascorbate peroxydase (*APX*) et la peroxydase (*POX*) (Ding *et al.*, 2010).

Dans un environnement contrôlé, des températures élevées de 35/25°C et 45/35°C (jour / nuit et 12 h / 12 h) appliquées à des plants de pois chiches ont entraîné une augmentation des teneurs en composés antioxydants tels que le glutathion et la proline (Kumar *et al.*, 2011). Chez ces plantes l'application exogène de 2,5 mM d'ABA avec une variation de température de 35/30°C, 40/35°C et 45/40°C (jour / nuit) favorise la croissance et réduit les dommages oxydatifs (Kumar *et al.*, 2012).

#### II.2.2.1.4. Réponses métaboliques

La proline et la glycine bêtaïne comptent parmi les principaux métabolites primaires subissant une augmentation de teneur en réponse au stress thermique. De nombreuses espèces végétales accumulent également des osmolytes tels que des sucres alcools (polyols) (Bita et Gerats, 2013). Cette accumulation sous contrainte thermique permettrait d'augmenter la stabilité des protéines et celle de la structure de la membrane plasmique (Sung *et al.*, 2003 ; Mirzaei *et al.*, 2012). Pour la plupart des plantes, l'augmentation de la température modifie l'activité des enzymes impliqués dans le métabolisme du carbone conduisant, pour certaines, à l'accumulation d'amidon et à la synthèse du saccharose ou à une diminution des teneurs en sucres solubles pour d'autres (Ruan *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Duan *et al.*, 2013). Il faut également noter que ces variations de teneurs diffèrent selon les organes de la plante (Marias *et al.*, 2017).

En conséquence, le rôle des sucres dans la réponse au stress thermique est mal compris en raison de résultats contradictoires. Ainsi, lorsque leur teneur augmente en réponse au stress thermique, les sucres semblent alors être associés à la tolérance au stress thermique et peuvent intervenir dans la réparation et la prévention des dommages. C'est le cas des feuilles et des racines d'*Agrotis* spp., des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, de *Nicotiana benthamia* et de certaines arbres forestiers (Liu et Huang, 2000 ; Sugio *et al.*, 2009 ; Niinemets, 2010).

En revanche, la diminution de la teneur en ces métabolites semble être une simple conséquence de la réduction de l'assimilation de carbone par inhibition de la photosynthèse, de la conductance stomatique et/ou d'une utilisation accrue par la respiration, comme cela a été montré dans les feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Zhang *et al.*, 2012 ; Duan *et al.*, 2013). Chez le blé, le maïs et la tomate, la chaleur a pour effet de réduire la synthèse mais aussi le transport

des glucides qui sont alors préférentiellement accumulés dans les organes végétatifs au détriment des organes reproducteurs (Plaut *et al.*, 2004 ; Suwa *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2017).

Les métabolites secondaires tels que les composés phénoliques (notamment les flavonoïdes et les anthocyanes) et les stéroïdes interviennent de manière significative dans les réponses des plantes soumises au stress thermique et jouent un rôle dans la tolérance à la chaleur (Wahid, 2007). Ainsi, chez les plants de tomates, un stress thermique par la chaleur entraîne une accumulation de composés phénoliques solubles liée à une augmentation de l'activité phénylalanine ammonia-lyase et une diminution de l'activité des peroxydases et des polyphénols oxydases, favorisant vraisemblablement l'acclimatation à la chaleur (Rivero *et al.*, 2001). Récemment, la comparaison du profil métabolique de génotypes de soja a révélé que des composés antioxydants tels que les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les tocophérols et l'ascorbate étaient plus fortement représentés dans les génotypes tolérants à la chaleur (Chebrolu *et al.*, 2016).

#### II.2.2.2. Le froid et le gel

Selon son intensité, le stress causé par de faibles températures peut être divisé en deux catégories :

- Un stress au froid dû à une exposition des plantes à des températures allant de 0 à 10°C
- Un stress au gel dû à une exposition à une température inférieure à 0°C

Comme nos travaux sont réalisés dans les pays tropicaux, les réponses au froid et au gel ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Le stress à basse température, froid ou au gel, inhibe diverses réactions métaboliques, empêchant ainsi l'expression du potentiel génétique complet des plantes. La réponse des plantes s'exprime par différents symptômes phénotypiques (Chinnusamy *et al.*, 2007).

#### II.2.3. Réponses au stress lumineux

Les plantes utilisent la lumière comme source d'énergie et comme signal environnemental important pour réguler leur croissance et leur développement. Ce phénomène appelé « photomorphogénèse » est souvent accompagné d'une forte intensité lumineuse induisant des réponses au stress chez les plantes (Müller-Xing *et al.*, 2014).

Le rayonnement solaire est composé de trois types de rayons ultra-violet (UV) : UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) et UV-C (<280 nm). La couche d'ozone stratosphérique de l'atmosphère absorbe les UV-C solaires (McKenzie *et al.*, 2011). Le type de réponse au stress

induit par la lumière est déterminé par le taux de fluence<sup>5</sup>, le temps d'exposition et si les plantes ont été acclimatées par une exposition antérieure à la lumière. Aussi, les effets des UV-B sur les plantes se ressentent au niveau morphologique et physiologique.

### II.2.3.1. Réponses morphologiques

Les changements morphologiques induits par les UV comprennent un épaississement des feuilles, un raccourcissement des pétioles et des tiges, une ramification axillaire accrue et des rapports racine/tige altérés (Robson *et al.*, 2015). Chez l'orge, une exposition de 7 jours au traitement UV/PAR (photosynthetically active radiation ou rayonnement photosynthétique actif) a eu un impact sur la croissance foliaire (Klem *et al.*, 2012). Une diminution de la hauteur de la plante et de la biomasse a été notée chez *Pisum sativum* lors d'une exposition UV (Alexieva *et al.*, 2001). Castronuovo et ses collègues (2014) ont observé une réduction de la croissance de plantules de tomates exposées à des UV-C. Chez l'arbrisseau *Hippophae rhamnoides*, l'exposition aux UV-B entraîne une régression de la surface foliaire et de la biomasse et du rapport entre la partie racinaire et la partie aérienne (Yang *et al.*, 2008). Des études en chambre de culture sur plantes ligneuses comme l'eucalyptus et l'acacia ont abouti aux mêmes résultats (Liu *et al.*, 2005).

### II.2.3.2. Réponses physiologiques

Comme la majorité des stress, les radiations UV entraînent une perturbation du métabolisme de la plante et provoquent des lésions oxydatives par la production de ROS (Alexieva *et al.*, 2001). En effet, les perturbations métaboliques et les altérations du transport d'électrons photosynthétiques ou de l'activité des NADPH-oxydases et des peroxydases membranaires favorisent la génération de ROS sous UV-B (Jenkins, 2009 ; Hideg *et al.*, 2013). L'interférence du rayonnement UV-B avec la photosynthèse de la plante est plus complexe. De nombreuses études menées en serre et en environnement contrôlé ont montré que le rayonnement UV-B peut altérer la photosynthèse en affectant les photosystèmes, les réactions de phosphorylation, la structure des chloroplastes et l'activité enzymatique (Allen *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 2007). Des études sur *Eucalyptus sp* et *Acacia sp* ont montré une baisse de la concentration totale en chlorophylle chez les individus placés dans un environnement riche en UV indiquant la dégradation de pigments photosynthétiques en présence de fortes doses d'UV (Liu *et al.*, 2005).

---

<sup>5</sup> Fluence ou taux de fluence : taux de rayonnement intégré dans le temps

Il est à noter que l'application d'une faible dose de rayonnement UV-B peut déclencher chez certaines espèces, une adaptation précoce qui permettrait de protéger les plantes des futurs stress (Müller-Xing *et al.*, 2014). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, l'application d'une faible dose d'UV-B a entraîné des modifications de la morphologie et de l'expression génétique sans provoquer des symptômes de stress, tout en favorisant son acclimatation (Hectors *et al.*, 2007). Par contre, une radiation élevée en UV-B, même dans un court laps de temps, a provoqué directement la destruction des protéines, des lipides membranaires et des pigments chloroplastiques, a inhibé la photosynthèse et la croissance et a endommagé l'ADN entraînant la sénescence et la mort cellulaire (Müller-Xing *et al.*, 2014).

### II.2.3.3. Transduction du signal

Plusieurs voies de transduction du signal<sup>6</sup> de rayonnement UV ont été actualisées et sont résumées sur la figure 11. Comme dans le cas des stress abiotiques ou biotiques, les UV induisent une voie de signalisation passant par la cascade des protéines kinases impliquant plus particulièrement MKP1, MPK3 et MPK6 dont les rôles respectifs ont été identifiés chez plusieurs mutants d'*Arabidopsis thaliana* (González Besteiro *et al.*, 2011). Ils ont augmenté la concentration en ROS qui ont, à leur tour, induit la production de phytohormones.

La voie de signalisation passant par un photorécepteur protéique, UV Resistance Locus 8 (*UVR8*), est propre à la réponse aux UV et joue un rôle primordial dans le processus de réponse photomorphogénique. La molécule de signalisation *UVR8* déclenche la mise en place de la défense par l'accumulation de composés phénoliques (Jenkins, 2009 ; Hideg *et al.*, 2013). L'*UVR8* est ainsi impliqué dans la régulation de la plupart des gènes de biosynthèse des flavonoïdes tels que la chalcone synthase (CHS), la chalcone isomérase (CHI) et la flavonol synthase (*FLS1*) (Brown et Jenkins, , 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré qu'*UVR8* interagit avec la protéine constitutive photomorphogénique 1 (COP1) pour activer *HY5*, un facteur de transcription régulateur clé de la photomorphogénèse impliqué dans l'élongation de l'hypocotyle et la synthèse des flavonoïdes (Brown *et al.*, 2005 ; Kaiserli et Jenkins, 2007). L'*UVR8* est par contre négativement régulé par un répresseur de photomorphogénèse *RUP* (Gruber *et al.*, 2010). Ensemble, ces éléments interviennent dans la régulation de la morphologie des plantes sous rayonnement UV-B et sont impliqués dans l'épaississement des feuilles, le raccourcissement

---

<sup>6</sup> Transduction du signal : mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit par des agents chimiques ou autres signaux.

des pétioles, l'enroulement et les altérations de la forme et de la largeur des feuilles entre autres (Jansen, 2002 ; Yang *et al.*, 2008 ; Klem *et al.*, 2012).

#### II.2.3.4. Réponses métaboliques

La réponse à de faibles doses d'UV-B se traduit par l'accumulation de composés antioxydants tels que le glutathion, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes ou les pyroxydines (Hideg *et al.*, 2013). Ainsi, les anthocyanes, flavonoïdes et autres composés phénoliques ont été synthétisés dans les feuilles de *Pisum sativum* et de *Triticum aestivum* en présence d'UV-B (Alexieva *et al.*, 2001). Ces composés agissent comme des écrans protecteurs pour les organites sensibles aux UV tels que les chloroplastes et sont souvent accumulés dans les vacuoles des cellules épidermiques et sous-épidermiques sous forme glycosylée (Emiliani *et al.*, 2013 ; Hectors *et al.*, 2014). Il est à noter que les feuilles de certains *Acacia sp* et *Eucalyptus sp* s'enrichissent en caroténoïdes (violaxanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine) lors d'un stress aux UV (Liu *et al.*, 2005).

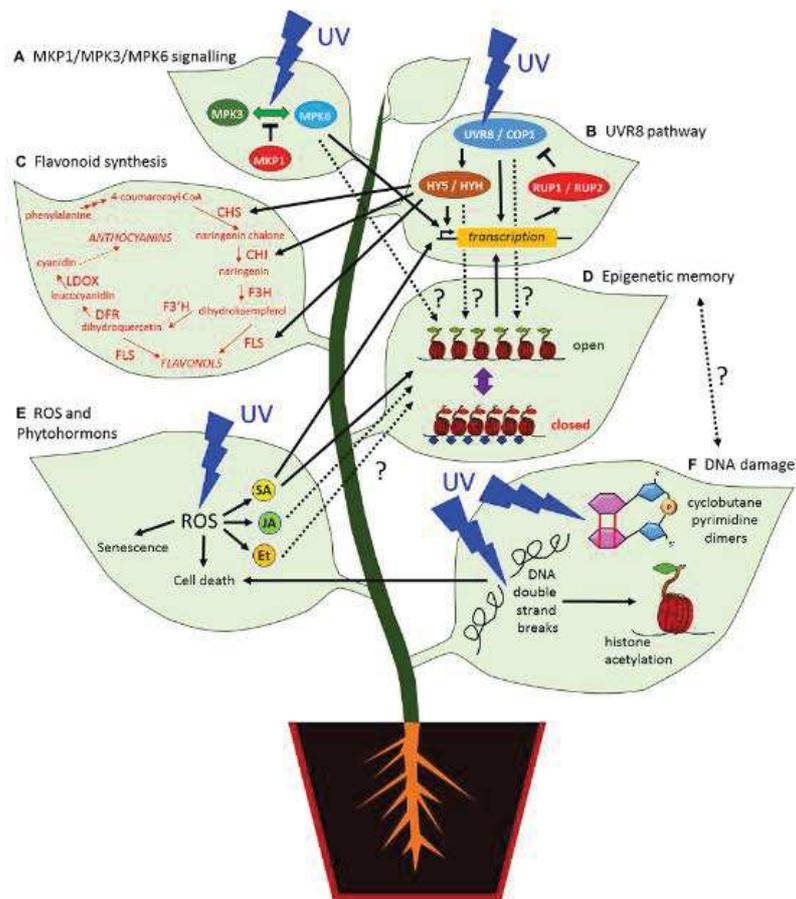


Figure 11 : Modèle simplifié montrant les différentes voies de transduction du signal de rayonnement UV dans les plantes et la mémoire épigénétique conduisant à l'acclimatation ou à l'adaptation

Source : Müller-Xing *et al.*, 2014

A : voie de signalisation des protéine kinase activée par des agents mitogènes (MPK), B : voie de signalisation des UV Resistance Locus 8 (UVR8), C : voie de biosynthèse des flavonoïdes, D : mémoire épigénétique, E : espèces réactive de l'oxygène et phytohormones, F : Dommage de l'ADN

#### II.2.4. Notion de stress combiné ou stress multiple

En conditions naturelles de culture, les plantes sont généralement soumises à une combinaison de stress abiotiques et biotiques qui affectent énormément leur croissance et leur rendement (Prasad *et al.*, 2006 ; Atkinson *et al.*, 2011 ; Suzuki *et al.*, 2014 ; Pandey *et al.*, 2015). La combinaison de stress ou « multistress » sur les plans physiologique et morphologique, représente une menace beaucoup plus importante qu'un stress individuel pour la plante. En conséquence, elle peut conduire à une réponse différente de celle observée lorsque les stress sont appliqués individuellement (Mittler, 2006 ; Dreesen *et al.*, 2012 ; Rollins *et al.*, 2013). En effet, les stratégies d'adaptation des plantes face à un stress multiple peuvent être différentes de celles qu'elles adoptent face à deux ou plusieurs contraintes individuelles (Pandey *et al.*, 2015). La plante conçoit ce stress simultané comme un nouvel état de stress. L'exemple de Pandey et ses collaborateurs (2015) sur la réponse moléculaire d'*Arabidopsis thaliana*, de *Triticum aestivum* et de *Solanum bicolor* à des stress uniques (sécheresse ou chaleur) et leurs combinaisons en est une belle illustration. Il a permis de montrer que la réponse génomique est variable en fonction de chaque espèce et que la réponse combinée est différente de la réponse unique (Figure 12). D'autres observations ont confirmé cette variabilité de réponse. Ainsi, chez *Pisum sativum*, l'application d'un stress UV a affecté beaucoup plus la croissance de la plante qu'un stress sécheresse ou un stress combiné « sécheresse et radiations UV » alors qu'il est apparu qu'un stress combiné « chaleur et sécheresse » affectait plus sévèrement un certain nombre de processus physiologiques que les deux contraintes appliquées séparément (Alexieva *et al.*, 2001). Par ailleurs, Rizhsky et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que l'activité photosynthétique des plants de *Nicotiana tabacum* exposés simultanément à la chaleur et à la sécheresse avait remarquablement diminué par rapport à celle enregistrée lors de l'application de stress individuels.

Pris dans leur ensemble, ces travaux semblent indiquer que prévoir la réponse d'une plante et son adaptabilité face aux changements climatiques ne peut être réalisée qu'en étudiant son comportement sur le terrain, en la soumettant à des conditions de culture dans lesquelles les paramètres climatiques présentent des caractéristiques contrastées. Les résultats obtenus en conditions contrôlées avec un ou plusieurs variables du climat ne semblent pas pouvoir être extrapolés aux conditions de culture en plein champ.

S

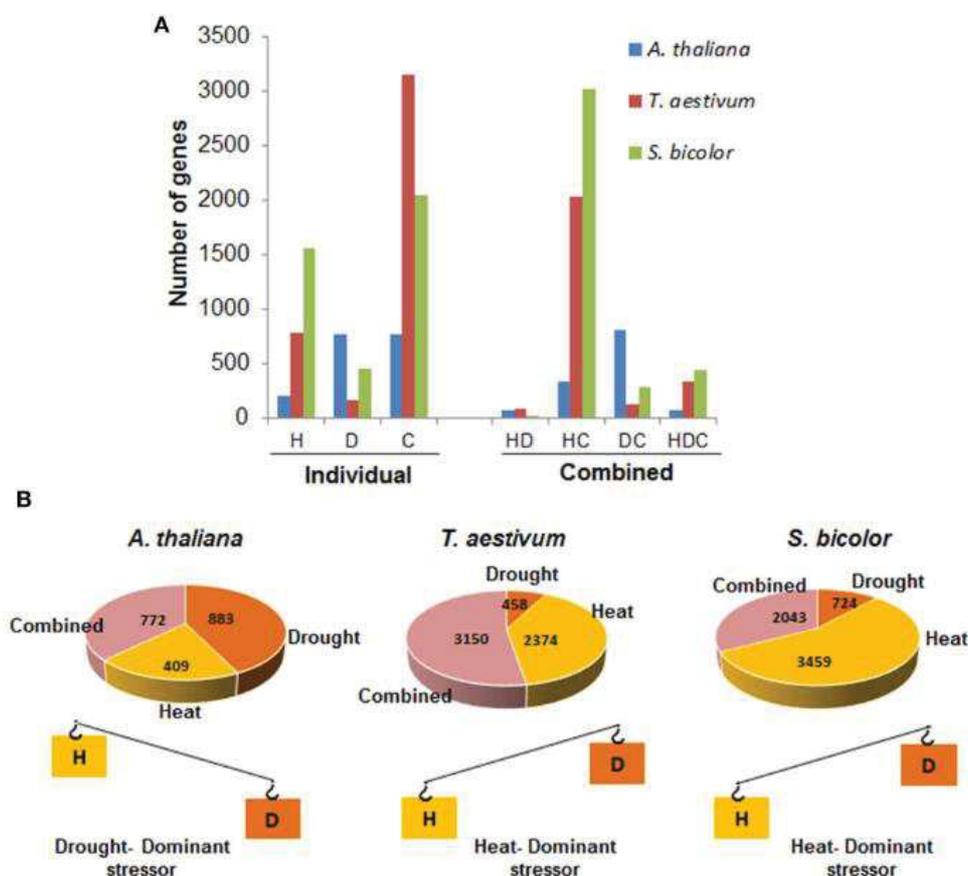


Figure 12 : Représentation de la réponse transcriptionnelle d'*Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* et *Solanum bicolor* aux stress chaleur et sécheresse, appliqués de manière individuelle ou combinée  
Source : Pandey *et al.*, 2015

### III. Cafés et changement climatique

Jusqu'à ce jour, seules des études *in silico*<sup>7</sup> de prédiction des zones futures de culture des cafés ont été effectuées en tenant compte des changements climatiques attendus (Davis *et al.*, 2012 ; Baca *et al.*, 2014 ; Bunn *et al.*, 2014 ; Bunn *et al.*, 2015 ; Magrach et Ghazoul, 2015 ; Ovalle-Rivera *et al.*, 2015). En ce qui concerne les travaux réalisés *in vivo*, en conditions contrôlées ou au champ, ils ont analysé la réponse des cafés face à la modification d'un ou de deux stress abiotiques. Ces recherches entreprises dans les années 2000, pour la plupart, ont essentiellement étudié les effets de la sécheresse, de la température (chaleur ou froid) et de la lumière sur la croissance et l'activité photosynthétique des cafés.

Ainsi, des investigations ont été menées sur la tolérance de *Coffea canephora* à la sécheresse au travers de l'étude des flux d'eau et des modifications de la surface foliaire en 2003, puis de l'architecture et du rendement des arbres ainsi que de la qualité des grains

<sup>7</sup> La méthode *in silico* : les méthodes de simulation ou modélisation d'un phénomène biologique à l'aide d'outils informatiques

en 2004 (DaMatta *et al.*, 2003 ; DaMatta, 2004b). A la même année, ces auteurs ont également analysé l'effet de l'ombrage sur la production de café. Pinheiro et ses collaborateurs (2004), ont étudié la tolérance de *C. canephora* à la sécheresse au travers des données morphologiques et des mesures de l'activité photosynthétique. En 2006, les effets de deux facteurs environnementaux, la température et la sécheresse sur la photosynthèse, le stress oxydatif et le rendement des caféiers ont été observés pour la première fois (DaMatta et Ramalho, 2006) et Ramalho et ses collègues (2014) ont démontré l'effet du froid sur les caféiers.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont rapporté les impacts des conditions environnementales sur la diversité biochimique des grains, sachant que la composition en métabolites influe fortement sur la qualité du café. Et les variations de l'altitude et de l'ombrage ont été particulièrement étudiées (Vaast *et al.*, 2006 ; Dussert *et al.*, 2008 ; Bertrand *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, la majorité des études réalisées avant 2010 sur la réponse des caféiers aux variations environnementales ont été focalisées sur la morphologie, la physiologie, la croissance et la productivité de la plante entière et sur la composition biochimique des fruits. Ce n'est qu'à partir de 2010 que des analyses biochimiques, différentes de celles sur le métabolisme carboné et sur les pigments photosynthétiques, ont été réalisées sur les feuilles. Pourtant, les feuilles sont présentes sur l'arbre tout au long de l'année et jouent donc un rôle majeur dans la perception des conditions environnementales déclenchant la mise en place des mécanismes adaptatifs. Fortunato et ses collaborateurs (2010) ont été les premiers à étudier les réponses au froid sur les plans biochimique (tocophérols, acides caféiques et chlorogéniques) et moléculaire. Ensuite, les travaux de Martins et ses collaborateurs (2014) ont montré l'importance des composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes, dans la réponse à l'intensité lumineuse chez *C. arabica*. Alors que les feuilles de caféier sont très riches en composés phénoliques tels que les acides chlorogéniques (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-diCQ, 3,5-diCQ, 4,5-diCQ) et les xanthones (mangiférine) (Tableau 2), il semble que les flavonoïdes, notamment la rutine, soient impliqués dans la réponse des feuilles à la lumière en conditions naturelles ou en conditions contrôlées (Campa *et al.*, 2017). Parmi les métabolites secondaires, les composés phénoliques apparaissent alors comme des composés intéressants à étudier chez les caféiers dans le cadre de la réponse adaptative de ces plantes aux changements environnementaux. La voie de biosynthèse de ces composés est constituée d'une voie commune à tous les composés phénoliques, appelée voie des phénylpropanoïdes, qui se divise ensuite en une voie conduisant à la biosynthèse des lignines et en une autre menant aux flavonoïdes. La voie de biosynthèse des xanthones est encore non décrite chez les caféiers.

Tableau 2 : Teneurs en composés phénoliques, exprimées en pourcentage de matière sèche, dans des feuilles matures de *C. arabica* var. *laurina* et *C. canephora*  
Source : Campa et al., 2012

Composé	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
3-CQA	0,098	0,169
4-CQA	0,256	0,220
5-CQA	3,231	1,305
3,4- diCQ	0,053	0,095
3,5- diCQ	0,171	0,209
4,5- diCQ	0,036	0,065
FQA	0,116	0,064
Mangiférine	0,566	0,000

### III.1. Voie de biosynthèse commune aux phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes dérivent de l'acide aminé phénylalanine par désamination à l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL ; EC : 4.3.1.5) afin de donner de l'acide *t*-cinnamique ou cinnamate. La PAL est l'enzyme reliant le métabolisme primaire du shikimate, conduisant aux acides aminés aromatiques et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes (Hoffmann, 2003). Chez les caféiers comme chez *Arabidopsis*, les isoformes<sup>8</sup> de la PAL sont codées par 4 gènes (Fraser et Chapple, 2011 ; Lepelley *et al.*, 2012).

L'acide *t*-cinnamique est un précurseur de l'acide salicylique et des coumarines. En effet, l'acide *t*-cinnamique subit une hydroxylation catalysée par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H ; EC : 1.14.13.11) pour donner l'acide *p*-coumarique ou coumarate. Cette enzyme est une monooxygénase de la famille des cytochromes P450 (CYP450). Un (01) seul gène *C4H* a été isolé chez *Arabidopsis thaliana* tandis que quatre (04) gènes ont été décrits chez les caféiers (Raes *et al.*, 2003). L'acide *p*-coumarique est ensuite transformé en thioester de coenzyme A, en *p*-coumaroyl CoA ou 4-coumaroyl CoA par l'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4CL ; EC : 6.2.1.12). La 4CL est codée par plusieurs gènes. Au moins quatre (04) sont connus chez *Arabidopsis* (Fraser et Chapple, 2011) alors que dix (10) ont été identifiés chez le caféier. Dans les plantes supérieures, le *p*-coumaroyl CoA représente le point de départ de la biosynthèse de la plupart des composés phénoliques (Vogt, 2010). Et la voie de biosynthèse menant aux proanthocyanidines, tanins et flavonoïdes diverge de celle des lignines au niveau de ce composé (Winkel-Shirley, 2001).

<sup>8</sup> Isoforme (protéine) : différente forme que prend une protéine lorsqu'elle est issue de gènes différents, ou du même gène par épissage alternatif

### III.2. Voie de biosynthèse de la lignine

Rinaldi et ses collaborateurs (2016) ont rassemblé les résultats des recherches effectuées sur de nombreuses espèces végétales et ont proposé la voie de biosynthèse présentée dans la figure 13. Cette voie débute par une estérification en présence de shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase (HCT/HQT ; EC : 2.3.1. 133) qui permet le transfert du shikimate ou du quinate sur la *p*-coumaroyl CoA (Hoffmann, 2003). Cette estérification est suivie d'une hydroxylation en 3' du *p*-coumaroyl shikimate/quinate par la *p*-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) pour former le caféoyl shikimate/quinate (Vermerris et Nicholson, 2007). Ces molécules sont alors désestérifiées par la HCT/HQT pour redonner le caféoyl CoA, molécule indispensable pour la synthèse des lignines. Chez les caféiers, ces deux (02) enzymes sont codées par deux (02) gènes et la voie du caféoyl-quinate est fortement exprimée par rapport à celle du caféoyl-shikimate (Mahesh *et al.*, 2007 ; Denoeud *et al.*, 2014).

La *p*-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase (C3'H ; EC : 1.14. 13.36) est la deuxième des trois P450 identifiées dans cette voie et fait partie de la famille des CYP98 (CYP98A3 chez *Arabidopsis*) (Vermerris et Nicholson, 2007).

Le caféoyl CoA subit ensuite un transfert de méthyle catalysé par la caféoyl CoA3-*O*-méthyltransférase (CCoAOMT ; EC : 2.1.1.104) pour donner le féruloïl CoA. Chez *Arabidopsis*, la CCoAOMT a sept (07) homologues mais un (01) seul a été confirmée (Raes *et al.*, 2003 ; Sibout *et al.*, 2005) tandis que chez les caféiers trois (03) gènes homologues<sup>9</sup> ont été identifiés. La cinnamoyl-CoA réductase (CCR ; EC : 1.2.1.44) catalyse la synthèse des hydroxycinnamaldéhydes à partir des thioesters d'hydroxycinnamoyl CoA. Le premier ADNc codant pour la CCR a été cloné à partir d'*Eucalyptus* et plusieurs autres études ont identifié des gènes CCR dans le tabac et le maïs (Hoffmann, 2003). Deux (02) ADNc de CCR d'*Arabidopsis* ont été également caractérisés et les séquences protéiques qu'ils ont codé (AtCCR1 et AtCCR2) ont été retrouvés identiques à plus de 80%. Les études cinétiques de AtCCR1 et AtCCR2 ont montré que les deux (02) protéines ont une affinité plus forte pour la féruloïl-CoA et plus faible pour le sinapoyl-CoA et le caféoyl-CoA (Lauvergeat *et al.*, 2001).

La férulate 5-hydroxylase (F5H) est la troisième CYP450 impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et elle catalyse l'hydroxylation du coniféraldéhyde et de l'alcool coniférylique pour produire le 5-hydroxyconiféraldéhyde et l'alcool 5-hydroxyconiféryl respectivement. L'acide caféique *O*-méthyltransférase (COMT ; EC : 2.1.1.68) est responsable de plusieurs méthylations dans la voie de biosynthèse des

<sup>9</sup> Gènes homologues : gènes qui divergent à partir d'une séquence ancêtre commune

phénylpropanoïdes, allant des acides hydroxycinnamiques libres jusqu'aux précurseurs d'alcool de lignine S par méthylation de 5-hydroxyconiféraldéhyde et de l'alcool 5-hydroxyconiférylique. Chez le caféier, quatre (04) gènes ont été codés pour cette protéine. La cinnamoyl alcool déshydrogénase (CAD ; EC : 1.1.1.195) catalyse, en présence de NADPH, l'étape finale de synthèse des monomères de lignine à partir du coniférylaldehyde et du sinapaldéhyde pour obtenir des monolignols d'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique respectivement. Neuf (09) homologues de *CAD* ont été identifiés chez *Arabidopsis* contre sept chez le caféier.

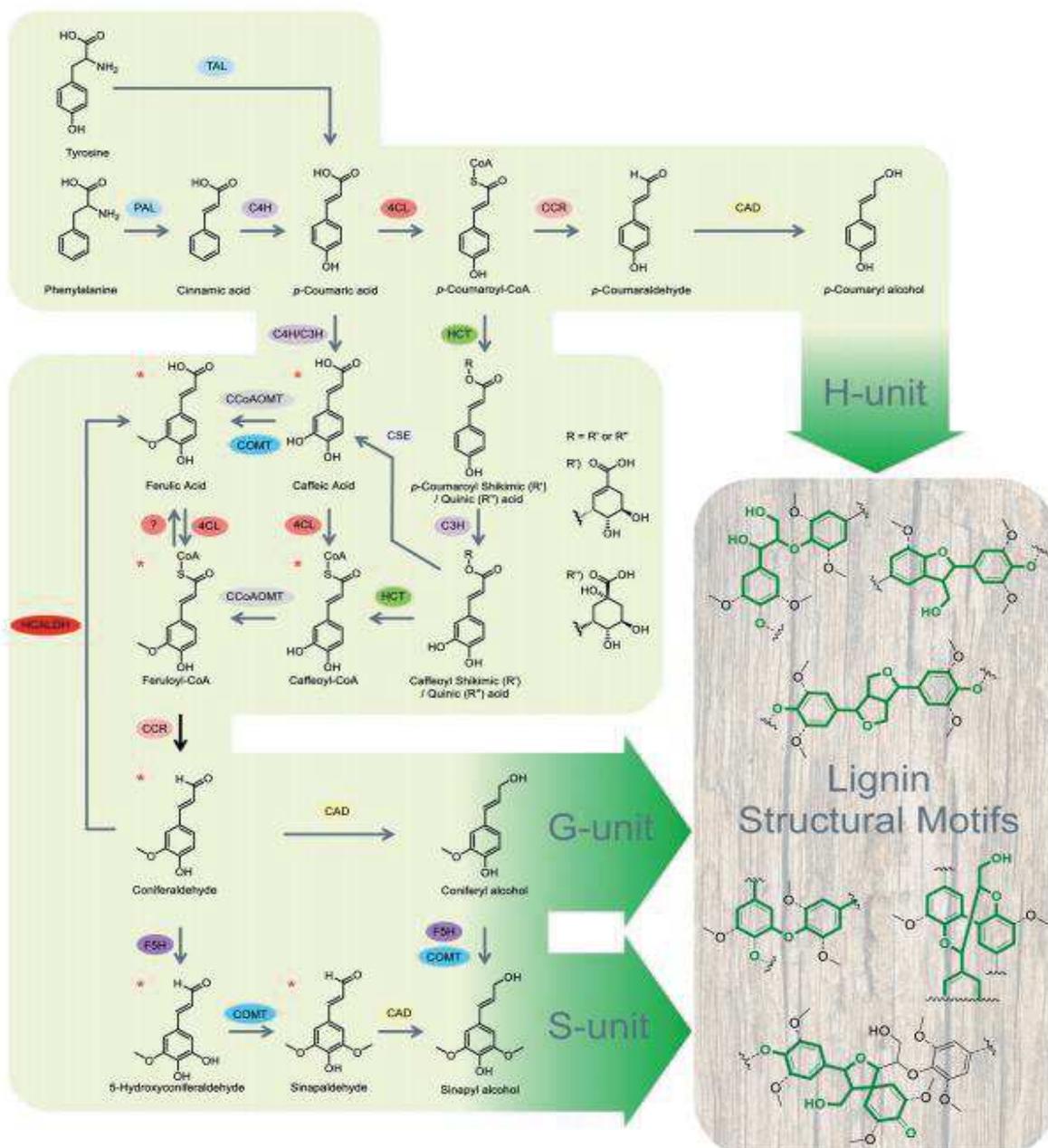


Figure 13 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la lignine  
 Source : Rinaldi *et al.*, 2016

### III.3. Voie de biosynthèse des flavonoïdes

La synthèse des flavonoïdes commence avec la condensation d'une molécule de 4-coumaroyl CoA et de trois malonyl-CoA afin de donner la naringénine chalcone ou 2',4,4',6'-tetrahydrochalcone (Figure 14). Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase (CHS ; EC : 2.3.1.74). Chez *Arabidopsis*, une (01) seule copie de gène a été trouvée contre dix (10) homologues chez la canne à sucre (Dzialo *et al.*, 2017) et trois (03) chez les caféiers.

La naringénine chalcone est ensuite isomérisée en naringénine par la chalcone isomérase (CHI ; EC : 5.5.1.6). Deux (02) isoformes ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Saito *et al.*, 2013) et deux (02) gènes homologues ont été trouvés chez le caféier. La flavanone hydroxylase (F3H ; EC : 1.14.11.9) catalyse la transformation de la naringénine en dihydrokaempférol (DHK). Chez les caféiers, cinq (05) homologues de *F3H* ont été identifiés mais un (01) seul chez *Arabidopsis* et le pamplemousse (Lucheta *et al.*, 2007). Le dihydrokaempférol peut être alors hydroxylé soit en position 3' par le flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H ; EC : 1.14.13.21) soit en positions 3' et 5' par le flavonoïde 3',5'-hydroxylase (F3'5'H ; EC : 1.14.13.88) pour former respectivement la dihydroquercétine (DHQ) et la dihydromyricétine. Les dihydroflavonols ainsi formés sont à la base de la différenciation des anthocyanes existant chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, un (01) seul homologue de *F3'H* a été noté contre cinq (05) chez les caféiers (Saito *et al.*, 2013). La DFR (EC : 1.1.1.219) catalyse la réduction stéréospécifique des dihydroflavonols en leucoanthocyanidines ou flavan-3,4-diols en utilisant le NADPH comme cofacteur. Et un (01) seul homologue a été observé chez *Arabidopsis* contre cinq (05) chez les caféiers (Saito *et al.*, 2013). Les leucoanthocyanidines peuvent donner des proanthocyanidines par deux voies : soit par l'anthocyanidine synthase, soit par la leucoanthocyanidine réductase. L'anthocyanidine synthase (ANS ; EC : 1.14.11.19) (appelée également leucoanthocyanidine dioxygénase, LDOX) oxyde les leucoanthocyanidines en anthocyanidines, composés précurseurs des anthocyanes et des proanthocyanidines par la voie des épicatechines. L'anthocyanidine réductase (ANR ; EC : 1.3.1.77) est responsable de la synthèse des épicatechines à partir des anthocyanidines (Xie *et al.*, 2003). Les leucoanthocyanidines sont réduites en catéchine grâce à la leucoanthocyanidine réductase (LAR) pour donner ensuite les proanthocyanidines. La flavonol synthase (FLS ; EC : 1.14.11.23) est directement responsable de la biosynthèse des flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine). Deux (02) homologues de *FLS* ont été identifiés chez *Arabidopsis* contre quatre (04) chez les caféiers (Saito *et al.*, 2013). L'enzyme UDP-glucose : flavonoïde 3-O-glucosyltransférase (F3GT ; EC : 2.4.1.91) est responsable du transfert de la fraction glucose de l'UDP-glucose au groupe hydroxyle en position 3 de l'anneau C. Chez *Arabidopsis*, un (01)

seul homologue a été identifié contre cinq (05) chez les caféiers (Saito *et al.*, 2013). La flavonol-3-*O*-glucoside L-rhamnosyltransférase (F3RT ; EC : 2.4.1.159) est une enzyme qui catalyse l'ajout d'un rhamnose sur un flavonoïde glycosylé. Un (01) seul homologue a été noté chez *Arabidopsis* alors que douze (12) ont été identifiés chez les caféiers (Saito *et al.*, 2013).

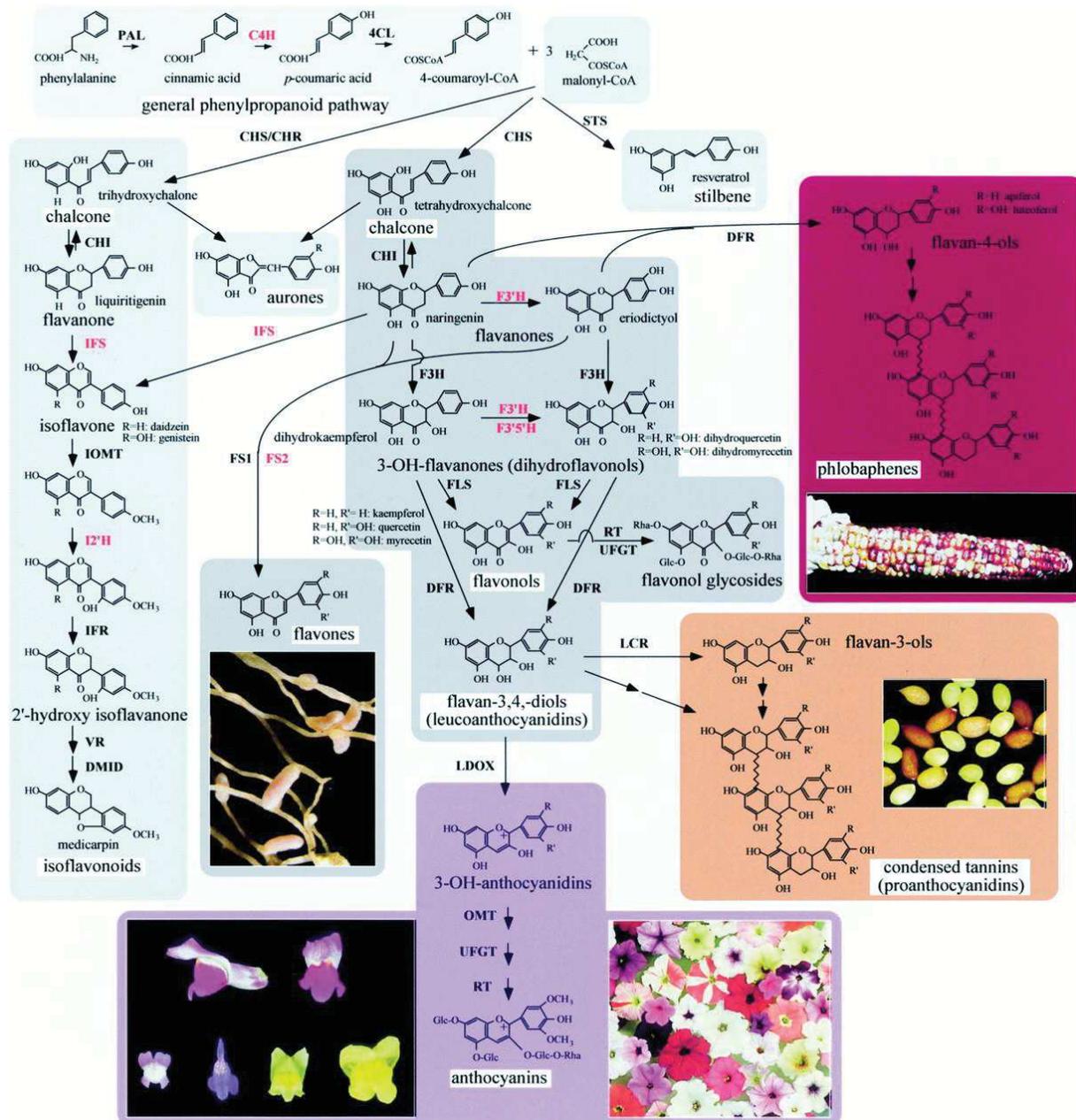


Figure 14 : Schéma représentant les différentes branches de la voie de biosynthèse des flavonoïdes d'après une étude sur plusieurs espèces

Source : Winkel-Shirley, 2001

C4H : cinnamate-4-hydroxylase, CHI : chalcone isomérase, CHR : chalcone réductase, CHS : chalcone synthase, 4CL : 4-coumaroyl : CoA-ligase, DFR : dihydroflavonol 4-réductase, DMID 7,2'-dihydroxy, 4'-méthoxyisoflavanol déshydratase, F3H : flavanone 3-hydroxylase, FSI et FSII : flavone synthase, F3'H : flavonoïde 3'hydroxylase ou F3'5'H : flavonoïde 3'5' hydroxylase, IOMT : isoflavone O-méthyltransférase, IFR : isoflavone réductase, I2'H : isoflavone 2'-hydroxylase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : Leucoanthocyanidine dioxygénase ou ANS : anthocyanidine synthase, LCR : Leucoanthocyanidine réductase, OMT : O-méthyltransférase, PAL : Phe ammonia-lyase, RT : rhamnosyl transférase, STS : stilbène synthase, UFGT : UDPGflavonoïd glucosyl transférase, et VR : véstitone réductase.

# MATERIEL ET METHODES

## I. Le dispositif expérimental au Mexique

Un dispositif altitudinal en plein champ a été installé à Xalapa (Veracruz, Mexique) depuis 2013 afin de mimer différentes conditions climatiques (Figure 15). La première parcelle (Colpos) est localisée à 650 m dans la municipalité de Cordoba (18 ° 51'22"N 96 ° 51'38 " W), la deuxième (Roma) a été placée dans une ferme privée nommée « Finca Roma » à 1050 m, dans la municipalité de Emiliano Zapata (19 ° 27'54"N 96 ° 52'49 " W), et la dernière station à 1250 m (19 ° 23'42"N 97 ° 00'03 " W) a été disposée à l'Institut National de Recherche Forestière, Agricole et de l'Élevage (INIFAP). La moitié de chaque site a été équipée d'une toile d'ombrage excluant 50% de la lumière afin de mimer les effets de l'agroforesterie. Les différentes variétés de *C. arabica* ont été plantées aléatoirement, mais le motif a été répété à l'identique sur les 3 parcelles. L'espèce *C. canephora* var. Nemaya marque la séparation des motifs ombragés et ensoleillés.

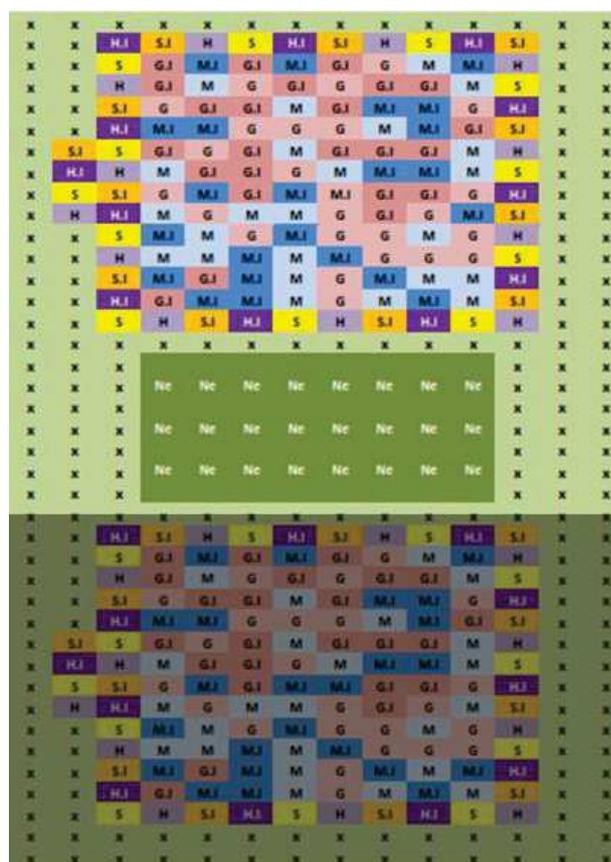


Figure 15 : Plan d'une parcelle expérimentale du dispositif altitudinal installé au Mexique, région de Xalapa (Veracruz, Mexique).

La partie vert clair représente la parcelle ensoleillée et la partie vert foncé la zone ombragée de culture de *C. arabica*. Les 2 parcelles sont séparées par 3 rangées de 8 plants de *C. canephora* (Ne) Les variétés *C. arabica* : G : Greffé (Marsellesa / Nemaya) (rose clair) ; G.I : Greffé (var. Marsellesa / var. Nemaya) Introgressé<sup>10</sup> ; H (rose) : hybride (violet clair) ; H.I : Hybride Introgressé (violet) ; M : var. Marsellesa (bleu clair) , M.I : var. Marsellesa Introgressé (bleu) ; S : Sarchimor (jaune) ; S.I : Sarchimor Introgressé (orange).

<sup>10</sup> L'introggression est un terme de la génétique désignant le transfert de gènes d'une espèce au pool génétique d'une autre après une hybridation suivie de rétrocroisements répétés avec l'une des espèces parentes. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-introggression-14399/>

## II. Zone de collecte à Madagascar

Dans le village d'Ambatolahamena (S 18°59'38.8" ; E 46°40'37.1"), commune Analavory, Région Itasy, la caféiculture est basée sur *C. arabica*. Dans cette région, la culture des caféiers est pratiquée avec ou sans irrigation et l'irrigation ne se fait pas tout au long de l'année mais durant la saison sèche (Mai-Septembre). La culture d'Arabica sur les Hautes Terres résulte de plusieurs projets de propagation de l'espèce. Ainsi, ces dernières années, plusieurs variétés de *C. arabica* ont été distribuées dans cette zone sans traçabilité. Le nom de la variété utilisée dans ce travail ne nous a pas été communiqué et les tentatives d'identification de la variété ont été infructueuses.

## III. La collecte des données météorologiques

Au Mexique, les données météorologiques ont été mesurées par des appareils installés sur chaque site : la température de l'air et l'humidité relative ont été enregistrées via « CS215 Campbell Scientific », le rayonnement solaire utilisant le « SP1110 Skye Instruments » et les précipitations par le « tipping bucket rain gauge ARG100 ». Ces données ont été enregistrées toutes les minutes puis compactées en heure en utilisant un data logger (model 21X, Campbell 134 Scientific Ltd, Shepshed, UK).

A Madagascar, le service météorologique d'Antananarivo n'a pu nous fournir que les données de température et de précipitation grâce à une station localisée à Antananarivo ville, antenne la plus proche (86 km à vol d'oiseau). De ce fait, les données météorologiques de Madagascar n'ont pas été utilisées pour cette étude.

## IV. Matériel végétal

Deux provenances de caféiers ont été considérées : Mexique et Madagascar.

Au Mexique, deux espèces ont été utilisées pour ce travail :

- *Coffea arabica* var. Marsellesa (*C. arabica* pied franc et *C. arabica* greffé sur *Coffea canephora* var. Nemaya)
- *Coffea canephora* var. Nemaya

*Coffea arabica* var. Marsellesa est une variété résistante à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). *Coffea canephora* var. Nemaya est une variété résistante aux nématodes du genre *Meloidogyne* sp et sélectionnée comme porte-greffe pour cette raison.

Les caféiers étaient âgés de 13 mois lors de la transplantation sur le dispositif expérimental. Tous les individus ont été plantés à la même période et ont donc le même âge.

A Madagascar, la variété de *C. arabica* étudiée a été plantée en 2007 pour un projet comparant la culture avec ou sans irrigation. Une variété que nous avons surnommée « *C. arabica* malgache » lors de cette étude.

## V. Méthodologie de collecte et de conservation des feuilles

Les collectes ont été réalisées (une fois par an) à des saisons différentes afin d'obtenir le plus de variabilité climatique possible (2014-2016). La première récolte a été effectuée en avril 2014, sur des plantes âgées d'un an ; la deuxième a été faite en juin 2015 et la dernière récolte en septembre 2016. Il est à souligner que la fructification des caféiers se fait après trois années de croissance végétative et par conséquent n'interfère pas avec les périodes de récoltes.

Deux stades de croissance de feuilles ont été considérés : les feuilles très jeunes (localisées au niveau du premier nœud à partir de l'apex) et les feuilles matures (localisées au niveau du troisième nœud à partir de l'apex) (Figure 16).



Figure 16 : Aspect des différents stades de feuilles de caféiers récoltés

Le nombre de récoltes a été varié en fonction des caféiers étudiés. Cependant, la méthodologie de récolte a été la même. L'heure de collecte, le nombre d'individus et le nombre de feuilles prélevées diffèrent en fonction des analyses à effectuer (Tableau 3).

Tableau 3 : Résumé des nombres de feuilles et d'individus étudiés par caféiers et selon les conditions de culture en fonction des analyses. Nb. ind : Nombre d'individus récolté à chaque altitude ou station; Nb. feuilles/ind : Nombre de feuilles prélevées par individu ; H : Heure de récolte après le lever du soleil.

Analyses	Caféiers étudiés Conditions de culture	Stade	Nb. ind/ Altitude	Nb. feuilles/ind	h
Morphologiques	<i>C. arabica</i> var. Marsellesa pieds francs (PF) et greffé (GR) en plein soleil <i>C. arabica</i> var. Marsellesa sous-ombrage	Mature	5	10	-
Biochimiques	<i>C. arabica</i> var. Marsellesa pieds francs (PF) et greffé (GR) en plein soleil <i>C. arabica</i> var. Marsellesa sous-ombrage <i>C. canephora</i> var. Nemaya <i>C. arabica malgache</i>	Juvenile Mature	5	5	4 à 6 h
Transcriptomiques	<i>C. arabica</i> var. Marsellesa pieds francs (PF) et greffé (GR) en plein soleil <i>C. arabica</i> var. Marsellesa sous-ombrage	Juvenile Mature	3	3	2 à 4 h

Pour les études morphologiques, dix (10) feuilles matures prélevées sur cinq (05) individus de chaque caféier étudié (*C. arabica* var Marsellesa greffé ou non), soumis aux mêmes conditions (sous ombrage, plein soleil), ont été mesurées.

Pour les analyses biochimiques, cinq (05) feuilles de chaque stade (mature, juvénile) ont été prises sur cinq (05) individus de chaque caféier étudié (*C. arabica* var Marsellesa greffé ou non, *C. canephora*, *C. arabica malgache*), soumis aux mêmes conditions (sous ombrage, plein soleil, irrigué ou non).

Pour les études transcriptomiques, trois (03) feuilles de chaque stade (mature, juvénile) prises sur trois (03) individus de chaque caféier étudié (*C. arabica* var Marsellesa greffé ou non), soumis aux mêmes conditions (sous ombrage, plein soleil), ont été analysées.

Les feuilles prélevées pendant les récoltes sont celles qui sont tournées vers l'Est ou celles qui ont été exposées au soleil.

Les feuilles matures de *C. arabica* var. Marsellesa ont été récoltées durant les trois ans d'étude. Les feuilles juvéniles ont été récoltées durant l'année 2015 sur cinq (05) caféiers cultivés à la station intermédiaire. Et à la même année, ont été prises les feuilles matures

étudiées pour les effets de l'ombrage et les effets du greffage, aux deux altitudes extrêmes et sur les trois altitudes respectivement.

Les feuilles matures de *C. canephora* var. Nemaya ont été récoltées en 2015 et 2016 aux trois stations.

Les feuilles matures de *C. arabica* malgaches ont été récoltées en février 2018 sur des individus cultivés sur des parcelles irrigués ou non.

Après la récolte, les feuilles ont été directement plongées dans l'azote liquide et transportées jusqu'au laboratoire (Institut de l'Ecologie (INECOL) ; Laboratoire de Biologie Moléculaire d'Ambatobe (LBM) pour être conservées à -80°C.

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées uniquement sur *C. arabica* var. Marsellesa si les études biochimiques ont été étendues sur toutes les caféiers étudiés.

## VI. Mesures morphologiques

Sur chaque parcelle et pour chaque individu, trois paramètres d'évaluation de la croissance des arbres ont été retenus et mesurés avant chaque récolte : la hauteur totale de la plante (cm), le diamètre (cm) du tronc de la plante au collet et le nombre d'entre-nœuds sur la tige principale.

Les tailles des feuilles matures ont été également relevées au moment de la récolte notamment la longueur (mm) et la largeur des feuilles (mm).

Pour les comparaisons de la croissance foliaire entre caféiers cultivés à l'ombre et au soleil, les évaluations de la masse sèche des feuilles et du nombre de stomates ont été réalisées. Aucune grandeur morphologique n'a été mesurée sur *C. canephora* au Mexique et sur *C. arabica* cultivé à Madagascar.

## VII. Les analyses biochimiques

Les feuilles en provenance du Mexique ont été lyophilisées sur place, puis envoyées à Montpellier (France) pour être analysées à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD - Montpellier).

Les feuilles en provenance de Madagascar ont été lyophilisées au Laboratoire de Biologie Moléculaire d'Ambatobe puis envoyées à l'IRD-Montpellier pour analyse, en suivant le protocole NAGOYA.

Les feuilles lyophilisées d'origine mexicaine et malgache sont pulvérisées mécaniquement à l'aide d'un broyeur IKA A10 puis conservées à l'abri de l'humidité et de la lumière solaire en attendant d'être préparées pour les analyses.

## VII.1. Dosages des composés phénoliques

Après extraction des composés contenus dans les feuilles de provenance mexicaine ou malgache, deux types d'analyses biochimiques ont été réalisés : une analyse quantitative par HPLC et une identification par LC-MS.

### VII.1.1. Extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont extraits à partir de 25mg de poudre de feuilles mises en suspension dans 6 mL de solvant d'extraction (méthanol/eau : 80/20). Dix (10)  $\mu$ L d'étalon interne (5-Méthoxyflavone à 1 mg/mL) sont ajoutés dans chaque tube contenant la mixture. Les tubes sont ensuite agités sur un agitateur sur plaque (Rotamax 120, Heidolph), placé dans une chambre froide (4°C) et à l'obscurité, pendant 3 heures, à une vitesse de 250 rpm. Après cette étape, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 3500 rpm à 8°C. Le surnageant est récupéré, puis filtré sur un filtre millipore (porosité de 0,2  $\mu$ m). Le volume du filtrat est divisé en deux : une partie est gardée dans un tube pour l'analyse HPLC et l'autre partie est conservée. L'ensemble est placé au congélateur (-20°C) en attendant son analyse. Trois répétitions techniques<sup>11</sup> ont été réalisées pour chaque individu.

### VII.1.2. Analyse biochimique quantitative

#### VII.1.2.1. Préparation des standards

Pour chaque standard, différentes dilutions (25, 50, 75, 100  $\mu$ g/mL) ont été réalisées à partir d'une solution mère à 1 mg/mL. Les composés de référence utilisés sont : la théophylline, la théobromine, le 5-CQA, la caféine, l'acide caféique, la mangiférine, l'épigallocatechine, le 3,5-diCQ, la rutine, la quercétine 3,4-di-O-glucoside, le kaempférol glucoside. Le 5-méthoxyflavone est ajouté comme standard interne.

#### VII.1.2.2. Caractéristiques de l'appareil chromatographique et dosage

Le dosage du matériel végétal a été réalisé en HPLC phase inverse sur un chromatographe Shimadzu LC 20 (Japan) muni d'une double pompe, d'un injecteur automatique, d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et d'une colonne Eclipse XDB C18 (3.5  $\mu$ m) de dimension 100 mm  $\times$  4.6 mm. La colonne est composée d'octadécylsilane greffée chimiquement à des microparticules de silice poreuse de 1,5 à 10  $\mu$ m de diamètre et disposée

---

<sup>11</sup> Répétition techniques ou répliqués techniques : mesure réalisée sur le même échantillon

dans un four permettant de maintenir la température constante (27°C) pendant la séparation. La pression lors de l'analyse est de l'ordre de 900 à 1100 psi.

Dix (10) µL d'extrait sont analysés à un débit de 0,6 mL/min en utilisant un gradient de solvant B dans A dont les proportions sont résumées dans le tableau 4. Le solvant A est constitué d'un mélange d'H<sub>2</sub>O et d'acide acétique (98/2 ; v/v), et le solvant B est un mélange d'H<sub>2</sub>O/MeOH/acide acétique (5/90/5, v/v/v).

Tableau 4 : Gradient de concentration des solvants A et B lors d'un dosage HPLC

Temps (min)	[B]%
0	15
1	25
4	25
5	32
7	32
8	35
10	35
11	58
13	58
14	62
15	62
16	64
17	64
18	80
20	80
21	15
26	15

#### VII.1.2.3. Analyse des données

L'enregistrement des spectres d'absorption a été réalisé sur trois longueurs d'onde différentes pour détecter les alcaloïdes et les trois groupes de composés phénoliques en fonction de leurs maxima d'absorption. Les alcaloïdes (théobromine et caféine) ainsi que les flavanols (catéchine et épicatechine) sont observés à 280 nm. Les esters d'acide hydroxycinnamique absorbent à 320 nm et les flavonols glycosylés et les xanthones sont observables à 360 nm.

#### VII.1.2.4. Méthode de calcul des concentrations en composés

Les aires de pics correspondant à chaque composé ont été enregistrées et transformées en concentration (exprimées en pourcentage de matière sèche) en utilisant les courbes

d'étalonnage réalisées avec les solutions standards. La courbe d'étalonnage est déterminée à partir des différentes dilutions de chaque standard (25, 50, 75, 100 µg/mL).

Pour les composés dont on ne disposait pas de témoin, leurs teneurs ont été exprimées en équivalent du composé de même famille et pour lequel une gamme étalon a été établie. Ainsi, les teneurs en 3-CQA, 4-CQA et FQA ont été calculées par rapport à la courbe d'étalonnage de 5-CQA, les dérivés de mangiférine en fonction de celle de la mangiférine, et les flavonols glycosylés en comparaison avec celle de la quercétine 3,4-di-*O*-glucoside.

### VII.1.3. Annotations des composés par LC-MS

« LC-MS » est une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les analyses UHPLC-DAD-ESI/QTOF ont été effectuées sur un système Agilent Infinity® 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) couplé à un UV/vis DAD et équipé d'un détecteur QTOF 6530 (Agilent) contrôlé par le logiciel MassHunter® (Agilent). La séparation analytique a été réalisée sur une colonne Poroshell® 120 EC-C12 (100 mm \* 3,0 mm, 2,7 µm) équipée d'une pré-colonne Poroshell® 20 EC-C18 (5 mm\* 3,0 mm, 2,7 µm). Un gradient de 0,4% d'acide formique dans l'eau (A) et d'acétonitrile (B) a été utilisé selon le tableau 5. Un contrôle qualité des analyses a été réalisé utilisant un mélange de même volume pour tous les extraits phénoliques.

Le débit de l'éluant et la température de la colonne ont été fixés à 1 mL/min et 60°C respectivement. Un total de 2,0 µL d'échantillon a été injecté. La source ESI a été optimisée comme suit pour les modes d'ionisation positive et négative : mode acquisition « Auto MSMS », spectre de balayage de  $m/z$  50 à 2000, tension capillaire de 3,5 kV, tension de buse 2000 V, fragmenteur à 110 V et énergie de dissociation induite de 20 eV. De l'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation avec un débit de 12 L/min et une température 310 °C à 40 psi.

Chaque pic de composé séparé par chromatographie liquide est couplé à plusieurs données spectrales : la formule brute, un spectre de masse et un spectre UV qui facilitent l'annotation

Tableau 5 : Gradient de concentration des solvants A et B par LC-MS

Temps (min)	[B] (%)
0	1
1,5	1
6	10
12	35
14	100
16	100

## VII.2. Analyses des sucres libres par chromatographie d'échanges d'ions

Le dosage des sucres libres a été réalisé par chromatographie échangeuse d'ions et leurs teneurs dans des conditions ombre/soleil ont été comparées pour *C. arabica* var. Marsellesa.

### VII.2.1. Extraction des sucres libres

Les sucres libres ont été extraits à partir de 20 mg de poudre mises en suspension dans 10 mL de solution aqueuse d'éthanol (80/20) mélangée au préalable avec du lactose (5 mg/L) comme étalon interne. Les tubes ont été placés à 80°C pendant 20 minutes en agitant toutes les 5 minutes. 10 µL de solution de Carrez A et 10 µL de solution de Carrez B ont été ajoutées dans chaque tube pour précipiter les protéines. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 3800 rpm à 4°C et 9 mL du surnageant ont été récupérés et évaporés au speedvac (Jouan® RC 1010, Saint-Herblain, France) sans chauffage. Trois répétitions techniques ont été réalisées pour chaque individu. Les tubes secs ont été immédiatement refermés et stockés au congélateur.

### VII.2.2. Analyse biochimique

#### VII.2.2.1. Préparation de la gamme étalon

Les standards utilisés ont été constitués par l'inositol (1 mg/mL), le sorbitol (1 mg/mL), le mannose (1 mg/mL), le glucose (2 mg/mL), le fructose (1 mg/mL), le lactose (1 mg/mL), le saccharose (2 mg/mL), le stachyose (1 mg/mL), le raffinose (1 mg/mL) et le maltose (1mg/mL). La gamme étalon a été obtenue à partir d'un mélange des standards à des dilutions différentes : 0, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10, 1/20, 1/25, 1/40, 1/50, 1/100.

### VII.2.2.2. Caractéristiques de l'appareil et dosage

Les sucres libres ont été séparés par chromatographie d'échange d'anions à pH élevé (basique) afin d'être quantifiés par détection ampérométrique. Cette technique permet de mesurer le courant ou la charge résultant de l'oxydation ou de la réduction des molécules à analyser à la surface d'une électrode de travail. Le signal est évalué en coulombs (C).

Les échantillons sous forme solide ont été repris dans 5 mL d'H<sub>2</sub>O ultrapure (MQ) à température ambiante, puis filtrés avec un filtre Millipore à 0,2 µm. Les sucres ont été quantifiés sur une chromatographie d'échange d'anions haute performance (Dionex Chromatography Co., Sunnyvale, CA) en utilisant une colonne HPLC CarboPac PA-1 (Dionex). Les sucres ont été résolus de manière isocratique avec un solvant constitué de NaOH à 150 mM, à une pression de 1350 à 1500 psi et un débit de 1 mL/min. Le volume d'extrait injecté dans l'analyseur a été de 10 µL.

### VII.2.2.3. Méthode de calcul des concentrations en sucres

Les mono-, di- et oligosaccharides ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des sucres standards et leurs teneurs ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage obtenues avec les mêmes standards. La concentration est exprimée en pourcentage de matière sèche.

## VII.3. Analyse de la teneur en amidon par un kit enzymatique

Le dosage de l'amidon a été réalisé afin de comparer sa teneur dans deux caféiers *C. arabica* var. Marsellesa cultivés dans des conditions ombre/soleil.

### VII.3.1. Principe du kit « total starch GOPOD »

Le dosage a été effectué à l'aide d'un kit « total starch GOPOD » (Megazyme, International, Ireland). Il s'agit d'une technique colorimétrique se déroulant en plusieurs réactions enzymatiques (Figure 17). Dans un premier temps, l'amidon est hydrolysé en maltodextrines par l'action de l' $\alpha$ -amylase à pH 5 à 100°C. Ensuite, les maltodextrines obtenues sont hydrolysées en D-glucose grâce à l'action de l'amyloglucosidase.

Le D-glucose ainsi obtenu est alors dosé indirectement par formation de quinoneimines. Une première oxydation en D-gluconate avec production d'une mole de peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire du glucose oxydase est obtenue, puis le peroxyde d'hydrogène est associé avec l'acide 4-hydrobenzoïque et le 4- aminoantipyrine contenus dans la solution de GOPOD, pour former le colorant quinoneimine et de l'eau sous l'action de la peroxydase.

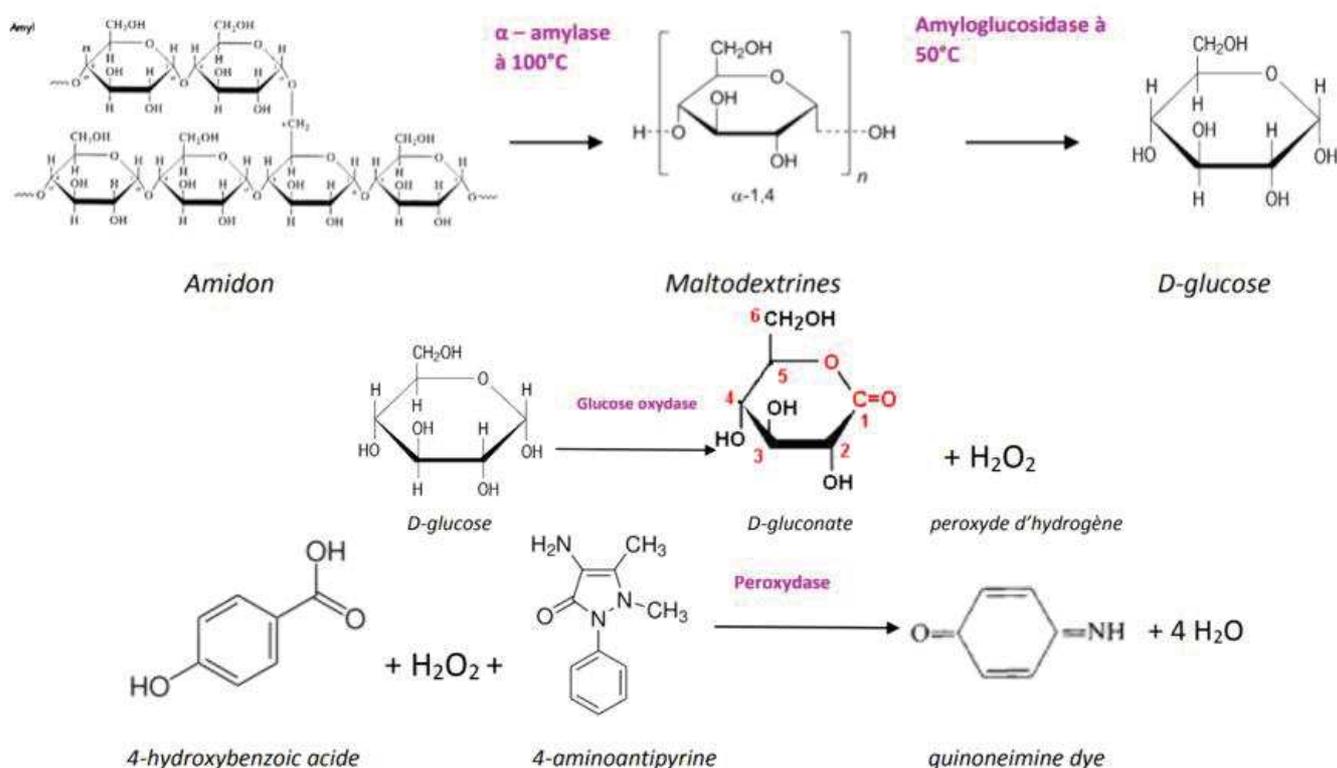


Figure 17 : Etapes des réactions enzymatiques du dosage de l'amidon par le kit GOPOD

### VII.3.2. Dosage de l'amidon

La première étape du dosage a consisté à éliminer les sucres libres de l'extrait végétal. Un premier extrait a été obtenu à partir de 30 mg de poudre végétale (échantillon) ou d'amidon (témoin positif) mis en solution dans 5 mL d'éthanol à 80% et placés dans un bain-marie à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 3000 rpm, le surnageant a été jeté. Le culot a été ensuite mis en suspension dans 5 mL d'éthanol à 80%, puis le mélange a été agité et centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Enfin, le culot a été repris dans 4 mL d'EtOH 80% avant d'être agité et centrifugé.

La deuxième étape a été la réaction enzymatique proprement dite. Un volume de 600  $\mu\text{L}$  de solution d' $\alpha$ -amylase a été rajouté au culot. Le mélange a été placé à  $100^{\circ}\text{C}$  durant 12 minutes, puis à  $50^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. A cette température, la deuxième réaction enzymatique est catalysée par l'ajout de 30  $\mu\text{L}$  de solution d'amyloglucosidase. Après 30 minutes, un volume d'eau de 4 mL a été ajouté au mélange. Après une centrifugation à 3000 rpm durant 10 minutes, 100  $\mu\text{L}$  de surnageant ont été placés dans un tube Eppendorf. Une gamme étalon a été préparée pour le dosage colorimétrique à 510 nm. Elle est composée de 100  $\mu\text{L}$  d'eau, de 100  $\mu\text{L}$  de solution de glucose diluée à  $\frac{1}{2}$  (fourni par le kit) et de solution d'hydrolyse de l'amidon préalablement diluée au 10ème du surnageant pour obtenir les 100  $\mu\text{L}$ . Avant d'être placés à  $50^{\circ}\text{C}$  durant 20 minutes, une solution de GOPOD d'un volume de 1,5 mL

a été ajoutée aux échantillons et à la gamme étalon. Deux lectures à 510 nm par dosage ont été réalisées en trois répétitions techniques par échantillon et par témoins.

### VII.3.3. Méthode de calcul de la teneur en amidon

La teneur en glucose des échantillons a été calculée en effectuant la différence entre les absorbances des échantillons et la moyenne de celles relevées pour les témoins blancs (eau). Une fois cette teneur calculée, la concentration en amidon, exprimée en pourcentage de matière sèche dans l'échantillon, a été déterminée en utilisant la formule suivante :

$$[\text{Amidon}] (\% \text{MS}) = \left( A_{510\bar{X}_{\text{échantillon}}} - A_{510\bar{X}_{\text{H}_2\text{O}}} \right) * \left[ \frac{50/A_{510\bar{X}_{\text{glucose}}}}{m_{\text{échantillon}}} \right] * V_{\text{final}} * 0,9$$

$\bar{X}$  : moyenne

$A_{510}$  : Absorbance à 510 nm

m (mg) : masse de poudre végétale par échantillon

$V_{\text{final}}$  : Volume [eau (4 mL) +  $\alpha$ -amylase (600 $\mu$ L) + amyloglucosidase (30 $\mu$ L)] = 4,7 mL

## VIII. Analyses transcriptomiques

Pour les analyses transcriptomiques, les ARN totaux ont été extraits suivant le protocole mis au point dans l'équipe et décrit par Breitler (2016). Il permet d'extraire les ARN et de les conserver à 4°C pendant quelques jours avant de les congeler ou de les utiliser. Après calcul des concentrations, les ARN ont été confiés à la plateforme MGX pour l'analyse transcriptomique.

Sur les 49 banques d'ARN préparées et analysées, 27 (3 répétitions biologiques<sup>12</sup> de 9 conditions différentes) ont été comparées dans ce travail (*C. arabica* var. Marsellesa cultivé sous ombre/soleil aux 3 altitudes pour les feuilles matures, cultivé en plein soleil pour les feuilles très jeunes à l'altitude intermédiaire et pied franc/greffé cultivés au soleil).

Le séquençage à haut débit de l'ARN ou RNAseq permet d'identifier les modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles, les translocations des gènes ainsi que les variations nucléotidiques. Il est également considéré comme la méthode standard pour quantifier le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm). Pour obtenir les ARNm, les ARN totaux ont subi une première étape de ribodéplétion pour éliminer le maximum d'ARN

<sup>12</sup> Répétitions biologiques : nombre d'individu échantillonné

ribosomaux et ne garder uniquement que les ARN messagers. Pour faciliter leur analyse, les matrices d'ARN messagers ainsi obtenues ont été coupées en petits fragments (50 nucléotides) et séquencées en single-end (séquençage dans un seul sens du brin) par la technologie Illumina. La plateforme MGX a réalisé le contrôle qualité, l'alignement des reads sur le génome de référence (*C. canephora*) et le comptage des reads de chaque gène.

### VIII.1. Contrôle qualité des reads

La qualité des données brutes a été évaluée par l'outil FastQC. Cette première étape de contrôle permet de vérifier la qualité des reads, notamment la taille, la qualité des reads générés (Figure 18), le pourcentage en GC, la présence des séquences adaptatrices/primers et les séquences dupliquées ou surreprésentées. Généralement, lorsque la qualité moyenne des séquences correspondant au score qualité de séquençage donnée par l'outil FastQC se trouve entre 30-36, les données brutes sont considérées comme de très bonne qualité. Entre 20-30, elles sont encore exploitables. En dessous de 20, les séquences sont de très mauvaise qualité. Nos scores qualités étant tous supérieurs à 30, nos données brutes ont été jugées de très bonne qualité.

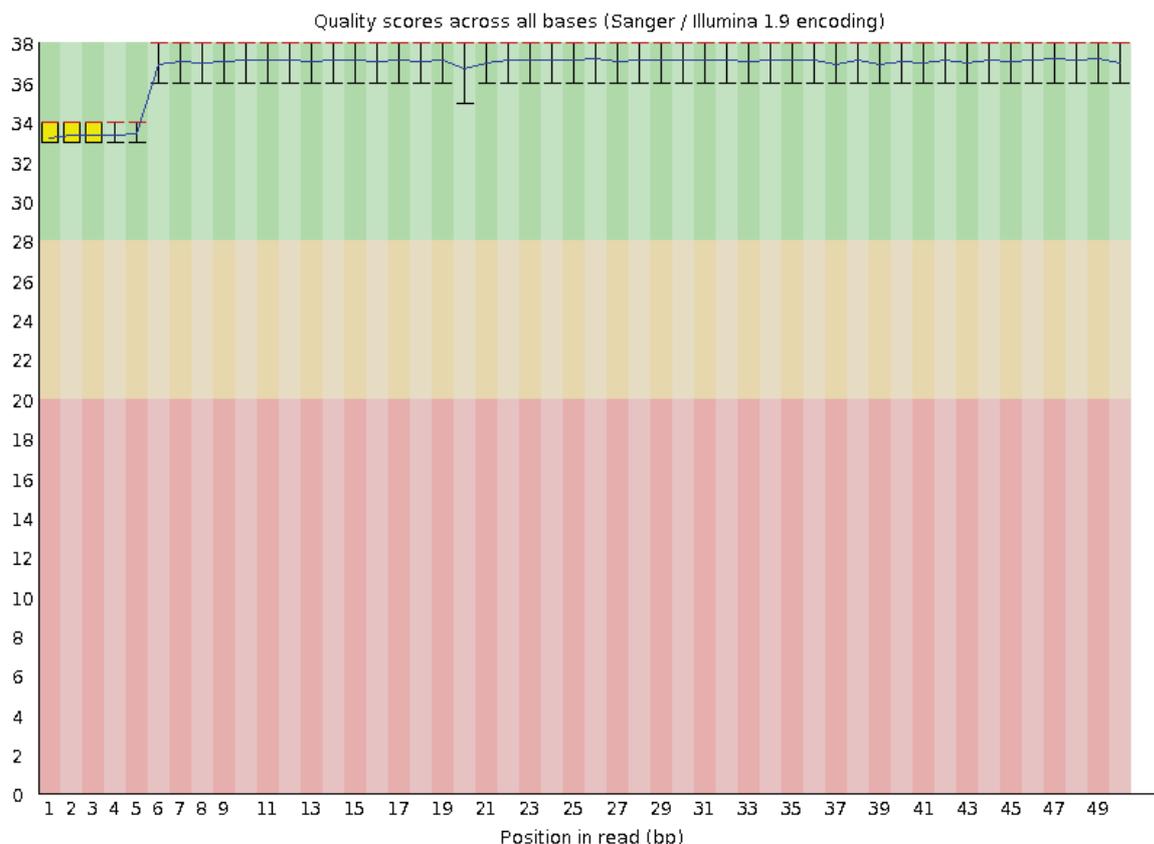


Figure 18 : Qualité des séquences par base pour les différents cycles.

L'axe des ordonnées montre les scores de qualité. Un score de qualité entre 30 et 40 indique une erreur de séquençage supérieur à 99.9%. L'arrière-plan du graphique divisé en 3 parties suivant l'axe des ordonnées indique en vert une très bonne qualité, en orange, une qualité raisonnable, en rouge une mauvaise qualité

Source : MGX Montpellier, 2016

## VIII.2. Cartographie des reads sur le génome de référence

La cartographie est une étape fondamentale pour l'analyse de l'expression différentielle. TopHat2 a été utilisé pour aligner les reads générés sur le transcriptome de référence *C. canephora* qui compte 25.574 gènes (Denoeud *et al.*, 2014). TopHat2 permet de faire des alignements plus précis en tenant compte des indels<sup>13</sup>, mismatches<sup>14</sup> de petite taille, qui sont dus aux erreurs de séquençage et gère également l'alignement des reads avec des grandes insertions/délétions ou des translocations avec l'option TopHat2-fusion inclus dans bowtie2 (programme utilisé par TopHat2 pour aligner les reads). Par ailleurs, TopHat2 possède la capacité de détecter de nouveaux sites de jonction d'alignement grâce à l'algorithme bowtie2 et fournit l'option « réalignement » (Langmead et Salzberg, 2012). Cette option permet de réaligner les reads non ou incorrectement alignés sur des potentiels sites d'épissage et de rapporter les meilleurs alignements en se basant sur la distance d'édition. La distance d'édition désigne le nombre minimum d'évènements d'insertion et de délétion pour un read<sup>15</sup> aligné. Cette capacité d'aligner le plus de reads avec précision représente respectivement la sensibilité et la spécificité de l'outil TopHat2 (Mohamed, 2018). L'algorithme est schématisé sur la figure 19.

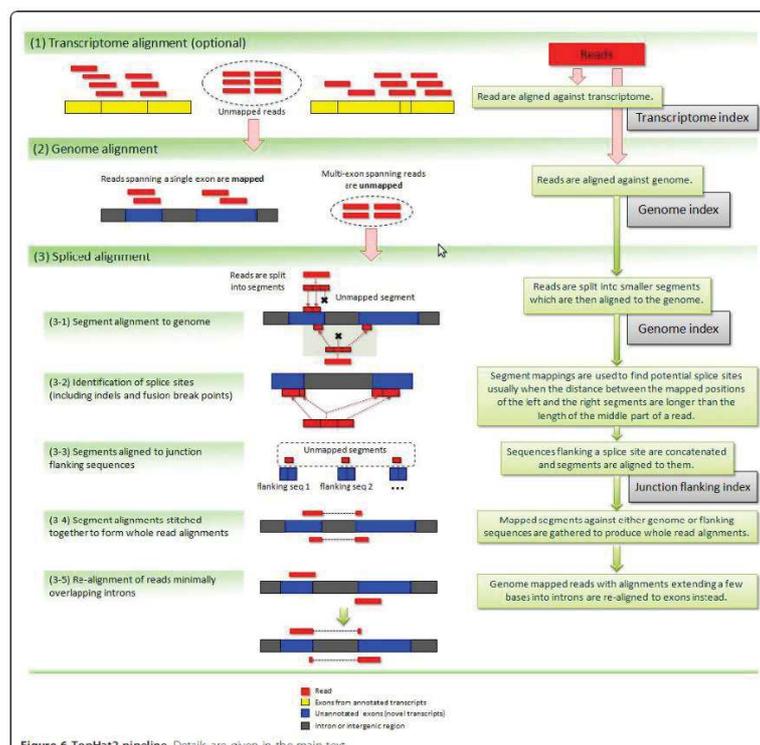


Figure 6 TopHat2 pipeline. Details are given in the main text.

Figure 19 : Description de l'algorithme TopHat2

Source : Kim *et al.*, 2013

<sup>13</sup> Indel : désigne une insertion ou une délétion dans une séquence biologique (acide nucléique ou protéine) par rapport à une séquence de référence

<sup>14</sup> Mismatches : désigne un mésappariement, c'est-à-dire un appariement des brins d'ADN non conforme aux principes biochimiques

<sup>15</sup> Read : fragment du génome

Ensuite le mapping peut être visualisé grâce au logiciel Integrative Genomics Viewer (IGV). D'autres informations sont également fournies par l'outil à savoir les scores d'alignement, le pourcentage des reads mappés<sup>16</sup> et non mappés<sup>17</sup>. Au niveau des régions codantes (exons) du génome de référence, les reads alignés se chevauchent les uns sur les autres et déterminent la profondeur du séquençage<sup>18</sup>. Il est conseillé d'avoir au moins 3 répétitions biologiques pour l'analyse de données RNAseq.

### VIII.3. Comptage des reads pour chaque gène

Après l'étape de mapping ou cartographie, les reads mappés sur le génome de référence sont comptés sur HTseq-count (Anders *et al.*, 2015).

Le principe du comptage des reads par HTSeq-count contient trois modes permettant de déterminer comment un read doit recouvrir un gène (Figure 20). Le mode « Union » a été choisi par MGX comme méthode de comptage. Après le comptage, l'outil génère un fichier dans lequel sont répertoriés l'ensemble des gènes (ID des gènes) présents dans le génome et le nombre de lectures alignées (reads) sur ces gènes.

Le résultat de l'analyse MGX est donné sous forme d'un tableau contenant les reads pour chaque gène mappé et pour chaque individu.

	union	intersection_strict	intersection_nonempty
	gene_A	gene_A	gene_A
	gene_A	no_feature	gene_A
	gene_A	no_feature	gene_A
	gene_A	gene_A	gene_A
	gene_A	gene_A	gene_A
	ambiguous (both genes with --nonunique all)	gene_A	gene_A
	ambiguous (both genes with --nonunique all)		
	alignment_not_unique (both genes with --nonunique all)		

Figure 20 : Comptage des reads avec HTseq-count.

<sup>16</sup> Read mappé : read aligné sur les exons d'un gène de manière non ambiguë

<sup>17</sup> Read non mappé : read non aligné sur les exons d'un gène

<sup>18</sup> Profondeur de séquençage : nombre moyen de reads par position mappée

## IX. Traitement des données

### IX.1. Données climatiques

Pour mieux caractériser le climat subi par les feuilles matures tout au long de leur croissance, les paramètres suivants ont été calculés durant 120 jours avant la récolte : la température moyenne (T, °C), l'humidité relative moyenne (RH, %), les précipitations cumulées (RAIN, mm) et le rayonnement solaire cumulé (SI, kW m<sup>-2</sup>). Cette durée correspond à la période de croissance d'une feuille jeune au stade mature.

### IX.2. Données morphologiques

Plusieurs mesures foliaires ont été réalisées pour caractériser les feuilles, à savoir : la longueur, la largeur, le poids sec et le nombre de stomates. Ces grandeurs ont été utilisées pour calculer certains paramètres morphologiques comme la surface foliaire (cm<sup>2</sup>), le poids spécifique (mg/cm<sup>2</sup>) et la densité stomatique des feuilles (N/mm<sup>2</sup>).

La surface foliaire (SF) est donnée par la formule classique (Ruget *et al.*, 1996) :

$$SF = L * l * 0,748$$

L : Longueur des feuilles (cm)

l : largeur des feuilles (cm)

Le poids spécifique (P. spec) a pour formule :

$$P. spec = \frac{m}{SF}$$

m : masse des feuilles (mg)

La densité stomatique (DS) a été calculée de la façon suivante :

$$DS = \frac{N}{SF}$$

N : nombre de stomate

### IX.3. Analyses statistiques

#### IX.3.1. Analyses morphologiques et biochimiques

Toutes les analyses morphologiques et biochimiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA 7 ®. Un test de d'homogénéité et un test de normalité (Test de Shapiro-Wilk) ont été réalisés avant l'analyse de variance (ANOVA).

Le test de Levene permet de tester la première hypothèse. Il consiste donc à vérifier si les variances dans les différents groupes sont homogènes ou égales. Si le test de Levene est statistiquement significatif ( $p < 0,05$ ), l'hypothèse d'homogénéité des variances doit être rejeté.

Le test de normalité consiste à déterminer la distribution des échantillons. Le test Shapiro-Wilk est utilisé pour tester la normalité qui constitue la seconde hypothèse. Si la statistique  $W$  est significative ( $p < 0,05$ ), il faut alors rejeter l'hypothèse selon laquelle la distribution correspondante est normale.

En présence d'une distribution normale et d'une homogénéité de la variance des individus, d'autres tests paramétriques ont été nécessaires dans l'analyse des données recueillies. Nous avons pour cela réalisé l'analyse de variance (ANOVA), le test  $t$  de Student et la corrélation de Pearson.

L'analyse de variance (ANOVA) permet de comparer les moyennes de plusieurs échantillons. Cette analyse nécessite deux conditions : d'abord, les échantillons doivent présenter une variance identique, ensuite ils doivent suivre une loi normale. Pour cette analyse, une comparaison post-hoc est obligatoire car elle permet d'identifier les moyennes des groupes qui sont particulièrement différentes. Nous avons utilisé le test de Newman-Keuls pour nos analyses.

Le test  $t$  de Student a le même principe que le test ANOVA. Il est utilisé pour comparer deux groupes. Ainsi, un test post-hoc n'est pas nécessaire.

La corrélation de Pearson consiste à mesurer la relation linéaire entre les valeurs de deux variables par le coefficient  $R$  de Pearson.

Dans le cas où la distribution est anormale et une inégalité de la variance est observée, des tests non paramétriques ont été utilisés : test de Mann-Whitney, l'équivalent de l'ANOVA et du test  $t$  de Student. Ce test a le même principe que ses homologues paramétriques ; la seule différence réside dans le fait que les tests non paramétriques sont basés sur des rangs.

Certaines données sont représentées en histogrammes pour faciliter la compréhension. Cette représentation a été réalisée sur Excel 2016 (Microsoft office ®).

Une analyse de co-inertie a pour objectif de montrer les corrélations entre plusieurs séries de données (covariance) utilisant le logiciel R. Dans notre cas, nous avons mis en évidence la relation entre les paramètres climatiques et les composés phénoliques dosés dans nos échantillons. Deux figures sont obtenues : les projections des variables et des individus dans un plan vectoriel à deux dimensions. Les deux axes de co-inertie présentés maximisent la covariance entre les coordonnées de projections des variables. Une des figures représente les variables et l'autre figure, les individus et les deux participent le plus à la formation des axes.

Si les variables et les individus sont répartis dans le même côté de l'axe, ils présentent des corrélations positives. Dans le cas contraire, c'est-à-dire que si les points se trouvent dans deux côtés opposés, la contribution est négative.

Les tests paramétriques ont été utilisés lors de l'étude des feuilles jeunes et matures de *C. arabica* var. Marsellesa aux trois altitudes. Pour les études des conditions ombre/soleil et des individus pied franc/greffé, les tests non para/métriques ont été privilégiés.

### IX.3.2. Analyse de l'expression différentielle

Cette étape a été réalisée avec EdgeR qui permet de quantifier les gènes différentiellement exprimés entre deux conditions (Robinson *et al.*, 2010). Ce logiciel est disponible sur la plateforme GALAXY mise en place par le service de Bioinformatique de l'IRD. Le package consiste à faire une comparaison, deux à deux, des individus de même groupe à large dispersion. Avant l'analyse différentielle, les reads alignés sur le génome de référence ont été normalisés grâce au calcul du RPKM (Reads Per Kilobase Million) selon la formule suivante :

$$\text{RPKM} = 10^9 * \frac{R}{N} * L$$

**R** désigne le nombre de reads alignés

**N** est le nombre total de reads

**L** correspond à la taille des exons du gène.

Dans l'analyse, des heatmaps ont été générés afin de visualiser les gènes différentiellement exprimés.

Le nombre de gènes différentiellement exprimés pour chaque condition a été visualisé par un diagramme de Venn disponible en ligne via le site <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>.

# RESULTATS

Partie I: Effets de l'altitude sur *C.*  
*arabica* var. *Marsellesa*

## I. Effets de l'altitude sur *C. arabica* var. Marsellea

En suivant la méthodologie de collecte résumée dans le tableau 3, nous avons, au total, travaillé sur 45 individus pour cette étude. Cette étape du travail consiste à caractériser les réponses morphologiques, biochimiques et transcriptomiques aux variations climatiques subies par les caféiers. Les différentes conditions obtenues grâce à des mesures réalisées sur trois années consécutives, sur les trois sites au Mexique, permettent de déterminer les facteurs climatiques qui auraient plus d'impact sur la croissance et le métabolisme secondaire, principalement sur les composés phénoliques des *C. arabica* var. Marsellea. Les analyses transcriptomiques effectuées à différents stades de croissance foliaire facilitent la compréhension de la synthèse des composés phénoliques et leur évolution au cours du développement foliaire en reliant l'expression des gènes et la teneur en composés des feuilles.

### I.1. Caractérisation climatique du dispositif altitudinal pour les trois ans d'études

Les paramètres climatiques ont été enregistrés durant les quatre mois précédant la récolte et les données retenues sont résumées dans le tableau 6. Il a été noté que, quelle que soit l'année de récolte, la température moyenne la plus élevée a été toujours observée à la plus basse altitude (650 m). Inversement, l'humidité relative a été toujours plus élevée à la plus haute altitude (1250m), avec une valeur maximale de 86,14 % en 2015 et un minimum de 76,17% enregistré en 2014 à 650m. Ces observations montrent que la température suit un gradient inverse à l'altitude, alors que l'humidité relative suit un gradient altitudinal.

Pour les deux autres paramètres enregistrés (radiation solaire (SI) et précipitations (RAIN)), aucune relation avec l'altitude n'a été notée, excepté que le rayonnement solaire cumulé est toujours plus faible à haute altitude. Cependant, en 2016, nous avons constaté une relation inverse entre l'altitude et le rayonnement solaire cumulé. De la même manière, une relation positive entre altitude et précipitation cumulée ne peut être établie qu'en 2015.

Globalement, ces résultats montrent qu'il est difficile d'attribuer un climat propre à chaque altitude mais que la température et l'humidité relative sont liées à l'altitude pour les trois années d'étude.

Tableau 6 : Evolution des paramètres climatiques durant trois années consécutives sur chaque station de récolte. Les valeurs ont été calculées en tenant compte des données enregistrées pendant les quatre mois précédant la récolte. Moyenne des températures (T, °C) ; rayonnement solaire cumulé (SI, kW.m<sup>-2</sup>) ; précipitations cumulées (RAIN, mm) ; moyenne de l'humidité (RH, %)

Année	Altitude (m)	T (° C)	SI (kW.m <sup>-2</sup> )	RAIN (mm)	RH (%)
2014	650	22,05	40,00	376,80	76,17
	1050	20,21	45,09	234,00	77,10
	1250	18,17	21,63	331,60	78,58
2015	650	20,04	25,54	255,20	82,46
	1050	18,46	37,02	343,20	84,49
	1250	16,42	22,01	444,59	86,14
2016	650	23,30	43,43	402,00	75,00
	1050	19,70	40,25	325,00	76,00
	1250	19,00	24,13	427,40	78,50

## I.2. Variations morphologiques de *C. arabica* en fonction de l'altitude

Les mesures ont été réalisées sur 5 plantes et 10 feuilles matures. Trois paramètres morphologiques ont été pris en compte pour l'arbre (hauteur, diamètre et nombre d'entre-nœuds de la plante) et deux autres pour la feuille (longueur et largeur). Les résultats des mesures effectuées sont récapitulés dans le tableau 7. Vus les résultats obtenus en 2014, aucune différence morphologique notable n'a été observée au niveau de la plante et des feuilles, excepté pour la plus haute altitude où les feuilles ont présenté une largeur significativement supérieure (60,37 cm par rapport à 53,87 cm et 55,62 cm pour les altitudes 1050 m et 650m respectivement).

Pour les deux autres années, les paramètres de croissance des plantes ont montré des valeurs d'autant plus basses que l'altitude est élevée, excepté en 2015, pour la hauteur totale des plantes. Autrement dit, la valeur maximale des paramètres de l'arbre a toujours été notée chez les individus cultivés à basse altitude (650 m). Par exemple, en 2015, la hauteur des individus cultivés à 1050 m et 1250 m ont représenté respectivement 83% et 98% de celle des individus cultivés à 650m. Alors qu'en 2016, la hauteur des caféiers en haute altitude (1050 m et 1250 m) a été 91% moins élevée que celle des individus cultivés à 650 m. Les mêmes variations ont été enregistrées pour le diamètre et le nombre d'entre-nœuds.

En ce qui concerne la taille des feuilles, un comportement inverse est observé : plus l'altitude est élevée, plus les feuilles sont grandes. Les plus grandes différences ont été observées en 2015, les feuilles à 1050 m et 650 m étant respectivement 84% et 74% moins longues et 84% et 66%

moins larges que celles d'Inifap (1250 m). La comparaison de ces valeurs moyennes a également montré que la taille des feuilles était indépendante de l'année de récolte ; les mesures prises en 2016 étant parfois supérieures à celles de 2014 ou 2015.

En résumé, la morphologie de l'arbre n'est pas liée à l'altitude, contrairement à celle de la taille des feuilles.

Tableau 7 : Mesures réalisées avant chaque récolte, chaque année de 2014 à 2016, à chaque station sur cinq individus.

Les valeurs représentent la moyenne de la hauteur, du diamètre et du nombre d'entre-nœuds de la plante, de la longueur et de la largeur des feuilles (N = 10). Test statistique : ANOVA, test post-hoc : Newman-keuls à  $p < 0,05$

Année	Station	Altitude (m)	Caractéristiques morphologiques				
			Plante			Feuilles matures	
			Hauteur (cm)	Diamètre (cm)	Entre- nœuds (N)	Longueur (mm)	Largeur (mm)
2014	Colpos	650	53,87 a	1,06 a	10,50 a	121,37 a	55,62 a
	Roma	1050	57,25 a	0,94 a	11,25 a	122,75 a	53,87 a
	Inifap	1250	48,87 a	1,11 a	10,25 a	127,50 a	60,37 b
	F		1,137	3,486	3,900	0,804	9,568
	p		0,363	0,076	0,060	0,477	<b>0,006</b>
2015	Colpos	650	121,20 b	35,00 b	28,00 b	118,83 a	50,30 a
	Roma	1050	100,80 a	32,16 ab	27,20 b	134,85 b	63,79 b
	Inifap	1250	118,60 b	29,00 a	22,80 a	161,17 c	75,87 c
	F		7,652	4,804	12,511	17,002	21,811
	p		<b>0,007</b>	<b>0,029</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
2016	Colpos	650	140,60 a	48,12 a	36,60 c	127,80 a	56,20 a
	Roma	1050	127,80 a	47,00 a	29,00 b	134,20 a	63,40 ab
	Inifap	1250	127,60 a	38,20 a	25,80 a	148,00 b	69,40 b
	F		0,607	0,933	36,928	5,869	7,961
	p		0,560	0,420	<b>0,000</b>	<b>0,017</b>	<b>0,006</b>

L'évolution de ces caractéristiques morphologiques a été comparée à celles des données climatiques, en fonction de l'altitude, sur les trois années de récolte. Comme le montre le tableau 8, aucune corrélation n'a pu être établie entre les critères morphologiques concernant la plante et les données météorologiques, excepté entre le nombre d'entre-nœuds et la température (faible corrélation positive de  $R = 0,331$  à  $p < 0,05$ ).

Par contre, une relation fortement significative a existé entre la croissance foliaire et les différents paramètres climatiques. En effet, la longueur et la largeur des feuilles ont été étroitement liées (à  $p < 0,001$ ) à la température (corrélation négative) et à la pluviométrie (corrélation positive). Une corrélation moyenne mais significative ( $p < 0,01$ ) a été également notée avec le rayonnement solaire et l'humidité.

Ainsi, il semble que la croissance de l'arbre ne dépend pas des conditions climatiques et que celle des feuilles est stimulée par la pluie et l'humidité relative mais limitée par les fortes températures et les fortes lumières.

Tableau 8 : Corrélation de Pearson entre les paramètres climatiques et les mesures morphologiques (N=90). Moyenne des température (T, °C) ; rayonnement solaire cumulé (SI, kW.m<sup>-2</sup>) ; précipitation (RAIN, mm) ; humidité relative (RH, %).  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\* ; ns non significative

Morphologie		Paramètres climatiques			
		T	SI	RAIN	RH
Plante	Hauteur (cm)	0,150 ns	-0,070ns	0,297ns	0,116ns
	Diamètre (cm)	0,206 ns	0,029ns	0,221ns	0,039ns
	Entre-nœuds (N)	<b>0,331*</b>	0,063ns	0,223ns	0,111ns
Feuilles matures	Longueur (mm)	<b>-0,525***</b>	<b>-0,406**</b>	<b>0,640***</b>	<b>0,416**</b>
	Largeur (mm)	<b>-0,571***</b>	<b>-0,401**</b>	<b>0,655***</b>	<b>0,394**</b>

### I.3. Variations biochimiques des feuilles jeunes et matures de *C. arabica*

#### I.3.1. Identification des composés

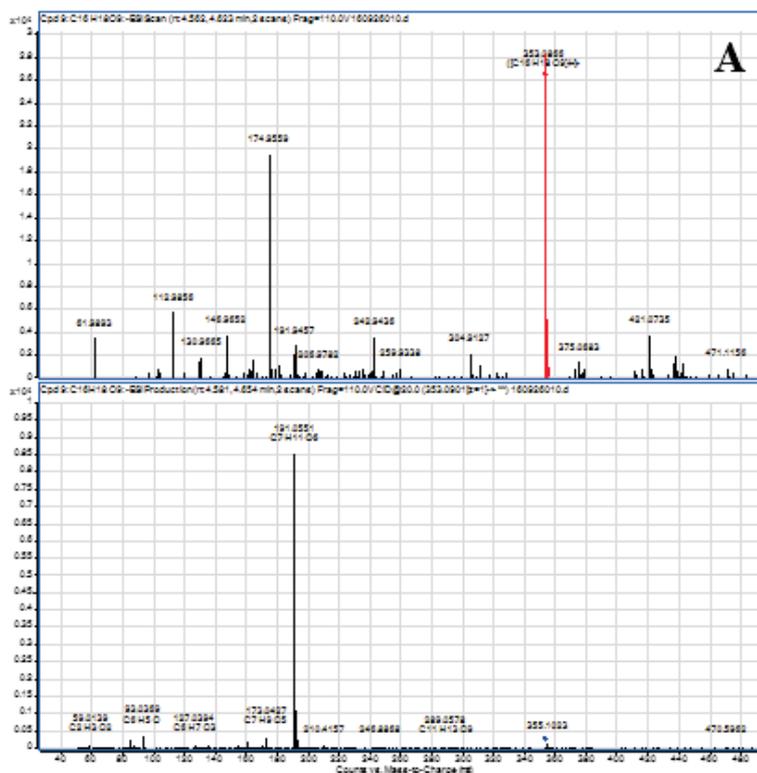
L'analyse LC-MS, réalisée à l'Université Claude-Bernard Lyon 1, a permis d'identifier 23 métabolites appartenant aux groupes des flavanols, flavones, flavonols, xanthones et esters d'acide hydroxycinnamiques pour les composés phénoliques et aux alcaloïdes. Ils ont été annotés grâce à leurs masses, leurs absorbances et leurs fragmentations (Tableau 9 et Annexe I).

Tableau 9 : Liste des composés analysés par LC-MS selon leur ordre d'éluion, avec leur temps de rétention (TR), leur masse en Da, leur formule brute, les longueurs d'onde auxquelles les maxima ont été observés, leur nom proposé, leur masse après la fragmentation en ion positif et négatif, et les fragments générés. \* : individu confirmé par un standard.

Pic N°	TR (min)	Masse (Da)	Formule moléculaire	Longueur d'onde (nm)	Nom des composés	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	[M-H] <sup>+</sup>	MS/MS
1	2,61	180,164	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	272	Théobromine*	-	-	181,072	67 (100) 85 (78) 181 (74) 138 (65)
2	3,00	354,309	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique	353,090	191 (100) 179 (61) 135 (47) 173 (6)	355,100	163 (100) 145 (24) 89 (9)
3	4,03	408,356	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	286	Iriflophénone 3- <i>C</i> -β-glucoside	407,101	287 (100) 317 (23) 245 (61) 193 (47) 125 (8)	409,111	195 (100) 231 (79) 13 (61) 325 (46) 177 (43) 121 (39) 271 (39)
4	4,20	290,270	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	278	(+)-Catéchine*	-	-	291,086	139 (100) 123 (59) 161 (12) 207 (6)
5	4,43	354,309	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique*	353,090	191 (100) 179 (2) 173 (1)	355,100	163 (100) 145 (11) 117 (4)
6	4,75	354,309	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique	353,090	191 (100) 173 (21) 179 (11)	355,100	163 (100) 145 (14) 117 (8) 89 (2)
7	4,90	194,190	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	272	Caféine*	-	-	195,089	138 (100) 110 (36) 195 (29) 69 (21)
8	5,42	290,270	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	278	(-)-Epicatechine*	289,071	109 (100) 203 (74) 125 (65) 151 (43) 245 (39)	-	-
9	5,62	338,309	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	310	Acide 5- <i>O</i> -coumaroylquinique	337,095	191 (100) 133 (17) 53 (12)	339,109	147 (100) 75 (23) 97 (23) 236 (23)
10	6,09	422,340	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	257-317-365	Mangiférine	421,080	301 (100) 331 (85) 259 (12) 421 (15) 273 (10)	423,091	273 (100) 303 (74) 327 (51) 369 (22) 351 (18) 299 (15) 357 (9)
11	6,80	368,335	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	258-267sh-300sh-327	Acide 5- <i>O</i> -fêruloylquinique	367,106	191 (100) 93 (21) 173 (11) 111 (7) 134 (4)	369,116	177 (100) 145 (42) 117 (5)
12	6,81	594,518	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	257-300sh-353	Flavone di- <i>C</i> -glycoside	593,156	593 (100) 473 (11) 353 (10) 406 (10) 503 (8)	595,164	457 (100) 427 (67) 379 (35) 325 (29) 295 (12)
13	6,86	772,658	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	257-300sh-353	Quercétine 3- <i>O</i> -dihexoside-deoxyhexoside	771,204	771 (100) 300 (53) 179 (5) 273 (5) 271 (5)	773,213	303 (100) 125 (53) 84 (26) 194 (13)
14	6,97	626,517	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	257-300sh-353	Quercétine 3,4-di- <i>O</i> -glucoside*	625,145	625 (100) 300 (72) 271 (10) 179 (3) 445 (3) 463 (3) 505 (3)	627,151	303 (100)
15	7,34	756,659	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	265-346	Kaempférol 3- <i>O</i> -dihexose-deoxyhexose	-	-	757,213	287 (100) 449 (6) 129 (6) 757 (6) 612 (1)
16	7,74	610,518	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	257-353	Quercétine 3- <i>O</i> -rutinoside*	609,154	609 (100) 300 (20)	611,160	303 (100)
17	7,90	578,520	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	257-353	Procyanidine	577,139	289 (100) 577 (83) 407 (72) 125 (61) 161 (17) 451 (11)	579,147	287 (100) 409 (94) 127 (84) 163 (31) 247 (19) 579 (13)
18	7,96	464,380	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	257-353	Quercétine 3-β-D-glucoside	463,091	300 (100) 463 (48) 191 (19) 271 (10)	465,102	303(100)
19	8,20	594,518	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	265-346	Kaempférol 3- <i>O</i> -hexose-deoxyhexose	-	-	596,163	287 (100) 596 (1)
20	8,39	516,451	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	246-300sh-324	Acide 3,4- <i>O</i> -dicaféoylquinique*	-	-	517,132	163 (100) 63 (27) 140 (18) 191 (18) 370 (11)
21	8,48	516,451	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	243-297sh-327	Acide 3,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique*	515,123	191 (100) 353 (91) 179 (63) 135 (13) 173 (6) 515 (3)	517,132	140 (100) 163 (77) 519 (64) 213 (59) 117 (41) 303 (41) 189 (27)
22	8,94	516,451	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	243-297sh-327	Acide 4,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique*	515,123	353 (100) 173 (73) 179 (53) 135 (11) 515 (3)	517,132	163 (100) 111 (18) 383 (14) 435 (14) 224 (5)
23	9,49	542,445	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	257-317-365	Parahydroxybenzoate de mangiférine	541,102	301 (100) 331 (79) 541 (53) 259 (6) 385 (6)	543,112	303 (100) 121 (96) 405 (24) 327 (23) 543 (21)

Les composés appartenant au groupe des flavanols ont été constitués par l'épicatéchine et la catéchine (identifiées grâce à un standard) ainsi que la procyanidine. Le flavone-di-C-hexose a représenté le seul flavone identifié. Les flavonols annotés ont été glycosylés : quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose, quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (identifié grâce à un standard), quercétine 3-*O*-glucoside, quercétine 3-*O*-rutinoside ou rutine (identifié grâce à un standard), kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose et kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose. La mangiférine, le parahydroxybenzoate de mangiférine et l'iriflophénone-3-*C*- $\beta$ -glucoside ont été attribués au groupe des xanthones. Parmi les esters d'acides hydroxycinnamiques, aussi appelés acides chlorogéniques, il a été possible d'identifier l'acide 5-*O*-caféoylquinique (utilisation d'un standard), l'acide 3-*O*-caféoylquinique, l'acide 4-*O*-caféoylquinique, l'acide 3,4-*O*-dicaféoylquinique (standard), l'acide 3,5-*O*-dicaféoylquinique (standard), l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique (standard), l'acide 5-*O*-féruloylquinique et l'acide 5-*O*-coumaroylquinique. Les deux alcaloïdes identifiés ont été la théobromine et la caféine. Un exemple de spectre de masse de l'acide 5-*O*-caféoylquinique est présenté sur la figure 21.

Ainsi, nous avons annoté au total 2 alcaloïdes et 21 composés phénoliques dont trois flavanols, un flavone, six flavonols, trois xanthones et huit esters d'acide hydroxycinnamiques.



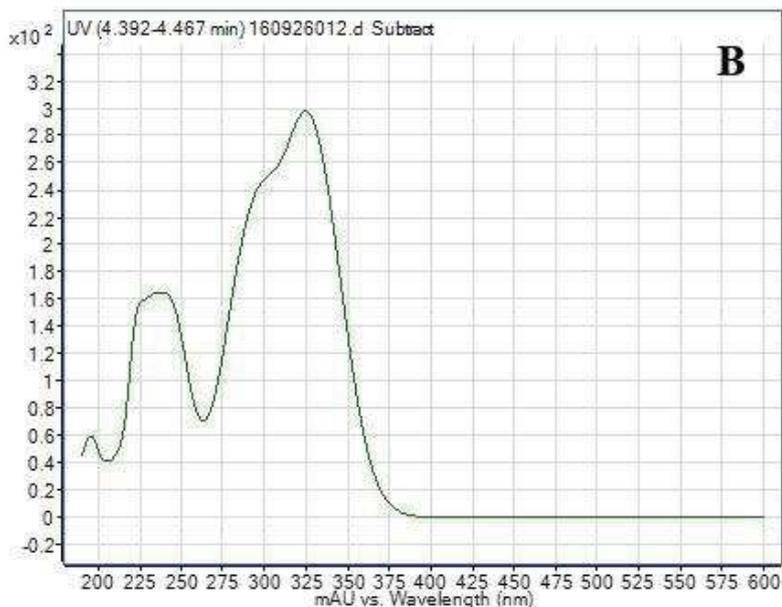


Figure 21 : (A) Exemple de spectre de masse en mode d’ionisation négatif ; (B) exemple de spectre UV de l’acide 5-*O*-caféoylquinique

### I.3.2. Quantification des composés phénoliques dans les feuilles matures

Le dosage a été effectué sur 5 individus prélevés par altitude et par année. Dans les feuilles des 45 individus étudiés, les 23 composés identifiés ont été détectés. 18 d’entre eux ont été présents en concentration suffisante pour être quantifiés par HPLC ( Figure 22). A cause de leur faible teneur, la procyanidine, l’iriflophénone-3-*C*- $\beta$ -glucoside, la quercétine 3-*O*-glucoside, l’acide 3-*O*-caféoylquinique et l’acide 5-*O*-coumaroylquinique n’ont pas été dosés dans les échantillons.

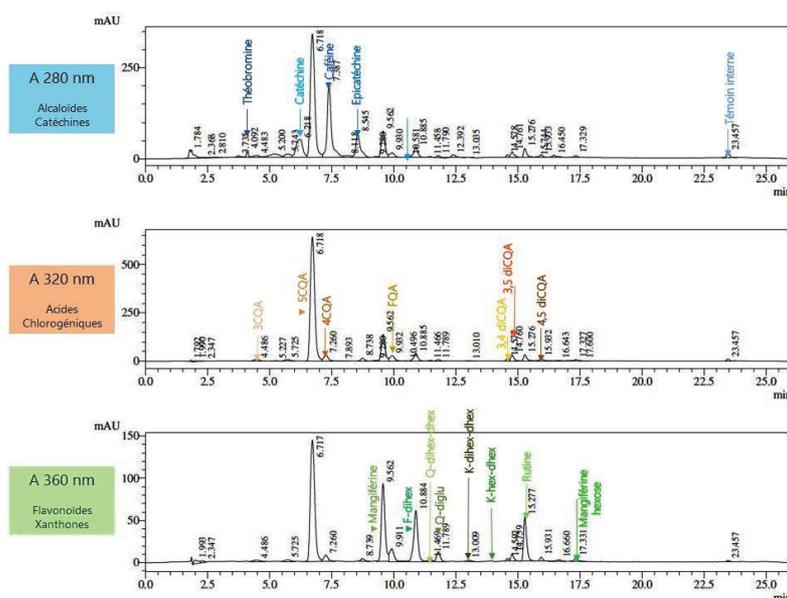


Figure 22 : Exemple de chromatogrammes d’extract méthanolique des feuille

Ces résultats suggèrent que l'évolution de la teneur en acides chlorogéniques n'est pas en liaison directe avec l'altitude.

Concernant les xanthones, la teneur en mangiférine (Mang) a été largement supérieure (50%) à celle de parahydroxybenzoate de mangiférine. La concentration minimale détectée pour la mangiférine a été en 2014 à 650 m (0,91 %) et la plus élevée (1,70%) a été notée en 2016 à 1250 m. Si sa teneur ne semble pas être liée à l'altitude, il apparaît cependant qu'elle évolue positivement selon les années de prélèvement pour un même site, montrant des valeurs plus élevées en 2015 et 2016. Tout comme pour la mangiférine, le taux en parahydroxybenzoate de mangiférine (Mang-OHbenz) a augmenté au cours des trois années ; les différences entre stations sont devenues alors significatives en 2016.

Tableau 10 : Moyennes des teneurs en acides chlorogéniques et en xanthones exprimées en pourcentage de matière sèche sur les trois stations altitudinales durant les trois années de récolte.

Acide 5-O-caféoylquinique (5-CQA), acide 4-O-caféoylquinique (4-CQA), acide 3,4-O-dicaféoylquinique (3,4-diCQA), acide 3,5-O-dicaféoylquinique (3,5-diCQA), acide 4,5-O-dicaféoylquinique (4,5-diCQA), acide 5-O-féruloylquinique (FQA) ; Mangiférine (Mang) ; parahydroxybenzsssssoate de mangiférine (Mang-OHbenz).  
Test statistique : ANOVA, test post-hoc : Newman-keuls  $p < 0,05$ .

Année	Altitude (m)	Composés phénoliques (% DW)							
		Acides chlorogéniques						Xanthones	
		5-CQA	4-CQA	3,4-diCQ	3,5-diCQ	4,5-diCQ	FQA	Mang	Mang-OHbenz
2014	650	2,844a	0,225a	0,028a	0,036a	0,059b	0,080a	0,914a	0,021a
	1050	3,620b	0,157a	0,019a	0,061b	0,021a	0,079a	1,033a	0,018a
	1250	3,957b	0,215a	0,029a	0,073b	0,030ab	0,112b	1,109a	0,027a
	<i>F</i>	8,415	3,658	2,695	6,738	4,857	8,154	1,028	1,818
	<i>P</i>	<b>0,009</b>	0,069	0,121	<b>0,016</b>	<b>0,037</b>	<b>0,010</b>	0,396	0,217
2015	650	4,526b	0,194b	0,037b	0,120a	0,036c	0,070b	1,685a	0,046a
	1050	3,706ab	0,216b	0,023ab	0,056a	0,025b	0,004a	1,309a	0,034a
	1250	2,962a	0,124a	0,014a	0,066a	0,013a	0,051b	1,310a	0,028a
	<i>F</i>	4,095	3,039	4,162	2,821	6,264	5,174	1,361	2,471
	<i>P</i>	0,050	0,093	<b>0,048</b>	0,107	<b>0,017</b>	<b>0,029</b>	0,300	0,134
2016	650	3,396b	0,168b	0,020a	0,032a	0,034b	0,100a	1,696b	0,051b
	1050	3,468b	0,177b	0,019a	0,042a	0,021a	0,083a	1,186a	0,036a
	1250	3,103a	0,113a	0,021a	0,087b	0,021a	0,072a	1,408ab	0,032a
	<i>F</i>	4,233	10,042	0,171	37,110	16,032	0,731	6,410	8,133
	<i>P</i>	<b>0,041</b>	<b>0,003</b>	0,849	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,500	<b>0,013</b>	<b>0,006</b>

Les flavonoïdes quantifiés appartiennent à trois groupes : les flavones, les flavanols et les flavonoïdes glycosylés (Tableau 11). Concernant le seul flavone quantifié, le flavone-di-C-hexose (F-dihex), la valeur maximale (0,98 %) a été notée en 2016 à 650 m et la teneur la plus basse (0,66 %) a été enregistrée la première année à 1250 m. Quelle que soit l'année de récolte,

ce composé a été d'autant plus accumulé que l'altitude a été élevée. En ce qui concerne les flavanols, la catéchine (catechin) a été plus représentée que l'épicatéchine (Epicat). Les teneurs maximales en catéchine et en épicatéchine ont été quantifiées (2,22% et 1,49 % respectivement) en 2015 à 650 m tandis que les valeurs minimales ont été détectées en 2014 à 1250 m pour la catéchine (0,74 %) et pour l'épicatéchine (0,63 %). La comparaison des concentrations suivant l'altitude et selon les années de récolte semble montrer que l'accumulation de ces composés dans les feuilles ne dépend pas de l'altitude.

Trois dérivés de quercétine ont été recensés parmi les flavonoïdes glycosylés : la quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (Q-dihex-dhex), la quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (Q-diglu) et la rutine (Rutin). Le composé majoritaire a été identifié à la rutine avec des teneurs qui ont atteint 19 fois plus élevées que la teneur en Q-dihex-dhex. Des différences significatives entre les taux des flavonoïdes n'ont été observées qu'à partir de la deuxième année sauf pour la rutine. Une augmentation avec l'altitude n'a été enregistrée que pour les quercétines glycosylées durant la troisième année et pour la rutine lors les deux premières années.

Il est à noter que des dérivés glycosylés du kaempférol ont été accumulés dans les feuilles lors de la troisième année de mesure et uniquement aux altitudes les plus basses. Le kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (K-dihex-dhex) n'a été détecté qu'à la plus basse altitude, tandis que le kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose (K-hex-dhex) a été présent aux deux altitudes basses (650 m et 1050 m).

En résumé, 16 composés phénoliques ont pu être quantifiés dans les feuilles matures. Parmi eux, nous avons pu lister les esters d'acides hydroxycinnamiques (2 CQAs (4-CQA et 5-CQA)) et les 3 diCQs, le FQA, les xanthones (mangiférine (Mang) et le parahydroxybenzoate de mangiférine (Mang-OHbenz)) et les flavonoïdes (une flavone, deux flavanols, et cinq flavonols glycosylés). Il semble difficile de pouvoir lier l'accumulation d'un composé dans la feuille mature à l'altitude à laquelle l'arbre est planté.

Nous avons montré précédemment que les paramètres climatiques ont évolué différemment selon l'altitude mais également selon l'année de prélèvement. Etant donné que ces paramètres ont pu intervenir sur l'expression du métabolisme secondaire, il nous a paru intéressant d'étudier la relation qui pouvait exister entre ces paramètres climatiques et les teneurs en composés.

Tableau 11 : Moyennes des teneurs en flavonoïdes exprimées en pourcentage de matière sèche sur les trois stations altitudinales durant les trois années de récolte.

Flavone-di-C-hexose (F-dihex) ; quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (Q-dihex-dhex) ; quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (Q-diglu) ; rutine (Rutin), kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (K-dihex-dhex) ; kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose (K-hex-dhex) ; catéchine (Catechin) et épicatechine (Epicat). Test statistique : ANOVA, test post-hoc : Newman-keuls  $p < 0,05$ .

Année	Altitudes (m)	Composés phénoliques (% DW)							
		Flavonoïdes						Flavanols	
		Flavonoïdes glycosylés						Catechin	Epicat
F-dihex	Q-dihex-dhex	Q-diglu	Rutin	K-dihex-dhex	K-hex-dhex				
2014	650	0,472b	0,048a	0,329a	0,616a	0	0	0,905ab	0,780ab
	1050	0,355a	0,065a	0,329a	0,731a	0	0	1,272b	0,945b
	1250	0,256a	0,050a	0,321a	0,915a	0	0	0,736a	0,631a
	<i>F</i>	9,350	2,850	0,019	1,598			4,340	4,022
	<i>p</i>	<b>0,006</b>	<b>0,110</b>	<b>0,981</b>	<b>0,255</b>			<b>0,048</b>	<b>0,056</b>
2015	650	0,604a	0,037a	0,179a	0,663a	0	0	2,226b	1,484b
	1050	0,503a	0,074b	0,349ab	0,821a	0	0	1,380a	1,272b
	1250	0,342a	0,045a	0,217a	0,951a	0	0	1,136a	0,485a
	<i>F</i>	1,221	12,231	4,237	1,076			10,724	16,514
	<i>p</i>	0,335	<b>0,002</b>	<b>0,046</b>	0,377			<b>0,003</b>	<b>0,001</b>
2016	650	0,976c	0,085c	0,422b	1,195b	0,026b	0,041c	1,180b	0,951a
	1050	0,541b	0,067b	0,346b	0,811a	0,000a	0,018b	1,395c	1,167a
	1250	0,330a	0,039a	0,215a	0,734a	0,000a	0,000a	0,946a	1,079a
	<i>F</i>	48,170	15,850	17,411	10,142	8,554	25,123	10,661	2,442
	<i>p</i>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	0,129

### I.3.3. Relation entre la teneur en composés et les paramètres climatiques

En associant les données climatiques sur les trois sites aux teneurs en composés phénoliques enregistrées sur les trois années d'étude, nous avons obtenu une série de données assez importantes permettant de comparer 9 situations différentes. Ces données ont été analysées en utilisant la corrélation de Pearson et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12.

En ce qui concerne les acides chlorogéniques, une corrélation négative (significative à  $p < 0,01$ ) de la teneur en CQAs avec les précipitations a été mise en évidence ; le 5-CQA a présenté une relation plus forte que le 4-CQA. Par contre, la teneur totale en diCQs a été faiblement et négativement corrélée ( $p < 0,05$ ) avec le rayonnement solaire. En effet, le taux des isomères a présenté des liens plus ou moins forts avec un des différents paramètres climatiques : le 3,4-diCQA semble être corrélé négativement aux précipitations, le 3,5-diCQA avec le rayonnement solaire, et le 4,5-diCQA a été corrélé positivement avec la température ( $p < 0,001$ ). En ce qui concerne le FQA, sa teneur a été fortement liée à l'humidité relative.

Concernant les flavonoïdes glycosylés, ils ont tous présenté, sauf la rutine, des liens très significative avec les deux paramètres climatiques à savoir la température et les rayonnements solaires. Pour la rutine, sa teneur semble être corrélée avec les précipitations. Si les concentrations en F-dihex, en K-dihex-dhex et en K-hex-dhex ont été fortement liées avec la température, celles des quercétines glycosylées ont été plus dépendantes des rayonnements solaires. Avec des teneurs négativement corrélées aux précipitations, les flavanols ont eu les mêmes relations que les CQAs avec les paramètres climatiques. Quant aux xanthones, seul le parahydroxybenzoate de mangiférine a présenté une corrélation avec la température.

Tableau 12 : Corrélations de Pearson entre les paramètres climatiques et les teneurs en composés phénoliques. Moyenne des températures (T, °C) ; rayonnement solaire cumulé (SI, kW.m<sup>2</sup>) ; précipitation (RAIN, mm) ; humidité relative (RH, %) ; acide 5-*O*-caféoylquinique (5-CQA), acide 4-*O*-caféoylquinique (4-CQA), acide 3,4-*O*-dicaféoylquinique (3,4-diCQA), acide 3,5-*O*-dicaféoylquinique (3,5-diCQA), acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique (4,5-diCQA), acide 5-*O*-fêruloïlquinique (FQA) ; Mangiférine (Mang) ; parahydroxybenzoate de mangiférine (Mang-OHbenz) ; flavone-di-*C*-hexose (F-dihex) ; quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (Q-dihex-dhex) ; quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (Q-diglu) ; rutine (Rutin), kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (K-dihex-dhex) ; kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose (K-hex-dhex) ; catéchine (catechin) et épicatechine (Epicat). p <0.05 : \* ; p<0.01 : \*\* ; p<0.001 : \*\*\* ; ns : non significative

Caractéristiques foliaires	Paramètre climatiques			
	T	SI	RAIN	RH
<b>Composés phénoliques</b>				
5-CQA	0,010ns	-0,108ns	<b>-0,625***</b>	0,124ns
4-CQA	0,225ns	0,217ns	<b>-0,416***</b>	-0,070ns
<b>CQAs</b>	<b>0,026ns</b>	<b>-0,088ns</b>	<b>0,631***</b>	<b>0,114ns</b>
3,4-diCQ	0,187ns	-0,155ns	-0,449**	-0,002ns
3,5-diCQ	-0,281ns	<b>-0,533***</b>	-0,265ns	0,357*
4,5-diCQ	0,531***	0,201ns	-0,145ns	-0,306*
<b>diCQs</b>	<b>-0,002ns</b>	<b>-0,356*</b>	<b>-0,326*</b>	<b>0,165ns</b>
FQAs	0,329*	0,028ns	-0,045ns	0,554***
F-dihex	<b>0,706***</b>	<b>0,463**</b>	-0,020ns	-0,299ns
Q-dihex-dhex	<b>0,367*</b>	<b>0,650***</b>	-0,016ns	-0,295ns
Q-diglu	<b>0,416**</b>	<b>0,605***</b>	0,011ns	<b>-0,442**</b>
Rutin	0,137ns	0,077ns	0,304*	-0,064ns
K-dihex-dhex	<b>0,583***</b>	<b>0,339**</b>	0,224ns	<b>-0,348**</b>
K-hex-dhex	<b>0,669***</b>	<b>0,497***</b>	0,180ns	<b>0,525***</b>
<b>Flavonoïdes glycosylés</b>	<b>0,543***</b>	<b>0,435**</b>	<b>0,156ns</b>	<b>-0,302ns</b>
Catéchine	0,078ns	0,013ns	<b>-0,558***</b>	0,272ns
Épicatéchine	0,235ns	0,168ns	<b>-0,481***</b>	-0,009ns
<b>Flavanols</b>	<b>0,163ns</b>	<b>0,090ns</b>	<b>0,582***</b>	<b>0,164ns</b>
Mangiférine	0,216ns	-0,135ns	0,032ns	0,126ns
Mang-OHbenz	<b>0,410**</b>	0,033ns	-0,037ns	-0,046ns
<b>Xanthones</b>	<b>0,225ns</b>	<b>-0,130ns</b>	<b>0,030ns</b>	<b>0,121ns</b>

La co-inertie permet de visualiser les relations entre paramètres climatiques et teneurs en composés en fonction des années (Figure 23). La figure 23A illustre cette corrélation. L'axe C1 oppose l'humidité relative aux deux autres paramètres : température et rayonnement solaire. Tous les flavonoïdes, exceptés la rutine, deux acides chlorogéniques (FQA et 4,5-diCQ) et la mangiférine, mais très faiblement, semblent avoir une relation positive avec le rayonnement solaire et la température. La teneur en 3,5-diCQ a montré une corrélation positive avec l'humidité relative. Sur l'axe C2 les précipitations semblent avoir une relation négative avec les flavanols (catéchine et épicatechine) ainsi qu'avec les 4-CQA, 5-CQA et 3,4-diCQ.

La figure 23A montre que l'accumulation en flavonoïdes, exceptée celle de la rutine, a augmenté avec l'intensité du rayonnement solaire et la température, alors que les flavanols et la plupart des acides chlorogéniques ont été accumulés quand les précipitations ont diminué. Elle souligne également que les paramètres climatiques n'ont qu'un faible impact sur la synthèse de la mangiférine et que les isomères de diCQs ont répondu différemment aux variations climatiques (rayonnement solaire, température et humidité relative).

La figure 23B représente la distribution des individus de chaque prélèvement en fonction des composés phénoliques accumulés. Il est intéressant de noter que durant la première année, aucune différence n'a été réellement notée entre les prélèvements effectués aux différentes altitudes (représentée en orange), alors qu'une forte dispersion a été observée pour les deux autres années. Cette répartition semble être liée aux précipitations pour la deuxième année de récolte (représentée en bleu) et aux rayonnements solaires et/ou à la température pour la troisième année (représentée en violet).

En conclusion, les deux analyses ont permis de définir quelques relations entre les teneurs en composés et les paramètres climatiques : une corrélation positive entre les teneurs en composés phénoliques et deux paramètres climatiques (température et rayonnement solaire) et une corrélation négative entre les teneurs en CQAs, en flavanols et les précipitations.

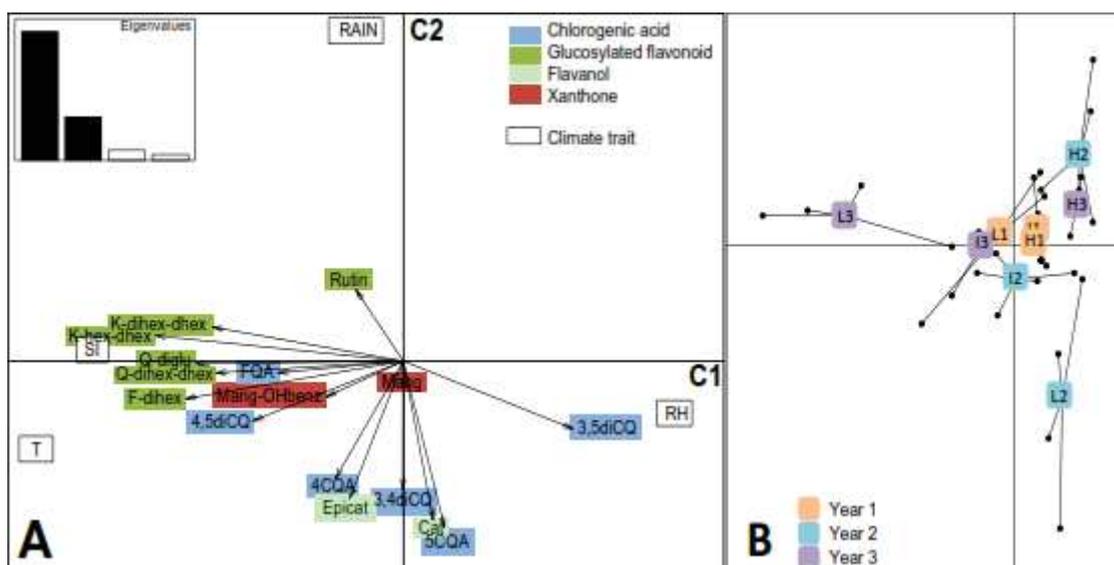


Figure 23 : Co-inertie décrivant la réponse entre paramètres climatiques et composés phénoliques pour les trois années de récolte

### I.3.4. Comparaison des teneurs en composés des feuilles jeunes et des feuilles matures

Le test *t* de Student a été réalisé sur les individus recueillis en deuxième année (2015), à la station intermédiaire afin de connaître les groupes de composés accumulés par les feuilles juvéniles et de déterminer, par la suite, les composés synthétisés au stade mature (Tableau 13). D'après les résultats du test *t*, les CQAs, les diCQs et les flavanols, plus particulièrement l'épicatéchine, ont été significativement plus accumulés dans les feuilles jeunes ( $p < 0,05$ ). Par contre, aucune variation importante de la teneur en FQA en fonction du stade de la feuille n'a été observée.

Parmi les flavonoïdes glycosylés, une concentration élevée en rutine a été enregistrée chez les feuilles jeunes et ce composé est majoritaire. Quant aux autres flavonoïdes glycosylés, exceptée la rutine (FG – R), des teneurs significativement importantes ont été notées dans les feuilles de stade mature. Les kaempférols glycosylés ont été absents des jeunes feuilles à cette altitude, tout comme dans les feuilles matures. Quant aux xanthones, elles ont été plus accumulées par les feuilles jeunes (différence significative) et représentées principalement par la mangiférine. Le parahydroxybenzoate de mangiférine a été plus concentré chez les feuilles matures mais ses teneurs n'ont pas présenté de différence significative.

En conclusion, il semble que les flavanols, les CQAs et les diCQs ainsi que la rutine et la mangiférine sont les composés fortement accumulés au stade juvénile. Ce résultat laisse supposer que leur biosynthèse est majoritairement réalisée à ce stade de croissance des feuilles.

Tableau 13 : Comparaison des moyennes des teneurs en composés phénoliques dans les feuilles très jeunes et matures des individus cueillis en 2015 à 1050 m. feuille jeune (FJ) ; feuille mature (FM).  
 acide 5-*O*-caféoylquinique (5-CQA), acide 4-*O*-caféoylquinique (4-CQA), acide 3,4-*O*-dicaféoylquinique (3,4-diCQA), acide 3,5-*O*-dicaféoylquinique (3,5-diCQA), acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique (4,5-diCQA), acide 5-*O*-fêruloylquinique (FQA) ; flavone-di-*C*-hexose (F-dihex) ; quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (Q-dihex-dhex) ; quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (Q-diglu) ; kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (K-dihex-dhex) ; kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose (K-hex-dhex) ; rutine (Rutin) ; Mangiférine (Mang) ; parahydroxybenzoate de mangiférine (Mang-OHbenz) . Flavanols : somme de la teneur en catéchine et épicatechine. CQAs : somme de la teneur en 5-CQA et 4-CQA. DiCQs : somme de la teneur en 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA. FG – R : somme de la teneur en quercétine glycosylés sans la rutine. FG : somme de la teneur de tous les flavonoïdes glycosylés. Xanthonés : somme de la mangiférine et le parahydroxybenzoate de mangiférine. Test statistique : Test *t*,  $p < 0,05$ .

Composés phénoliques	FJ	FM	Valeur t	<i>p</i>
Catéchine	1,209	1,380	1,596	0,149
Epicatechine	<b>2,244 ***</b>	1,271	-7,271	0,000
<b>Flavanols</b>	<b>3,453 ***</b>	<b>2,651</b>	<b>-5,062</b>	<b>0,001</b>
5-CQA	<b>7,411 ***</b>	3,706	-9,512	0,000
4-CQA	0,103	0,216 ***	4,873	0,001
<b>CQAs</b>	<b>7,515 ***</b>	<b>3,922</b>	<b>-9,376</b>	<b>0,000</b>
3,4diCQ	0,032	0,023	-2,173	0,061
3,5diCQ	<b>1,073 ***</b>	0,055	-8,334	0,000
4,5diCQ	<b>0,085 ***</b>	0,024	-8,261	0,000
<b>DiCQs</b>	<b>1,192 ***</b>	<b>0,103</b>	<b>-8,608</b>	<b>0,000</b>
FQA	0,000	0,004	1,418	0,194
F-dihex	0,072	<b>0,502 ***</b>	6,550	0,000
Q-dihex-dhex	0,004	<b>0,073 ***</b>	8,989	0,000
Q-diglu	0,031	<b>0,348 ***</b>	5,133	0,001
<b>FG – R</b>	<b>0,036</b>	<b>0,422 ***</b>	<b>5,874</b>	<b>0,000</b>
K-dihex-dhex	0,000	0,000		
K-hex-dhex	0,000	0,000		
Rutin	<b>1,456 ***</b>	0,821	-3,622	0,007
<i>FG</i>	<i>1,746</i>	<i>1,566</i>	<i>0,731</i>	<i>0,485</i>
Mangiférine	<b>4,675 ***</b>	1,308	-8,420	3,014
Mang-OHbenz	0,028	0,033	0,920	0,384
<b>Xanthonés</b>	<b>4,703 ***</b>	<b>1,342</b>	<b>-8,417</b>	<b>0,000</b>

La présence des différents composés phénoliques dans les feuilles matures pourrait être associée à une synthèse en réponse à un facteur environnemental mais également à une teneur constitutive liée à une synthèse précoce dans les feuilles au stade plus jeune. Aussi, nous avons étudié le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des composés phénoliques non seulement entre feuilles matures soumises à différentes conditions de culture, mais également entre feuilles jeunes et matures.

## I.4. Variations de l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes

### I.4.1. Comparaison de l'expression des gènes en fonction de l'altitude dans les feuilles matures

La moyenne de l'expression des gènes de trois individus cultivés au soleil a été calculée pour l'année 2015 sur les trois stations (trois altitudes différentes). L'annotation a été effectuée sur la base des 25 574 gènes issus du séquençage de *C. canephora* (Denoeud *et al.*, 2014). Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes focalisés sur les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. En présence d'un grand nombre de gènes homologues (en particulier dans la voie des flavonoïdes), seuls ont été retenus ceux présentant une forte homologie de séquence avec un paralogue identifié chez *Solanum lycopersicum* (tomate), plante possédant la même capacité d'accumulation en acides chlorogéniques que les caféiers. Les moyennes d'expression de ces différents gènes et leur comparaison, deux à deux, entre les différentes altitudes sont portées dans le tableau 14.

Nous avons noté que tous ces gènes ont été faiblement exprimés, excepté *C4HI*, gène de la coumarate hydroxylase et par conséquent, leurs valeurs de RPKM sont inférieures à 100.

Cependant, des différences significatives ont été notées, en particulier au niveau des gènes homologues impliqués en début de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (*PAL*, *C4H* et *4CL*) et ceux de la voie de synthèse des flavonoïdes. En effet, tous les gènes engagés dans cette première étape de la voie (*CHS*, *F3H* ou *F3'H*), excepté *CHI*, ont présenté une différence significative d'expressions entre les altitudes extrêmes (650 m et 1250 m) et l'altitude intermédiaire (1050 m). Les mêmes variations ont été également notées pour les gènes impliqués dans la synthèse des flavanols (*ANR* et *LAR*), exceptée *ANS* et des flavonols (sauf *DFR*). Il faut cependant souligner que tous les homologues n'ont pas été différentiellement exprimés et que les différences d'expression n'ont pas toujours été notées en comparant les mêmes altitudes. Ainsi, seulement trois des 4 gènes homologues de *FLS* (codant pour les flavonols synthases) ont montré une différence significative.

En s'intéressant aux gènes de glycosylation tels que *F3GT* ou *F3RT*, seulement un à deux homologues ont généralement présenté des résultats probants, en comparant les altitudes extrêmes à l'altitude intermédiaire. Seul *F3RT\_11* a eu une différence d'expression statistiquement notoire entre les arbres cultivés à 650 m et ceux cultivés à 1250 m.

Pour les gènes codants impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine, peu d'entre eux ont subi une différence significative, exceptés *HQT* dans la voie de synthèse des acides chlorogéniques, *CCR1* et *CAD3*, dans celle de la lignine.

En résumé, l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, au niveau des feuilles matures prélevées quatre heures après le lever du soleil, montre que ces gènes ont été faiblement exprimés et qu'ils ont présenté des différences significatives d'expression selon l'altitude à laquelle sont plantés les caféiers. Des différences d'expression ont été également notées sur les branches de la voie de synthèse, mais les plus fréquentes se trouvent dans la voie commune (voie générale des phénylpropanoïdes) et au début de la voie de synthèse des flavonoïdes.

Sur la figure 24 montrant le schéma de la voie des phénylpropanoïdes, ont été portées les valeurs moyennes d'expression des homologues de gènes pour lesquels des différences significatives d'expression entre altitudes ont été notées (KEGG Database ; NCBI Database). Il apparaît que sur les quatre branches représentées : la voie principale des phénylpropanoïdes (voie a), la voie de la lignine (voie b), la voie des flavanols (voie c) et la voie des flavonoïdes (voie d), la majorité des gènes présentant une différence significative d'expression appartiennent aux individus cultivés à 1050 m.

Sur cette même figure, ont été portées les valeurs des teneurs en composés correspondant à chaque voie de biosynthèse. Il a été observé que les teneurs totales en CQAs et flavanols ont diminué avec l'altitude alors que celles des flavonoïdes glycosylés ont augmenté à l'altitude intermédiaire. Ce dernier profil d'accumulation de composés correspond au profil d'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes qui a montré de plus fortes expressions à 1050 m que sur les deux autres stations.

Ainsi, il n'y a pas de correspondance entre le profil d'expression des gènes et la teneur en composé sauf pour les flavonoïdes glycosylés

Il faut cependant rappeler que la comparaison des teneurs en composés phénoliques aux données météorologiques a permis de montrer que la concentration en flavonoïdes glycosylés dans les feuilles matures a été corrélée à la température et à la lumière. D'autre part, les échantillons de feuilles analysés dans cette partie du travail ont été prélevés durant l'année 2015 qui a été marquée par une quantité cumulée de rayonnements solaires plus forte à 1050 m par rapport à celle des deux autres stations (Tableau 6). Aussi, l'accumulation de flavonoïdes

glycosylés dans les feuilles matures à l'altitude intermédiaire peut être interprétée comme une réponse de celles-ci (radiations solaires).

D'autre part, la comparaison des teneurs en composés phénoliques dans les feuilles matures avec celles des feuilles juvéniles nous a laissé supposer que certains d'entre eux ont été synthétisés préférentiellement dans les feuilles juvéniles. Nous avons donc comparé l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes dans les feuilles matures et les feuilles jeunes.

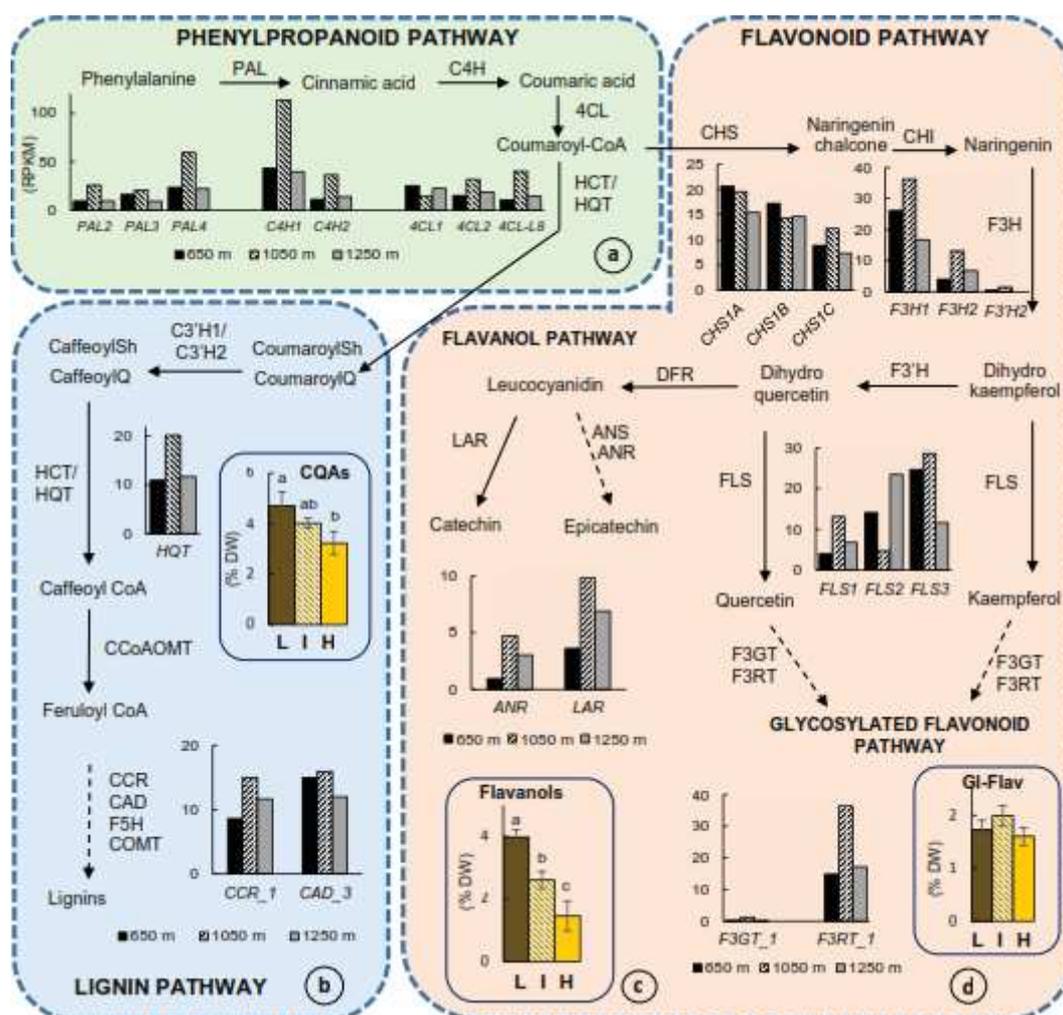


Figure 24 : Diagramme représentant les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes exprimés en RPKM avec les teneurs en composés exprimées en pourcentage de matière sèche

Tableau 14 : Moyennes du niveau d'expression, exprimées en « Reads Per Kilobase and per Million » (RPKM), des différents homologues des gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans les feuilles matures de *C. arabica* cv Marsellesa cultivé aux trois altitudes et valeurs de *p* de la comparaison deux à deux des moyennes (N = 3) dans le logiciel EdgeR (notées en bleu lorsque la valeur est inférieure à 0,05). Annotation des gènes réalisée en utilisant le séquençage de *C. canephora*  
Source : Deneud et al., 2014

Voie de biosynthèse des composés phénoliques	Famille de gène	Nom des gènes	Numéro d'accèsion	RPKM			P value		
				650 m	1050 m	1250 m	1050/650	1050/1250	650/1250
Phénylpropanoïdes PPP	Phénylalanine ammonia-lyase (PAL)	<i>PAL1</i>	Cc02_g11230	12,03	19,43	14,50	0,484	0,359	0,827
		<i>PAL2</i>	Cc06_g03980	9,23	25,53	9,13	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	0,406
		<i>PAL3</i>	Cc01_g10880	15,93	20,53	8,87	0,901	<b>0,001</b>	0,001
		<i>PAL4</i>	Cc00_g20750	23,20	59,37	21,83	<b>0,006</b>	<b>0,000</b>	0,359
	Trans-cinnamate 4-monooxygénase (C4H)	<i>C4H1</i>	Cc01_g15360	43,07	113,70	39,47	<b>0,015</b>	<b>0,001</b>	0,306
		<i>C4H2</i>	Cc00_g10050	10,93	36,23	13,30	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,858
		<i>C4H3</i>	Cc00_g05190	0	0	0	NA	NA	NA
		<i>C4H4</i>	Cc00_g00170	0	0	0	NA	NA	NA
	4-coumarate-CoA ligase (4CL)	<i>4CL1</i>	Cc06_g13370	25,10	14,03	22,07	<b>0,007</b>	0,212	0,140
		<i>4CL2</i>	Cc04_g05510	14,93	31,37	18,67	<b>0,053</b>	<b>0,018</b>	0,656
		<i>4CL-L1</i>	Cc10_g00840	7,37	9,77	8,00	0,781	0,353	0,516
		<i>4CL-L2</i>	Cc04_g09970	15,47	17,60	24,07	0,833	0,379	0,503
		<i>4CL-L3</i>	Cc08_g03990	0,07	0,03	0,17	0,646	0,141	0,323
		<i>4CL-L4</i>	Cc02_g10610	0,03	0	0	NA	NA	NA
		<i>4CL-L5</i>	Cc01_g10510	0,03	0	0	NA	NA	NA
		<i>4CL-L6</i>	Cc06_g04280	7,23	7,43	11,17	0,899	0,139	0,174
		<i>4CL-L7</i>	Cc07_g03940	0,13	0,37	0,33	0,102	0,783	0,174
		<i>4CL-L8</i>	Cc02_g02860	10,43	40,00	13,90	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,930
	Biosynthèse des esters caféoyls	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate /quinate hydroxycinnamoyl transférase (HCT)	<i>HCT</i>	Cc04_g05230	5,70	7,73	6,00	0,874	0,520
Hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase (HQT)		<i>HQT</i>	Cc06_g14760	10,93	20,17	11,67	0,094	<b>0,011</b>	0,376
Monooxygénase/p-coumarate 3-hydroxylase (C3'H)		<i>C3'H1</i>	Cc06_g20390	47,73	78,53	59,50	0,227	0,238	0,978
	<i>C3'H2</i>	Cc00_g08150	2,07	1,40	2,03	0,141	0,266	0,718	
Biosynthèse de la lignine	Caféoyl-CoA –O Methyltransférase (CCoAOMT)	<i>CCoAOMT1</i>	Cc02_g18970	75,73	70,07	73,33	0,307	0,835	0,219
		<i>CCoAOMT-L1</i>	Cc06_g11010	5,63	4,70	5,53	0,243	0,708	0,429
		<i>CCoAOMT-L2</i>	Cc11_g06680	27,43	27,47	28,77	0,554	0,713	0,338
	Cinnamoyl-CoA Réductase (CCR)	<i>CCR1</i>	Cc00_g08940	8,57	15,00	11,63	<b>0,037</b>	0,308	0,640
		<i>CCR2</i>	Cc04_g05040	38,97	38,57	35,30	0,281	0,682	0,138

Voie de biosynthèse des composés phénoliques	Famille de gène	Nom des gènes	Numéro d'accension	RPKM			P value		
				650 m	1050 m	1250 m	1050/650	1050/1250	650/1250
Biosynthèse de la lignine	Cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)	<i>CAD1a</i>	Cc00_g23810	5,27	6,43	5,13	0,799	0,380	0,260
		<i>CAD1b</i>	Cc01_g04750	12,27	17,37	14,97	0,632	0,290	0,563
		<i>CAD2</i>	Cc00_g06680	10,60	11,50	10,00	0,732	0,356	0,207
		<i>CAD3</i>	Cc00_g06650	14,97	15,93	11,97	0,591	0,123	<b>0,039</b>
		<i>CAD4</i>	Cc00_g06700	5,33	5,67	4,63	0,463	0,350	0,097
		<i>CAD6</i>	Cc02_g29030	8,30	13,17	6,53	0,429	0,051	0,123
		<i>CAD7</i>	Cc07_g13720	2,40	2,43	3,60	0,985	0,252	0,260
	Férulate 5-Hydroxylase (F5H)	<i>F5H-like</i>	Cc07_g10360	29,00	58,90	42,13	0,113	0,386	0,468
	acide caféique/5-hydroxyfêrulique O-Méthyltransfêrase (COMT)	<i>COMT1</i>	Cc02_g00760	14,87	12,67	17,87	0,295	0,240	0,897
		<i>COMT2</i>	Cc01_g04680	2,67	2,10	2,27	0,158	0,709	0,301
		<i>COMT3</i>	Cc00_g12180	1,63	1,87	2,07	0,763	0,741	0,977
		<i>COMT4</i>	Cc00_g20770	0	0,17	0,07	NA	NA	NA
	Chalcone Synthase (CHS)	<i>CHS1A</i>	Cc00_g32030	20,63	19,53	15,40	<b>0,005</b>	0,828	<b>0,003</b>
		<i>CHS1B</i>	Cc00_g19010	17,20	14,37	14,57	<b>0,015</b>	0,666	<b>0,045</b>
<i>CHS1C</i>		Cc03_g07320	8,90	12,20	7,33	0,390	0,050	<b>0,005</b>	
Chalcone Isomêrase (CHI)	<i>CHI</i>	Cc02_g08570	26,13	37,60	29,17	0,988	0,278	0,285	
	<i>CHI-L</i>	Cc02_g05390	8,50	13,07	7,20	0,748	0,053	0,107	
Flavanone 3-Hydroxylase (F3H)	<i>F3H_1</i>	Cc07_g10740	26,10	36,20	16,73	0,589	<b>0,009</b>	0,002	
	<i>F3H_3</i>	Cc02_g18330	12,70	17,23	13,20	0,874	0,305	0,386	
	<i>F3H_4</i>	Cc03_g07510	5,63	6,93	7,07	0,757	0,652	0,887	
	<i>F3H_5</i>	Cc02_g00770	25,40	27,67	39,23	0,265	0,623	0,110	
	<i>F3H_2</i>	Cc06_g20380	4,00	13,13	6,73	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	0,646	
Flavonoid monooxygênase (F3'H)	<i>F3'H_5</i>	Cc09_g06360	1,63	2,20	1,33	0,883	0,155	0,203	
	<i>F3'H_3</i>	Cc00_g14670	4,17	3,47	4,17	0,089	0,968	0,096	
	<i>F3'H_2</i>	Cc00_g28140	0,50	1,47	0	<b>0,002</b>	0,066	0,000	
	<i>F3'H_1</i>	Cc00_g01250	0,03	0,03	0,03	NA	NA	NA	
	<i>F3'H_4</i>	Cc08_g13140	5,10	4,97	6,60	0,510	0,616	0,874	
Dihydroflavonol-4-Réductase (DFR)	<i>DFR_3</i>	Cc01_g04630	3,43	3,30	4,17	0,200	0,640	0,413	
	<i>DFR_1</i>	Cc10_g04290	7,37	8,10	10,70	0,985	0,509	0,498	
	<i>DFR_4</i>	Cc02_g28500	19,60	29,50	23,77	0,460	0,194	0,575	
	<i>DFR_5</i>	Cc02_g36730	26,03	21,10	25,57	0,213	0,940	0,242	
	<i>DFR_6</i>	Cc02_g23910	10,27	12,33	13,30	0,953	0,941	0,988	
	<i>DFR_2</i>	Cc07_g09810	0,53	1,07	0,77	0,172	0,306	0,725	
Anthocyanidine Synthase (ANS)	<i>ANS</i>	Cc08_g13720	1,33	3,83	2,00	0,096	0,159	0,796	
Anthocyanidine Réductase (ANR)	<i>ANR</i>	Cc00_g13610	0,93	4,73	3,03	<b>0,000</b>	0,162	<b>0,003</b>	
Leucoanthocyanidine Réductase (LAR)	<i>LAR</i>	Cc11_g10630	3,60	9,83	6,90	<b>0,006</b>	0,176	0,150	
Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase (FLS)	<i>FLS_3</i>	Cc10_g11070	24,73	28,73	11,63	<b>0,043</b>	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>	
	<i>FLS_1</i>	Cc06_g20380	4,00	13,13	6,73	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	0,646	
	<i>FLS_2</i>	Cc00_g12470	14,07	4,67	23,53	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,524	
	<i>FLS_4</i>	Cc08_g11560	5,63	9,83	6,40	0,548	0,284	0,637	

Voie de biosynthèse des composés phénoliques	Famille de gène	Nom des gènes	Numéro d'accension	RPKM			P value		
				650 m	1050 m	1250 m	1050/650	1050/1250	650/1250
Biosynthèse des flavonoïdes	Flavonol 3-O-glucosyltransférase (F3GT)	<i>F3GT_2</i>	Cc04_g12890	0,70	0,83	0,73	NA	NA	NA
		<i>F3GT_4</i>	Cc03_g10590	7,43	10,63	11,30	0,469	0,958	0,437
		<i>F3GT_5</i>	Cc06_g04680	0,53	0,37	0,63	NA	NA	NA
		<i>F3GT_1</i>	Cc10_g04750	0,17	1,20	0,10	<b>0,006</b>	<b>0,000</b>	0,321
		<i>F3GT_6</i>	Cc06_g04650	8,17	11,33	10,80	0,530	0,602	0,915
		<i>F3GT_3</i>	Cc06_g04640	3,73	4,33	5,20	0,930	0,665	0,603
	Flavonol-3-O-glucoside L-rhamnosyltransférase	<i>F3RT_3</i>	Cc07_g13910	0	0	0	NA	NA	NA
		<i>F3RT_4</i>	Cc05_g11640	8,17	9,17	6,77	0,803	0,379	0,260
		<i>F3RT_5</i>	Cc01_g16510	1,77	1,73	1,47	0,315	0,969	0,336
		<i>F3RT_8</i>	Cc10_g08470	0,23	0,20	0,33	NA	NA	NA
		<i>F3RT_6</i>	Cc01_g16590	0,03	0	0,03	NA	NA	NA
		<i>F3RT_1</i>	Cc07_g13900	14,80	36,37	17,13	<b>0,026</b>	<b>0,012</b>	0,773
		<i>F3RT_9</i>	Cc11_g01180	35,33	27,37	36,87	0,111	0,348	0,509
		<i>F3RT_10</i>	Cc02_g14190	2,17	2,73	1,97	0,867	0,213	0,282
		<i>F3RT_11</i>	Cc05_g11630	9,10	14,27	10,37	0,398	0,184	0,039
		<i>F3RT_12</i>	Cc01_g16600	0,03	0,03	0,23	NA	NA	NA
		<i>F3RT_7</i>	Cc10_g13040	4,50	5,23	4,20	0,564	0,485	0,204
		<i>F3RT_2</i>	Cc07_g13920	9,40	6,30	8,93	0,079	0,335	0,421

#### I.4.2. Comparaison de l'expression des gènes en fonction de l'âge des feuilles

La comparaison de l'expression des gènes par les feuilles matures avec celle des feuilles au stade juvénile a été réalisée sur les caféiers cultivés à l'altitude intermédiaire. Cette étude a montré que pratiquement tous les gènes ont été surexprimés dans les feuilles jeunes, excepté ceux impliqués dans les dernières étapes de la biosynthèse des monolignols (Figure 25). Par contre, les taux en flavonoïdes glycosylés autres que la rutine ont été nettement plus importants dans les feuilles matures permettant de déduire que leur synthèse pourrait alors se produire notamment à ce stade de développement.

Dans leur ensemble, ces résultats semblent montrer que la synthèse des différents composés phénoliques soit répartie au cours de la croissance de la feuille et que, dans les feuilles matures, les flavonoïdes glycosylés sont synthétisés en réponse à la lumière. Cependant, la surexpression des gènes de glycosylation dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes chez les feuilles matures n'est que faiblement traduite par les différences de teneurs en flavonoïdes glycosylés.

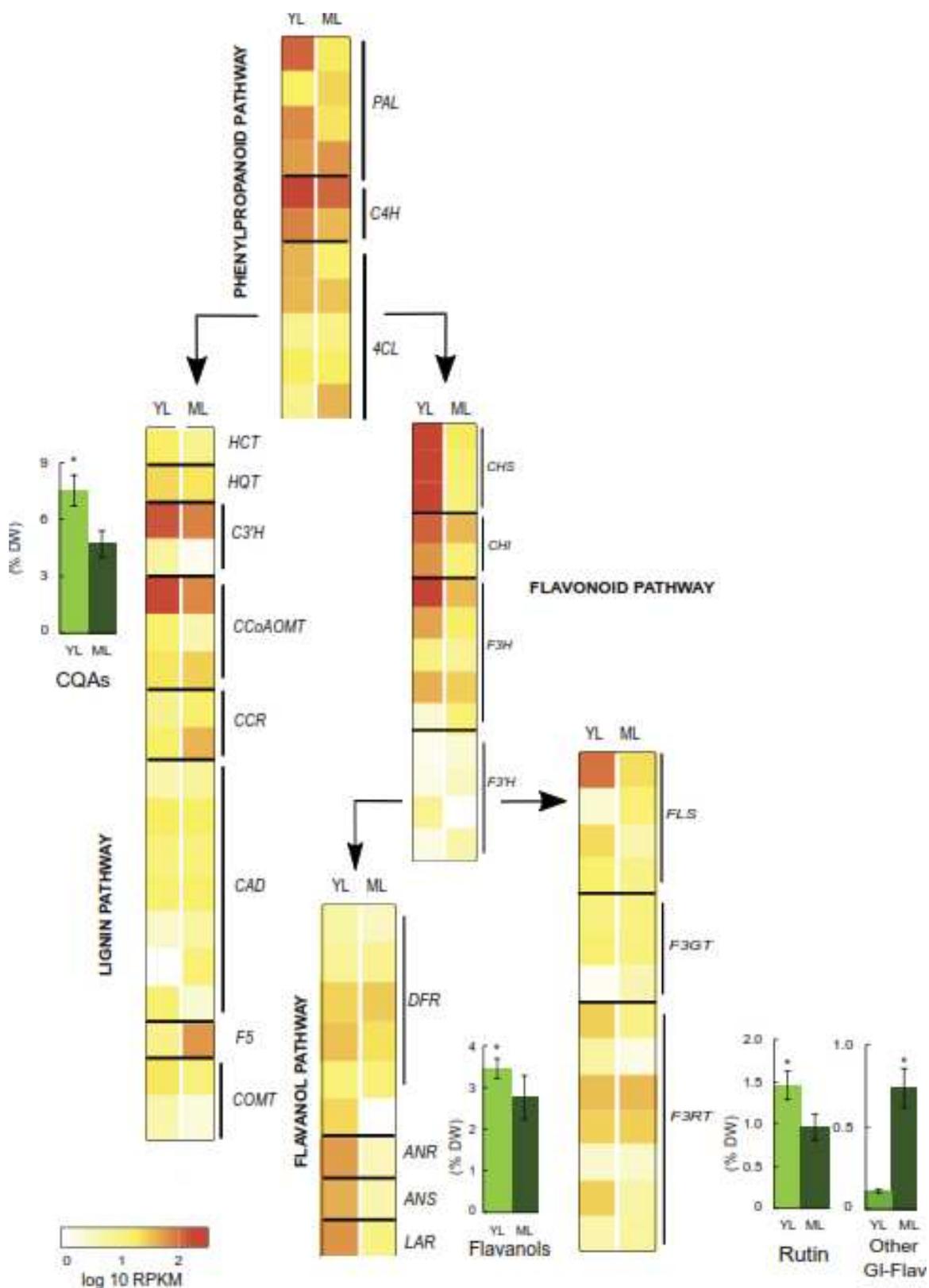


Figure 25 : Heatmap représentant les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes exprimés en logRPKM avec les diagrammes de la teneur en composés exprimée en pourcentage de matière sèche des individus récoltés en 2015 sur les feuilles jeunes et matures

## 1.5. Discussion et conclusion

Plusieurs auteurs ont soutenu que les traits morphologiques des végétaux, dont la surface foliaire, ont tendance à être fortement corrélés avec le climat, comme chez *Encelia farinosa*, *Picea abies*, *Alnus sinuata* et *Betula papyrifera* (Sandquist et Ehleringer, 1997 ; Oleksyn *et al.*, 1998 ; Benowicz *et al.*, 2000). Xue-jun et ses collaborateurs (2013) ont montré que, chez *Zea mays*, la période de croissance augmente avec l'altitude et est en liaison avec une diminution de la température.

Nos résultats ont aussi permis d'associer la croissance des feuilles à l'altitude et à la température, mais également à l'humidité relative, comme le suggèrent Wang et ses collaborateurs (2015). Par contre, la croissance générale de la plante ne peut être reliée à aucun des paramètres climatiques.

L'analyse biochimique par LC-MS a mis en évidence pour la première fois la présence de deux composés dans les feuilles de *C. arabica* : l'iriflophénone-C-glucoside et un dérivé de xanthone, le parahydroxybenzoate de mangiférine. Leur présence semble indiquer que la synthèse de la mangiférine a été réalisée via la benzophénone synthase comme ce qui a été décrit chez *Anemarrhena asphodeloides*, *Hypersicum androsaemum* et *Cyclopia genistoides* (Fujita et Inoue, 1981 ; Schmidt et Beerhues, 1997 ; Joubert *et al.*, 2014). D'autre part, contrairement aux résultats trouvés par Ratanamarno et Surbka (2017), des dérivés de gallocatéchine n'ont pas été détectés. Enfin, ces analyses ont confirmé la présence de dérivés de quercétine et de kaempférol glycosylés déjà observés par Martins et ses collaborateurs (2014) dans les feuilles de la variété « Catuai Vermelho IAC 44' » de *Coffea arabica*.

Une analyse de corrélation entre la teneur en composés phénoliques et les caractéristiques climatiques a révélé que les teneurs en flavonoïdes dans les feuilles matures ont tendance à croître avec la température et le rayonnement solaire et que celles en CQAs et en flavanols ont diminué lorsque les précipitations ont augmenté. Il est intéressant de voir que des composés appartenant à la même famille ne suivent pas les mêmes évolutions en fonction d'un même paramètre climatique donné. Ainsi, les trois isomères de diCQs ont présenté des relations différentes avec la température et le rayonnement solaire cumulé, résultat déjà observé chez les grains de *Coffea arabica* (Joët *et al.*, 2010). Contrairement aux flavonoïdes glycosylés, la teneur en rutine n'a été corrélée ni avec la température ni avec le rayonnement solaire dans les feuilles matures. D'autre part, l'analyse du contenu des feuilles jeunes en flavonoïdes glycosylés a montré que la synthèse de chaque composé de cette famille a évolué au cours de la croissance de la feuille, la rutine étant surtout accumulée par les feuilles jeunes, alors que les autres composés glycosylés sont spécifiquement produits dans les feuilles matures. L'étude

transcriptomique semble confirmer la forte concentration en flavonoïdes glycosylés, autres que la rutine, dans les feuilles matures en corrélation avec l'intensité lumineuse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Martins et ses collaborateurs (2014) sur la réponse des caféiers aux radiations UV-B (Vidović *et al.*, 2017). Le rôle important des dérivés de quercétine dans la photoprotection est attribué à la présence du noyau B ortho-dihydroxylé des flavonoïdes qui constituerait un écran protecteur contre les rayonnements UV (Agati *et al.*, 2011 ; Agati *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2017b).

En étudiant l'évolution de la teneur en composés phénoliques, leur niveau de biosynthèse et la relation composé/climat, des marqueurs biochimiques et génétiques ont été mis en évidence chez *C. arabica* var. Marsellesa cultivé en plein soleil. L'ensemble des composés phénoliques, de part l'évolution de leur teneur, peut être considéré comme marqueur du stade de développement de la feuille, alors que les CQAs, les flavanols et les flavonols glycosylés pourraient constituer les marqueurs d'adaptation aux conditions hydriques, lumineuses et thermiques. Les gènes impliqués dans la glycosylation des flavonols, particulièrement exprimés chez les feuilles matures en condition de forte lumière, pourraient servir de marqueurs de l'adaptation aux radiations solaires.

Partie II : Effets de l'ombrage sur *Coffea arabica* var. Marsellesa cultivé à deux altitudes extrêmes

## II. Effets de l'ombrage sur *Coffea arabica* var. Marsellesa cultivé à deux altitudes extrêmes

Le dispositif expérimental se compose de trois stations dont deux se situent dans des zones limites pour la culture des Arabicas. En effet, ces altitudes présentent des facteurs limitants pour cette espèce à savoir les températures de la journée très élevées et l'humidité faible à 650 m d'altitude, les basses températures de la nuit, l'ensoleillement faible et l'humidité importante à 1250m.

Cette partie consiste à comparer le développement des plantes cultivées sous ombrage à celui des plantes exposées au soleil pour en déduire l'impact de l'intensité lumineuse sur la réponse des caféiers dans ces deux stations dont les conditions de culture peuvent générer du stress. L'étude a été réalisée sur 20 individus.

### II.1. Réponses morphologiques des caféiers à l'ombrage

Les tableaux 15 et 16 présentent les différences morphologiques de la plante entière et des feuilles matures entre une culture sous ombrage (SO) et une culture en plein soleil (PS) à chacune des altitudes durant l'année 2015. Ces résultats montrent qu'à basse altitude, seule la hauteur des plantes est statistiquement différente (élevée sous ombrage) alors qu'à haute altitude, la hauteur des plantes, le diamètre de leur tronc et le nombre d'entre-nœuds sont statistiquement plus faibles sous ombrage. Ces résultats semblent indiquer un effet négatif de l'ombrage sur la croissance des caféiers, surtout en haute altitude. En comparant la croissance générale des caféiers entre les deux altitudes, il est à noter que les individus cultivés en altitude élevée ont une croissance plus faible que ceux en basse altitude qu'ils soient placés à l'ombre ou en plein soleil. En effet, à 1250 m, l'intensité lumineuse est 15% plus faible en 2015 (Tableau 6).

La différence de croissance entre stations est encore plus marquée à l'ombre qu'au soleil. Les mesures effectuées sur les feuilles attestent une croissance plus grande des feuilles de caféiers sous ombrage, quelle que soit l'altitude (valeurs statistiquement différentes à  $p < 0,05$ ). Pour la comparaison des paramètres morphologiques, la longueur et la largeur des feuilles sont, en moyenne, 1,25 fois plus grandes à l'ombre. Ce qui donne une valeur de surface foliaire 66% et 50% supérieure à la plus basse et à la plus haute altitude respectivement. Le poids sec varie dans le même sens et présente une valeur très faible pour les plantes cultivées en plein soleil à basse altitude. Étonnamment, contrairement à ce qui a été observé à basse altitude, l'ombrage entraîne une diminution du poids spécifique des feuilles à haute altitude.

Quant à la densité stomatique, l'ombrage a entraîné une baisse de celle-ci, également notée en fonction de l'altitude.

Ainsi, les conditions d'ombrage ont un effet négatif sur la croissance générale des plantes à une altitude élevée mais favorisent la croissance foliaire à basse et haute altitudes.

Tableau 15 : Tailles des plants de *Coffea arabica* var. Marsellea et des feuilles matures cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de la lumière PS : plein soleil, SO : sous ombrage. Mesures effectuées en 2015. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ )

Caractéristiques morphologiques						
Altitude (m)	Condition	Plante			Feuilles matures	
		Hauteur (cm)	Diamètre (cm)	Entre-nœuds (N)	Longueur (mm)	Largeur (mm)
650	PS	114,77 ± 17,02	32,64 ± 5,42	24,82 ± 3,15	119,10 ± 1,20	54 ± 0,54
Colpos	SO	127,02 ± 20,04	30,95 ± 6,81	24,28 ± 4,61	151,20 ± 2,14	70,5 ± 0,91
	p	0,024	0,274	0,688	<0,0001	<0,0001
1250	PS	108,08 ± 12,69	27,21 ± 2,55	22,25 ± 0,96	161,20 ± 1,30	75,90 ± 0,67
Inifap	SO	92,75 ± 10,78	20,96 ± 3,41	17,83 ± 2,33	190,90 ± 1,24	96,20 ± 0,74
	p	0,006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tableau 16 : Surfaces foliaires, poids secs, poids spécifiques et densités stomatiques des feuilles matures de *C. arabica* var. Marsellea cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de la lumière. PS : plein soleil, SO : sous ombrage. Mesures effectuées en 2015, Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ )

Caractéristiques morphologiques					
Altitude (m)	Condition	Feuilles matures			
		Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )	Poids sec (g)	Poids spécifique (mg/cm <sup>2</sup> )	Densité stomatique (N/mm <sup>2</sup> )
650	PS	48,47 ± 9,27	0,43 ± 0,09	8,94 ± 0,97	209,4 ± 22,2
Colpos	SO	80,85 ± 20,30	0,77 ± 0,20	9,54 ± 0,82	178,8 ± 13,5
	p	<0,0001	<0,0001	0,004	0,005
1250	PS	91,92 ± 14,58	0,82 ± 0,14	8,98 ± 0,88	174,7 ± 18,4
Inifap	SO	137,78 ± 17,93	1,13 ± 0,21	8,31 ± 2,11	141,6 ± 13,5
	p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001

## II.2. Réponses biochimiques des caféiers à l'ombrage

### II.2.1. Effets de l'ombrage sur le contenu foliaire en sucres

Les résultats du dosage des sucres libres par la chromatographie d'échange d'ions chez les caféiers cultivés aux deux altitudes extrêmes (650 m et 1250 m) et à deux conditions de luminosité (plein soleil et 50% d'exclusion d'ombrage) sont présentés dans le tableau 17.

Ils montrent que quelles que soient les conditions de culture, le saccharose et l'amidon constituent les sucres majoritaires rencontrés dans les feuilles de caféiers. Ainsi, les teneurs en saccharose varient de 3,33% (à l'ombre, à haute altitude) à 4,71% (en plein soleil, à basse altitude) et celles de l'amidon varient de 4,79% (sous ombrage, aux deux altitudes) à 6,57% (en plein soleil, à haute altitude). Glucose et fructose sont également bien représentés mais dans des concentrations en moyenne 5 fois plus faibles que celles du saccharose. Aux deux altitudes, les teneurs en sucres libres sont affectées par l'ombrage, mais des valeurs statistiquement différentes sont presque exclusivement observées à la plus haute altitude. En effet, sous ombrage, fructose, glucose et amidon ont des teneurs plus faibles (3 fois moins pour les deux premiers et 30 fois moins pour l'amidon) alors que celle du mannose est 2 fois plus forte. Par contre, à basse altitude, sur les neufs sucres dosés, une différence significative entre les deux conditions n'est observée que pour le raffinose dont la teneur est 1,64 fois plus basse sous ombrage. Si le glucose, fructose, saccharose et amidon sont les premiers sucres produits lors de la photosynthèse, raffinose, et stachyose sont des sucres dont l'accumulation est souvent liée à des stress.

Tableau 17 : Teneurs en sucres libres et amidon, exprimées en pourcentage de matière sèche, des feuilles matures de *C. arabica* var. Marsellea cultivés à deux altitudes extrêmes avec ou non exclusion de 50% de lumière. PS : plein soleil, SO : sous ombrage. Mesures effectuées en 2015. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ )

Sucres (% MS)	Altitude (m) et station					
	650 (Colpos)			1250 (Inifap)		
	PS	SO	<i>p</i>	PS	SO	<i>p</i>
Fructose	1,13 ± 0,25	0,75 ± 0,17	0,050	0,78 ± 0,13	0,24 ± 0,05	<b>0,021</b>
Glucose	0,86 ± 0,23	0,71 ± 0,06	0,220	0,79 ± 0,25	0,27 ± 0,04	<b>0,021</b>
Mannose	0,44 ± 0,19	0,28 ± 0,11	0,142	0,14 ± 0,05	0,30 ± 0,06	<b>0,021</b>
Saccharose	4,71 ± 0,15	4,44 ± 0,29	0,086	3,81 ± 0,48	3,33 ± 0,23	0,149
Amidon	4,86 ± 0,88	4,79 ± 0,86	0,916	6,57 ± 0,56	4,79 ± 0,80	<b>0,027</b>
Sorbitol	0,026 ± 0,006	0,020 ± 0,006	0,142	0,035 ± 0,017	0,017 ± 0,008	0,083
Maltose	0,031 ± 0,012	0,031 ± 0,024	0,806	0,038 ± 0,013	0,051 ± 0,040	1,00
Raffinose	0,405 ± 0,070	0,246 ± 0,029	<b>0,014</b>	0,267 ± 0,045	0,238 ± 0,062	0,149
Stachyose	0,159 ± 0,056	0,119 ± 0,035	0,142	0,082 ± 0,031	0,105 ± 0,033	0,083

### II.2.2. Effets de l'ombrage sur les teneurs en composés phénoliques

Les résultats du dosage par HPLC des composés phénoliques sont partiellement présentés dans la partie I de ce chapitre. Ces mêmes résultats sont représentés dans le tableau 18 en mettant en évidence les deux conditions de luminosité sous forme de ratio avec deux altitudes différentes.

Il est intéressant de noter qu'à basse altitude, quelle que soit la famille de composés, le ratio de la teneur en métabolites est toujours inférieure à un (01) dans les feuilles à l'ombre par rapport à celle en plein soleil. C'est dans le groupe de flavonols glycosylés que les ratios sont les plus faibles et qu'ils témoignent tous des valeurs statistiquement différentes entre ombre et soleil. La rutine est le composé dont la concentration est la plus altérée par l'ombrage, avec une valeur 5 fois plus faible (ratio 0,19). A haute altitude, les accumulations en flavanols et esters d'acides hydroxycinnamiques sont favorisées sous ombrage (ratio supérieur à 1), alors que celles des flavonoïdes glycosylés et des xanthones sont diminuées, mais dans une moindre mesure qu'à basse altitude. A haute altitude, seules les valeurs d'épicatéchine, rutine et dérivé de mangiférine sont statistiquement différentes entre ombre et soleil.

Ces résultats vont dans le sens du rôle majeur joué par les flavonoïdes glycosylés dans la réponse à la lumière et confirment ceux déjà obtenus. Pour les flavanols et les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, leur plus faible accumulation sous ombrage, à basse altitude, pourrait être liée à un déficit hydrique moins important sous ombrage, souligné par des poids secs et spécifiques de feuilles plus importants sous cette condition. La réponse inverse observée à haute altitude est surprenante, puisqu'elle traduit un état hydrique plus faible sous ombrage.

La récolte étant faite en fin de saison sèche, il est possible que le stress hydrique soit provoqué par une insuffisance de la quantité d'eau dans le sol pour la biomasse foliaire très importante en condition d'ombrage à haute altitude.

Ainsi, l'ombrage a un effet différent, selon l'altitude, sur l'accumulation en composés phénoliques : si les flavonoïdes glycosylés sont moins présents à basse altitude, les flavanols et les CQAs sont plus concentrés à haute altitude. Ces résultats corroborent ceux que nous avons déjà obtenus sur les sucres.

Tableau 18 : Ratios des concentrations en composés phénoliques majeurs dans les feuilles matures de plants de *Coffea arabica* var, Marsellesa cultivés sous ombrage (SO ; à 50% d'exclusion) comparés aux individus cultivés en plein soleil (PS) à deux altitudes différentes, 650 m et 1250 m. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05, *$ )

Composés phénoliques		Ratio SO/PS	
		650 m	1250 m
Flavanols	Catéchine	0,842	1,304
	Epicatéchine	0,993	<b>2,392*</b>
Acides chlorogéniques Dérivés d'acides hydroxycinnamiques	5-CQA	0,763	1,062
	4-CQA	0,935	1,190
	3,4-diCQ	0,881	1,805
	3,5-diCQ	0,943	1,868
	4,5-diCQ	0,568*	1,390
	FQA	0,711	1,264
Flavonols glycosylés	F-dihex	<b>0,555*</b>	0,900
	Q-dihex-dhex	<b>0,540*</b>	0,698
	Q-diglu	<b>0,412*</b>	0,627
	Rutine	<b>0,190*</b>	<b>0,550*</b>
Xanthones	Mangiférine	0,685	0,793
	Mang-OHbenz	<b>0,591*</b>	<b>0,627*</b>

### II.3. Réponses transcriptomiques à l'ombrage

Sur la plateforme de bioinformatique Galaxy de l'IRD, il est possible de comparer les niveaux d'expression des gènes entre deux situations à l'aide du logiciel EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Pour supprimer les gènes faiblement exprimés, un filtre a été utilisé. Appliqué sur les valeurs normalisées, il permet d'éliminer les gènes dont la somme des expressions est inférieure à 15 (3 individus pour chaque motif). Six échantillons de feuilles ont été comparés à chaque altitude (3 individus/motif x 2 (ombre/soleil)).

L'analyse d'expression différentielle a ainsi été réalisée sur un total de 21264 gènes, à un niveau de probabilité de  $p < 0,05$  et un  $\log_2$  fold change ( $\text{Log}_2\text{FC}^{19}$ ) compris entre -20 et 20. Elle a permis de mettre en évidence 161 gènes différentiellement exprimés entre les caféiers cultivés à l'ombre ou au soleil à haute altitude (1250 m), et 42 gènes à basse altitude (650 m). La faible quantité de gènes est à souligner et traduit une très grande similitude de fonctionnement des individus de cette variété de caféier, qu'ils soient à l'ombre ou au soleil. La figure 26A montre que, parmi les gènes différentiellement exprimés aux deux altitudes, 21 sont communs. Ce qui représente 50% et 13% des gènes différentiellement exprimés à basse et à

<sup>19</sup>  $\text{Log}_2\text{FC}$  change ou  $\text{Log}_2\text{FC}$  : ration entre deux niveaux d'expression des gènes

haute altitudes respectivement. Étonnamment, tous les gènes communs sont surexprimés en condition de plein soleil (Figure 26B). Parmi les gènes différentiellement exprimés, uniquement à basse altitude (21), onze (11) sont surexprimés et dix (10) sous-exprimés en plein soleil (Figure 26B et C). A haute altitude, parmi les 140 gènes différentiellement exprimés, 85 gènes sont surexprimés et seulement 55 sous-exprimés.

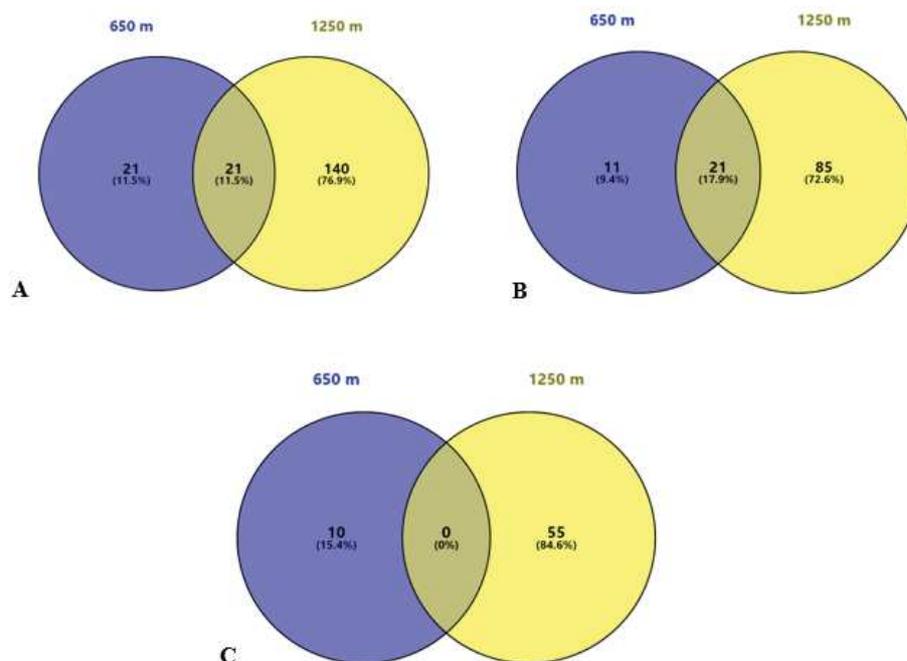


Figure 26 : Diagramme de Venn des gènes mettant en évidence le nombre de gènes différentiellement exprimés chez les individus cultivés à 650 m (violet), 1250 m (jaune) considérés à part ou ensemble et aux deux altitudes (intersection).

Totalité des gènes (A) ; gènes surexprimés en plein soleil (B), gènes sous-exprimés en plein soleil (C).

### II.3.1. Gènes surexprimés en plein soleil aux deux altitudes

Parmi les vingt-et-un (21) gènes communs aux deux altitudes, trois (03) n'ont pas de fonction connue et la majorité sont des gènes impliqués dans la réponse aux stress. Ainsi, douze (12) gènes codants pour des protéines de choc thermique « Heat shock Protein ou HSP » et un gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la thermotolérance ont été identifiés. Deux gènes homologues impliqués dans la glycolyse, un gène permettant l'activation de la photosynthèse, un gène codant pour une protéine transmembranaire impliquée dans le transport du nitrate et une ARNt méthyltransférase ont également été notés (Tableau 19). Les HSP sont responsables du maintien de la conformation des acides nucléiques et des protéines en cas de stress afin d'empêcher leur dégradation. Elles sont classées en fonction de leur poids moléculaire ou en fonction des compartiments cellulaires dans lesquels elles interviennent. Parmi les *HSP* surexprimées en plein soleil, les deux tiers codent pour des petites protéines de

choc thermique (sHSP), de poids moléculaire inférieur à 42 kDa, les restes appartiennent à la classe des HSP70. Il est intéressant de noter que, les protéines HSP ayant une localisation précise, interviennent dans les différents compartiments cellulaires, excepté les mitochondries : quatre (04) HSP agissent dans le cytoplasme, deux (02) dans le réticulum endoplasmique et trois (03) dans le chloroplaste. L'ensemble indique qu'en plein soleil, les caféiers mettent en place un système de protection de ces molécules vitales quasiment dans tous les compartiments cellulaires. Cette protection n'est pas ou plus faiblement mise en place à l'ombre.

Le facteur de transcription MBF1C est décrit comme un activateur de la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana*, mais son rôle est parfois élargi à la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Suzuki *et al.*, 2008).

Les ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase activases (RCA1) ont pour fonction d'activer la RuBisCO et par voie de conséquence, la photosynthèse. Elles sont décrites comme intervenant dans la réponse à différents stress biotiques et abiotiques, en particulier la lumière (Kurek *et al.*, 2007) et à la température (Crafts-Brandner et Salvucci, 2000 ; Heckathorn *et al.*, 2002 ; Kaushal *et al.*, 2013). Les 6-phosphofructokinases 3 (PFK3) catalysent la première étape de la glycolyse, transformant le D-fructose-6-phosphate provenant du métabolisme du glucose en fructose-1,6-biphosphate (Mustroph *et al.*, 2007). Elles participent à la transformation de la source carbonée fournie par la photosynthèse en énergie (ATP). Il est à noter que les plus fortes expressions de *PFK3* et *RCA1* en plein soleil pourraient être liées à la stimulation de l'activité photosynthétique conduisant à une augmentation de la teneur en glucose, qui en retour, pourrait induire l'activation de la glycolyse.

Le gène codant pour un transporteur de nitrate, annoté *NRT 1.2*, représente une très forte homologie de séquence (75 % d'identité entre les séquences protéiques déduites) avec le transporteur *NPF4.6* (NRT1/PTR FAMILY 4.6) dont la fonction serait également de permettre l'importation de l'acide abscissique à l'intérieur des cellules (Kanno *et al.*, 2012). De ce fait, ce gène pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'ouverture des stomates et donc dans la régulation de la photosynthèse.

En définitive, il semblerait que seulement les gènes impliqués dans les deux grands processus métaboliques soient surexprimés dans les feuilles en plein soleil, en commun, aux deux altitudes : la réponse aux stress et le métabolisme carboné.

Tableau 19 : Processus biologiques, numéros d'accèsion, fonctions moléculaires, compartimentations et niveaux d'expression moyen des gènes surexprimés à la fois à basse et haute altitude dans les feuilles de *C. arabica* var. Marsellesa cultivés en plein soleil.

Processus biologique	ID gène	Fonction moléculaire	Composante cellulaire	Log2FC	
				650 m	1250 m
Réponse au stress	Cc08_g11130	18.8 kDa classe II sHSP2	Cytoplasme	8,39	12,4
	Cc06_g01960	17.5 kDa classe I HSP	Cytoplasme	4,55	5,76
	Cc01_g13580	17.5 kDa classe I HSP	Cytoplasme	5,15	3,27
	Cc02_g07140	HSP18.2	Cytoplasme	3,26	5,3
	Cc03_g03680	HSP70-8		1,82	3,7
	Cc02_g23670	HSP22.7	Réticulum endoplasmique	7,38	10,23
	Cc02_g33190	Luminal-binding protein 5, BiP5 (HSP70)	Réticulum endoplasmique	3,31	5,21
	Cc11_g16360	HSP21	Chloroplaste	3,58	6,77
	Cc08_g15170	HSP83A	Chloroplaste	2	2,29
	Cc08_g12550	18.8 kDa class II HSP23	Chloroplaste	3,14	4,65
	Cc01_g12750	17.6 kDa class I HSP3		4,51	6,91
	Cc04_g05250	HSP70		5,11	5,74
	Cc06_g09540	Facteur de transcription MBF1C	Noyau	3,44	4,94
Cc08_g11070	Putative méthyltransférase NSUN5, méthylation, ARNr 28S	Noyau	2,67	2,86	
Glycolyse	Cc06_g23680	6-phosphofructokinase 3, PFK3	Cytoplasme	3,21	4,72
	Cc06_g23690	6-phosphofructokinase 3, PFK3		3,02	4,18
Photosynthèse	Cc04_g14500	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase activase 1	Chloroplaste	1,92	3,25
Transport de Nitrate/ABA	Cc04_g15590	Transporteur de nitrate et ABA, NRT1.2/NPF4.6	Membrane cellulaire	2,92	3,8

Nous avons remarqué que le différentiel d'expression est toujours plus élevé à haute altitude, excepté pour un sHSP (Figure 27). Ceci indiquerait que les effets de l'ombrage sont plus importants à haute altitude, non seulement par la plus forte intensité de la réponse différentielle observée, mais également par le plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés.

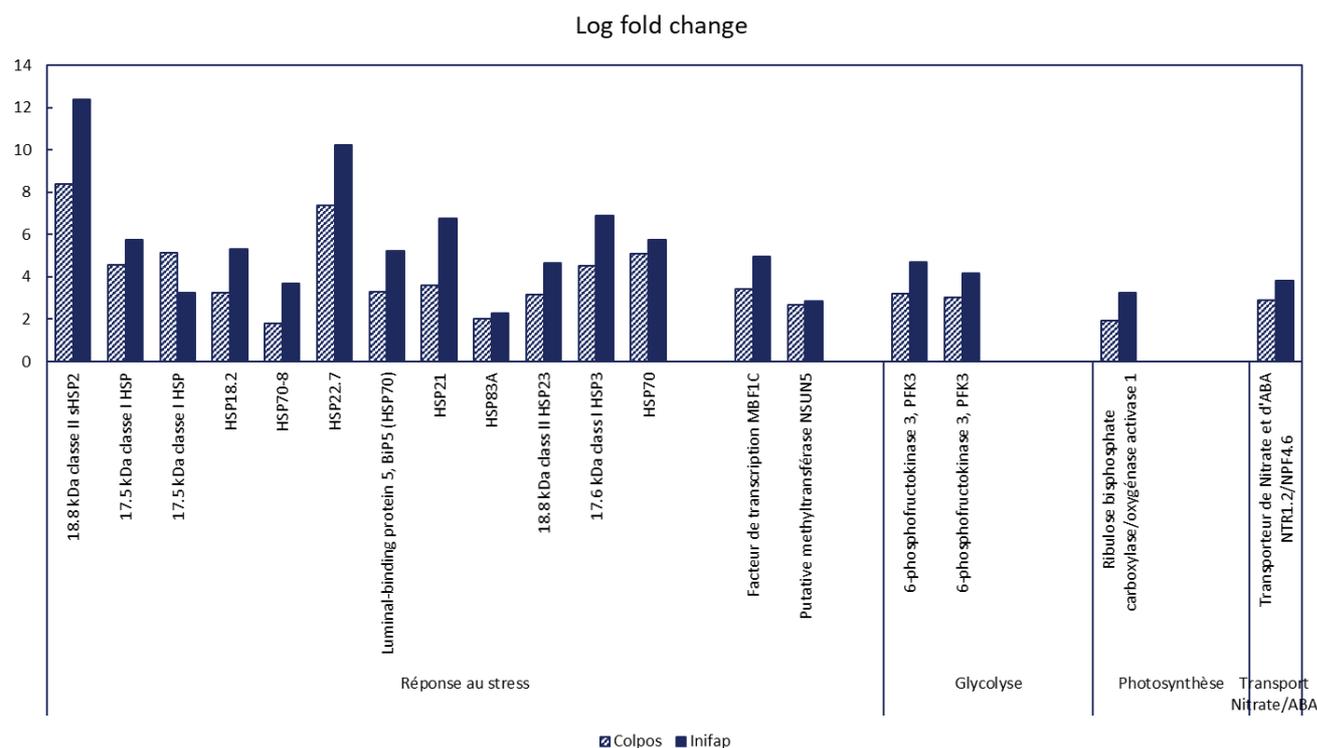


Figure 27 : Histogramme de l'expression des gènes communs surexprimés en plein soleil aux deux altitudes

Tableau 20 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les feuilles de *C. arabica* var. Marsellesa cultivés à basse altitude selon les conditions d'ombrage (50 % d'exclusion ou non)

	ID des gènes	Fonction moléculaire	Processus biologique
Gènes surexprimés	Cc04_g04290	26.5 kDa heat shock protein, mitochondrie, HSP26,5	Réponse au stress
	Cc11_g01350	Putative Photosystème I PsaA/PsaB –	Photosynthèse
	Cc01_g13570	Putative UDP-glycosyltransférase 76C4 UGT76C4 –F3GT	Biosynthèse des flavonoïdes
	Cc00_g06640	DFR	Biosynthèse des flavonoïdes
	Cc00_g21360	Transporter d'acide aminé transmembranaire	
	Cc11_g06080	Putative protéase DEGP14 –	Protéolyse
	Cc01_g13170	Protéine à fonction inconnue	
	Cc00_g01900	Protéine à fonction inconnue	
	Cc04_g16250	Protéine à fonction inconnue	
	Cc00_g01730	Protéine à fonction inconnue	
	Cc08_g05020	Protéine à fonction inconnue	
Gènes sous-exprimés	Cc02_g09840	Putative Major facilitator superfamily protein -	Transport transmembranaire
	Cc03_g03660	Amine oxydase	Voie métabolique des amines
	Cc04_g01940	Protein HOTHEAD - HTH	Signalisation cellulaire
	Cc09_g01950	Putative Cytochrome P450 77A3	Biosynthèse de la cutine
	Cc10_g13070	Putative Cyanidine-3-O-glucoside 2-O-glucuronosyltransférase UGAT	Voie des flavonoïdes
	Cc06_g21100	Putative DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC10 - facteur de transcription lié à l'ADN	
	Cc01_g08330	Putative récepteur des protéines 12 RLP12,	Maintenance des méristèmes
	Cc04_g07480	Putative récepteur de protéine kinase ZmPK1-	Phosphorylation des protéines
	Cc00_g11630	Probable pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase-	Épissage des mRNA
	Cc04_g05800	Récepteur de protéine kinase ZmPK1- PK1	

### II.3.2. Gènes différentiellement exprimés uniquement à basse altitude

Vingt-et-un (21) gènes sont différentiellement exprimés de façon spécifique à basse altitude. Onze (11) sont surexprimés et dix (10) sous-exprimés en plein soleil. Ces gènes sont présentés dans le tableau 20.

Parmi les onze (11) gènes surexprimés, seulement six (06) ont une fonction connue et participent à la réponse au stress (un gène *HSP*), à la photosynthèse (*PSI*, *PSaA/PSaB*), à la synthèse des flavonoïdes (*F3GT* et *DFR*) et à la protéolyse (protéase et transport transmembranaire d'acides aminés). L'expression de *HSP26.5* a été notée uniquement chez *Arabidopsis thaliana* en réponse aux stress thermique et conduirait à la thermotolérance (Wang *et al.*, 2016 ; Zhuang *et al.*, 2018). La présence de ce gène en tant que réponse à la thermotolérance n'a pas encore été montré chez d'autre espèce.

Les dix (10) gènes sous-exprimés en plein soleil présentent des fonctions très variées. Ils participent au métabolisme général de la cellule, excepté un gène codant pour une cytochrome 450 impliquée dans la synthèse de la cutine et un gène *UGAT* permettant la formation de flavonoïdes glucuronylés<sup>20</sup>.

En tenant compte de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés (surexprimés et sous-exprimés), seize (16) gènes présentent des fonctions connues et dix (10) d'entre eux sont plus particulièrement impliqués dans la réponse à la lumière. Ils sont listés dans le tableau 21 et leur différentiel d'expression entre ombre et plein soleil est représenté sur la figure 28. D'après les Log2FC, il semblerait que les feuilles maintenues en plein soleil surexpriment des gènes impliqués dans la réponse au stress et la photosynthèse tout en sous-exprimant des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire de base. A l'ombre, il semble donc que les feuilles investissent moins dans la réponse causée par une forte luminosité et favoriserait la croissance et la protection cellulaire.

En résumé, à basse altitude, les feuilles en plein soleil montrent une expression plus forte des gènes impliqués dans la réponse au stress alors que les feuilles à l'ombre favorisent la croissance et la protection cellulaire.

<sup>20</sup>Une molécule glucuronylé est un composé lié à un glucose oxydé sur son carbone numéro 6 par une liaison osidique

Tableau 21 : Gènes sélectionnés pour leur intérêt potentiel en tant que marqueurs de la réponse adaptative à la lumière à basse altitude. Numéros d'accèsion, fonctions et différentiels d'expression entre les arbres au soleil et à l'ombre

ID des gènes	Fonction	Log2FC
Cc11_g06080	Protéolyse	8,42
Cc04_g04290	HSP-réponse au stress	6,21
Cc01_g13570	F3GT - Biosynthèse des flavonoïdes	5,01
Cc11_g01350	Photosynthèse	4,76
Cc00_g06640	DFR-biosynthèse des flavonoïdes	2,67
Cc00_g11630	Epissage des ARNm	-8,17
Cc04_g07480	Phosphorylation des protéines	-7,77
Cc01_g08330	Maintenance des méristèmes	-7,57
Cc09_g01950	Biosynthèse des cutines	-5,74
Cc04_g01940	Signalisation cellulaire	-4,14

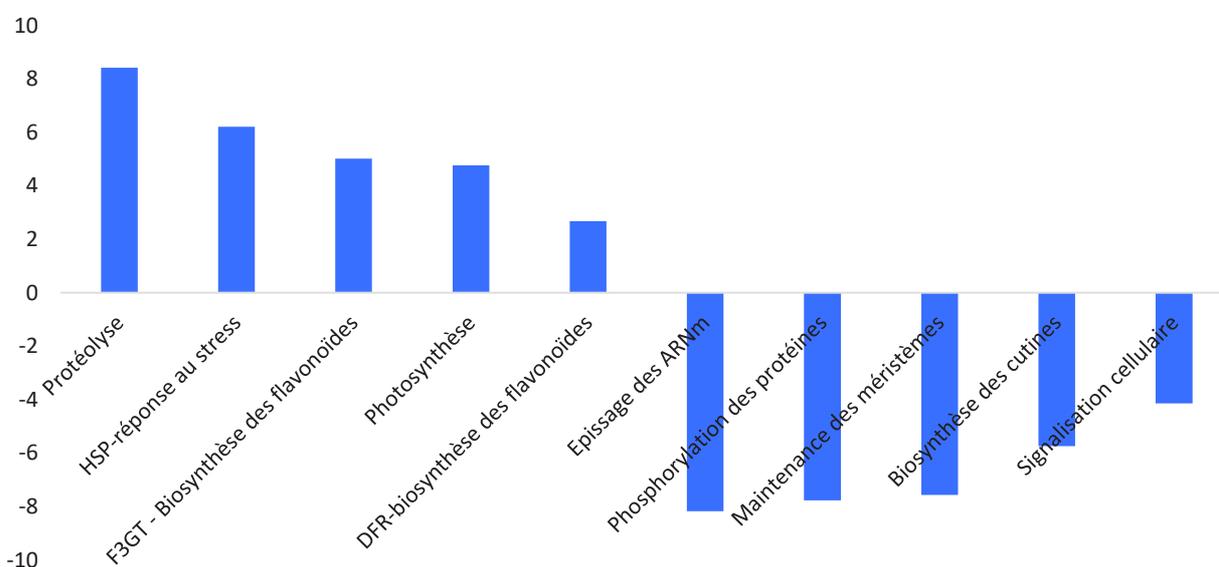


Figure 28 : Expression différentielle des gènes retenus pour l'identification d'une réponse à l'ombrage

### II.3.3. Gènes différentiellement exprimés uniquement à haute altitude (1250 m)

Les résultats des analyses d'expression différentielle des gènes ont montré que parmi les 140 gènes spécifiques aux feuilles matures des individus cultivés à 1250 m, 85 sont surexprimés au soleil et 40 sont sous-exprimés. Ces derniers n'ont pas été retenus car ils n'ont pas présenté de fonction connue. En ce qui concerne les gènes surexprimés en plein soleil, la recherche de fonction a été réalisée sur les vingt (20) gènes qui ont montré la plus forte différence d'expression. Parmi eux, quatorze (14) ont une fonction moléculaire connue et sont présentés dans le tableau 22. Ils peuvent être classés dans les mêmes groupes que ceux identifiés à basse altitude : les gènes de réponse au stress (HSP), les gènes impliqués dans la photosynthèse et dans le transport de nitrate. La présence des cinq (05) gènes impliqués dans la

voie de signalisation induite par l'auxine, a fait la particularité de la réponse des plantes cultivées en plein soleil à haute altitude, traduisant alors un impact sur le développement de la plante (Tableau 22).

Tableau 22 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les feuilles de *C. arabica* var. Marsellesa cultivés à haute altitude selon les conditions d'ombrage (50 % d'exclusion ou non)

ID des gènes	Fonction moléculaire	Composante cellulaire	Log2FC
Cc02_g04220	Protéine de 14 kDa riche en proline DC2.1		8,44
Cc08_g08390	Protéine induite par l'auxine ARG7		8,29
Cc08_g08380	Protéine induite par l'auxine ARG7		8,17
Cc02_g16700	Protéine induite par l'auxine 15A		7,59
Cc00_g22640	Protéine induite par l'auxine ARG7		5,72
Cc02_g02350	HSP83A		3,9
Cc10_g10920	Protéine induite par l'auxine 5NG4		3,46
Cc07_g13330	15.7 kDa HSP15.7	Peroxisome	2,78
Cc02_g07150	17.6 kDa HSP17.6C classe I		2,66
Cc04_g00900	17.4 kDa HSP17.4B classe III		2,52
Cc06_g08580	Transporteur de nitrate 1.4 NRT1.4		2,4
Cc05_g09650	Protéine associée à la chlorophylle a et b 1 CAB1C	Chloroplaste	2,14
Cc02_g00910	HSP22	Chloroplaste	1,95
Cc08_g02340	Transporteur de nitrate 1.5 NRT1.5		1,86

Ces résultats montrent que, quelle que soit l'altitude, la culture des caféiers en plein soleil stimule la synthèse de protéines de choc thermique (HSP) par rapport à la culture sous ombrage qui favorise la croissance.

#### II.4. Discussion et conclusion

L'étude morphologique a montré un impact faible de l'ombrage sur la croissance à basse altitude (augmentation de la taille des feuilles) alors qu'il est assez fort à haute altitude, avec une diminution de la taille des plantes et une augmentation de celle des feuilles. Cette dernière observation est en accord avec les résultats obtenus avec *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-99 cultivé en plein champ (Jaramillo-Botero *et al.*, 2010). En général, lorsque l'intensité lumineuse est faible, des modifications morphologiques sont observées chez les plantes pour qu'elles puissent maximiser l'utilisation de la lumière. Ainsi, les plantes privilégient la croissance en hauteur et/ou l'augmentation de la surface foliaire, comme chez

*Capscicum annum* (Díaz-Pérez, 2013). Dans notre étude, il semble que la condition d'ombrage conduise les caféiers à investir dans l'activité photosynthétique en augmentant la taille des feuilles plutôt que celle de la plante entière. En altitude, la croissance de la plante est même inhibée à l'ombre, ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'un autre facteur environnemental entre en jeu, comme un déficit en eau causé soit par la forte croissance des feuilles soit par les plus faibles températures liées à l'altitude et augmentées par l'ombrière. Alors que nous avons noté que la température était plus basse sur le site à haute altitude, l'ajout d'une toile d'ombrage sur les cultures entraîne, pendant la période d'éclairement, une diminution de la température par rapport à la situation en plein soleil (Figure 29). Des températures plus faibles pourraient être à l'origine de la limitation de la croissance, comme cela a été observé chez les cucurbitacées (Inthichack *et al.*, 2014). Quoiqu'il en soit, au niveau des feuilles, l'analyse transcriptomique montre que l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation induites par l'auxine est supérieure dans les feuilles des arbres au soleil, sans que nous ayons pu déterminer si ces gènes avaient un rôle stimulateur ou inhibiteur de la croissance. Ce résultat confirme l'impact de la culture sous ombrage sur la croissance de la plante et désigne, du moins lorsque les cultures sont pratiquées en altitude, ces voies de signalisation comme des gènes candidats, marqueurs potentiels de l'adaptation à l'ombrage.

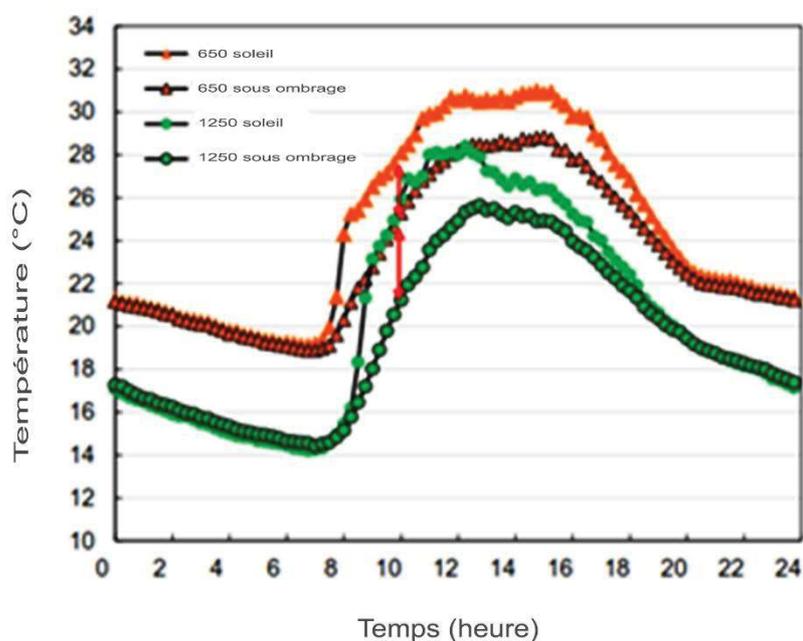


Figure 29 : Evolution de la température journalière à basse (650) et haute (1250) altitudes pour les plantes cultivées en plein soleil ou sous ombrage

D'autre part, l'étude métabolique montre que, comme la variété Catuai' Vermelho IAC 44 (Martins *et al.*, 2014), les individus en plein soleil à haute altitude accumulent plus de sucres libres que les individus sous ombrage. Par contre, à basse altitude, ces individus se différencient par une forte accumulation de raffinose, polyol impliqué dans la réponse à différents stress, plus particulièrement le stress osmotique, son rôle principal consistant à piéger les ROS (Nishizawa *et al.*, 2008). En prenant en compte la densité stomatique élevée et les fortes teneurs en sucres (saccharose, glucose, amidon) en condition de plein soleil aux deux altitudes, mais surtout à haute altitude, il est à supposer que l'activité photosynthétique est plus forte en plein soleil. D'ailleurs, l'analyse transcriptomique montre une expression supérieure de gènes de la photosynthèse et de la glycolyse dans les feuilles de plantes en plein soleil, quelle que soit l'altitude.

L'analyse métabolique ciblée sur les composés phénoliques a montré un effet de l'ombrage identique aux deux altitudes sur la teneur en flavonoïdes glycosylés mais un effet opposé sur celles des flavanols et acides chlorogéniques. En effet, si la culture sous ombrage à basse altitude s'accompagne d'une plus faible teneur globale en composés phénoliques, la culture sous ombrage à altitude élevée favorise l'accumulation des flavanols et des acides chlorogéniques. Pour les flavonoïdes, les différences de teneurs très marquées observées à faible altitude sont à associer à une différence d'expression de deux gènes de glycosylation impliqués dans la synthèse des flavonoïdes, *F3GT* et *DFR*, dont les expressions sont respectivement 5 et 2,7 fois plus fortes (respectivement, exprimée en Log<sub>2</sub>FC) dans les feuilles exposées au soleil. La surexpression de *F3GT* confirme le rôle majeur des flavonoïdes glycosylés dans la réponse des feuilles de *C. arabica* à l'intensité lumineuse (Martins *et al.*, 2014 ; Vidović *et al.*, 2017) et désigne ces composés comme des marqueurs potentiels de la capacité adaptative des caféiers à l'augmentation des rayonnements. La différence de réponse de ces métabolites est moins marquée à altitude élevée, ce qui peut être due à une quantité de radiations solaires plus faible en altitude (Tableau 6), mais également à l'influence d'un autre facteur climatique, comme la température ou la pluviométrie dont les écarts entre ombre et soleil peuvent évoluer en fonction de l'altitude.

Un des résultats majeurs obtenus par l'analyse transcriptomique est la mise en évidence d'une plus forte expression de nombreux gènes codant pour des HSP en plein soleil. Cette observation révèle que les feuilles de caféiers cultivés en plein soleil sont placées en situation de stress. Elle correspond à la réponse attendue de plantes qui, à l'origine, étaient des plantes de couvert, poussant dans les forêts tropicales africaines. Les HSP telles que les HSP70 ont pour rôle de protéger les protéines, généralement en empêchant leur agrégation ou leur

repliement en conditions de stress thermique (Tripp *et al.*, 2009). Mais chaque groupe de HSP a un mécanisme de protection spécifique. Ainsi, les sHSP dégradent les protéines qui présentent un repliement inadapté. Même si la présence de ces protéines est signalée lors de l'application de tout type de stress, leur rôle a surtout été étudié en présence de stress thermique. Il a été montré que les HSP70, en combinaison avec les HSP90, jouent le rôle de molécule-signal lors d'attaques de pathogènes (Tiwari *et al.*, 2015) et/ou en réponse à la température (froid et chaleur) (Garavaglia *et al.*, 2009). En combinaison avec les HSP17.6 ou HSP18.1, elles facilitent l'adaptation du raisin et des petits pois au stress thermique (Zhang *et al.*, 2008 ; Al-Whaibi, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, la synthèse de HSP83A aide dans les réponses thermiques (Nguyen *et al.*, 2015). Chez les caféiers, la forte présence des HSP en plein soleil pourrait alors correspondre à une réponse à un stress thermique. Nous avons vu que deux gènes codant pour la 6-phosphofructokinase 3, enzyme de la glycolyse induite par la chaleur, étaient également surexprimés en plein soleil. L'ensemble de ces résultats montre que *C. arabica* var Marsellesa, arbre dont les ancêtres sont originaires des forêts d'Afrique, met en place dans ses feuilles, lorsqu'il est cultivé en plein soleil, un système de protection lui permettant de lutter contre l'augmentation de la température externe ou interne induite par l'intensité lumineuse.

Partie III : Impacts du greffage sur la  
réponse de *C. arabica* à l'altitude

### III. Impacts du greffage sur la réponse de *C. arabica* à l'altitude

Le greffage de *C. arabica* sur un porte-greffe provenant d'une espèce plus résistante est présenté comme l'une des solutions possibles pour rendre *C. arabica* plus tolérant aux changements climatiques. Dans cette optique, cette partie du travail étudie l'apport du greffage sur la réponse de *C. arabica* var. Marsellesa à différentes conditions climatiques. Pour cela, nous allons comparer le comportement de plants greffés sur *C. canephora* à des plants non greffés cultivés en plein soleil à trois altitudes différentes sur la base d'analyses morphologiques, biochimiques et transcriptomiques. Le nombre total d'individu étudié s'est élevé à trente (30).

#### III.1. Réponses morphologiques comparées

Le tableau 23 présente les caractéristiques morphologiques des arbres non greffés (pieds francs, PF) et greffés (GR) ainsi que celles de leurs feuilles matures mesurées au cours de l'année 2015 sur les trois stations situées à des altitudes différentes. La comparaison entre greffés et non greffés montre que, suivant l'altitude, le greffage peut avoir un effet positif ou négatif sur la croissance des plantes et des feuilles, mais l'analyse statistique ne permet pas de dégager des différences significatives entre les valeurs, excepté pour le nombre d'entre-nœuds à la plus haute altitude. Il est cependant intéressant de noter que le greffage a un effet positif sur tous les paramètres de croissance lorsque la culture est réalisée à la station d'altitude intermédiaire (Roma, 1050 m). Une légère diminution de la hauteur de la plante et de la taille des feuilles semblerait être la réponse commune des plantes au greffage pour les deux autres stations.

Tableau 23 : Mesure de la croissance de *Coffea arabica* cv. Marsellesa greffé à trois altitudes. PF : Pieds Francs ; GR : Greffés. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05$ )

Caractéristiques morphologiques						
Altitude (m)	Condition	Plante			Feuilles matures	
		Hauteur (cm)	Diamètre (cm)	Entre-nœuds (N)	Longueur (mm)	Largeur (mm)
650	PF	121,20 ± 3,90	35,00 ± 1,17	28,00 ± 1,14	118,56 ± 2,91	54,06 ± 1,64
Colpos	GR	116,10 ± 4,26	34,40 ± 2,80	27,40 ± 1,12	118,83 ± 3,17	49,93 ± 1,45
	<i>p</i>	0,421	0,841	1,000	1,000	1,000
1050	PF	100,80 ± 5,43	32,16 ± 1,86	27,20 ± 0,73	134,85 ± 7,67	63,79 ± 4,19
Roma	GR	109,60 ± 7,48	35,46 ± 1,58	29,20 ± 1,24	142,79 ± 3,66	67,56 ± 0,44
	<i>p</i>	0,222	0,222	0,310	0,421	0,690
1250	PF	118,60 ± 1,89	29,00 ± 0,89	22,80 ± 0,20	161,17 ± 3,43	75,87 ± 1,55
Inifap	GR	113,00 ± 1,47	29,63 ± 1,07	24,50 ± 0,29	143,50 ± 5,91	70,79 ± 6,61
	<i>p</i>	0,063	0,730	<b>0,016</b>	0,063	0,556

Ainsi, le greffage a un effet faible et variable, selon l'altitude, sur la croissance des caféiers : effet inhibiteur du développement de la plante et des feuilles aux altitudes extrêmes mais effet stimulateur à l'altitude intermédiaire.

### III.2. Réponses biochimiques comparées

Les résultats des dosages par HPLC des composés phénoliques contenus dans les feuilles matures sont présentés dans le tableau 24 sous forme de ratio (GR/PF) entre les feuilles de plants greffés (GR) et non greffés (PF). Si nous nous intéressons aux flavanols (catéchine et épicatechine), nous pouvons noter que le greffage a un effet négatif sur leur accumulation dans les feuilles, excepté à haute altitude pour l'épicatechine dont la concentration est plus de 2 fois supérieure dans les feuilles des plants greffés que dans les non-greffés. Cependant, cette différence n'est pas significative à  $p < 0,05$  traduisant une forte diversité de proportions en ces métabolites entre les plantes du même motif. En ce qui concerne les acides chlorogéniques ou esters d'acides hydroxycinnamiques (CQAs, diCQs et FQA), les ratios des teneurs évoluent en fonction de l'altitude : légèrement moins accumulés dans les feuilles des greffés à basse altitude (excepté pour le FQA). Ces composés présentent des taux assez semblables chez les greffés et non-greffés à l'altitude intermédiaire et sont plus fortement accumulés chez les greffés à haute altitude, en particulier le 5-CQA, le 3,4-diCQ et le FQA. Pour les flavonoïdes glycosylés (dérivés de flavone, de kaempférol et de quercétine), l'effet du greffage varie à la fois en fonction de l'altitude et du composé considéré. Alors que F-dihex est faiblement concentré chez les greffés à basse altitude, tous les autres dérivés sont présents en fortes teneurs. A moyenne altitude, les deux dérivés de quercétine, autres que la rutine, sont faiblement accumulés chez les greffés, contrairement aux deux autres métabolites qui sont stables quantitativement. La plus haute altitude ne semble pas avoir d'effet différentiel sur les proportions de tous ces composés. Quant aux xanthones (mangiférine et dérivé de mangiférine), la teneur en mangiférine varie très peu entre pieds greffés et non greffés, excepté à haute altitude où les valeurs sont plus faibles chez les greffés alors que celle du dérivé hydroxybenzoyle évolue en fonction de l'altitude : plus accumulé chez les greffés à basse altitude, teneur équivalente à altitude moyenne et faible concentration à haute altitude. Cependant, il est important de noter que des différences significatives de teneur, à  $p < 0,05$ , ne sont obtenues que pour la rutine à faible altitude et le 5-CQA à haute altitude, ce qui traduit là encore une forte variabilité au sein des motifs étudiés.

Ainsi, le greffage a un effet minime au point de vue biochimique. Malgré que les altitudes extrêmes aient deux comportements différents comme une accumulation de flavonoïdes glycosylés est notée à basse altitude, et à haute altitude, nous avons des teneurs élevées en flavanols et CQAs, les différences de concentration ne sont statistiquement différentes que pour la rutine à basse altitude et le CQA à haute altitude.

Tableau 24 : Ratio des concentrations en composés phénoliques des feuilles matures de *Coffea arabica* var. Marsellesa greffés (GR) comparés aux individus non greffés (pieds franc (PF)) à trois altitudes différentes. Test statistique : Mann-Whitney's ( $\alpha = 0,05, *$ )

Composés phénoliques		Ratio GR/PF		
		650 m	1050 m	1250 m
Flavanols	Catéchine	0,758	0,793	0,997
	Epicatéchine	0,951	0,695	2,255
Acides chlorogéniques Dérivés d'acides hydroxycinnamiques	5-CQA	0,955	1,066	1,334*
	4-CQA	0,849	1,041	1,294
	3,4-diCQ	0,812	1,057	1,513
	3,5-diCQ	0,803	1,138	1,163
	4,5-diCQ	0,902	1,044	1,320
	FQA	1,012	0,997	1,810
Flavonoïdes glycosylés	F-dihex	0,768	1,085	0,945
	Q-dihex-dhex	1,258	0,769	0,922
	Q-diglu	1,201	0,853	1,055
	Rutine	1,535*	1,032	0,965
Xanthones	Mangiférine	1,043	0,822	0,829
	Mang-OHbenz	1,119	1,042	0,816

### III.3. Réponses transcriptomiques comparées

Les analyses transcriptomiques entre les individus greffés et non greffés ont été réalisées sur la plateforme Galaxy de l'IRD, à l'aide du logiciel EdgeR (Robinson et al, 2010) en appliquant un filtre de 15 pour chaque motif. Ce qui réduit le nombre de gènes transcrits à comparer à 18925, 19751 et 19520 pour l'altitude la plus basse, intermédiaire et la plus haute, respectivement. En fixant le niveau de probabilité à 0,05 comme dans l'étude précédente, le nombre de gènes différentiellement exprimés est trop élevé (6903 à faible altitude) pour réaliser correctement l'analyse. Le seuil a alors été fixé à  $p < 0,001$  de manière à ne sélectionner que les différences d'expression hautement significatives.

Dans ces conditions, un (01) gène a été mis en évidence chez les caféiers cultivés à haute altitude (1250 m), 29 à moyen altitude (1050 m) et 878 à basse altitude (650 m) à  $p < 0,001$  (Figure 30). Parmi ces gènes différentiellement exprimés, trois (03) gènes sont communs aux altitudes 650 m et 1050 m et aucune ressemblance n'a été trouvée pour les trois altitudes ni aux altitudes 650 m et 1250 m ou 1050 m et 1250 m. Ces trois gènes ne présentent pas de fonction connue.

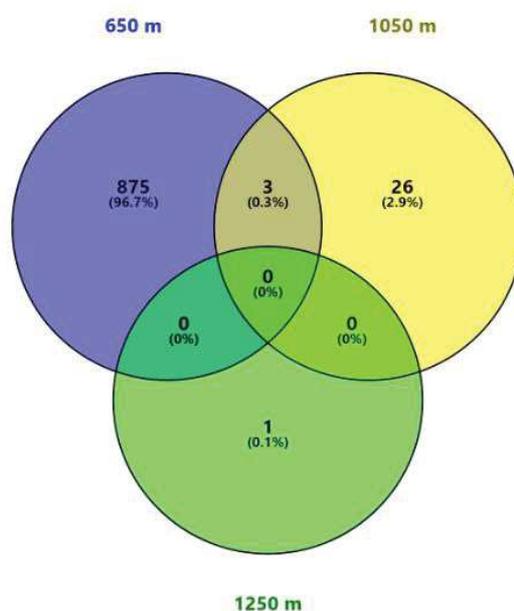


Figure 30 : Diagramme de Venn mettant en évidence le nombre de gènes différentiellement exprimés chez les individus cultivés à 650 m (violet), 1050 m (jaune) et 1250 m (vert) considérés à part ou ensemble

### III.3.1. Expressions comparées chez les individus cultivés à haute altitude (1250 m)

Le gène mis en évidence à cette altitude a pour fonction de réguler la signalisation cellulaire de la cytokinine (*AHP4*). Il est surexprimé chez les individus greffés (Log2FC : 3,71) (Hutchison *et al.*, 2006).

### III.3.2. Expressions comparées chez les individus cultivés à l'altitude intermédiaire (1050 m)

La réponse spécifique des greffés au niveau transcriptomique est représentée par 26 gènes différentiellement exprimés. Parmi eux, nous avons écarté 23 gènes dont treize (13) ayant des fonctions inconnues et dix (10) intervenant dans la réponse à des stress biotiques. La comparaison des niveaux d'expression des 3 gènes restants est présentée sur la figure 31. Deux d'entre eux (*ACSI*) sont surexprimés chez les pieds francs et sont impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène, phytohormone induite en réponse aux stress biotiques et abiotiques (Huang *et al.*,

2007). Le troisième gène (*CAX1*) est surexprimé chez les greffés. Il intervient dans les transports ioniques (Conn *et al.*, 2011).

Ainsi, une forte proportion des gènes différentiellement exprimés n'est pas annotée ou intervient dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques.

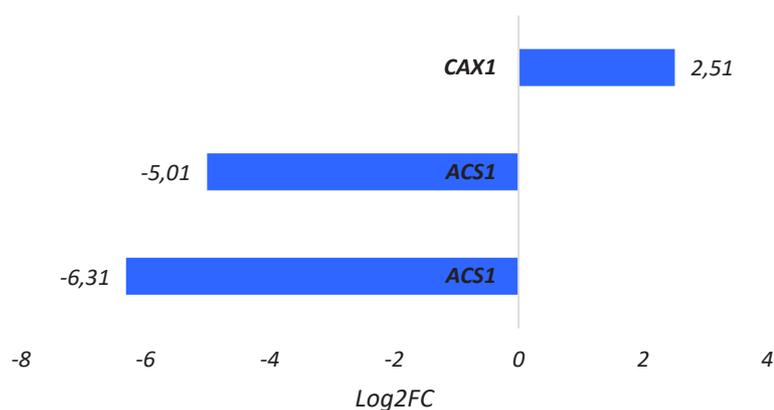


Figure 31 : Comparaison de l'expression différentielle (Log2FC) des 3 gènes retenus entre les feuilles de *C. arabica* var. Marsellea greffés (GR) ou pieds francs (PF) à l'altitude intermédiaire (GR/PF)

### III.3.3. Expressions comparées chez les individus cultivés à basse altitude (650 m)

A basse altitude, l'effet du greffage est très marqué au niveau transcriptomique. Parmi les 878 gènes différentiellement exprimés dans les feuilles des individus cultivés à 650 m, 602 ont des fonctions inconnues. Parmi les 276 gènes restants, 32 sont impliqués dans les réponses à des stress biotiques et n'ont pas été retenus dans l'analyse comparée. La comparaison des 244 gènes restants est donnée dans le tableau 25.

Si le nombre de gènes surexprimés chez les pieds francs et les greffés est quasi équivalent (124 pour les pieds francs contre 120 chez les greffés), les fonctions moléculaires des gènes surexprimés les plus représentés sont différentes. En effet, chez les pieds francs, la moitié des gènes surexprimés est impliquée dans la signalisation cellulaire (31 gènes) ou dans la croissance et le développement (28 gènes) alors que chez les greffés, plus de la moitié des gènes sont impliquées dans le transport des molécules ou des solutés (ion, azote, protéine, sucre, eau...) (45 gènes) ou dans la traduction des protéines (23 gènes). Cette dernière fonction n'est pas surexprimée dans les feuilles des pieds francs. Il faut également noter qu'un plus grand nombre de gènes impliqués dans la photosynthèse est surexprimé chez les greffés (7 au lieu de 3 chez les non greffés). Enfin, les gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotiques et différentiellement exprimés entre les deux motifs sont peu nombreux et ne sont pas

systématiquement surexprimés dans l'un ou l'autre des motifs. Les fonctions de ces gènes et leur différence d'expression sont indiquées dans les tableaux 26 et 27.

Tableau 25 : Nombre de gènes surexprimés dans les feuilles des individus cultivés à basse altitude (650 m) regroupés selon leur fonction, en excluant la réponse stricte aux stress biotiques

Fonction	Nombre de gène		
	Total	Pied franc	Greffées
Croissance et développement	45	28	17
Photosynthèse	10	3	7
Biosynthèse des phénylpropanoïdes	1	0	1
Biosynthèse de la lignine	2	0	2
Biosynthèse du mévalonate	3	3	0
Biosynthèse des caroténoïdes	1	0	1
Biosynthèse des flavonoïdes	3	0	3
Métabolisme des lipides	8	4	4
Méthylation de l'ADN	1	1	0
Modification des ARN	14	14	0
Modification des protéines	11	8	3
Réparation de l'ADN	6	5	1
Réponse au ROS	2	1	1
Réponse au stress	5	2	3
Réponse au stress abiotiques	10	5	5
Traduction	23	0	23
Signalisation cellulaire	35	31	4
Transport	64	19	45
<b>Total</b>	<b>244</b>	<b>124</b>	<b>120</b>

Chez les pieds francs, *MDAR4* est le gène le plus fortement différentiellement exprimé. Il est impliqué dans la détoxification du peroxyde d'oxygène en cas de stress oxydatif (Eastmond, 2007). *KIN17* a un rôle dans le réglage des réponses physiologiques durant une déficience cuivrique (Garcia-Molina *et al.*, 2014). *ASPG1* serait impliqué dans la réponse à la sécheresse (Yao *et al.*, 2012), de même que *CPL3*, un régulateur négatif de la voie de signalisation induite par l'ABA (Li *et al.*, 2014). *NADK2* est impliqué dans la protection des chloroplastes contre les dommages oxydatifs (Chai *et al.*, 2005) et *RH42* intervient dans la réponse à l'hypoxie (Umate *et al.*, 2010). Enfin, le gène *WEB1* a un rôle dans la tolérance aux fortes intensités lumineuses (Kodama *et al.*, 2011).

L'analyse de la fonction des gènes montre que la réponse aux stress abiotiques des plants de *C. arabica* non greffés est plus forte que celle des greffés. Une plus grande protection contre les stress oxydatifs semble être mise en place chez ces individus, en particulier lorsque ce stress

oxydatif provient d'un stress lumineux (*RH42* et *WEB1*) ou hydrique (*ASPG1* et *CPL3*). Cette réponse est accompagnée de la surexpression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la modification des protéines (8), la modification des ARN (8), la réparation de l'ADN (5) et la méthylation de l'ADN (1). La surexpression des gènes de la voie de biosynthèse des mévalonates va également dans le sens d'une réponse plus forte des pieds francs aux stress. En effet, les mévalonates sont les précurseurs des terpénoïdes, métabolites impliqués dans la réponse aux stress biotique ou abiotique (Vickers *et al.*, 2014).

Tableau 26 : Fonctions et expressions comparées des gènes impliqués dans la réponse au stress et surexprimés chez les individus pieds francs à basse altitude

ID des gènes	Description	Log2FC
Cc06_g15110	Probable Monodéhydroascorbate réductaseMADR4 At3g27820	3,54
Cc07_g19190	Protéine de liaison ADN KIN17	2,53
Cc04_g07380	Protéase aspartique des cellules de garde 1 ASPG1	2,44
Cc11_g15170	ARN polymérase II CPL3	2,29
Cc10_g12740	NAD kinase 2 NADK2	2,26
Cc10_g09510	ARN hélicase 42 RH42	1,66
Cc10_g04200	Protéine en réponse à la lumière bleu 1 WEB1	1,47

Dans les feuilles des individus greffées, les gènes surexprimés impliqués dans la réponse au stress abiotique sont au nombre de huit (08) (Tableau 27). Le plus fortement différentiellement surexprimé est le gène *RD22*, impliqué dans la réponse à la déshydratation (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1993). Le gène codant pour une isoflavone réductase P3 (*AtIlg75280*) intervient en cas de stress oxydatif (Kwon *et al.*, 2015). *SPX3*, *SPX2* et *PAP17* en réponse à un déficit en phosphate ( $P_i$ ) (Shi *et al.*, 2014 ; Puga *et al.*, 2014 ; Klecker *et al.*, 2014). La surexpression de *CBL1* intervient en cas de stress hydrique lié à la sécheresse, au stress salin ou au froid et permet d'activer la signalisation via les  $Ca^{2+}$  (Cheong *et al.*, 2003). Quant au gène *MSRB3*, il serait plus impliqué dans la détoxification de la méthionine sulfoxide et des ROS dans le réticulum endoplasmique lors de l'acclimatation au froid (Kwon *et al.*, 2007). Enfin, *GRP2* est surexprimé en réponse au froid (Kim *et al.*, 2007). Il est à souligner que *C. canephora*, le porte-greffe, est sensible au froid (Fortunato *et al.*, 2010) et supporte difficilement la culture à haute altitude (DaMatta et Ramalho, 2006), mais cela ne permet pas d'expliquer cette réponse des plants greffés, car elle est observée uniquement à basse altitude.

Tableau 27 : Fonctions et expressions comparées des gènes impliqués dans la réponse au stress et surexprimés chez les individus greffés à basse altitude

ID des gènes	Description	Log2FC
Cc00_g24060	Gène en réponse à la déshydratation <i>RD22</i>	2,6
Cc01_g03970	Homologue de l'isoflavone réductase <i>At1g75280</i>	2,45
Cc04_g09270	Phosphatase acide pourpre 17 <i>pap17</i>	2,11
Cc06_g08450	Protéine contenant le domaine SPX 2 <i>SPX2</i>	2,04
Cc03_g08450	Protéine de liaison aux ARN 2 <i>GRP2</i>	1,84
Cc02_g24440	Protéine contenant le domaine SPX 3 <i>SPX3</i>	1,83
Cc08_g11190	Calcineurine <i>CBL1</i>	1,66
Cc03_g02760	Peptide méthionine sulfoxyde réductase B3 <i>MSRB3</i>	1,54

En résumé, les individus non greffés et greffés cultivés à basse altitude mettent en place un système de réponse aux stress abiotiques. Cependant, le dispositif mis en place ne fait pas intervenir les mêmes gènes et voies de signalisation ( $\text{Ca}^{2+}$  au lieu de l'ABA). De plus, ces individus semblent plutôt répondre à un stress de type hydrique qui pourrait être engendré par les basses températures.

#### III.4. Discussion et conclusion

L'effet du greffage sur la croissance des plantes et des feuilles n'est pas significatif et diffère en fonction de l'altitude. Ce mode de culture ne semble avoir trop d'influences sur la croissance des caféiers, contrairement à ce qui se passe chez les pommiers et les cerisiers (Tworkoski and Miller, 2007 ; López-Ortega *et al.*, 2016).

Les différences biochimiques sont également faibles et ne vont pas dans le même sens aux trois altitudes. Par contre, les résultats des études transcriptomiques indiquent que de nombreux gènes sont différentiellement exprimés entre les pieds francs et les greffés, d'autant plus que les arbres sont cultivés à basse altitude. Étonnamment, peu de gènes sont communs à deux ou trois altitudes, mettant en évidence des réponses différentes liées au greffage selon l'altitude. Si le greffage ne modifie que très faiblement l'expression des gènes à haute altitude, son effet est plus marqué à altitude moyenne et surtout à faible altitude où de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux stress sont différentiellement exprimés. En effet, à basse altitude, les caféiers semblent devoir s'adapter à des conditions hydriques défavorables et mettent en place des réponses différentes selon que les plantes soient greffées ou non. De plus, à basse et moyenne altitudes, beaucoup de gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans la

réponse au stress biotique indiquant que le greffage aurait beaucoup d'influence sur la réponse de *C. arabica* aux pressions de type biotique.

#### IV. Essai de validation des marqueurs biochimiques chez les caféiers

Dans cette partie du travail, nous avons, dans un premier temps, analysé et comparé les réponses biochimiques de *C. canephora* et *C. arabica* soumis à des variations identiques de climat. Pour cela, trente (30) plants de *C. canephora* ont fait l'objet de collecte de feuille. La seconde étape du travail a consisté à confronter les réponses biochimiques de *C. arabica* placé dans de nouvelles conditions environnementales à celles de *C. arabica* déjà enregistrées. Pour cette étude, nous avons pris 5 individus par mode de culture (sous irrigation ou non).

##### IV.1. Variation des contenus phénoliques des feuilles de *C. canephora* en fonction de l'altitude

Une première analyse par LC-MS a permis de montrer la présence de seulement quatre groupes de composés biochimiques : flavones, flavonols, flavanols et esters d'acide hydroxycinnamiques. Dans ce dernier groupe, nous avons noté un dérivé de l'acide caféique, non annoté en LC-MS mais séparé à un temps de rétention de 16,5 minutes en HPLC (Figure 32). D'autre part, la présence de xanthones n'a pas été détectée.

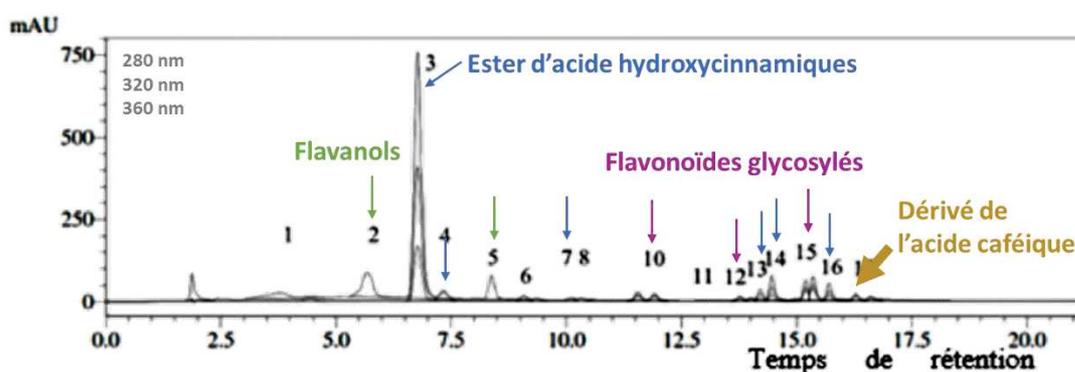


Figure 32 : Chromatogramme de *C. canephora* cv Nemaya obtenu à trois longueurs d'onde égales à 280 nm, 320 nm et 360 nm.

1 : Théobromine ; 2 : Catéchine ; 3 : 5-CQA ; 4 : 4-CQA ; 5 : Caféine ; 6 : Epicatéchine ; 7 : FQA ; 8 : F-dihex ; 9 : Q-di-hex-dhex ; 10 : Q-diglu ; 11 : K-dihex-dhex ; 12 : K-hex-dhex ; 13 : 3,4-diCQ ; 14 : 3,5-diCQ ; 15 : Rutine ; 16 : 4,5-diCQ ; 17 : Dérivé d'acide caféique

L'évaluation du contenu des feuilles de *C. canephora*, effectuée sur des prélèvements des années 2015 et 2016, est présentée dans les tableaux 28 et 29.

Tableau 28 : Moyennes des teneurs en acides chlorogéniques et xanthones, évaluées sur deux années de récolte et exprimées en pourcentage de matière sèche, de feuilles matures de *C. canephora* cultivés à trois altitudes différentes.

Acide 5-*O*-caféoylquinique (5-CQA), acide 4-*O*-caféoylquinique (4-CQA), acide 3,4-*O*-dicaféoylquinique (3,4-diCQA), acide 3,5-*O*-dicaféoylquinique (3,5-diCQA), acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique (4,5-diCQA), acide 5-*O*-fêruloylquinique (FQA) ; Der A. caf : dérivé d'acide caféique. Test statistique : Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

Année	Altitude (m)	Composés phénoliques (%DW)							
		Flavonoïdes						Flavanols	
		Flavonoïdes glycosylés						Catechin	Epicat
	F-dihex	Q-dihex-dhex	Q-diglu	Rutin	K-dihex-dhex	K-hex-dhex			
2015	650	0,046b	0,403a	0,217b	0,290a	0,174b	0,119b	2,818b	0,092ab
	1050	0,000a	0,336a	0,111ab	0,339a	0,086ab	0,017a	1,606a	0,162b
	1250	0,000a	0,224a	0,056a	0,383a	0,000a	0,064ab	2,369ab	0,026a
	<i>p</i>	<b>0,006</b>	<b>0,069</b>	<b>0,010</b>	<b>0,374</b>	<b>0,008</b>	<b>0,007</b>	<b>0,019</b>	<b>0,010</b>
2016	650	0,029a	0,453b	0,383b	0,686a	-	0,236b	2,757a	0,286a
	1050	0,029a	0,343ab	0,126a	0,522a	-	0,070ab	2,581a	0,639b
	1250	0,020a	0,234a	0,112a	0,461a	-	0,060a	3,300a	0,184a
	<i>p</i>	<b>0,086</b>	<b>0,018</b>	<b>0,008</b>	<b>0,068</b>		<b>0,006</b>	<b>0,220</b>	<b>0,011</b>

Tableau 29 : Moyennes des teneurs en flavonoïdes, évaluées sur deux années de récolte et exprimées en pourcentage de matière sèche, de feuilles matures de *C. canephora* cultivés à trois altitudes différentes.

Flavone-di-C-hexose (F-dihex) ; quercétine 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (Q-dihex-dhex) ; quercétine 3,4-di-*O*-glucoside (Q-diglu) ; rutine (Rutin), kaempférol 3-*O*-dihexose-déoxyhexose (K-dihex-dhex) ; kaempférol 3-*O*-hexose-déoxyhexose (K-hex-dhex) ; catéchine (catechin) et épicatechine (Epicat). Test statistique : Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

Année	Altitude (m)	Composés phénoliques (%DW)								
		Acides chlorogéniques						Xanthones		
		5-CQA	4-CQA	3,4-diCQ	3,5-diCQ	4,5-diCQ	FQA	Der A. caf	Mang	Mang-OHbenz
2015	650	3,518a	0,226a	0,090a	0,204a	0,119a	0,019a	0,022a	0,000	0,000
	1050	3,120a	0,181a	0,107a	0,126a	0,123a	0,037ab	0,038a	0,000	0,000
	1250	2,909a	0,148a	0,080a	0,207a	0,077a	0,053b	0,031a	0,000	0,000
	<i>p</i>	<b>0,071</b>	<b>0,112</b>	<b>0,410</b>	<b>0,054</b>	<b>0,053</b>	<b>0,007</b>	<b>0,163</b>		
2016	650	3,828b	0,176b	0,083b	0,240a	0,138b	0,028a	0,127b	0,000	0,000
	1050	2,975ab	0,130ab	0,054ab	0,313a	0,053a	0,027a	0,075a	0,000	0,000
	1250	2,788a	0,114a	0,045a	0,278a	0,051a	0,033a	0,102ab	0,000	0,000
	<i>p</i>	<b>0,014</b>	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	<b>0,208</b>	<b>0,009</b>	<b>0,136</b>	<b>0,029</b>		

Le composé majoritaire du groupe des acides chlorogéniques est le 5-CQA. Sa teneur varie entre 2,79 et 3,83 % MS, et ces valeurs sont obtenues en 2016, respectivement à la plus basse et à la plus haute altitude. D'une manière générale, les teneurs en esters d'acide caféique (CQAs et DiCQs) sont plus faibles à 1250 m, quelle que soit l'année de prélèvement. Par contre,

le dérivé d'acide férulique et le 3,5-diCQ sont plus accumulés à cette forte altitude. Les teneurs de ces esters d'acide caféique sont souvent plus élevées à 650m, mais des différences significatives sont observées uniquement durant l'année 2016 entre les altitudes extrêmes, pour les contenus en 4- et 5-CQA, et en 3,4- et 4,5-DiCQA.

Concernant les flavonoïdes, presque tous les composés du groupe des flavonoïdes glycosylés, sauf la rutine, sont plus accumulés à faible altitude, quelle que soit l'année de récolte. Les dérivés de quercétine présentent des concentrations élevées qui peuvent être supérieures à celles de la rutine en 2015 (Tableau 29). La plupart de ces composés ont des teneurs significativement différentes entre altitudes au cours d'une année, mais seuls le Q-diglu et le K-hex-dhex montrent des différences significatives au cours des deux années. En particulier, le Q-diglu voit sa teneur augmenter avec l'altitude, quelle que soit l'année de récolte.

En ce qui concerne les flavanols, le composé majoritaire est la catéchine dont la teneur varie de 2,76 à 3,3% MS. Nous observons que la teneur en épicatechine est en général 10 fois plus faible que celle de la catéchine. Les teneurs en ces deux composés sont toujours statistiquement différentes à l'altitude intermédiaire par rapport aux deux autres, la catéchine y étant plus faiblement accumulée.

En résumé, les feuilles de *C. canephora* se distinguent de celles de *C. arabica* par la présence d'un dérivé d'acide caféique (non identifié) et l'absence de composés de la famille des xanthones. Un seul composé, le Q-diglu, pourrait être considéré comme marqueur biochimique de l'adaptation par sa baisse de teneur en fonction de l'altitude et une hausse des concentrations en fonction de l'année de récolte.

#### IV.2. Variation des contenus phénoliques des feuilles de *C. arabica* malgache en fonction du mode de culture

Les valeurs moyennes des teneurs en composés phénoliques des feuilles de *C. arabica* cultivés avec ou sans irrigation sont données dans le tableau 30. Le test de Mann-Whitney (à  $p < 0.05$ ) permet d'identifier l'épicatechine, le 3,5-diCQ et l'ensemble des flavonoïdes glycosylés sauf la rutine comme des marqueurs potentiels de la diversité entre plants irrigués et non irrigués. D'une manière générale, les feuilles des individus irrigués sont plus concentrées en flavanols, mais moins riches en flavonoïdes glycosylés et xanthones. Concernant les CQAs et les diCQs, l'accumulation préférentielle dépend du métabolite considéré. En effet, si la teneur en 5-CQA est plus élevée pour les individus irrigués, celle du 4-CQA est plus forte chez les

individus non irrigués. De même, le 4,5-diCQ est plus fortement accumulé dans les feuilles des individus non irrigués, alors que le 3,4-diCQ et le 3,5-diCQ sont plus concentrés chez les individus irrigués. Ces évaluations n'ayant été réalisées qu'une seule fois, il est difficile de les comparer aux résultats obtenus au Mexique. Cependant, les variations obtenues indiquent que l'enrichissement en eau du sol favorise l'accumulation des flavanols et limite celle des flavonoïdes glycosylés et des xanthones. Ce résultat est en opposition aux résultats obtenus au Mexique qui montraient un effet négatif des fortes pluviométries sur les teneurs en acides chlorogéniques et flavanols. L'apport de l'eau uniquement au niveau du sol pourrait-il alors modifier l'accumulation des composés phénoliques dans les feuilles ?

Tableau 30 : Moyennes des teneurs en composés phénoliques (%MS) dans les feuilles des caféiers malgaches en culture irriguée ou non (N = 10). Test statistique : Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )

Composés phénoliques		Non irrigué	Irrigué
Flavanols	Catéchine	1,288	1,749
	Epicatechine	0,644	0,904*
Acides chlorogéniques Dérivés d'acides hydroxycinnamiques	5-CQA	2,8	2,948
	4-CQA	0,162	0,14
	3,4-diCQ	0,019	0,02
	3,5-diCQ	0,029	0,052*
	4,5-diCQ	0,022	0,018
	FQA	0,081	0,067
Flavonols glycosylés	F-dihex	0,648*	0,409
	Q-dihex-dhex	0,096*	0,062
	Q-diglu	0,552*	0,323
	Rutine	1,152	0,94
	K-dihex-dhex	0,068*	0,03
	K-hex-dhex	0,113*	0,04
Xanthones	Mangiférine	1,036	0,877
	Mang-OHbenz	0,027	0,02

### IV.3. Discussion et conclusion

Les mêmes groupes de composés phénoliques ont été quantifiés chez *C. canephora* et *C. arabica* malgache. Deux différences majeures ont été notées entre les deux espèces cultivées l'absence des xanthones et la présence d'un dérivé d'acide caféique chez les *C. canephora*. Si l'absence des xanthones a déjà été mentionnée chez *C. canephora* (Talamond *et al.*, 2008 ; Campa *et al.*, 2012), la présence de ce dérivé d'acide caféique n'a jamais été soulignée (Mondolot *et al.*, 2006 ; Campa *et al.*, 2012 ; Martins *et al.*, 2014). Cependant, ce dérivé a peut-être été pris en compte lors de la quantification des acides caféiques totaux de *C. canephora* dans les réactions de tolérance au froid (Fortunato *et al.*, 2010). En fait, le composé qui marque la différence entre altitude chez *C. canephora* est le Q-diglu. Ce composé est connu pour son activité antioxydante lors de stress (Wahid *et al.*, 2007 ; Chebrolu *et al.*, 2016 ; Vidović *et al.*, 2017). Pour *C. arabica* malgache, l'irrigation semble favoriser l'accumulation des flavanols, ce qui va dans le sens des études sur *Cuminum cyminum* qui montrent une accumulation d'anthocyanidines, dont les flavanols sont les précurseurs, en cas d'irrigation (Alinian *et al.*, 2015).

Bien que les analyses n'aient été réalisées que sur deux ans, nous pouvons remarquer que chez *C. canephora* comme chez *C. arabica*, les molécules qui semblent susciter un intérêt pour servir de marqueur biochimique de l'adaptation sont les flavonoïdes glycosylés, et plus particulièrement le Q-diglu en tant que marqueur de l'adaptation à la lumière. D'autre part, ce sont ces composés qui permettent d'établir une différence significative entre *C. arabica* irrigué ou non.

# **DISCUSSION GENERALE**

Parmi les 124 espèces du genre *Coffea*, 53 sont endémiques à Madagascar et deux espèces africaines sont mondialement exploitées pour la production de café : *C. arabica* et *C. canephora* (Davis *et al.*, 2007 ; Davis *et al.*, 2011). Actuellement, la caféiculture est menacée par le changement climatique et des solutions doivent être trouvées pour préserver cette culture, en particulier en recherchant des individus susceptibles de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales générées par les modifications climatiques. Dans ce cadre, notre étude s'est intéressée à la mise en évidence de marqueurs biochimiques ou génétiques qui sont liés à l'adaptation des caféiers aux stress abiotiques induits par le changement climatique. Connaissant la richesse des caféiers en certains composés phénoliques, notre étude s'est focalisée sur la recherche de marqueurs appartenant à cette famille de composés ainsi que de gènes concourant ou non à leur synthèse et pouvant servir de cibles en amélioration pour les caféiers cultivés.

En cultivant la variété Marsellesa de *C. arabica* à trois altitudes différentes comprises entre 650 et 1250 m et en analysant le contenu des feuilles matures récoltées sur trois années successives, nous avons pu montrer que les acides chlorogéniques, les flavanols et les flavonols glycosylés étaient de bons indicateurs de l'adaptation des feuilles à certaines contraintes climatiques. Une analyse du transcriptome a permis de confirmer le rôle de certains flavonols glycosylés dans l'adaptation des feuilles matures aux radiations solaires. La comparaison du contenu phénolique de ces feuilles avec celui de feuilles d'arbres poussant sous ombrage conforte le rôle de ces molécules dans l'adaptation aux radiations solaires. L'analyse comparative du transcriptome révèle la surexpression, en culture en plein soleil, de gènes codant pour des protéines de choc thermique (HSP) qui pourraient être des indicateurs de la capacité adaptative des caféiers à la lumière. L'étude comparative du métabolisme phénolique et du transcriptome de plants non greffés ou greffés sur *Coffea canephora* permet de révéler des différences au niveau de l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques et des transports de solutés. Le greffage semble faciliter le transport des nitrates et la photosynthèse. L'adaptation passerait par des voies de signalisation différentes chez les individus greffés. Enfin, les flavonols glycosylés semblent intervenir également dans l'adaptation de *C. canephora* aux modifications environnementales engendrées par l'altitude ainsi que dans l'adaptation des *C. arabica* à la pauvreté du sol en eau.

## I. Les marqueurs potentiels en réponse aux rayonnements solaires

Nos études métaboliques et transcriptomiques désignent les flavonols glycosylés, et plus particulièrement les dérivés de quercétine différents de la rutine, comme acteurs principaux dans l'adaptation des feuilles matures aux radiations solaires. Ces résultats, excepté pour la rutine dont les teneurs ne suivent pas celles des autres composés glycosylés, sont en accord avec ceux de Martins et ses collaborateurs (2014) obtenus sur une autre variété de *C. arabica* dans une expérimentation où seule l'intensité lumineuse était modifiée. Très récemment, Zhang et ses collaborateurs (2017a) ont montré que, chez *Fagopyrum tataricum*, la rutine pouvait également intervenir dans les réponses à la sécheresse et à une basse température. Dans notre dispositif expérimental constitué de trois essais à différentes altitudes pour lesquelles toutes les caractéristiques du climat sont susceptibles d'être différentes, il est possible que la teneur en rutine soit le reflet de la réponse à plusieurs stress environnementaux, contrairement aux autres composés de la même famille. L'implication des composés phénoliques dans la réponse aux rayonnements solaires a été décrite chez de nombreuses espèces telles que *Pisum sativum* ou *Triticum aestivum* (Alexieva *et al.*, 2001 ; Vidović *et al.*, 2017). Le rôle particulier des flavonols glycosylés dans la photoprotection est largement documenté. Il est attribué à la présence du noyau B ortho-dihydroxylé des flavonoïdes qui constituerait un écran protecteur contre les rayonnements UV (Agati *et al.*, 2011 ; Agati *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2017b). De plus, la forme glycosylée permet d'améliorer la solubilité, la réactivité et la stabilité de la molécule tout en donnant une plus grande activité antioxydante grâce aux groupements hydroxyles (Hernández *et al.*, 2009 ; Mierziak *et al.*, 2014).

L'étude comparative de la morphologie des arbres cultivés en plein soleil et sous ombrage a également permis de montrer que l'ombrage favorise l'accroissement de la surface foliaire. Ce résultat est soutenu par les études de Díaz-Pérez (2013) qui notent que les plants de *Capiscicum annum* se développent en hauteur et/ou augmentent leur surface foliaire pour maximiser l'utilisation de la lumière. En parallèle, notre analyse transcriptomique montre que l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation induites par l'auxine est supérieure chez les individus sous ombrage, indiquant un effet plus important de la croissance à l'ombre. Elle a mis en évidence une surexpression de trois groupes de protéines de choc thermiques (*HSP*) chez les caféiers non ombragés : les sHSP, HSP70 et HSP90. Les individus placés en plein soleil répondent donc à un stress qui pourrait être lumineux ou thermique (forte chaleur en plein soleil ou chaleur dégagée par l'activité photosynthétique plus intense en plein soleil) (Al-Whaibi, 2011).

Il faut cependant noter que ces observations ne sont valables que pour les feuilles matures. En effet, en comparant le contenu des feuilles matures à celui de feuilles juvéniles et en s'appuyant sur l'analyse de l'expression des gènes dans ces deux types de feuilles, il est apparu que les flavonols glycosylés accumulés dans les feuilles jeunes étaient différents de ceux produits en réponse au stress dans les feuilles matures. Si deux quercétines glycosylées sont synthétisées dans les feuilles matures en réponse à la lumière, c'est la rutine, ou quercétine 3-*O*-rutinoside, qui est largement majoritaire dans les feuilles jeunes et pourrait jouer le rôle d'antioxydant et de photoprotection. Les marqueurs moléculaires potentiels identifiés dans les feuilles matures pourraient donc ne pas être ceux identifiés dans les feuilles jeunes ou d'autres organes de la plante.

## II. Marqueurs potentiels en réponse à la température

Nous savons que le fonctionnement de la photosynthèse induit une production de chaleur et qu'une forte radiation solaire provoque une augmentation de la température foliaire par une activité photosynthétique accrue. Les plantes ont mis en place des systèmes permettant d'évacuer la chaleur liée à l'activité photosynthétique mais il nous est difficile de discerner, dans les réponses à la forte intensité lumineuse, celles qui répondent au stress radiatif de celles qui répondent au stress thermique induit. Aussi, les gènes impliqués dans la réponse au stress thermique peuvent aussi être impliqués dans les stress lumineux. D'ailleurs, au niveau biochimique, les flavonols glycosylés sont décrits comme des composés liés à la réponse à la chaleur dans les feuilles de tomate, de pastèque, de canne à sucre et des grains de soja (Rivero *et al.*, 2001 ; Wahid, 2007 ; Chebrolu *et al.*, 2016). Notre étude transcriptomique comparant les caféiers cultivés à l'ombre et au soleil a mis en évidence trois groupes d'HSP, HSP70, HSP90 et les sHSP. La majorité des études sur les HSP ont été conduites sous stress thermique, d'où leur fonction connue dans la thermotolérance (Takahashi *et al.*, 1992; Sarkar *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016) comme pour HSP17.6 et HSP 18.1, dont l'expression combinée a été observée chez le raisin et les petits pois en réponse au stress thermique (Zhang *et al.*, 2008; Al-Whaibi, 2011). Lors de cette analyse, un autre groupe de HSP (HSP83A) est surexprimé au soleil, mais il est décrit par ailleurs comme impliqué dans la réponse aux stress thermique (Nguyen *et al.*, 2015). Il a été montré plusieurs fois chez *Arabidopsis thaliana* que le HSP26.5 était induit après un stress thermique (Wang *et al.*, 2016 ; Zhuang *et al.*, 2018). Concernant les gènes impliqués dans la photosynthèse (*RCA1*) et (*PFK3*), des études montrent qu'ils seraient impliqués dans l'adaptation aux stress thermiques (Kurek *et al.*, 2007 ; Mustroph *et al.*, 2007).

Ainsi, il nous est difficile de dire si les marqueurs génétiques mis en évidence par comparaison des plantes cultivées en plein soleil ou sous ombrage sont des marqueurs d'adaptation à la lumière ou à la température. En tout état de cause, leur expression contribue au maintien des caféiers en culture en plein soleil et leur permet d'assurer leur croissance sous ces conditions. Cependant, en comparant les croissances sous ombrage et en plein soleil, nous avons constaté, du moins en ce qui concerne les feuilles, une plus grande croissance sous ombrage. Il n'est pas impossible que l'énergie dispensée par la plante pour tolérer les fortes intensités lumineuses (et la température qui en découle) soit fournie aux dépens de la croissance. Il faut également noter que les feuilles des plantes cultivées en plein soleil à basse altitude, en plus de surexprimer les HSP, renferment des teneurs fortes en raffinose, sucre accumulé en condition de stress. A cette altitude, en limitant la situation de stress, l'ombrage semble être une condition favorable à la culture des caféiers.

### III. Marqueurs potentiels en réponse au stress hydrique

Les différentes analyses effectuées lors de cette étude sur la réponse de *C. arabica* à l'altitude ou/et à l'ombrage nous indiquent que les CQA et les flavanols constituent des marqueurs biochimiques potentiels de stress hydrique. Chez *Prunus avium*, *Cistus clusii* et *Salvia officinalis*, cette relation négative entre la teneur en métabolites et les précipitations est expliquée par le fait que la plante investit dans la croissance et réduit la synthèse de métabolites secondaires en cas de fortes précipitations (Cohen *et al.*, 1994 ; Hernández *et al.*, 2004 ; Bettaieb *et al.*, 2011). D'autre part, Bidel et ses collaborateurs (2007) et Smirnoff (2008) ont montré que chez trois espèces ligneuses (*Morus nigra* L., *Prunus mahaleb* L. et *Lagerstroemia indica* L) les CQAs sont des antioxydants pouvant être accumulés sous l'effet de la sécheresse et d'une forte radiation solaire. Lors de la comparaison entre feuilles issues de pieds non greffés et greffés sur *C. canephora*, nous avons pu noter, à basse altitude, une concentration plus faible en flavanols et CQAs chez les greffés. De plus, l'analyse transcriptomique a montré que les pieds greffés et non greffés surexprimaient des gènes impliqués dans la réponse à la déshydratation (*RD22*, *CBL1*, *ASPG1*, *CPL3*). Les pieds greffés surexprimaient également de nombreux gènes impliqués dans les transports de solutés. Cet ensemble indiquerait que le porte-greffe *C. canephora* cv. Nemaya éviterait que *C. arabica* se trouve en situation de stress hydrique dans les conditions de culture imposées à basse altitude. Si les flavanols et les CQAs peuvent être considérés comme des marqueurs biochimiques potentiels de stress hydrique, les

gènes *RD22*, *CBL1*, *ASPG1* et *CPL3* pourraient constituer d'excellents gènes candidats pour la sélection d'individus en fonction de leur tolérance au stress hydrique.

Le gène de réponse au stress *RD22*, induit par l'ABA a tout d'abord été décrit par Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (1993) chez *Arabidopsis thaliana*. Puis, il a été prouvé sur les études de la vigne que ce gène est un marqueur de stress abiotique lié à la déshydratation comme la sécheresse ou la salinité (Hanana *et al.*, 2008 ; Matus *et al.*, 2014). Le gène *CBL1* est impliqué dans la signalisation de la voie calcique en réponse au stress hydrique, au stress salin et au froid chez *Arabidopsis thaliana* (Albrecht *et al.*, 2003 ; Cheong *et al.*, 2003), mais également chez d'autres espèces comme *Ammopiptanthus mongolicus* (Guo *et al.*, 2010) et *Glycine max* (Neto *et al.*, 2013). Il semblerait que *CBL1* soit également une réponse commune au stress lié à la déshydratation comme le gène *RD22*. La surexpression du gène *ASPG1* aide les plants d'*Arabidopsis thaliana* à faire face à la sécheresse (Yao *et al.*, 2012) mais aussi au froid (Liu *et al.*, 2012). Ces observations nous confortent dans la sélection de ces gènes comme marqueurs dans la réponse à la déshydratation.

#### IV. Validation des marqueurs biochimiques chez d'autres espèces

Cette validation a été tentée sur la deuxième espèce cultivée, *C. canephora*. Généralement cultivée en basse altitude (du niveau de la mer jusqu'à 1200m) et à température environnant 24 à 26°C (DaMatta et Ramalho, 2006), cette espèce ne rencontre pas les conditions de culture idéales dans cette étude où les températures peuvent souvent descendre en-dessous de 16°C à haute altitude. Les analyses biochimiques semblent montrer que seul le FQA pourrait être un marqueur de l'adaptation aux faibles températures, sa teneur augmentant avec l'altitude de plantation. Par contre, tout comme chez *C. arabica*, les flavonols glycosylés participent à la réponse aux radiations solaires. Cependant, les dérivés de kaempférols s'associent aux dérivés de quercétine pour répondre aux fortes conditions de lumière.

La majorité des études réalisées sur les caféiers cultivés à Madagascar sont basées sur l'analyse biochimique des grains. De manière générale, la composition des grains de *C. arabica* décrite par Rakotomalala (1993) correspond à celle des feuilles de *C. arabica* malgache de notre étude excepté certains composés caractéristiques des grains. Les conditions d'irrigation favorisent la concentration en flavanol dans les feuilles de *C. arabica* malgache, ce qui constitue une réponse différente de celle obtenue au Mexique. Ce résultat pourrait cependant être expliqué par une adaptation au stress hydrique des individus sous irrigation (Alinian *et al.*, 2015). De même, alors que la production de flavonoïdes glycosylés est apparue comme une

réponse classique à une forte radiation solaire, les caféiers irrigués présentent des teneurs plus faibles en ces composés que les non irrigués, ce qui pourrait indiquer là encore un effet particulier de l'irrigation sur le métabolisme des composés phénoliques.

**CONCLUSION GENERALE ET**  
**PERSPECTIVES**

L'originalité de ce travail a été de réaliser en plein champ des études sur la réponse des caféiers à la modification des paramètres climatiques en plein champ, dans des conditions naturelles pour lesquelles les différents paramètres du climat sont susceptibles de changer, seuls ou ensemble. Cette approche, comparée à des études réalisées en chambre de culture ou en pots au cours desquelles un seul paramètre environnemental est modifié, rend plus difficile l'interprétation des résultats mais présente l'avantage de se rapprocher des conditions naturelles auxquelles les caféiers seront soumis dans le cadre du changement climatique. Il a quand même été possible de mettre en évidence des marqueurs d'adaptation biochimiques et transcriptomiques chez *C. arabica*.

Globalement, les résultats morphologiques obtenus suivant les différentes conditions de culture (altitude, ombrage, greffage, irrigation) ont permis d'associer la croissance des feuilles à l'altitude et à la température mais également à l'humidité relative. La croissance foliaire est stimulée par la pluie et l'humidité relative mais limitée par des températures et radiations solaires élevées. Par contre, la croissance générale de la plante ne peut être reliée à aucun des paramètres climatiques. Le greffage ne semble pas avoir trop d'influence sur la croissance des caféiers.

Quant à la composition phénolique des feuilles, les analyses chromatographiques (HPLC et LC-MS) ont permis d'identifier, pour la première fois, la présence de deux composés de la famille des xanthones dans les feuilles de *C. arabica* : l'iriflophénone-*C*-glucoside et le parahydroxybenzoate de mangiférine. Dans les feuilles matures, nous avons montré que l'accumulation des composés phénoliques n'est pas liée à l'altitude. Par contre, celle de certains composés est liée plus particulièrement à l'un des paramètres climatiques. Ainsi, les teneurs en flavonoïdes glycosylés, excepté celle de la rutine, augmentent avec la hausse des rayonnements solaires et de la température, alors que celles des flavanols et des CQAs augmentent quand les précipitations diminuent, par conséquent en cas de stress hydrique. Les CQAs, les flavanols et les flavonols glycosylés peuvent donc constituer des marqueurs de l'adaptation des feuilles matures aux conditions hydriques, lumineuses et thermiques. De plus, les gènes impliqués dans la glycosylation des flavonols, particulièrement exprimés chez les feuilles matures en condition de forte lumière, pourraient servir de marqueurs de l'adaptation aux radiations solaires.

Les résultats biochimiques obtenus grâce au dispositif ombrage confirment nos précédentes observations par l'accumulation des flavonoïdes en réponse à la lumière. De plus, les analyses transcriptomiques nous montrent deux gènes impliqués dans leur synthèse, *F3GT* et *DFR* et de nombreux gènes codant pour les HSP qui sont surexprimés dans les feuilles exposées au soleil, ce qui permet de considérer ces gènes comme des marqueurs potentiels de la capacité adaptative

des caféiers à l'augmentation du rayonnement solaire. Les analyses transcriptomiques sur les caféiers greffés permettent de d'ajouter des gènes impliqués dans les transports cellulaires et dans la réponse à la déshydratation (*RD22*, *CBL1* *ASPG1*, *CPL3*) comme marqueurs potentiels des stress hydriques. La recherche de validation des marqueurs biochimiques en analysant les feuilles de *C. canephora* et de *C. arabica* malgache conforte la possibilité d'utiliser les flavonoïdes glycosylés, notamment le Q-diglu, comme marqueur biochimique d'adaptation.

En perspective, il s'agira tout d'abord de valider le rôle des marqueurs génétiques candidats par des RT-qPCR et de les tester ensuite sur les variétés commercialisées. Il faudrait également élargir l'étude en augmentant le nombre d'individus par essai, le nombre de répétitions et le nombre d'espèces étudiées. De même, il faudrait étendre l'étude à d'autres métabolites secondaires décrits comme intervenant dans les réponses adaptatives, tels que les lipides et les terpénoïdes. Pour confirmer leur implication dans les réponses aux stress, des expérimentations doivent être envisagées en culture contrôlée. Enfin, il serait intéressant de disposer du séquençage complet du génome d'Arabica afin d'augmenter le nombre de gènes à fonction connue.

Ces travaux constituent une première approche pour comprendre les mécanismes mis en jeu par les caféiers pour répondre à différentes conditions environnementales, et en particulier celles qu'ils pourront rencontrer dans un contexte de changement de pratiques culturales pour répondre aux changements climatiques. Approfondis et validés par des études complémentaires, ils pourraient être utiles pour la sélection d'individus producteurs capables de s'adapter aux changements de techniques culturales ou de climat.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adler, S., **2014**. Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation laurina sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L. (phdthesis). Université de la Réunion.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., **2013**. Functional roles of flavonoids in photoprotection : new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72, 35–45.
- Agati, G., Cerovic, Z.G., Pinelli, P., Tattini, M., **2011**. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environmental and Experimental Botany*. 73, 3–9.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, U., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., Kudla, J., **2003** : The calcium sensor *CBL1* integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 36, 457–470.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., **2001**. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* 24, 1337–1344.
- Alinian, S., H., Zeinali, Razmjoo, J., **2016**. Flavonoids, anthocynins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum* L.) accessions under different irrigation regimes. *Industrial Crops and Products*.81, 49–55
- Allen, D.J., Nogues, S., Baker, N.R., **1998**. Ozone depletion and increased UV-B radiation : is there a real threat to photosynthesis ? *Journal of Experimental Botany* 49, 1775–1788.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L., **1997**. Reactive oxygen species and antioxidants : Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100, 224–233.
- Al-Whaibi, M.H., **2011**. Plant heat-shock proteins : A mini review. *Journal of King Saud University - Science*. 23, 139–150.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., **2015**. HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31, 166–169.
- Anthony, F., Combes, M., C., A., B., B., G., G., P., L., **2002**. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 104, 894–900.
- Apel, K., Hirt, H., **2004**. Reactive oxygen species : Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 373–399.
- Ashraf, M., Hafeez, M., **2004**. Thermotolerance of Pearl Millet and Maize at Early Growth Stages : Growth and Nutrient Relations. *Biologia Plantarum*. 48, 81–86.
- Asthir, B., **2015**. Protective mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Journal of Plant Interactions*. 10, 202–210.
- Atkinson, N.J., Dew, T.P., Orfila, C., Urwin, P.E., **2011**. Influence of Combined Biotic and Abiotic Stress on Nutritional Quality Parameters in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 9673–9682.

- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A.J., Morales, C., **2015**. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013) : impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*. 7, 303–321.
- Baca, M., Läderach, P., Hagggar, J., Schroth, G., Ovalle, O., **2014**. An Integrated Framework for Assessing Vulnerability to Climate Change and Developing Adaptation Strategies for Coffee Growing Families in Mesoamerica. *PLoS ONE* 9, e88463.
- Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.-D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., von Koskull-DÖring, P., **2004** : Heat stress response in plants : a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Biosciences*. 29, 471–487.
- Benowicz, A., Guy, R.D., El-Kassabi, Y.A., **2000**. Geographic pattern of genetic variation in photosynthetic capacity and growth in two hardwood species from British Columbia. *Oecologia*. 123, 168–174.
- Bertrand, B., Montagnon, C., Georget, F., Charmetant, P., Etienne, H., **2006**. Creation and dissemination of Arabica coffee varieties : What varietal innovations ? *Cahiers Agricultures* 77–88.
- Bertrand, B., Villarreal, D., Laffargue, A., Posada, H., Lashermes, P., Dussert, S., **2008**. Comparison of the Effectiveness of Fatty Acids, Chlorogenic Acids, and Elements for the Chemometric Discrimination of Coffee (*Coffea arabica* L.) Varieties and Growing Origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56, 2273–2280.
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B., **2011**. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33, 1103–1111.
- Bidel, L.P.R., Meyer, S., Goulas, Y., Cadot, Y., Cerovic, Z.G., **2007**. Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation : in vivo qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *J. Photochemistry Photobiology, Biobiology*. 88, 163–179.
- Bitá, C.E., Gerats, T., **2013**. Plant tolerance to high temperature in a changing environment : scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*. 4, 273–291
- Blum, A., **2016**. Stress, strain, signaling, and adaptation –not just a matter of definition. *Journal of Experimental Botany*. 67, 562–565.
- Bokszczanin, K.L., Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network (SPOT-ITN) Consortium, Fragkostefanakis, S., **2013**. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science*. 4, 315.
- Breitler, J.-C., Campa, C., Georget, F., Bertrand, B., Etienne, H., **2016**. A single-step method for RNA isolation from tropical crops in the field. *Scientific Reports*. 6, 38368.

- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J., Jenkins, G.I., **2005**. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 18225–18230.
- Brown, B.A., Jenkins, G.I., **2008**. UV-B Signaling Pathways with Different Fluence-Rate Response Profiles Are Distinguished in Mature *Arabidopsis* Leaf Tissue by Requirement for *UVR8*, *HY5*, and *HYH*. *Plant Physiology*. 146, 576–588.
- Bunn, C., Läderach, P., Jimenez, J.G.P., Montagnon, C., Schilling, T., **2015**. Multiclass Classification of Agro-Ecological Zones for Arabica Coffee : An Improved Understanding of the Impacts of Climate Change. *PLoS ONE* 10, e0140490.
- Bunn, C., Läderach, P., Rivera, O.O., Kirschke, D., **2014**. A bitter cup : climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. *Climatic Change*. 129, 89–101.
- Camargo, M.B.P. de, 2010. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia*. 69, 239–247.
- Campa, C., Mondolot, L., Rakotondravao, A., Bidel, L.P.R., Gargadennec, A., Couturon, E., Fisca, P.L., Rakotomalala, J.-J., Jay-Allemand, C., Davis, A.P., **2012**. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves : biological implications and uses. *Annals of Botany*. 110, 595–613.
- Campa, C., Urban, L., Mondolot, L., Fabre, D., Roques, S., Lizzi, Y., Aarrouf, J., Doubeau, S., Breitler, J.-C., Letrez, C., Toniutti, L., Bertrand, B., La Fisca, P., Bidel, L.P.R., Etienne, H., **2017**. Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase. *Frontiers in Plant Science*. 8.
- Castronuovo, D., Tataranni, G., Candido, V., Sofo, A., Scopa, A., **2014**. UV-C irradiation effects on young tomato plants : preliminary results. *Pakistan Journal of Botany*. 46(3), 945–949.
- Chai, M.-F., Chen, Q.-J., An, R., Chen, Y.-M., Chen, J., Wang, X.-C., **2005**. NADK2, an Arabidopsis chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Molecular Biology*. 59, 553–564.
- Chebrolu, K.K., Fritschi, F.B., Ye, S., Krishnan, H.B., Smith, J.R., Gillman, J.D., **2016**. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. *Metabolomics*. 12, 28.
- Cheong, Y.H., Kim, K.-N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J., Luan, S., **2003**. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 15, 1833–1845.
- Chevalier, A., **1946**. L'évolution de la culture du Caféier à Madagascar. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*. 26, 390–398.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.-K., **2007**. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*. 12, 444–451.
- Coffee farmers - Fairtrade Foundation <https://www.fairtrade.org.uk>

- Cohen, Y., Treutter, D., Feucht, W., **1994**. Water stress induced changes in phenol composition of leaves and phloem of *Prunus avium* L. *Acta Horticulturae*. 494–497.
- Conn, S.J., Gilliham, M., Athman, A., Schreiber, A.W., Baumann, U., Moller, I., Cheng, N.-H., Stancombe, M.A., Hirschi, K.D., Webb, A.A.R., Burton, R., Kaiser, B.N., Tyerman, S.D., Leigh, R.A., **2011** : Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by *CAX1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 240–257.
- Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E., **2000**. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 13430–13435.
- Craparo, A.C.W., Van Asten, P.J.A., Läderach, P., Jassogne, L.T.P., Grab, S.W., **2015**. *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change : Global implications. *Agricultural and Forest Meteorology*. 207, 1–10.
- Crisp, P.A., Ganguly, D., Eichten, S.R., Borevitz, J.O., Pogson, B.J., **2016**. Reconsidering plant memory : Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*. 2, 1–14
- DaMatta, F.M., **2004a**. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee : a review. *Field Crops Research*. 86, 99–114.
- DaMatta, F.M., **2004b**. Exploring drought tolerance in coffee : a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 16, 1–6.
- DaMatta, F.M., Avila, R.T., Cardoso, A.A., Martins, S.C.V., Ramalho, J.C., **2018**. Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global Warming : A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(21), 5264–5274.
- DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Pinheiro, H.A., Ducatti, C., Loureiro, M.E., **2003**. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science*. 164, 111–117.
- DaMatta, F.M., Godoy, A.G., Menezes-Silva, P.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M.V.P., Morais, L.E., Torre-Neto, A., Ghini, R., **2016**. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions : disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*. 67, 341–352.
- DaMatta, F.M., Ramalho, J.D.C., **2006**. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production : a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18, 55–81.
- Davis, A.P., Chester, M., Maurin, O., Fay, M.F., **2007**. Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Ixoroideae) : the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology. *American Journal of Botany*. 94, 313–329.
- Davis, A.P., Gole, T.W., Baena, S., Moat, J., **2012**. The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*) : Predicting Future Trends and Identifying Priorities. *PLoS ONE* 7, e47981.

- Davis, A.P., Tosh, J., Ruch, N., Fay, M.F., **2011**. Growing coffee : *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data ; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical journal of the Linnean Society*. 167, 357–377.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.-X., Srivastava, R., Rothstein, S.J., Howell, S.H., **2011**. Heat induces the splicing by *IRE1* of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 7247–7252.
- Denoëud, F., Carretero-Paulet, L., Dereeper, A., Droc, G., Guyot, R., Pietrella, M., Zheng, C., Alberti, A., Anthony, F., Aprea, G., Aury, J.-M., Bento, P., Bernard, M., Bocs, S., Campa, C., Cenci, A., Combes, M.-C., Cruzillat, D., Silva, C.D., Daddiego, L., Bellis, F.D., Dussert, S., Garsmeur, O., Gayraud, T., Guignon, V., Jahn, K., Jamilloux, V., Joët, T., Labadie, K., Lan, T., Leclercq, J., Lepelley, M., Leroy, T., Li, L.-T., Librado, P., Lopez, L., Muñoz, A., Noel, B., Pallavicini, A., Perrotta, G., Poncet, V., Pot, D., Priyono, Rigoreau, M., Rouard, M., Rozas, J., Tranchant-Dubreuil, C., VanBuren, R., Zhang, Q., Andrade, A.C., Argout, X., Bertrand, B., Kochko, A. de, Graziosi, G., Henry, R.J., Jayarama, Ming, R., Nagai, C., Rounsley, S., Sankoff, D., Giuliano, G., Albert, V.A., Wincker, P., Lashermes, P., **2014**. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*. 345, 1181–1184.
- Díaz-Pérez, J.C., **2013**. Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) Crop as Affected by Shade Level : Microenvironment, Plant Growth, Leaf Gas Exchange, and Leaf Mineral Nutrient Concentration. *Horticultural Science*. 48, 175–182.
- Ding, W., Song, L., Wang, X., Bi, Y., **2010**. Effect of abscisic acid on heat stress tolerance in the calli from two ecotypes of *Phragmites communis*. *Biologia Plantarum*. 54, 607–613.
- Doré, C., Varoquaux, F., **2006**. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Editions Quae.
- Dreesen, F.E., De Boeck, H.J., Janssens, I.A., Nijs, I., **2012**. Summer heat and drought extremes trigger unexpected changes in productivity of a temperate annual/biannual plant community. *Environmental and Experimental Botany*. 79, 21–30.
- Duan, H., Amthor, J.S., Duursma, R.A., O’Grady, A.P., Choat, B., Tissue, D.T., **2013**. Carbon dynamics of eucalypt seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO<sub>2</sub>] and elevated temperature. *Tree Physiology*. 33, 779–792.
- Dussert, S., Laffargue, A., Kochko, A. de, Joët, T., **2008**. Effectiveness of the fatty acid and sterol composition of seeds for the chemotaxonomy of *Coffea* subgenus *Coffea*. *Phytochemistry*. 69, 2950–2960.
- Dzialo, M., Szopa, J., Czuj, T., Zuk, M., **2017**. Oligodéoxynucleotides Can Transiently Up- and Downregulate *CHS* Gene Expression in Flax by Changing DNA Methylation in a Sequence-Specific Manner. *Frontiers in Plant Science*. 8.
- Eastmond, P.J., **2007**. Monodehydroascorbate reductase4 is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19, 1376–1387.

- Emiliani, J., Grotewold, E., Falcone Ferreyra, M.L., Casati, P., **2013**. Flavonols protect Arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Molecular Plant*. 6, 1376–1379.
- Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M.Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., Huang, J., **2017**. Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Fahad, S., Hussain, S., Saud, S., Khan, F., Hassan, S., Amanullah, Nasim, W., Arif, M., Wang, F., Huang, J., **2016**. Exogenously Applied Plant Growth Regulators Affect Heat-Stressed Rice Pollens. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 202, 139–150.
- Filho, W.L., **2010**. The Economic, Social and Political Elements of Climate Change. Springer Science & Business Media.
- Fortunato, A.S., Lidon, F.C., Batista-Santos, P., Leitão, A.E., Pais, I.P., Ribeiro, A.I., Ramalho, J.C., **2010**. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of Coffea sp. Under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 167, 333–342.
- Fraser, C.M., Chapple, C., **2011**. The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 9.
- Fujita, M., Inoue, T., **1981**. Further studies on the biosynthesis of mangiferin in Anemarrhena asphodeloides : hydroxylation of the shikimate-derived ring. *Phytochemistry*. 20, 2183–2185.
- Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., **2009**. Hsp70 and Hsp90 expression in Citrus and Pepper plants in response to Xanthomonas axonopodis pv. Citri. *European Journal of Plant Pathology*. 123, 91–97.
- Garcia-Molina, A., Xing, S., Huijser, P., **2014**. The Arabidopsis KINI7 and its homolog KLP mediate different aspects of plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*. 9(5). 828–840
- Gay, C., Estrada, F., Conde, C., Eakin, H., Villers, L., **2006**. Potential impacts of climate change on agriculture : A case of study of coffee production in Veracruz, Mexico. *Climatic Changes*. 79, 259–288.
- GIEC, **2007**. Bilan des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, [Équipe de rédaction principale, Pachauri, R.K. et Reisinger, A.
- GIEC **2013** : Changements climatiques 2013 - Les éléments scientifiques par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution climatique.
- González Besteiro, M.A., Bartels, S., Albert, A., Ulm, R., **2011**. Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *The Plant Journal*. 68, 727–737.

- Grativol, C., Hemerly, A.S., Ferreira, P.C.G., **2012**. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Gene Regulatory Mechanisms, Plant gene regulation in response to abiotic stress. Biochimica et Biophysica Acta*. 1819, 176–185.
- Gruber, H., Heijde, M., Heller, W., Albert, A., Seidlitz, H.K., Ulm, R., **2010**. Negative feedback regulation of UV-B–induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 20132–20137.
- Guo, L., Yu, Y., Xia, X., Yin, W., **2010**. Identification and functional characterisation of the promoter of the calcium sensor gene CBL1 from the xerophyte *Ammopiptanthus mongolicus*. *Plant Biology*, 10, 18.
- Haggar, J., baker, P.S., **2007**. Global warming : the impact on coffee. NCAA conferences handout.
- Hailu, H., **2011**. Growth and Physiological Response of Two *Coffea arabica* L. Populations under High and Low Irradiance (Thesis). Addis Ababa University.
- Hanana, M., Deluc, L., Fouquet, R., Daldoul, S., Léon, C., Barrieu, F., Ghorbel, A., Mliki, A., Hamdi, S., **2008**. Identification et caractérisation d'un gène de réponse à la déshydratation « rd22 » chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 331, 569–578.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Roychowdhury, R., Fujita, M., **2013a**. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 9643–9684.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujit, M., **2013b**. Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants, in : Vahdati, K. (Ed.), *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*.
- Hatfield, J.L., Prueger, J.H., **2015**. Temperature extremes : Effect on plant growth and developpement. *Weather and Climate extremes*. 10, 4–10.
- Heckathorn, S.A., Ryan, S.L., Baylis, J.A., Wang, D., Iii, E.W.H., Cundiff, L., Luthe, D.S., **2002**. *In vivo* evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Functional Plant Biology*. 29, 935–946.
- Hectors, K., Prinsen, E., De Coen, W., Jansen, M.A.K., Guisez, Y., **2007**. *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*. 175, 255–270.
- Hectors, K., Van Oevelen, S., Geuns, J., Guisez, Y., Jansen, M.A.K., Prinsen, E., **2014**. Dynamic change in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 152, 219–230.
- Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S., **2004**. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology*. 24, 1303–1311.

- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S., **2009**. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants ? *Trends in Plant Science*. 14, 125–132.
- Hideg, E., Jansen, M.A.K., Strid, A., **2013**. UV-B exposure, ROS, and stress : inseparable companions or loosely linked associates ? *Trends in Plant Science*. 18, 107–115.
- Hoffmann, L., **2003**. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes ; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). (phdthesis). Université Louis Pasteur - Strasbourg I.
- Huang, L.-C., Lai, U.-L., Yang, S.-F., Chu, M.-J., Kuo, C.-I., Tsai, M.-F., Sun, C.-W., **2007** : Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli ACC synthase and ACC oxidase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 47–53.
- Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J., **2006** : The Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell*, 18, 3073–3087.
- Hussain, H.A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S.A., Men, S., Wang, L., **2018**. Chilling and Drought Stresses in Crop Plants : Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. *Frontier in Plant Science*. 9.
- Hüve, K., Bichele, I., Tobias, M., Niinemets, U., **2006**. Heat sensitivity of photosynthetic electron transport varies during the day due to changes in sugars and osmotic potential. *Plant, Cell & Environment*. 29, 212–228.
- International Coffee Organization - ICO <http://www.ico.org>.
- Inthichack, P., Nishimura, Y., Fukumoto, Y., **2014**. Effect of diurnal temperature alternations on plant growth and mineral composition in cucumber, melon and watermelon. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 17, 1030–1036.
- International Panel on Climate Change, IPCC, **2014**. Fifth Assessment Report - Synthesis Report.
- Jansen, M.A.K., **2002**. Ultraviolet-B radiation effects on plants : induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum*. 116, 423–429.
- Jaramillo, J., Muchugu, E., Vega, F.E., Davis, A., Borgemeister, C., Chabi-Olaye, A., **2011**. Some Like It Hot : The Influence and Implications of Climate Change on Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) and Coffee Production in East Africa. *PLoS ONE* 6, e24528.
- Jaramillo-Botero, C., Santos, R.H.S., Martinez, H.E.P., Cecon, P.R., Fardin, M.P., **2010**. Production and vegetative growth of coffee trees under fertilization and shade levels. *Scientia Agricola*. 67, 639–645.
- Jenkins, G.I., **2009**. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 407–431.

- Joët, T., Laffargue, A., Descroix, F., Doulebeau, S., Bertrand, B., Kochko, A. de, Dussert, S., **2010**. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry*. 118, 693–701.
- Joo, J.H., Bae, Y.S., Lee, J.S., **2001**. Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiology*. 126, 1055–1060.
- Joubert, E., de Beer, D., Hernández, I., Munné-Bosch, S., **2014**. Accumulation of mangiferin, isomangiferin, iriflophenone-3-C- $\beta$ -glucoside and hesperidin in honeybush leaves (*Cyclopia genistoides* Vent.) in response to harvest time, harvest interval and seed source. *Industrial Crops and Products*. 56, 74–82.
- Kaiserli, E., Jenkins, G.I., **2007**. UV-B Promotes Rapid Nuclear Translocation of the Arabidopsis UV-B-Specific Signaling Component *UVR8* and Activates Its Function in the Nucleus. *The Plant Cell*. 19, 2662–2673.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiha, T., Kamiya, Y., Seo, M., **2012** : Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 9653–9658.
- Kaushal, N., Awasthi, R., Gupta, K., Gaur, P., Siddique, K.H.M., Nayyar, H., **2013**. Heat-stress-induced reproductive failures in chickpea (*Cicer arietinum*) are associated with impaired sucrose metabolism in leaves and anthers. *Functional Plant Biology*. 40, 1334–1349
- Kaushal, N., Bhandari, K., Siddique, K.H.M., Nayyar, H., **2016**. Food crops face rising temperatures : An overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1),1–42.
- KEGG Database <https://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., **2013**. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14, R36.
- Kim, J.Y., Park, S.J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S.J., Goh, C.-H., Cho, K., Han, O., Kang, H., **2007**. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions. *The Plant Journal*. 50, 439–451.
- Kinoshita, T., Seki, M., **2014**. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant Cell Physiology*. 55, 1859–1863.
- Kleckler, M., Gasch, P., Peisker, H., Dörmann, P., Schlicke, H., Grimm, B., Mustroph, A., **2014**. A Shoot-Specific Hypoxic Response of Arabidopsis Sheds Light on the Role of the Phosphate-Responsive Transcription Factor phosphate starvation response1. *Plant Physiology*. 165, 774–790.
- Klem, K., Ač, A., Holub, P., Kováč, D., Špunda, V., Robson, T.M., Urban, O., **2012**. Interactive effects of PAR and UV radiation on the physiology, morphology and leaf optical properties of two barley varieties. *Environmental and Experimental Botany*. 75, 52–64.

- Kodama, Y., Suetsugu, N., Wada, M., **2011**. Novel protein-protein interaction family proteins involved in chloroplast movement response. *Plant Signaling & Behavior*. 6, 483–490.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., Franklin, K.A., **2009**. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the *bHLH* transcription factor PIF4. *Current Biology*. 19, 408–413.
- Kumar, S., Kaur, R., Kaur, N., Bhandhari, K., Kaushal, N., Gupta, K., Bains, T.S., Nayyar, H., **2011**. Heat-stress induced inhibition in growth and *chlorosis* in mungbean *Phaseolus aureus* is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33, 2091.
- Kumar, S., Kaushal, N., Nayyar, H., Gaur, P., **2012**. Abscisic acid induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings by facilitated accumulation of osmoprotectants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34, 1651–1658.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J.A., Gaur, P., Nayyar, H., **2013**. Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 59, 823–843.
- Kumar, S.V., Wigge, P.A., **2010**. *H2A.Z*-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* 140, 136–147.
- Kurek, I., Chang, T.K., Bertain S.M., Madrigal, A., Liu, L., Lassner, M.W., Zhu, G., **2007** : Enhanced thermostability of *Arabidopsis* Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *The Plant Cell*, 19, 3230–3241.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., Schroeder, J.I., **2003**. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 22, 2623–2633.
- Kwon, S.J., Kwon, S.I., Bae, M.S., Cho, E.J., Park, O.K., **2007**. Role of the methionine sulfoxide reductase *MsrB3* in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant And Cell Physiology*. 48, 1713–1723.
- Kwon, T., Sparks, J.A., Nakashima, J., Allen, S.N., Tang, Y., Blancaflor, E.B., **2015**. Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development. *American Journal of Botany*. 102, 21–35.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., **2012**. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9, 357–359.
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R., Vierling, E., **2005**. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*. 138, 882–897.
- Lashermes, P., Combes, M.C., Robert, J., Trouslot, P., D’Hont, A., Anthony, F., Charrier, A., **1999**. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*. 261, 259–266.

- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D., Grima-Pettenati, J., **2001**. Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry*. 57, 1187–1195.
- Lee, G.J., Vierling, E., **2000**. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*. 122, 189–198.
- Lepelley, M., Mahesh, V., McCarthy, J., Rigoreau, M., Crouzillat, D., Chabrillange, N., De Kochko, A., Campa, C., **2012** : Characterization, high-resolution mapping and differential expression of three homologous PAL genes in *Coffea canephora* Pierre (Rubiaceae). *Planta*, 236, 313–326.
- Li, F., Cheng, C., Cui, F., de Oliveira, M.V.V., Yu, X., Meng, X., Intorne, A.C., Babilonia, K., Li, M., Li, B., Chen, S., Ma, X., Xiao, S., Zeng, Y., Fei, Z., Metz, R., Johnson, C.D., Koiwa, H., Sun, W., Li, Z., de Souza Filho, G.A., Shan, L., He, P., **2014**. Modulation of RNA polymerase II phosphorylation downstream of pathogen perception orchestrates plant immunity. *Cell Host & Microbe*. 16, 748–758.
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., Yu, D., **2010**. Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* *WRKY39* in heat stress. *Molecular & Cells* 29, 475–483.
- Liu, H.-C., Liao, H.-T., Charng, Y.-Y., **2011**. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*. 34, 738–751.
- Liu, H., Ouyang, B., Zhang, J., Wang, T., Li, H., Zhang, Y., Yu, C., Ye, Z., **2012** : Differential Modulation of Photosynthesis, Signaling, and Transcriptional Regulation between Tolerant and Sensitive Tomato Genotypes under Cold Stress. *PLoS ONE*, 7, e50785.
- Liu, H.-T., Gao, F., Li, G.-L., Han, J.-L., Liu, D.-L., Sun, D.-Y., Zhou, R.-G., **2008**. The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 55, 760–773.
- Liu, L.-X., Xu, S.-M., Woo, K.C., **2005**. Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophyll cycle in tropical acacias and eucalyptus. *Environmental and Experimental Botany*. 54, 121–130.
- Liu, X., Huang, B., **2000**. Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass. *Crop Science*. 40, 503–510.
- López-Ortega, G., García-Montiel, F., Bayo-Canha, A., Frutos-Ruiz, C., Frutos-Tomás, D., **2016**. Rootstock effects on the growth, yield and fruit quality of sweet cherry cv. ‘Newstar’ in the growing conditions of the Region of Murcia. *Scientia Horticulturae*. 198, 326–335.
- Louarn, J., **1976**. Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore, Paris, Revue : *Café Cacao thé*. (1), 33-52.
- Lucheta, A.R., Silva-Pinhati, A.C.O., Basílio-Palmieri, A.C., Berger, I.J., Freitas-Astúa, J., Cristofani, M., **2007**. An in silico analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*. *Genetics and Molecular Biology*. 30, 819–831.

- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy, K. (Eds.), **2006**. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Springer, Dordrecht.
- Magrath, A., Ghazoul, J., **2015**. Climate and Pest-Driven Geographic Shifts in Global Coffee Production : Implications for Forest Cover, Biodiversity and Carbon Storage. *PLoS ONE* 10, e0133071.
- Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrillange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., Morant, M., Noirot, M., Hamon, S., de Kochko, A., Werck-Reichhart, D., Campa, C., **2007**. Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree : evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. 64, 145–159.
- Marias, D.E., Meinzer, F.C., Still, C., **2017**. Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea arabica*. *Ecology and Evolution* 7, 1297–1310.
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitão, A.E., Rodrigues, A.P., Pais, I.P., Martins, L.D., Silva, M.J., Reboredo, F.H., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.J.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C., **2016**. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [CO<sub>2</sub>] Conditions in *Coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*. 7.
- Martins, S.C.V., Araújo, W.L., Tohge, T., Fernie, A.R., DaMatta, F.M., **2014**. In High-Light-Acclimated Coffee Plants the Metabolic Machinery Is Adjusted to Avoid Oxidative Stress Rather than to Benefit from Extra Light Enhancement in Photosynthetic Yield. *PLoS ONE* 9, e94862.
- Matus, J.T., Aquea, F., Espinoza, C., Vega, A., Cavallini, E., Santo, S.D., Cañón, P., Guardia, A.R-H., Serrano, J., Tornielli, G.B., Arce-Johnson, P., **2014** : Inspection of the grapevine BURP superfamily highlights an expansion of *RD22* genes with distinctive expression features in berry development and ABA-mediated stress responses. *PLoS ONE*, 9, e110372.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O., Ilyas, M., Madronich, S., **2011**. Ozone depletion and climate change : impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 10, 182–198.
- MGX Montpellier, **2016** : Rapport RNA-Seq.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A., **2014**. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*. 19, 16240–16265.
- Mirzaei, M., Pascovici, D., Atwell, B.J., Haynes, P.A., **2012**. Differential regulation of aquaporins, small *GTPases* and *V-ATPases* proteins in rice leaves subjected to drought stress and recovery. *Proteomics*. 12, 864–877.
- Mittler, R., **2006**. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 11, 15–19.
- Mittler, R., **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7, 405–410.

- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P., **2012**. How do plants feel the heat ? *Trends in Biochemical Sciences*. 37, 118–125.
- Mohamed, A., **2018** : Analyse de co-expression sur des données RNAsèq chez les patients atteints de mucoviscidose.
- Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., De Kochko, A., Campa, C., **2006**. Evolution in Caféoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*. 98, 33–40.
- Montagnon, C., Leroy, T., Eskes, A.B., **1998**. Amélioration variétale de *Coffea canephora* II. Les programmes de sélection et leurs résultats. Plantation, recherche, développement 89–98.
- Müller-Xing, R., Xing, Q., Goodrich, J., **2014**. Footprints of the sun : memory of UV and light stress in plants. *Frontiers in Plant Science*. 5.
- Mustroph, A., Sonnewald, U., Biemelt, S., **2007** : Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 581, 2401–2410.
- NCBI Database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J., **2002**. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 388–395.
- Neto, J.R.C.F., Pandolfi, V., Guimaraes, F.C.M., Benko-Iseppon, A.M., Romero, C., Silva, R.L., De O Rodrigues, F.A., Abdelnoor, R.V., Nepomuceno, A.L., Kido, E.A., **2013** : Early transcriptional response of soybean contrasting accessions to root dehydration. *PLoS ONE*, 8, e83466.
- Nguyen, A.H., Matsui, A., Tanaka, M., Mizunashi, K., Nakaminami, K., Hayashi, M., Iida, K., Toyoda, T., Nguyen, D.V., Seki, M., **2015**. Loss of *Arabidopsis* 5'-3' Exoribonuclease *AtXRN4* Function Enhances Heat Stress Tolerance of Plants Subjected to Severe Heat Stress. *Plant and Cell Physiology*. 56, 1762–1772.
- Niinemets, Ü., **2010**. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants : Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*. 260, 1623–1639.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S., **2008**. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*. 147, 1251–1263.
- Noctor, G., Foyer, C.H., **1998**. Ascorbate and glutathione : Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49, 249–279.
- Novaes, P., Souza, J.P., Prado, C.H.B.A., **2011**. Grafting for improving net photosynthesis of *coffea arabica* in field in southeast of brazil. *Experimental Agriculture* 47, 53–68.
- Oleksyn, J., Modrzyński, J., Tjoelker, M.G., Z ytkowiak, R., Reich, P.B., Karolewski, P., **1998**. Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects : common

- garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Functional Ecology*. 12, 573–590.
- Ovalle-Rivera, O., Läderach, P., Bunn, C., Obersteiner, M., Schroth, G., **2015**. Projected Shifts in *Coffea arabica* Suitability among Major Global Producing Regions Due to Climate Change. *PLoS ONE* 10, e0124155.
- Pandey, P., Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., **2015**. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations : physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*. 6.
- Petkova, V., Denev, I.D., Cholakov, D., Porjazov, I., **2007**. Field screening for heat tolerant common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) by measuring of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Scientia Horticulturae*. 111, 101–106.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B., Loureiro, M.E., **2004**. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*. 167, 1307–1314.
- Pinto, D., Concetta, M., De Gara, L., **2004**. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2559–2569.
- Plaut, Z., Butow, B.J., Blumenthal, C.S., Wrigley, C.W., **2004**. Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post-anthesis water deficit and elevated temperature. *Field Crops Research*. 86, 185–198.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen, L.H., **2006**. Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*. 139, 237–251.
- Prasad, P.V.V., Staggenborg, S.A., Ristic, Z., **2008**. Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants. Response of Crops to Limited Water : Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth *Processes advances in agriculture*, 301–355.
- Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R., Wang, Z., Franco-Zorrilla, J.M., de Lorenzo, L., Irigoyen, M.L., Masiero, S., Bustos, R., Rodríguez, J., Leyva, A., Rubio, V., Sommer, H., Paz-Ares, J., **2014**. *SPX1* is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111, 14947–14952.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Peer, Y.V. de, Boerjan, W., **2003**. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 133, 1051–1071.
- Rakotomalala, J.J., **2018**. Le nouveau Café RATELO : Caféier hybride issu de croisements entre Café Canephora, Café Eugenioïdes et Café Arabica. Conférences.

- Rakotomalala, J.J., Raharimalala, E.N., Rabemiafara, A., Radalovelovelo, D., Rakotoniaina, A.P., Rabakomanantsoa, L.R., Nagai, C., Noiroto, M., Charrier, A., **2016**. Diversity of « ratelo », tetraploid threeway interspecific hybrids of coffee created in Madagascar. Conférence.
- Rakotomalala, J.-J.R., **1993**. Diversité biochimique des caféiers : analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques : particularités des caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea Chev.*). *Alianza*. (Phdthesis)
- Ramalho, J.C., DaMatta, F.M., Rodrigues, A.P., Scotti-Campos, P., Pais, I., Batista-Santos, P., Partelli, F.L., Ribeiro, A., Lidon, F.C., Leitão, A.E., **2014**. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26, 5–18.
- Randrianarisoa, M.T., **2016** : Le secteur café. Hôtel Carlton Antananarivo.
- Ratanamarno, S., Surbka, S., **2017**. Caffeine and catechine in fresh coffee leaf (*Coffea arabica*) and coffee leaf tea. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 11, 211–218.
- Rihan, H.Z., Al-Issawi, M., Fuller, M.P., **2017**. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*. 12, 143–157.
- Rinaldi, R., Jastrzebski, R., Clough, M.T., Ralph, J., Kennema, M., Bruijninx, P.C.A., Weckhuysen, B.M., **2016**. Paving the Way for Lignin Valorisation : Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*. 55(29), 8164–8215
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L., **2001**. Resistance to cold and heat stress : accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*. 160, 315–321.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R., **2002**. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*. 130, 1143–1151.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., **2010**. EdgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26, 139–140.
- Robson, T.M., Klem, K., Urban, O., Jansen, M.A.K., **2015**. Re-interpreting plant morphological responses to UV-B radiation. *Plant, Cell & Environment*. 38, 856–866.
- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J., von Korff, M., **2013**. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*. 64, 3201–
- Ruan, Y.-L., Jin, Y., Yang, Y.-J., Li, G.-J., Boyer, J.S., **2010**. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase : roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*. 3, 942–955.
- Ruget, F., Bonhomme, R., Chartier, M., **1996**. Estimation simple de la surface foliaire de plantes de maïs en croissance. *Agronomie*. 16, 553–562.

- Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J.M., Goloubinoff, P., **2009**. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *The Plant Cell*. 21, 2829–2843.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., Fernie, A.R., **2013**. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis* : Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72, 21–34.
- Sandquist, D.R., Ehleringer, J.R., **1997**. Intraspecific Variation of Leaf Pubescence and Drought Response in *Encelia farinosa* Associated with Contrasting Desert Environments. *The New Phytologist*. 135, 635–644.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S., **2002**. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant *MAP* kinase pathways. *The Plant Journal*. 31, 629–638.
- Sarkar, N.K., Kim, Y.-K., Grover, A., **2009** : Rice sHsp genes : genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics*, 10, 393.
- Schmidt, W., Beerhues, L., **1997**. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 420, 143–146.
- Sehgal, A., Sita, K., Nayar, H., **2016**. Heat stress in plants : sensing and defense mechanisms. *Journal of Plant Science Research*. 32, 195–210.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., **2012**. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 26.
- Shi, J., Hu, H., Zhang, K., Zhang, W., Yu, Y., Wu, Z., Wu, P., **2014**. The paralogous *SPX3* and *SPX5* genes redundantly modulate Pi homeostasis in rice. *Journal of Experimental Botany*. 65, 859–870.
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L., Séguin, A., **2005**. Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and -D are the Primary Genes Involved in Lignin Biosynthesis in the Floral Stem of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 17, 2059–2076.
- Sita, K., Sehgal, A., HanumanthaRao, B., Nair, R.M., Vara Prasad, P.V., Kumar, S., Gaur, P.M., Farooq, M., Siddique, K.H.M., Varshney, R.K., Nayyar, H., **2017**. Food Legumes and Rising Temperatures : Effects, Adaptive Functional Mechanisms Specific to Reproductive Growth Stage and Strategies to Improve Heat Tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 8.
- Smirnoff, N., **2008**. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. John Wiley & Sons.
- Srivastava, R., Deng, Y., Howell, S.H., **2014**. Stress sensing in plants by an ER stress sensor/transducer, *bZIP28*. *Frontiers in Plant Science*. 5.
- Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., Maule, A.J., **2009**. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 21, 642–654.

- Sun, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N., **2002**. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. - Gene Structure and Expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577, 1–9.
- Sun, X., Sun, C., Li, Z., Hu, Q., Han, L., Luo, H., **2016** : AsHSP17, a creeping bentgrass small heat shock protein modulates plant photosynthesis and ABA-dependent and independent signalling to attenuate plant response to abiotic stress : Role of AsHSP17 in stress response. *Plant, Cell & Environment*, 39, 1320–1337.
- Sung, D.-Y., Kaplan, F., Lee, K.-J., Guy, C.L., **2003**. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*. 8, 179–187.
- Suwa, R., Hakata, H., Hara, H., El-Shemy, H.A., Adu-Gyamfi, J.J., Nguyen, N.T., Kanai, S., Lightfoot, D.A., Mohapatra, P.K., Fujita, K., **2010**. High temperature effects on photosynthate partitioning and sugar metabolism during ear expansion in maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 124–130.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., Mittler, R., **2008** : The transcriptional co-activator *MBF1c* is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 9269–9275.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., **2014**. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*. 203, 32–43.
- Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P., **2007**. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8, 125.
- Takahashi, T., Naito, S., Komeda, Y., **1992** : The Arabidopsis HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic Arabidopsis plants : a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. *The Plant Journal*, 2, 751–761.
- Talamond, P., Mondolot, L., Gargadennec, A., Kochko, A. de, Hamon, S., Fruchier, A., Campa, C., **2008**. First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). *Acta Botanica Gallica*. 155, 513–519.
- Tariq, M., Waseem, S., Bilal, H.A., S.M.Saqlan., N., **2010**. An overview on the small heat shock proteins. *African Journal of Biotechnology*. 9(7), 927–949.
- Tiwari, S., Thakur, R., Shankar, J., **2015**. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnology Research International*. 1–11
- Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D.G., **2002**. *Arabidopsis* *gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 517–522.
- Tripp, J., Mishra, S.K., Scharf, K.-D., **2009**. Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant, Cell & Environment*. 32, 123–133.

- Tworzoski, T., Miller, S., **2007**. Rootstock effect on growth of apple scions with different growth habits. *Scientia Horticulturae*. 111, 335–343.
- Umate, P., Tuteja, R., Tuteja, N., **2010**. Genome-wide analysis of helicase gene family from rice and *Arabidopsis* : a comparison with yeast and human. *Plant Molecular Biology*. 73, 449–465.
- Vaast, P., Bertrand, B., Perriot, J.-J., Guyot, B., Génard, M., **2006**. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 197–204.
- Verhage, F.Y.F., Anten, N.P.R., Sentelhas, P.C., **2017** : Carbon dioxide fertilization offsets negative impacts of climate change on Arabica coffee yield in Brazil. *Climatic Change*, 144, 671–685.
- Vermerris, W., Nicholson, R., **2007**. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science & Business Media.
- Vickers, C.E., Bongers, M., Liu, Q., Delatte, T., Bouwmeester, H., **2014**. Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant, Cell & Environment*. 37, 1753–1775.
- Vidović, M., Morina, F., Jovanović, S.V., **2017**. Stimulation of Various Phenolics in Plants Under Ambient UV-B Radiation, in: Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M., Parihar, P. (Eds.), UV-B Radiation. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 9–56.
- Vogt, T., **2010**. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 3, 2–20.
- Wahid, A., **2007**. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plant Research*. 120, 219–228.
- Wahid, A., Close, T.J., **2007**. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum*. 51, 104–109.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., **2007**. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*. 61, 199–223.
- Wang, G., Liu, J., Meng, T., **2015**. Leaf trait variation captures climate differences but differs with species irrespective of functional group. *Journal of Plant Ecology*. 8, 61–69.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., **2004**. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9, 244–252.
- Wang, X., Huang, W., Yang, Z., Liu, J., Huang, B. **2016** : Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by *CtHsfA2b* from African bermudagrass conferring heat tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 6.
- Winkel-Shirley, B., **2001**. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. 126, 485–493.

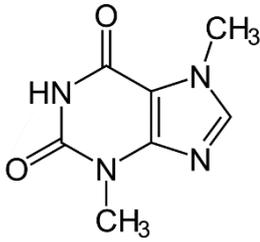
- Wise, R.R., Olson, A.J., Schrader, S.M., Sharkey, T.D., **2004**. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell & Environment*. 27, 717–724.
- Wisniewski, M., Nassuth, A., Teulières, C., Marque, C., Rowland, J., Cao, P.B., Brown, A., **2014**. Genomics of Cold Hardiness in Woody Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 33, 92–124.
- Wrigley, G., **1988**. Coffee in Evolution of crop plants. 2. edition. Essex (Inglaterra), Longman Scientific and Technical. 438-443.
- Illustration des espèces : [www.swwbm.com/Illustrations/Illust.html](http://www.swwbm.com/Illustrations/Illust.html)
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., Dixon, R.A., **2003**. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*. 299, 396–399.
- Xue-jun, C., Guang-cai, C., Qun, S., Dong-bin, W., Jing, C., Ya-xiong, Y., Jie, L., Wei, L., **2013**. Altitude effects on maize growth period and quality traits. *Acta Ecologica Sinica*. 33(4), 233–236
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., **1993**. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*. 238, 17–25.
- Yan, J., Tsuichihara, N., Etoh, T., Iwai, S., **2007**. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant, Cell & Environment*. 30, 1320–1325.
- Yang, Y., Yao, Y., He, H., **2008**. Influence of ambient and enhanced ultraviolet-B radiation on the plant growth and physiological properties in two contrasting populations of *Hippophae rhamnoides*. *Journal of Plant Research*. 121, 377–385.
- Yao, X., Xiong, W., Ye, T., Wu, Y., **2012**. Overexpression of the aspartic protease *ASPG1* gene confers drought avoidance in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 63, 2579–2593.
- Zhang, J.-H., Wang, L.-J., Pan, Q.-H., Wang, Y.-Z., Zhan, J.-C., Huang, W.-D., **2008**. Accumulation and subcellular localization of heat shock proteins in young grape leaves during cross-adaptation to temperature stresses. *Scientia Horticulturae*. 117, 231–240.
- Zhang, J.-L., Poorter, L., Hao, G.-Y., Cao, K.-F., **2012**. Photosynthetic thermotolerance of woody savanna species in China is correlated with leaf life span. *Annals of Botany*. 110, 1027–1033.
- Zhang, L., Li, X., Ma, B., Gao, Q., Du, H., Han, Y., Li, Y., Cao, Y., Qi, M., Zhu, Y., Lu, H., Ma, M., Liu, L., Zhou, J., Nan, C., Qin, Y., Wang, J., Cui, L., Liu, H., Liang, C., Qiao, Z. **2017a** : The tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance. *Molecular Plant*, 10, 1224–1237.
- Zhang, Q., Liu, M., Ruan, J., **2017b**. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biology*. 17, 64.

- Zhang, W., Zhou, R.-G., Gao, Y.-J., Zheng, S.-Z., Xu, P., Zhang, S.-Q., Sun, D.-Y., **2009**. Molecular and Genetic Evidence for the Key Role of *AtCaM3* in Heat-Shock Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 149, 1773–1784.
- Zhong, L., Zhou, W., Wang, H., Ding, S., Lu, Q., Wen, X., Peng, L., Zhang, L., Lu, C. **2013** : Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *The Plant Cell*, 25, 2925–2943.
- Zhou, R., Kjær, K.H., Rosenqvist, E., Yu, X., Wu, Z., Ottosen, C.-O., **2017**. Physiological Response to Heat Stress During Seedling and Anthesis Stage in Tomato Genotypes Differing in Heat Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 203, 68–80.
- Zhou, Y., Lam, H.M., Zhang, J., **2007**. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *Journal of experimental Botany*. 58, 1207–1217.
- Zhuang, L., Cao, W., Wang, J., Yu, J., Yang, Z., Huang, B., **2018** : Characterization and Functional Analysis of FaHsfC1b from *Festuca arundinacea* Conferring Heat Tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19

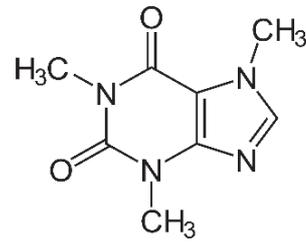
# ANNEXE

## Annexe I : Structure des composés identifiés par LC-MS

## ALCALOÏDES

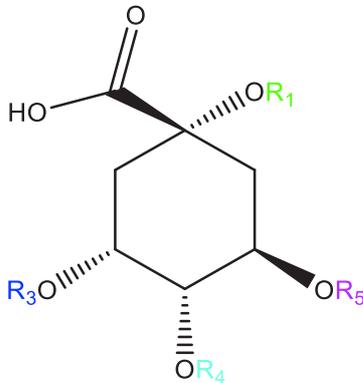


Pic n° 1  
Théobromine

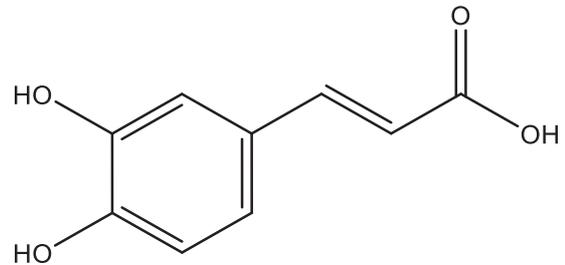


Pic n° 7  
Caféine

## ESTERS D'ACIDE HYDROXYCINNAMIQUES

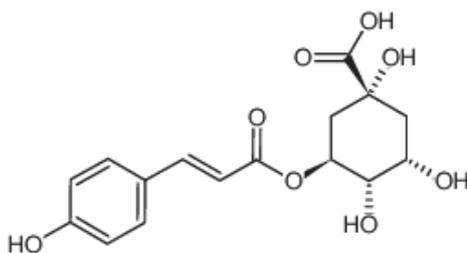


Acide quinique (AQ)

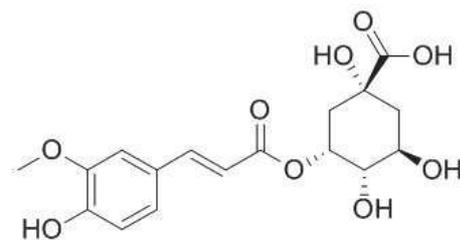


Acide caféique (AC)

Pic n°	Nom	R1	R3	R4	R5
2	Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique	H	AC	H	H
6	Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique	H	H	AC	H
5	Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique	H	H	H	AC
20	Acide 3,4- <i>O</i> -dicaféoylquinique	H	AC	AC	H
21	Acide 3,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique	H	AC	H	AC
22	Acide 4,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique	H	H	AC	AC



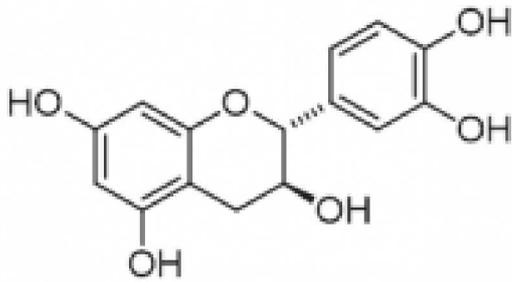
Pic n° 9  
Acide coumaroylquinique



Pic n° 11  
Acide 5-féruloylquinique (FQA)

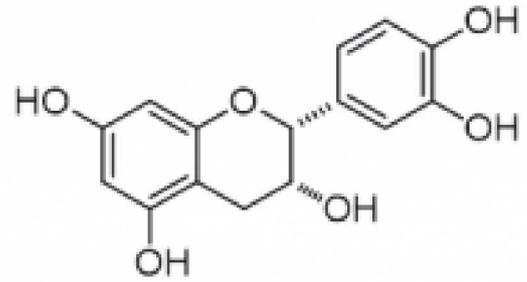
## FLAVONOÏDES

### Flavanols



(+)-catéchine

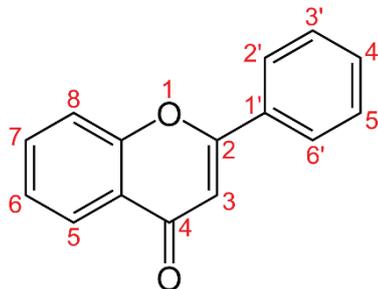
Pic n° 4  
(+)-catéchine



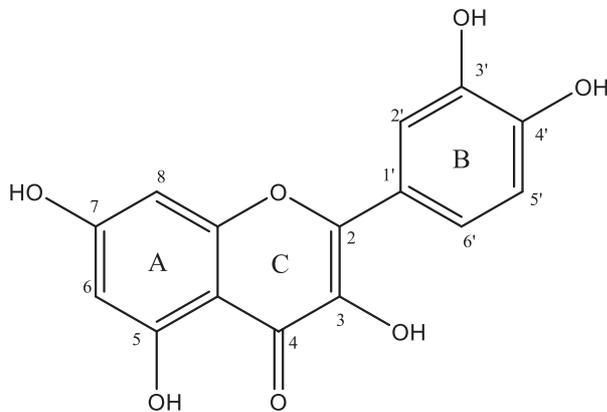
(-)-épicatéchine

Pic n° 8  
(-)-épicatéchine

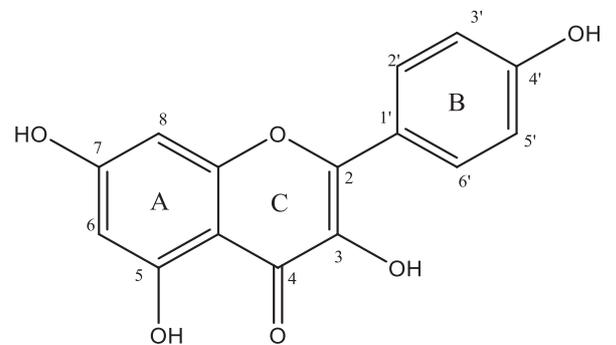
### Flavone



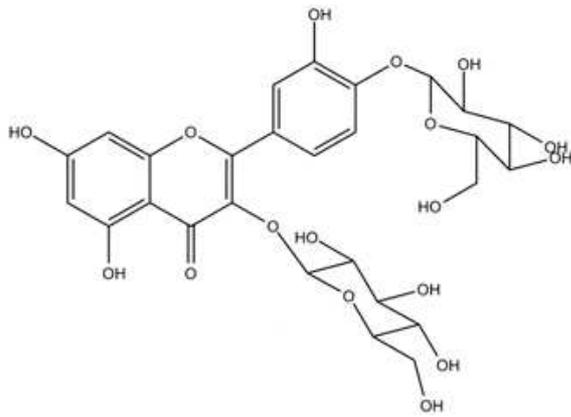
### Flavonols



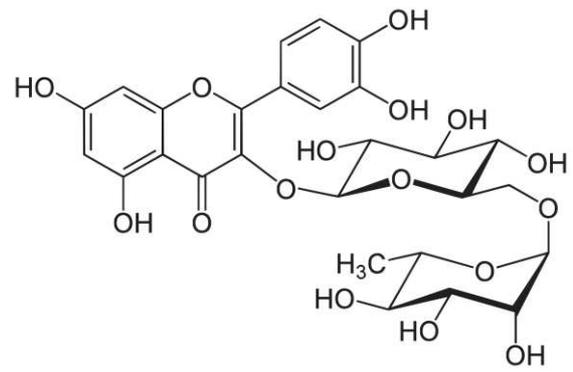
Quercétine



Kaempférol



**Quercétine 3,4-di-O-glucoside**



**Rutine**

# ARTICLE

**Environmental conditions and leaf age impact phenolic content and biosynthesis in leaves of field-grown *Coffea arabica* L.**

Journal:	<i>Tree Physiology</i>
Manuscript ID	TP-2018-229.R1
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>VESTALYS, Ialy; Universite d'Antananarivo, Faculté des Sciences; Institut de recherche pour le developpement France-Sud, IPME</p> <p>MICHALET, Serge; Université Lyon 1, Villeurbanne, UMR5557, Ecologie microbienne</p> <p>VILLAIN, Luc; CIRAD, INECOL, cluster BioMimic; CIRAD Occitanie-Montpellier, IPME</p> <p>BREITLER, Jean-Christophe; CIRAD, INECOL, Cluster BioMimic; CIRAD Occitanie-Montpellier, IPME</p> <p>FOSSATI-GASCHIGNARD, Odile; Institut de recherche pour le developpement France-Sud, CBGP</p> <p>SEVERAC, Dany; MGX</p> <p>Georget, Frédéric; CIRAD Occitanie-Montpellier, IPME</p> <p>DEREEPER, Alexis; Institut de recherche pour le developpement France-Sud, IPME</p> <p>Bertrand, Benoît; CIRAD Occitanie-Montpellier, IPME</p> <p>RAKOTOARISOA, Noronirina; Universite d'Antananarivo Faculte des Sciences</p> <p>BONATO, Olivier; Institut de recherche pour le developpement France-Sud, IPME</p> <p>RAHERIMANDIMBY, Marson; Universite d'Antananarivo Faculte des Sciences</p> <p>LEGENDRE, Laurent; université de Lyon 1</p> <p>Etienne, Herve; CIRAD Occitanie-Montpellier, IPME</p> <p>CAMPA, Claudine; Institut de recherche pour le developpement France-Sud, IPME</p>
Keywords:	biochemical responses, environmental change, leaves, phenolic compounds, Transcriptomic

1  
2  
3 **1 Environmental conditions and leaf age impact phenolic content and**  
4 **2 biosynthesis in leaves of field-grown *Coffea arabica* L.**  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

4 Ialy Rojo VESTALYS<sup>1,2</sup>, Serge MICHALET<sup>3</sup>, Luc VILLAIN<sup>4,8</sup>, Jean-Christophe  
5 BREITLER<sup>4,8</sup>, Odile FOSSATI-GASCHIGNARD<sup>5</sup>, Dany SEVERAC<sup>6</sup>, Frédéric  
6 GEORGET<sup>7,8</sup>, Alexis DEREPPER<sup>2</sup>, Benoit BERTRAND<sup>7,8</sup>, Noronirina Victorine  
7 RAKOTOARISOA<sup>1</sup>, Olivier BONATO<sup>2</sup>, Marson RAHERIMANDIMBY<sup>1</sup>, Laurent  
8 LEGENDRE<sup>3</sup>, Hervé ETIENNE<sup>7,8</sup>, Claudine CAMPA<sup>2</sup>  
9

10 **Author names and affiliations**

11 <sup>1</sup> Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Antananarivo, Madagascar

12  
13 <sup>2</sup> IRD, CIRAD, Univ Montpellier, IPME, Montpellier, France

14  
15 <sup>3</sup> Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne, France;  
16 CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France; INRA, UMR1418,  
17 Villeurbanne, France

18 <sup>4</sup> CIRAD, INECOL, Clúster BioMimic, 34394 Xalapa Enríquez, Ver., Mexico

19 <sup>5</sup> IRD, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, CBGP, Montpellier, France

20  
21 <sup>6</sup> MGX, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

22  
23 <sup>7</sup> CIRAD, UMR IPME, F-34398 Montpellier, France

24  
25 <sup>8</sup> IPME, Univ Montpellier, IRD, CIRAD, Montpellier, France  
26

27 **KEYWORDS (6 max)**

28 abiotic stress; adaptive response; *Coffea arabica*; leaf age; phenolic compounds; RNAseq  
29

30 **Corresponding author:**

31 Claudine CAMPA,  
32 IRD, UMR IPME,  
33 Equipe CoffeeAdapt  
34 911 avenue Agropolis  
35 BP 64501  
36 34394. Montpellier Cedex 5, France  
37 Tél: 33 (0)4 67 41 62 43  
38 claudine.campa@ird.fr  
39  
40  
41

**ABSTRACT**

*Coffea arabica* L., the species most exploited for coffee production but most sensitive to environmental modifications, must be able to adapt to the climate changes that are already taking place. This study focused on the leaf secondary metabolites, a key element of the stress adaptive machinery of most plants. Using LC-DAD-MS<sup>2</sup>, 23 secondary metabolites (2 alkaloids, 3 benzophenones and 18 phenolics) were annotated, including novel glycosylated flavonoids and benzophenones. The analysis of the phenolic content in mature and juvenile leaves collected at different elevations and seasons was complemented by the study of the expression of phenolic biosynthesis genes assessed by RNA-seq. It revealed that the caffeoylquinic acid, flavanol and rutin content of the mature leaves paralleled a higher synthesis when leaves were younger. In juvenile leaves, higher metabolite contents (2.2-, 1.3- and 1.8-fold increases for caffeoylquinic acids, flavanols and rutin, respectively) and, except for lignification, higher expression of most of the homologous genes encoding the phenylpropanoid pathway (2-fold higher in average when expressed in log<sub>10</sub> RPKM) were observed. Glycosylated flavonoid content, except rutin, was 8-fold higher in mature leaves than in juvenile one, indicating biosynthesis occurs when leaves were aging. Comparing phenolic content and gene expression between mature leaves of trees cultivated at three different elevations indicated that glycosylated flavonoid content was more influenced by temperature than by solar irradiance ( $R = 0.543$ ,  $p < 0.001$  and  $R = 0.435$ ,  $p < 0.01$ , respectively) when chlorogenic acid and flavanol contents were more dependent on rainfall ( $R = -0.449$ ,  $p < 0.001$  and  $R = -0.582$ ,  $p < 0.001$ , respectively). These results suggest that secondary metabolite contents in *C. arabica* mature leaves result from developmentally- and environmentally-controlled gene expression with perceived environmental conditions.

**1. INTRODUCTION**

Of the 124 species that form the *Coffea* genus (Davis et al. 2011), mostly *Coffea arabica* L. and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner are cultivated, with *C. arabica* being the major crop in core production centers such as Mexico and Central America (ICO 2013). However, this species appears to be highly susceptible to abiotic stresses generated by climate change (e.g. increased air [CO<sub>2</sub>], supra-optimal temperature and water scarcity). Over the past few decades, the mean temperature in the Andean and Mesoamerican regions has increased by 1°C and the seasonal rainfall pattern has changed. In parallel, at the lowest elevation (<700 m asl) in Mexican and Nicaraguan plantations, reduced growth, erratic flowering, incomplete

1  
2  
3 76 fruit maturation and fruit drop have been noticed (Villers et al. 2009; Baca et al. 2014). Losses  
4 77 from pests and diseases have also increased (Avelino et al. 2015). Early predictive models  
5 78 suggest that the world coffee production area will be halved by 2050, especially in Brazil, the  
6 79 largest coffee provider (Bunn et al. 2015; Magrach and Ghazoul 2015; Ovalle-Rivera et al.  
7 80 2015). More recent investigations predict that [CO<sub>2</sub>]-fertilization could mitigate the negative  
8 81 effect of temperature, helping coffee plants to acclimate under predicted global warming  
9 82 scenarios (DaMatta et al. 2016; Martins et al. 2016; Verhage et al. 2017; Dubberstein et al.  
10 83 2018; Rahn et al. 2018). With the hope of maintaining their production level, growers are  
11 84 developing different strategies in order to prevent coffee trees experiencing drastic climate  
12 85 changes. Growing coffee plants at higher elevations is one of the proposed solution. However,  
13 86 climate change does not necessarily mean that climatic parameters are altered in a concerted  
14 87 manner regardless of the elevation and information on the adaptive mechanisms of *C. arabica*  
15 88 plants to different elevations and environmental conditions is needed.

16 89 Secondary metabolites (SM) constitute one of the major adaptive tools of plants to biotic and  
17 90 abiotic stresses (Bennett and Wallsgrove 1994). Their accumulation is finely tuned to  
18 91 perceived environmental cues (Sampaio et al. 2016). They belong to various chemical classes,  
19 92 such as phenolic compounds, alkaloids and terpenes. A large body of literature is devoted to  
20 93 phenolic compounds that participate in plant resistance and acclimation/adaptation to  
21 94 environmental constraints through various mechanisms, including their strong antioxidant  
22 95 activity which enables them to quench the reactive oxygen species (ROS) emitted during any  
23 96 form of stress, their capacity to absorb UV (Winkel-Shirley 2002; Tattini et al. 2004; Pavarini  
24 97 et al. 2012) and their toxicity towards plant pests (Clé et al. 2008). They are key players of the  
25 98 adaptation of *Arabidopsis thaliana* leaf to intense light (Hectors et al. 2014) and  
26 99 caffeoylquinic acid, a chlorogenic acid described as a lignin precursor and carbon reservoir  
27 100 (Grace and Logan 2000), accumulates to greater levels in response to temperature and light in  
28 101 *Solanum tuberosum* leaves and in *Capsicum annuum* seeds (Yao et al. 1995; Díaz et al. 1997).  
29 102 In coffee plants, SM have been well described in the economically-valuable beans because of  
30 103 their role in coffee beverage quality and human health. They include a variety of chlorogenic  
31 104 acids (esters of hydroxycinnamic acids - mainly 5-caffeoylquinic acid), alkaloids such as  
32 105 caffeine and its derivatives (Anthony et al. 1993; Campa et al. 2008), lipids (Dussert et al.  
33 106 2008; Bertrand et al. 2008) and volatile organic compounds (Bertrand et al. 2012a). Studies  
34 107 on SM in leaves are scarce and are often limited to caffeine and chlorogenic acids (Ashihara  
35 108 et al. 2008; Magalhães et al. 2010). Recently, the presence of other phenolics, such as  
36 109 flavonoids (Martins et al. 2014) and the xanthone mangiferin (Campa et al. 2012; Trevisan et

1  
2  
3 110 al. 2016) have been reported. Except for one report on the response of *C. arabica* leaves to  
4 111 light intensity (Martins et al. 2014), no information is available on the SM response of *C.*  
5 112 *arabica* leaves to climate traits under field conditions. This study therefore aims to 1) increase  
6 113 knowledge on coffee leaf SM, 2) follow phenolic biosynthesis during leaf ontogeny and 3) try  
7 114 to identify, under field-conditions where climate variations are multifactorial, the phenolics  
8 115 that are more elicited by variations of environmental parameters..  
9  
10  
11  
12  
13

## 117 2. MATERIALS AND METHODS

### 118 2.1. Experimental design

119 Leaves of young *Coffea arabica* L. cv. Marsellesa trees cultivated under full sun conditions  
120 were collected once, but at different seasons in 2015, 2016 and 2017 in field trials located at  
121 three elevations in Mexico : (1) Colegio de Posgraduados campus, Cordoba municipality  
122 (Colpos) at an altitude of 650 m asl (L, at 18° 51'22"N 96° 51'38"W), (2) a private farm  
123 "Finca Roma", Emiliano Zapata municipality (Roma) at an altitude of 1050 m asl (I, at 19°  
124 27'54"N 96° 52'49"W) and (3) an experimental station of the Instituto Nacional de  
125 Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Teocelo municipality (INIFAP) at an  
126 altitude of 1250 m asl (H, at 19° 23'42"N 97° 00'03"W). *C. arabica* L. cv. Marsellesa is an  
127 introgressed cultivar from the Sarchimor varietal family that displays resistance to coffee leaf  
128 rust (*Hemileia vastatrix*) (Bertrand et al. 2012b).  
129

### 130 2.2. Meteorological data and climate characterization

131 Environmental data were monitored from a meteorological station located on each plot. Air  
132 temperature and relative humidity (CS215, Campbell Scientific Ltd, Shepshed, UK), solar  
133 irradiance (SP1110, Skye Instruments Ltd, Llandrindod Wells, UK), and gross rainfall  
134 (tipping bucket rain gauge ARG100, Environmental Measurements Ltd, Sunderland, UK)  
135 were recorded every minute and aggregated on hourly basis using a data logger (model 21X,  
136 Campbell Scientific Ltd, Shepshed, UK). In order to characterize the climate conditions under  
137 which the collected leaves became mature (from their appearing on the apical bud to their  
138 positioning on the third node) the mean temperature (T, °C), mean relative humidity (RH, %),  
139 cumulated rainfall (RAIN, mm) and cumulated solar irradiance (SI, kW m<sup>-2</sup>) were calculated  
140 over 120 days before leaf sampling.  
141

### 142 2.3. Leaf sampling for secondary metabolite analyses and RNA extractions

1  
2  
3 143 For each altitudinal plot, 25 mature leaves were sampled on five plants of similar stature (five  
4 144 leaves per plant) in April, June and September. To allow reasonable time for sample  
5 145 treatment, the monthly samples were made during three consecutive years between 5 and 6 h  
6 146 after sunrise in April 2014 (7 months after the planting of 8-month-old plants grown in the  
7 147 nursery), June 2015 (29-month-old plants), and September 2016 (44-month-old plants).  
8 148 Leaves of the third node from the branch apex (considered as mature leaves) and of the 6<sup>th</sup> to  
9 149 8<sup>th</sup> pairs of plagiotropic branches were selected. Their lamina size (length and width) was  
10 150 recorded before stem clipping. It was ensured that the sampled leaves were fully exposed to  
11 151 the sun (avoiding shaded leaves) and oriented towards the East. Leaves of the same harvest  
12 152 and collected on the same tree were packed together, plunged in liquid nitrogen in the field  
13 153 immediately after harvest and maintained at -80°C until freeze drying. Using the same  
14 154 protocol, a collection of juvenile leaves was assembled in June 2015 at the intermediate  
15 155 elevation (1050 m asl) by collecting five leaves on the first node from the branch apex on five  
16 156 selected trees (same trees as for mature leaf samplings). All of these samples were later  
17 157 analyzed for SM. An additional harvest of mature and young leaves was conducted similarly  
18 158 in June 2015, at the three elevations, on three of the five selected trees except that -80°C  
19 159 frozen samples were directly subjected to RNA extraction and not freeze-dried. This set of  
20 160 samples was used for RNA-seq analysis and was carried 3 h before the sampling for SM  
21 161 analysis to prevent wound-induced transcriptional changes.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

162

#### 163 **2.4. Secondary metabolite analysis**

164 The freeze-dried leaf samples were vacuum packed and sent to the IRD laboratory,  
165 Montpellier, France, to be ground into fine powder with an electric blender (A10 IKA Model)  
166 and stored till extraction. For each sample, extraction was carried out by stirring 25 mg of  
167 plant material in 6 mL of MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) for 3 h at 4°C (250 rpm, Rotamax 120,  
168 Heidolph), supplemented with 10 µL of 5-methoxyflavone (4 mM) as internal standard. After  
169 centrifugation (10 min, 8°C, 3500 rpm), the organic extract was collected and filtered  
170 (Millipore, 0.25 µm porosity) before analysis. Each extraction was carried out in triplicate.

171 Quantitative analyses were carried out on an HPLC system (Shimadzu LC 20, Japan) as  
172 described earlier (Campa et al. 2017). Parallel analyses were performed in triplicate on pure  
173 standard solutions of theophylline, theobromine, caffeine, mangiferin, 5-CQA and caffeic acid  
174 from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France), glycosylated kaempferol and  
175 quercetin, rutin, (+)-catechin, (-)-epicatechin and epigallocatechin from Extrasynthese (Lyon,  
176 France) and 3,4-, 3,5- and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid (diCQA) from Biopurify

1  
2  
3 177 Phytochemicals (Chengdu, China) at 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Quantification of 3-, 4- and  
4 178 5-CQA, FQAs and 3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA was undertaken at 320 nm, caffeine and catechin  
5 179 derivatives at 280 nm, and mangiferin, kaempferol and quercetin derivatives at 360 nm.  
6 180 Concentrations were expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight by comparison with the standard curves  
7 181 established with respective standards. For 3-CQA, 4-CQA and FQA, contents were calculated  
8 182 against the 5-CQA standard curve. The contents of the mangiferin derivative and of each  
9 183 flavonol derivative were calculated on the basis of mangiferin and quercetin standard curves,  
10 184 respectively, and expressed as mangiferin and quercetin equivalent. Each coffee leaf powder  
11 185 sample was extracted and analyzed three times. For each sample, the mean alkaloid and  
12 186 phenolic compound contents were expressed as a percentage of dry weight (% DW).

13  
14  
15  
16  
17  
18  
19 187 To confirm the above standard-based identifications and to provide some basic structural  
20 188 information on the other substances, UHPLC-DAD-ESI-MS/MS (QTOF) analyses were  
21 189 performed on an Agilent Infinity® 1290 system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)  
22 190 coupled to a UV/vis DAD detector and equipped with a QTOF 6530 detector (Agilent)  
23 191 controlled by MassHunter® software (Agilent). Analytic separation was carried out on a  
24 192 Poroshell® 120 EC-C18 column (100 mm x 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) equipped with a pre-column  
25 193 (Poroshell® 20 EC-C18, 5 mm x 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ). A gradient of 0.4% formic acid in water  
26 194 (A) and acetonitrile (B) was used as follows: 0 min, 1% B; 1.5 min, 1% B; 6 min, 10% B; 12  
27 195 min, 35% B; 14 min, 100% B; 16 min, 100% B. The flow rate and column temperature were  
28 196 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  and 60°C, respectively. A total of 2.0  $\mu\text{L}$  of sample extract was injected. The  
29 197 ESI source was optimized as follows for positive and negative ionization modes (in “Auto  
30 198 MSMS” acquisition mode): scan spectra from  $m/z$  50 to 2000, capillary voltage 3.5 kV, nozzle  
31 199 voltage 2000 V, fragmentor 110 V, fixed collision-induced dissociation (CID) energy at 20  
32 200 eV. Nitrogen was used as the nebulizing gas with a flow rate of 12  $\text{L min}^{-1}$  and a temperature  
33 201 of 310°C at 40 psi.

34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43 202

### 44 203 **2.5. RNA extraction and RNA-seq analysis**

45 204 Total RNA was extracted as described by Breitler et al. (2016) after grinding in liquid  
46 205 nitrogen leaves that had been previously harvested under field conditions. RNA was  
47 206 quantified using a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer  
48 207 Scientific, Waltham, MA, USA). RNA quality and integrity were verified by an Agilent 2100  
49 208 Bioanalyzer (Agilent Technologies) with RNA 6000 Nano™ kits ensuring RIN values equal  
50 209 to or greater than 7.0.

1  
2  
3 210 RNA-seq was carried out by the MGX platform (Montpellier GenomiX, [www.mgx.cnrs.fr/](http://www.mgx.cnrs.fr/)).  
4 211 RNA-seq libraries were constructed with the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit  
5 212 from Illumina. A 1 µg aliquot of total RNA was used to construct the libraries. Clustering and  
6 213 50 nucleotide single-end sequencing were carried out according to the manufacturer's  
7 214 instructions. Image analyses and base calling were carried out using the HiSeq Control  
8 215 Software and Real-Time Analysis component (Illumina). The reads were aligned using BWA  
9 216 (Burrows–Wheeler Aligner; Li and Durbin 2009) against the *C. canephora* 25,574 protein-  
10 217 coding gene models used as the reference transcriptome (Denoeud et al. 2014). Unmapped  
11 218 and multi-position matched reads were excluded from later analyses, whereas uniquely  
12 219 mapped reads were counted using samtools *idxstats*  
13 220 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505943>; Li et al. 2009) for subsequent differential  
14 221 expression analysis by EdgeR (Robinson et al. 2010) in our Galaxy instance (Giardine et al.  
15 222 2005). With these criteria, the percentage of reads mapped uniquely to a genomic location  
16 223 varied from 61.5 to 84.9 %.

17 224 For each sample, reads were normalized using EdgeR and a filter was used to remove slightly  
18 225 expressed genes. For that, total expression (sum of the abundances in the 9 samples of mature  
19 226 leaves) was calculated and genes having a total expression below 35 were discarded. The  
20 227 number of genes selected for further analysis was thus 19,586. A differential expression  
21 228 analysis of these genes (between the three elevations) was carried out between each elevation  
22 229 considering *p* values ( $p < 0.05$ ). For the intermediate elevation, heatmaps of expression levels  
23 230 (in log<sub>10</sub> RPKM – Reads Per Kilobase Million) for each gene at two leaf growth stages were  
24 231 reported using the DiffExDB database ([http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-](http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-bin2/microarray/public/diffexdb.cgi)  
25 232 [bin2/microarray/public/diffexdb.cgi](http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-bin2/microarray/public/diffexdb.cgi)), a web-based tool from the IRD bioinformatics platform  
26 233 (Montpellier, France). Genes involved in phenolic biosynthesis were selected according to the  
27 234 locus ID given in the *C. canephora* genome published by Denoeud et al. (2014), or found by  
28 235 protein blast analysis with known orthologous proteins in other plant species  
29 236 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <https://coffee-genome.org/blast>).

30 237

## 31 238 **2.6. Statistical analyses**

32 239 Meteorological, morphological and biochemical data were checked for homogeneity of  
33 240 variance using Levene's test (Statistica, 7.1). All data (three years, three sites, two leaf types)  
34 241 were then analyzed using a one-way ANOVA with the average temperature, cumulated solar  
35 242 irradiance, cumulated rainfall and relative humidity as fixed factors. Significant differences  
36 243 between means were estimated at 5% ( $P < 0.05$ ), 1% ( $P < 0.01$ ), and 0.1% ( $P < 0.001$ ) using

1  
2  
3 244 the Newman-Keuls test. Correlations between climatic variables and leaf growth or  
4 245 metabolite content were calculated and estimated by Pearson's correlation coefficient.  
5  
6 246 Multivariate analyses were carried out using R language (R Development Core Team 2011;  
7  
8 247 package: readxl - Wickham 2016; base; ade4 - Chessel et al. 2004; Dray and Dufour 2007).  
9  
10 248 Factorial analyses were done on metabolites and meteorological data tables with 42 samples  
11 249 and 14 and 4 parameters, respectively. PCAs provided graphical descriptions of each table  
12 250 dataset. Co-Inertia Analyses linking metabolite contents to meteorological parameters were  
13 251 then carried out (CoI, Dolédec and Chessel 1994; Dray et al. 2003).  
14  
15  
16 252

### 17 253 3. RESULTS

#### 18 254 3.1. Characterization of mature leaf secondary metabolites

19 255 In total, 23 metabolites were detected in mature leaf extracts, two belong to the purine  
20 256 alkaloids, theobromine (**1**) and caffeine (**7**), eight are chlorogenic acid derivatives, three  
21 257 belong to benzophenones and related xanthenes, and ten are flavonoids. The analysis by LC-  
22 258 DAD-MS<sup>2</sup> led to the detection of the 23 substances under positive ionization and only 21 of  
23 259 them under negative ionization (Tab. 1). The identity of 10 compounds was suggested by the  
24 260 parallel analysis of pure standards, while basic structural information was suggested for the  
25 261 others on the basis of their high resolution mass, fragmentation pattern and UV spectra.  
26 262 Compounds **2**, **5** and **6** were characterized by a pseudomolecular ion [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 353.0901  
27 263 in negative mode and at *m/z* 355.1002 ([M+H]<sup>+</sup>) in positive mode corresponding to a  
28 264 molecular formula of C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>. They shared the same UV spectrum displaying a shoulder at  
29 265 300 nm and a maximum at 325 nm. These characteristics corresponded to mono-  
30 266 caffeoylquinic acid (CQA) isomers. Compound **5** was identified as 5-*O*-caffeoylquinic acid  
31 267 by comparison with a standard, whereas **2** and **6** were identified as 3-*O*- and 4-*O*-  
32 268 caffeoylquinic acid, respectively, according to literature describing their RT elution order and  
33 269 their specific MS/MS spectra in negative mode (Schütz et al. 2004; Willems et al. 2016).  
34 270 Similarly, **9** and **11** were identified as 5-*O*-coumaroylquinic acid and 5-*O*-feruloylquinic acid,  
35 271 respectively. Compound **3** was characterized by a pseudomolecular ion [M+H]<sup>+</sup> at *m/z*  
36 272 409.1107 and [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 407.1012 suggesting a molecular formula of C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>. The UV  
37 273 absorption spectrum ( $\lambda_{\max}$  at 296 nm) and complex MS/MS fragmentation suggested that **3** is  
38 274 a glycosylated benzophenone-*C*-heteroside tentatively identified as iriflophenone 3-*C*- $\beta$ -  
39 275 glucoside by Ito et al. (2012). By comparison with standards, peaks **4** and **8** were identified as  
40 276 (+)-catechin and (-)-epicatechin, respectively, and peak **10** as mangiferin (Mang). Compound  
41 277 **23** showed a UV spectrum and a non-glycosylated backbone similar to Mang and  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 278 corresponded to Mang + C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Compared to mangiferin (Mang), it displayed an additional  
4 279 fragment ion at *m/z* 385 in negative ionization mode corresponding to a loss of  
5  
6 280 [parahydroxybenzoate+H<sub>2</sub>O], and a major fragment ion at *m/z* 121 in the positive mode,  
7  
8 281 corresponding to a benzoic acid ion ([C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>). This suggested that **23** was mangiferin  
9  
10 282 parahydroxybenzoate (Mang-OHbenz). Peak **12** was characterized by a pseudomolecular ion  
11 283 [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 595.1643 and [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 593.1555, leading to a molecular formula of  
12 284 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>. Its UV spectrum ( $\lambda_{\max}$  at 265 and 330 nm) was similar to a di-hexosyl flavone  
13 285 (Mabry et al. 1970). Its MS/MS fragmentation in positive and negative modes suggested that  
14 286 **12** is a flavone-di-C-hexose (F-dihex).

15  
16  
17 287 Peaks **13**, **14**, **16** and **18** shared the same UV spectra ( $\lambda_{\max}$  at 257 and 353 nm with **13** and **14**  
18 288 presenting an additional shoulder at 300 nm) indicative of 3-*O*-substituted flavonols (Mabry  
19 289 et al. 1970). Compounds **14**, **16** and **18** were respectively identified as quercetin-3-*O*-  
20 290 diglucoside (Q-diglu), rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside) and quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside (Q-glu)  
21 291 by comparison with standards. Peak **13** showed the same UV spectrum as compound **14** but  
22 292 eluted earlier. Furthermore, it displayed a pseudomolecular ion [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 771.2036 and  
23 293 [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 773.2129 (gain of 146 amu compared to **14**, corresponding to a deoxyhexose).  
24 294 It was therefore annotated as quercetin-3-*O*-dihexose-deoxyhexose (Q-dihex-dhex).

25  
26  
27 295 Peaks **15** and **19** only fragmented in positive mode. They shared the same UV spectrum ( $\lambda_{\max}$   
28 296 at 265 and 346 nm) and MS/MS fragmentation with a base peak at *m/z* 287 indicative of 3-*O*-  
29 297 substituted kaempferol derivatives. Compound **15** showed fragment ions at *m/z* 612 (loss of  
30 298 deoxyhexose), 449 (loss of deoxyhexose + hexose) and 287 (loss of deoxyhexose + 2  
31 299 hexoses) and was annotated as kaempferol-3-*O*-di-hexose-deoxyhexose (K-dihex-dhex).  
32 300 Similarly, compound **19** was annotated as kaempferol-3-*O*-hexose-deoxyhexose (K-hex-  
33 301 dhex).

34  
35  
36 302 Peak **17** showed a pseudomolecular ion [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 577.1386, [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 579.1472  
37 303 (molecular formula of C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>) and exhibited a weakly intense  $\lambda_{\max}$  at 276 nm characteristic  
38 304 of catechin derivatives. According to its MS/MS fragmentation, it was annotated as catechin  
39 305 dimer (procyanidin). Peaks **20**, **21** and **22** had similar UV spectra ( $\lambda_{\max}$  at 324-327 nm and a  
40 306 shoulder at 297-300 nm) and the same molecular formula of C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>. Compound **21** was  
41 307 identified as 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid by comparison with a standard (3,5-diCQ) and,  
42 308 according to Zhong et al. (2015), **20** and **22** were identified as 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid  
43 309 (3,4-diCQ) and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQ), respectively.

44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55 310

### 3.2. Differential expression of phenolic biosynthesis genes according to elevation and leaf age

The expression level of the major genes involved in phenolic biosynthesis was assessed on mature leaves from each site in June. Figure 1 gives a schematic view of the coffee phenolic pathway genes for which the level of transcripts showed significant differences among the three elevations, at  $p < 0.05$  (Tab. S1 for a complete set of results and statistical analysis). The highest transcript abundance level was generally observed at the intermediate elevation (1050 m asl). For genes related to the common part of the phenylpropanoid pathway, significant differences could be seen for three of the four phenylalanine ammonia-lyase genes (*PAL2*, *PAL 3* and *PAL 4*), two of the four cinnamate-4-hydroxylase genes (*C4H1* and *C4H2*) and three of the ten 4-coumarate-CoA ligase (*4CLI*, *4CLA* and *4CL-L8*) homologs (Fig. 1a). A higher transcript abundance was also noted in leaves from the intermediate elevation for some genes related to lignin (Fig. 1b) and most of the genes involved in the flavanol (Fig. 1c) and glycosylated flavonoid (Fig. 1d) pathways, except for two chalcone synthase homologs (*CHS1A* and *CHS1B*) and *FLS\_2*, one of the four flavonol synthase homologs. The greatest transcript abundance differences were observed for *PAL4*, *C4H1*, *4CL-L8* and *F3RT\_1* (one of the 12 homologs encoding a flavonol-3-O-glucoside-L-rhamnosyltransferase) for which transcript levels were about 2-fold higher at 1050 m asl compared to the other two sites. These results supported the observed higher glycosylated flavonoid content in leaves from this intermediate elevation (Fig. 1d; Tab. S4). On the other hand, no correlation could be established between *C3'H*, *CCoAOMT*, *F5H* and *COMT* expression levels and CQAs content, or between *ANR* or *LAR* expression and flavanol content (Tab. S4). For these compounds, contents in mature leaves actually decreased with elevation, unlike the expression levels for the genes involved in their biosynthesis (Fig. 1 b,c).

As phenolics present in mature leaves may have been synthesized at a younger age, phenolic pathway gene expression was compared between mature and juvenile leaves (first node from the apex) collected at the same time from the same trees at the intermediate elevation. It revealed that they were more expressed in juvenile leaves, except for those involved in lignin biosynthesis (*CCR*, *CAD*, *F5H* and *COMT*) (Fig. 2). Transcript levels for genes from the common phenylpropanoid (*PAL*, *C4H* and *4CL*), chlorogenic acid (*HQT*, *HCT* and *C3'H*), flavonoid (*F3H*, *F3'H* and *FLS*), flavanol (*DFR*, *ANS*, *ANS* and *LAR*) or glycosylated flavonol (*FLS*, *F3GT* and *F3RT*) pathways were, on average, 2-fold higher in young leaves (expressed in log<sub>10</sub> RPKM). The highest differences were noticed for genes encoding the flavanol pathway, their expression being between 2.5- and 4.3-fold higher in juvenile leaves compared

1  
2  
3 345 to mature one, expressed in log fold change (Tab. S5). As shown in Fig. 2, higher expression  
4 346 in juvenile leaves tallied with higher chlorogenic acid, flavanol and rutin contents in mature  
5  
6 347 leaves, but not with non-rutin glycosylated flavonoid contents (Tab. S4).  
7  
8 348

### 9 349 **3.3. Climate traits and elevation**

10 350 In order to take into account the climate experienced by the leaves during their growth, till the  
11 351 mature stage, climate traits values were averaged over 4 months before sampling for mean  
12 352 temperature (T) and relative humidity (RH) and summed for solar irradiation (SI) and rainfall  
13 353 (RAIN). Values differed between the three sites situated at elevations of 650, 1050 and 1250  
14 354 m asl (Tab. 2). The upper site, at 1250 m asl, was characterized by the lowest mean  
15 355 temperatures (T, from 16.4°C to 19.0°C), the lowest cumulative solar irradiance (SI, from  
16 356 21.6 to 24.1 kW m<sup>-2</sup>) and the highest cumulative rainfall and mean relative humidity (RAIN,  
17 357 from 331.6 to 444.6 mm and RH, from 78.5 to 86.1%, respectively), except in April when the  
18 358 lowest site received the most rainfall. The highest mean temperature and the lowest relative  
19 359 humidity were observed at the latter site, situated at 650 m asl (T from 20 to 23.3°C and from  
20 360 75 to 82.5%, respectively). At this elevation, the highest cumulative solar irradiance (SI) and  
21 361 the lowest cumulative rainfall were noted in June and September, respectively. Comparing the  
22 362 9 sets of measurements (3 elevations and 3 months), differences were particularly marked in  
23 363 terms of solar irradiance and rainfall, with the maximum values being twice as high as the  
24 364 minimum values (SI 45.1 kW m<sup>-2</sup> at 1060 m compared to 21.6 kW m<sup>-2</sup> at 1250 m asl in June  
25 365 and RAIN 444.6 mm at 1250 m in June compared to 234 mm at 1050 m asl in April). Yearly  
26 366 solar irradiance variations were particularly significant at the lowest site, where a 41%  
27 367 variation was noted compared to 10.4 and 17.9% for the highest and intermediate sites,  
28 368 respectively. In brief, out of the four climate traits taken into consideration, only the mean  
29 369 temperature and relative humidity were related to elevation in the studied part of the year  
30 370 despite being the least variable during the year and among sites.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

### 46 372 **3.4. Phenolic content of mature leaves as affected by season and elevation**

47 373 Because of the low abundance of some SM in the *C. arabica* extracts (peak height less than  
48 374 three-fold background noise), only 18 (including the two alkaloids) could be safely quantified  
49 375 by HPLC-DAD. Figure S1 shows an overlay of two typical chromatograms and the list of  
50 376 compounds (numbered according to Tab. 1) that were used for quantitative analyses.  
51 377 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) was the most abundant phenolic compound in all extracts  
52 378 (Tab. S2). Its content varied from 2.84 to 4.53% of leaf DW (g per 100 g dry leaves) and these  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 379 extreme values were observed over a three-month interval in leaves collected at the lowest  
4 380 elevation. Flavanols and rutin (glycosylated flavonoid) also appeared to accumulate at high  
5 381 levels: catechin and epicatechin contents varied between 0.73 and 2.22% DW and between  
6 382 0.48 and 1.48% DW, respectively, and rutin content varied between 0.62 and 1.19% DW  
7 383 (Tab. S3).

8  
9  
10 384 Significant differences ( $p < 0.05$ ) were noted between the highest and the lowest elevation site  
11 385 for 5-CQA content. However, as elevation and 5-CQA content appeared to positively  
12 386 correlate in April 2014 and negatively correlate in June 2015 and September 2016, no  
13 387 consistent relationship could be established between elevation and 5-CQA content. The same  
14 388 behavior was observed with the other chlorogenic acids (4-caffeoylquinic acid, a 10-fold less  
15 389 abundant 5-CQA isomer, the three isomers of dicaffeoylquinic acids (diCQs) and an isomer of  
16 390 feruloylquinic acid (FQA)), the xanthone derivatives (mangiferin and Mang-OHbenz), the  
17 391 flavanols and most of the glycosylated flavonoids. As an exception, flavone di-*C*-hexoside (F-  
18 392 dihex) contents showed a gradual decrease with respect to elevation, with significant  
19 393 correlations ( $P < 0.05$ ) observed in April and September (Tab. S3). Indeed, F-dihex content  
20 394 was 1.8-fold less in April and June and 2.9-fold less in September at the highest elevation  
21 395 compared to the lowest one. Its content also appeared to increase during the growing season at  
22 396 each elevation, especially at the lowest elevation, where F-dihex content doubled from 0.47 to  
23 397 0.97% DW from April to September.

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33 398 Correlations between SM and the main environmental conditions (T, SI, RAIN, RH) were  
34 399 then estimated (Tab. 3). Total glycosylated flavonoid content significantly correlated with T  
35 400 and SI (at  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively), CQAs and flavanol contents with rainfall  
36 401 (RAIN, negative correlation at  $p < 0.001$ ) and FQAs content with RH ( $p < 0.001$ ). On the other  
37 402 hand, diCQs and xanthone contents displayed no overall correlation with any environmental  
38 403 factor, even though the content of some components from these groups correlated well with  
39 404 one specific climate trait. For instance, a good correlation existed between 4,5-diCQ content  
40 405 and T ( $p < 0.001$ ) and 3,5-diCQ content and SI (negatively correlated at  $p < 0.001$ ) or between  
41 406 the mangiferin derivative (Mang-OHbenz) content and T ( $p < 0.01$ ). Out of the 16 studied  
42 407 phenolic compounds, only rutin and mangiferin did not show any significant correlation to  
43 408 any climate trait. In the group of glycosylated flavonoids, some compounds, such as F-dihex  
44 409 and kaempferol derivatives, were more highly correlated to T than to SI (for example, F-dihex  
45 410 content showed  $R = 0.706$  with T instead of  $R = 0.463$  with SI). Conversely, quercetin-  
46 411 dihexoside-deoxyhexose (Q-dihex-dhex) and quercetin-diglucoside (Q-diglu) contents  
47 412 correlated more with SI ( $R = 0.650$  and  $0.605$ , respectively).

1  
2  
3 413 A co-inertia analysis (CoI) was carried out for a more global view of leaf phenolic  
4 414 metabolism–environment relationships. A first CoI representation (Fig. 3A) clearly illustrated  
5 415 the results obtained during the linear regression analyses. RH positioning was opposite to SI  
6 416 and T on the first axis. All the flavonoids except rutin, two chlorogenic acids (FQA and 4,5-  
7 417 diCQ) and Mang-OHbenz appeared to be associated with SI and T (negative C1; Fig. 1A),  
8 418 while 3,5-diCQ content was associated with RH (positive C1). The second axis opposed the  
9 419 precipitations (RAIN) to the content of flavanols (catechin and epicatechin) and most of the  
10 420 chlorogenic acids (4- and 5-CQA and 3,4-diCQ). This analysis demonstrated that flavonoid  
11 421 glycoside contents, except for rutin, increased with increasing SI and T, while the  
12 422 accumulation of flavanols and most of the chlorogenic acids increased when RAIN decreased.  
13 423 Moreover, it highlighted that mangiferin content was not influenced by any of the measured  
14 424 climate traits and illustrated the contrasted responses of the different diCQs isomers to SI, T  
15 425 and RH.

16 426 The second representation (Fig. 3B) gives an overview of the sample distribution. It appeared  
17 427 that metabolite fingerprints were site-dependent and were less variable in April (samples from  
18 428 650 masl (L1), 1050 masl (I1) and 1250 masl (H1) grouped at the origin of both axes).  
19 429 Samples from the highest elevation were characterized by the lowest metabolite contents  
20 430 (positive C1 axis), the highest levels in RAIN and RH, and the lowest T, particularly in June  
21 431 (Year 2). Leaves from the low elevation site (L) were the ones that displayed the largest  
22 432 seasonal differences. Indeed, in June (L2), which was characterized by low rainfall, they  
23 433 exhibited very high flavanol and chlorogenic acid contents, and, in September (Year 3), they  
24 434 accumulated more flavonoid glycosides in relation to high SI and T. At the intermediate  
25 435 elevation (I), metabolic changes followed the same trend but were much less pronounced.  
26 436 Leaf size also appeared to depend on climate traits. Indeed, the length and width of leaves  
27 437 closely correlated with T and SI (negative correlation at  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) as  
28 438 well as with RAIN and RH (positive correlation at  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Tab.  
29 439 3). However, no correlation was observed between leaf size and metabolite contents, except  
30 440 for CQAs and flavanols (Tab. 4).

## 4. DISCUSSION

### 4.1. LC-DAD-MS<sup>2</sup> analysis enhances knowledge of coffee leaf secondary metabolites

31 443 UPLC-DAD-MS/MS was used to provide a more exhaustive description of leaf SM. The  
32 444 presence of two metabolites from the benzophenone group, an iriflophenone-C-glucoside, and  
33 445 a xanthone derivative, mangiferin parahydroxybenzoate, is described for the first time in  
34 446

1  
2  
3 447 coffee plants. Their presence in *C. arabica* leaves, along with the confirmation of the  
4 448 mangiferin accumulation previously described by Campa et al (2012), suggests the existence  
5  
6 449 of a biosynthetic pathway for mangiferin *via* a benzophenone synthase, as observed in  
7  
8 450 *Hypericum* and *Anemarrhena* (Schmidt and Beerhues 1997; Fujita and Inoue 1981) and  
9  
10 451 reviewed in Joubert et al. (2014). The nature of the major accumulated flavanols was also  
11 452 clarified. They consist of catechin, epicatechin and a procyanidin. Unlike in Ratanamarno and  
12 453 Surbkar (2017), no galocatechin derivative was detected. Lastly, this analysis led to the  
13  
14 454 annotation of some glycosylated derivatives of quercetin and kaempferol observed earlier by  
15 455 Martins et al. (2014) when analyzing the leaf content of the ‘Catuai Vermelho IAC 44’ variety  
16 456 of *C. arabica*. If most SM were found at detectable levels in all samples, kaempferol  
17 457 derivatives were only detected at the end of the growing season at low elevation.  
18  
19  
20  
21

458

#### 22 459 **4.2. Phenolic content in mature leaves is influenced by the main climate traits**

23  
24 460 Plants are capable of sensing a wide range of environmental factors and are equipped with an  
25 461 intricate machinery that integrates these sometimes conflicting signals to achieve coordinated  
26  
27 462 growth with biochemical responses. Although plant performance, and even plant survival,  
28  
29 463 depends on the proper functioning of its signaling networks, little is known about the make-up  
30 464 of these networks in most cultivated plants (Berens et al. 2017). Probably because this study  
31 465 was carried out over several seasons, none of the SM contents quantified (except for F-dihex)  
32 466 could be correlated with elevation or season despite their widely accredited role in the  
33 467 adaptive response of plants to their environment (Bernal et al. 2013; Petrusa et al. 2013). As  
34 468 it has been noticed that flavonoid content and temperature correlated (Tab. 3) and temperature  
35 469 decreases with elevation, it is surprising that flavonoid content and elevation were not related.  
36  
37 470 An explanation can be found in the correlation also observed between flavonoid content and  
38 471 irradiance, a climate trait whose evolution did not depend on elevation. This result underlines  
39 472 that under natural growing conditions, where climate parameters change independently from  
40 473 one another, it is difficult, unlike in controlled conditions, to correlate SM content to a  
41 474 specific climate parameter.

42  
43  
44  
45  
46  
47  
48 475 However, in this study, using a dataset combining 9 situations (3 elevations x 3 harvest  
49 476 months), it was possible to show correlations between specific families of phenolics and one  
50 477 or some environmental conditions. It appeared that mature leaf flavonoid contents increased  
51 478 with temperature and irradiance and that CQAs and flavanol contents decreased when rainfall  
52 479 increased, a climate factor that had a positive effect on leaf growth. The correlation between  
53 480 CQA and temperature already observed in coffee plants submitted to 3-days chilling cycles

1  
2  
3 481 (13°C day /4°C night) was not observed here (Fortunato et al. 2010) maybe because of the  
4 482 more limited temperature variations recorded on the three elevations (the extreme mean  
5 483 recorded values ranged from 16.5 to 23.3 °C). FQA also seemed to correlate negatively with  
6 484 relative humidity. Surprisingly, the different diCQ isomers exhibited opposite behaviors for  
7 485 both temperature and solar irradiance. The high correlation between temperature and 4,5diCQ  
8 486 content was accompanied by a negative, but not significant, relationship with 3,5-diCQ  
9 487 content. The highly negative correlation of solar irradiance with 3,5-diCQ content was also  
10 488 accompanied by a positive but not significant relationship with 4,5-diCQ. As already  
11 489 observed in green Arabica coffee beans (Joet et al. 2010), climate traits may act differently on  
12 490 the leaf esterification rates of the different substitutable positions of the quinic acid ring. The  
13 491 results of this study further indicate that similar conclusions may be drawn on other SM  
14 492 chemical classes. For example, rutin content is unaffected by both temperature and solar  
15 493 irradiance in mature leaves in opposition to the other glycosylated flavonoids. Mangiferin  
16 494 parahydroxybenzote appeared unaffected by temperature unlike mangiferin. This may be  
17 495 linked to the complex structure-function relationship among members of most phenolics  
18 496 classes.

19 497 The stimulation of kaempferol and quercetin derivatives biosynthesis by SI observed here  
20 498 confirms previous results obtained in coffee leaves under controlled conditions (Martins et al.  
21 499 2014) and are in line with the response of strawberry fruit to temperature increases (Wang and  
22 500 Zheng 2001) and with the reaction of numerous plants to UV-B irradiance (Vidovic et al.  
23 501 2017). Recent studies indicated that quercetin derivatives, and more specifically ortho-  
24 502 dihydroxylated B-ring flavonoids, play an important role in photoprotection as ROS-  
25 503 detoxifying agents and, to a lesser extent, as UV-screens (Agati et al. 2011; 2013; Zhang et al.  
26 504 2017).

27 505 Another interesting result of this study is the observed highly negative correlation between  
28 506 cumulated rainfall and CQAs or flavanol contents, suggesting a potentially greater  
29 507 accumulation of these two families of compounds under dryer conditions. Usually, plants  
30 508 respond to different types of stress conditions by limiting growth and by accumulating  
31 509 phenolics, the trade-off between growth and secondary metabolism being modulated by  
32 510 resource availability (Caretto et al. 2015). Thus, water stress and drought stress limit growth  
33 511 and stimulate flavanols and/or chlorogenic acid accumulation in leaves of *Prunus avium*  
34 512 (Cohen et al. 1994), *Cistus clusii* (Hernandez et al. 2004) and *Salvia officinalis* (Bettaieb et al.  
35 513 2011). In *Commelina communis* leaves, Plumbe and Willmer (1986) showed that phenolics,  
36 514 such as chlorogenic acid, inhibit stomatal opening and, as a consequence, limit leaf

1  
2  
3 515 evapotranspiration. In this work, lower coffee leaf growth and higher CQAs and flavanol  
4 516 contents were observed when decreases in rainfall led to water stress (Tab. 3).  
5  
6 517

7  
8 **4.3. Phenolic content of mature leaves as a trace of the biosynthesis activity at the**  
9 **juvenile stage**

10 520 One of the difficulties in deciphering the molecular mechanisms controlling phenolic content  
11 521 is that it results from the cumulative efforts of biosynthesis, storage, transformation and  
12 522 catabolism processes from leaf initiation to its harvest for analysis. Considering the results  
13 523 obtained by analyzing the leaf content at an early stage of maturity, the levels of phenolics in  
14 524 mature leaves could then be attributed to storage processes rather than biosynthesis. All  
15 525 analyzed genes from the phenolic biosynthesis displayed higher expression in juvenile than  
16 526 mature leaves except those involved in the first steps of lignification, i.e. after CQA and FQA  
17 527 biosynthesis (especially *CCR* and *F5*). Such expression profiles tallied with estimates of  
18 528 CQAs and flavanol contents in these two groups of leaves, thereby suggesting that soluble  
19 529 phenolics biosynthesis is greater in juvenile leaves, while lignin synthesis increases during  
20 530 leaf aging. The negative correlation ( $p < 0.01$ ) between leaf size and CQAs or flavanol contents  
21 531 (Tab. 4) suggests that the synthesis of these compounds may mostly occur in juvenile leaves  
22 532 and that their content gradually decreases as leaves expand, by degradation or simple dilution.  
23 533 It agrees with the observed lack of correlation in mature leaves between flavanol or CQAs  
24 534 content and the expression of the genes involved in their biosynthesis. It indicates that  
25 535 environmental impact on leaf expansion and phenolics biosynthesis level at an immature stage  
26 536 mostly determines the phenolics content in mature leaves. It also suggests that the phenolics  
27 537 specifically produced at the early growth stage play a major role in the protection of juvenile  
28 538 leaves.

29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41 539 Glycosylated flavonoids appeared to behave differently. Their content was higher in mature  
42 540 than in juvenile leaves with the notable exception of rutin that accounted for 93% of the total  
43 541 glycosylated flavonoids in juvenile leaves and only 57% in mature leaves. This compound  
44 542 appeared to be mostly synthesized in young leaves probably due to a higher expression of the  
45 543 flavonol synthase (*FLS*), flavonoid glucosyltransferase (*F3GT*) and more especially glucosyl-  
46 544 rhamnosyltransferase (*F3RT*) genes in agreement with previous results obtained under  
47 545 controlled growth conditions (Campa et al. 2017). Nevertheless, the content of all  
48 546 glycosylated flavonoids paralleled the expression levels of their biosynthesis genes in the  
49 547 samplings of mature leaves collected at different elevations. This suggests that glycosylated  
50 548 flavonoid biosynthesis and accumulation can be modulated by the perception of  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 549 environmental cues at a mature stage, rutin biosynthesis being additionally developmentally  
4 550 up-regulated at a juvenile stage. Based on the observed correlation between mature leaf  
5 551 glycosylated flavonoid content (more specifically with compounds containing a deoxyhexose,  
6 552 such as Q-dihex-dhex or K-hex-dhex - Tab. 3) and solar irradiation, a positive impact of solar  
7 553 irradiation on the glycosylated flavonoid biosynthesis in mature leaves can be proposed.  
8 554 Taken together, these observations confirm previous results obtained with *C. arabica*  
9 555 cultivated in a growth chamber under low light conditions and suddenly exposed to higher  
10 556 light conditions (Campa et al. 2017) or in field conditions comparing sun-exposed and shaded  
11 557 mature leaves (Martins et al. 2014).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 559 5. CONCLUSION

20 560 Carried out on field-grown Arabica trees exposed to full sun light, this study made it possible,  
21 561 by a fine analysis of the phenolics present during leaf ontogeny, to reveal that the content in  
22 562 glycosylated flavonoids changed with leaf age. While juvenile leaves synthesized and  
23 563 accumulated rutin, mature leaves were enriched in glycosylated derivatives of quercetine  
24 564 compared to younger leaves. Moreover, the higher content in chlorogenic acids, flavanols and  
25 565 rutin associated with the higher level of expression of genes encoding their biosynthesis in  
26 566 juvenile leaves compared to mature leaves pointed to a higher synthesis of these compounds  
27 567 at an early stage of leaf growth. Analyzing phenolic content of mature leaves collected at  
28 568 three different seasons on trees cultivated at three different elevations revealed quantitative  
29 569 but not qualitative differences. Glycosylated flavonoids seemed to accumulate at higher levels  
30 570 when temperature and solar irradiation increased, and flavanols and chlorogenic acids when  
31 571 rainfall decreased. Comparing the level of phenolic pathway gene expression in leaves of the  
32 572 same age did not unveil which ones are under the direct control of climate parameters, an  
33 573 information that may only be accessed under controlled conditions.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

## 47 576 Bibliography

- 48 577 Agati G, Brunetti C, Di Fernando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M (2013) Functional roles  
49 578 of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol*  
50 579 *Biochem* 72: 35-45.  
51 580 Agati G, Cerovic ZG, Pinelli P, Tattini M (2011) Light-induced accumulation of ortho-  
52 581 dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence  
53 582 excitation techniques. *Environ Exp Bot* 73: 3-9.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 583 Anthony F, Clifford MN, Noirot M (1993) Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.:  
4 584 chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genet Resour Crop Evol* 40: 61–  
5 585 70. doi: 10.1007/BF00052636
- 6 586 Ashihara H, Sano H, Crozier A (2008) Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis,  
7 587 catabolism, function and genetic engineering. *Phytochem* 69: 841–856.  
8 588 doi:10.1016/j.phytochem.2007.10.029
- 9 589 Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P,  
10 590 Anzueto F, Hruska AJ, Morales C (2015) The coffee rust crises in Colombia and Central  
11 591 America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7:  
12 592 303–321. doi: 10.1007/s12571-015-0446-9
- 13 593 Baca M, Läderach P, Hagggar J, Schroth G, Ovalle O (2014) An integrated framework for  
14 594 assessing vulnerability to climate change and developing adaptation strategies for coffee  
15 595 growing families in Mesoamerica. *PLoS ONE* 9(2): e88463. doi:  
16 596 10.1371/journal.pone.0088463
- 17 597 Bennett RN, Wallsgrove RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms.  
18 598 *New Phytol* 127: 617–633. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x
- 19 599 Berens M, Berry H, Mine A, Argueso C, Tsuda K (2017) Evolution of hormone signaling  
20 600 networks in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 55: 401-425.
- 21 601 Bernal M, Llorens L, Julkunen-Tiitto R, Badosa J, Verdaguer D (2013) Altitudinal and  
22 602 seasonal changes of phenolic compounds in *Buxus sempervirens* and cuticles. *Plant Physiol*  
23 603 *Biochem* 70: 471-482. Doi: 10/1016/j.plaphy.2013.06.012
- 24 604 Bertrand B, Boulanger R, Dussert S, Joët T (2012a) Climatic factors directly impact the  
25 605 volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee  
26 606 beverage quality. *Food Chem* 135(4): 2575-83. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.060
- 27 607 Bertrand B, Montagnon C, Georget F, Charmetant P, Etienne H (2012b) Création et diffusion  
28 608 de variétés de caféiers Arabica : quelles innovations variétales ? *Cahiers Agricultures* 21  
29 609 (2-3): 77-88.
- 30 610 Bertrand B, Villarreal D, Laffargue A, Posada H, Lashermes P, Dussert S (2008) Comparison  
31 611 of the Effectiveness of Fatty Acids, Chlorogenic Acids, and Elements for the Chemometric  
32 612 Discrimination of Coffee (*Coffea arabica* L.) Varieties and Growing Origins. *J Agric Food*  
33 613 *Chem* 56: 2273–2280. doi: 10.1021/jf073314f
- 34 614 Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B (2011) Drought effects on  
35 615 polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L.  
36 616 *Acta Physiol Plant* 33: 1103-1111, doi: 10.1007/s11738-010-0638-z
- 37 617 Breitler J-C, Campa C, Georget F, Bertrand B, Etienne H (2016) A single-step method for  
38 618 RNA isolation from tropical crops in the field. *Scientific Reports* 6: 38368. doi:  
39 619 10.1038/srep38368
- 40 620 Bunn C, Läderach P, Jimenez JGP, Montagnon C, Schilling T (2015) Multiclass  
41 621 Classification of Agro-Ecological Zones for Arabica Coffee: An Improved Understanding  
42 622 of the Impacts of Climate Change. *PLoS ONE* 10: e0140490.  
43 623 doi:10.1371/journal.pone.0140490
- 44 624 Campa C, Rakotomalala JJ, de Kochko A, Hamon S (2008) Chlorogenic acids : diversity in  
45 625 green beans of wild coffee species. *Adv Plant Physiol* 10: 421–437.
- 46 626 Campa C, Mondolot L, Rakotondravao A, Bidet LPR, Gargadennec A, Couturon E, La Fisca  
47 627 P, Rakotomalala JJ, Jay-Allemand C, Davis AP (2012) A survey of mangiferin and  
48 628 hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications  
49 629 and uses. *Annals Bot* 110: 595–613. doi:10.1093/aob/mcs119
- 50 630 Campa C, Urban L, Mondolot L, Fabre D, Roques S, Lizzi Y, Aarouf J, Doubeau S, Breitler  
51 631 J-C, Letrez C, Toniutti L, Bertrand B, La Fisca P, Bidet LPR, Etienne H (2017) Juvenile

- 1  
2  
3 632 coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase,  
4 633 Front Plant Sci 8: 1126. doi: 10.3389/fpls.2017.01126
- 5 634 Caretto S, Linsalata V, Colella G, Mita G, Lattanzio V (2015) Carbon fluxes between primary  
6 635 metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. Int J Mol Sci 16: 26378-  
7 636 26394. doi: 10.3390/ijms161125967
- 8 637 Chessel D, Dufour A, Thioulouse J (2004) The ade4 package. I. One-table methods. R News  
9 638 4: 5–10.
- 10 639 Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E, Jansen MAK (2008)  
11 640 Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for  
12 641 phenolic accumulation and UV-tolerance. Phytochem 69: 2149–2156. doi:  
13 642 10.1016/j.phytochem.2008.04.024
- 14 643 Cohen Y, Treutter D, Feucht W (1994) Water stress induced changes in phenol composition  
15 644 of leaves and phloem of *Prunus avium* L. Acta Horticultrae 381: 494-497.
- 16 645 DaMatta FM, Godoy AG, Menezes-Silva PE, Martins SCV, Sanglard LMVP, Morais LE,  
17 646 Torre-Neto A, Ghini R (2016) Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees  
18 647 grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions. J Exp Bot 67: 341-352. doi:  
19 648 10.1093/jxb/erv463
- 20 649 Davis AP, Tosh J, Ruch N, Fay MF (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae)  
21 650 subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size,  
22 651 morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. Bot. J. Linn. Soc 167: 357–  
23 652 377. doi:10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x
- 24 653 Denoeud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A, Droc G, Guyot R, Pietrella M, Zheng C, Alberti  
25 654 A, Anthony F, Aprea G, Aury JM, Bento P, Bernard M, Bocs S, Campa C, Cenci A,  
26 655 Combes MC, Crouzillat D, Da Silva C, Daddiego L et al. (2014) The genome of coffee  
27 656 displays ancestral asterid gene order and provides insight into caffeine, aroma and flavor  
28 657 evolution, Science 345: 1181-1184. doi: 10.1126/science.1255274
- 29 658 Díaz J, Barceló AR, De Cáceres FM (1997) Changes in shikimate dehydrogenase and the end  
30 659 products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early  
31 660 development of seedlings of *Capsicum annuum*. New Phytol 136: 183–188. doi:  
32 661 10.1046/j.1469-8137.1997.00743.x
- 33 662 Dolédec S, Chessel D (1994) Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-  
34 663 environment relationships. Freshwater Biol 31: 277-294.
- 35 664 Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for  
36 665 ecologists. J Stat Softw 22: 1-20.
- 37 666 Dray S, Chessel D, Thioulouse J (2003) Co-inertia analysis and the linking of ecological  
38 667 tables. Ecology 84: 3078-3089.
- 39 668 Dubberstein D, Rodrigues WP, Semedo JN, Rodrigues AP, Pais IP, Leitao AE, Partelli FL,  
40 669 Campostrini E, Reboredo F, Scotti-Campos P, Lidon FC, Ribeiro-Barros AI, DaMatta FM,  
41 670 Ramalho JC (2018) Mitigation of the negative impact of warming on the coffee crop: the  
42 671 role of increased air [CO<sub>2</sub>] and management strategies. In: Shanker A (Ed) Climate  
43 672 Resilient Agriculture - Strategies and Perspectives. Intech. ISBN 978-953-51-5660-4, pp  
44 673 57-85. doi: 10.5772/intechopen.72374
- 45 674 Dussert S, Laffargue A, de Kochko A, Joët T (2008) Effectiveness of the fatty acid and sterol  
46 675 composition of seeds for the chemotaxonomy of *Coffea* subgenus *Coffea*. Phytochem 69:  
47 676 2950–2960. doi:10.1016/j.phytochem.2008.09.021
- 48 677 Fortunato AS, Lidon FC, Batista-Santos P, Leitao AE, Pais IP, Ribeiro AI, Ramalho JC  
49 678 (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea*  
50 679 sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. J Plant Physiol 167: 333-  
51 680 342. Doi:10.1016/j.jplph.2009.10.013
- 52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 681 Fujita M, Inoue T (1981) Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena*  
4 682 *asphodeloides*: hydroxylation of the skikimate-derived ring. *Phytochem* 20(9): 2183-2185.
- 5 683 Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D,  
6 684 Albert I, Taylor J, et al. (2005) Galaxy: A platform for interactive large-scale genome  
7 685 analysis. *Genome Res* 15: 1451–1455, doi:10.1101/gr.4086505
- 8 686 Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant  
9 687 phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans R Soc B Biol Sci* 355: 1499–1510.
- 10 688 Hectors K, Van Oevelen S, Geuns J, Guisez Y, Jansen MAK, Prinsen E (2014) Dynamic  
11 689 changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*.  
12 690 *Physiol Plant* 152: 219–230. doi:10.1111/ppl.12168
- 13 691 Hernandez I, Alegre L, Munné-Bosch S (2004) Drought-induced changes in flavonoids and  
14 692 other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field  
15 693 conditions. *Tree Physiol* 24: 1303-1311.
- 16 694 ICO (2013) Statistics on coffee: historical production data worldwide. In: Organization ICO  
17 695 (ed.) Retrieved January, 2018, from: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp)
- 18 696 Ito T, Kakino M, Tazawa S, Oyama M, Maruyama H, Araki Y, Hara H, Iinuma M (2012)  
19 697 Identification of Phenolic Compounds in *Aquilaria crassna* Leaves Via Liquid  
20 698 Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectroscopy. *Food Sci Technol Res* 18 :  
21 699 259–262. doi:10.3136/fstr.18.259
- 22 700 Joët T, Laffargue A, Descroix F, Doubeau S, Bertrand B, de Kochko A, Dussert S (2010)  
23 701 Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the  
24 702 biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chem* 118: 693-701.  
25 703 doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.048
- 26 704 Joubert E, de Beer D, Hernandez I, Munné-Bosch S (2014) Accumulation of mangiferin,  
27 705 isomangiferin, iriflophenone-3-C-b- glucoside and hesperidin in honeybush leaves  
28 706 (*Cyclopia genistoides* Vent.) in response to harvest time, harvest interval and seed source.  
29 707 *Ind Crops Prod* 56: 74-82.
- 30 708 Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler  
31 709 transform *Bioinformatics* 25: 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
- 32 710 Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin  
33 711 R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence Alignment/Map  
34 712 format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- 35 713 Mabry T, Markham, KR, Thomas MB (1970) The Ultraviolet Spectra of Flavones and  
36 714 Flavonols. In: Mabry T, Markham KR, Thomas MB (eds) *The Systematic Identification of*  
37 715 *Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 41-164.
- 38 716 Magalhães STV, Fernandes FL, Demuner AJ, Picanço MC, Guedes RNC (2010) Leaf  
39 717 alkaloids, phenolics, and coffee resistance to the leaf miner *Leucoptera coffeella*  
40 718 (Lepidoptera: Lyonetiidae). *J Econ Entomol* 103: 1438–1443.
- 41 719 Magrath A, Ghazoul J (2015) Climate and Pest-Driven Geographic Shifts in Global Coffee  
42 720 Production: Implications for Forest Cover, Biodiversity and Carbon Storage. *PLoS ONE*  
43 721 10: e0133071. doi:10.1371/journal.pone.0133071.
- 44 722 Martins SCV, Araujo WL, Tohge T,  
45 723 Fernie AR, DaMatta FM (2014) In high-light-acclimated coffee plants the metabolic  
46 724 machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light  
47 725 enhancement in photosynthetic yield. *PLoS ONE* 9:e94862. doi:  
48 726 10.1371/journal.pone.0094862
- 49 727 Martins MQ, Rodrigues WP, Fortunato AS, Leitao AE, Rodrigues AP, Pais IP, Martins LD,  
50 728 Silva MJ, Reboredo FH, Partelli FL, Campostrini E, Tomaz MA, Scotti-Camps P,  
51 729 Ribeiro Barros AI, Lidon FJC, DaMatta FM, Ramalho JC (2016) Protective response  
52 730 mechanisms to heat stress in interaction with high [CO<sub>2</sub>] conditions in *Coffea* spp. *Front*  
53 731 *Plant Sci* 7: 947. doi: 10.3389/fpls.2016.00947

- 1  
2  
3 731 Ovalle-Rivera O, Läderach P, Bunn C, Obersteiner M, Schroth G (2015) Projected Shifts in  
4 732 *Coffea arabica* Suitability among Major Global Producing Regions Due to Climate  
5 733 Change. PLoS ONE 10(4): e0124155. doi:10.1371/journal.pone.0124155 Pavarini DP,  
6 734 Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP (2012) Exogenous influences on plant secondary  
7 735 metabolite levels. Anim Feed Sci Technol. Special Issue: Plant Bioactive Compounds in  
8 736 Ruminant Agriculture - Impacts and Opportunities 176: 5–16.  
9 737 doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002
- 10 738 Petrusa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A (2013) Plant  
11 739 flavonoids – Biosynthesis, transport and involvement in stress responses. Int J Mol Sci 14:  
12 740 14950-14973. Doi: 10.3390/ijms140714950
- 13 741 Plumbe AM, Willmer CM (1986) Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of  
14 742 some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. New Phytol  
15 743 103: 17-22.
- 16 744 Rahn E, Vaast P, Laderach P, van Asten P, Jassogne L, Ghazoul J (2018) Exploring  
17 745 adaptation strategies of coffee production to climate change using a process-based model.  
18 746 Ecological Modelling, 371: 76-89. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2018.01.009
- 19 747 Ratanamarno S, Surbkar S (2017) Caffeine and catechine in fresh coffee leaf (*Coffea arabica*)  
20 748 and coffee leaf tea. Maejo Int J Sci Technol 11: 211-218.
- 21 749 Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for  
22 750 differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26: 139-40.  
23 751 doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- 24 752 R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical  
25 753 Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-  
26 754 900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org>.
- 27 755 Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB (2016) Effect of the environment on the secondary  
28 756 metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of  
29 757 plants. Sci Rep 6. doi: 10.1038/srep29265
- 30 758 Schmidt W, Beerhues L (1997) Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures  
31 759 of *Hypericum androsaenum* L., FEBS Letters 420: 143-146.
- 32 760 Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G (2004) Differential  
33 761 accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under  
34 762 excess light and drought stress. New Phytol 163: 547–561. doi:10.1111/j.1469-  
35 763 8137.2004.01126.x
- 36 764 Trevisan MTS, Farias de Almeida R, Soto G, De Melo Virginio Filho E, Ulrich CM, Owen  
37 765 RW (2016) Quantitation by HPLC-UV of Mangiferin and Isomangiferin in Coffee (*Coffea*  
38 766 *arabica*) Leaves from Brazil and Costa Rica After Solvent Extraction and Infusion. Food  
39 767 Anal Methods 9: 2649–2655, doi: 10.1007/s12161-016-0457-y
- 40 768 Verhage FYF, Anten NPR, Sentelhas PC (2017) Carbon dioxide fertilization offsets negative  
41 769 impacts of climate change on Arabica coffee yield in Brazil. Climatic Change 144: 671-  
42 770 685. doi: 10.1007/s10584-017-2068-z
- 43 771 Vidovic M, Morina F, Jovanovic SV (2017) 2- Stimulation of various phenolics in plants  
44 772 under ambient UV-B radiation. In: Singh VP, Singh S, Prasad SM, Parihar P (eds) UV-B  
45 773 radiation: from environmental stressor to regulator of plant growth, John Wiley & Sons  
46 774 Ltd, pp. 9-56.
- 47 775 Villers L, Arizpe N, Orellana R, Conde C, Hernandez J (2009) Impacts of climatic change on  
48 776 coffee flowering and fruit development in Veracruz, México. Interciencia 34(5):322–9.
- 49 777 Wang SY, Zheng W (2001) Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in  
50 778 strawberry. J. Agric. Food Chem 49: 4977-4982.
- 51 779 Wickham H (2016) readxl: Read Excel Files. R package version 0.1.1. [https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=readxl)  
52 780 [project.org/package=readxl](https://CRAN.R-project.org/package=readxl).

- 1  
2  
3 781 Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant*  
4 782 *Biol* 5: 218–223. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X
- 5 783 Yao K, Luca VD, Brisson N (1995) Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the  
6 784 Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant*  
7 785 *Cell* 7:1787–1799. doi:10.1105/tpc.7.11.1787
- 8 786 Zhang Q, Liu M, Ruan J (2017) Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional  
9 787 roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biol.* 17: 64. doi:  
10 788 10.1186/s12870-017-1012-8
- 11 789 Zhong R-F, Xu G-B, Wang Z, Wang A-M, Guan H-Y, Li J, He X, Liu J-H, Zhou M, Li Y-J,  
12 790 Wang Y-L, Liao S-G (2015) Identification of anti-inflammatory constituents from  
13 791 *Kalimeris indica* with UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS and GC–M. *J Ethnopharmacol* 165:  
14 792 39-45. doi:10.1016/j.jep.2015.02.034
- 15 793 Willems JL, Khamis MM, Saeid WM, Purves RW, Katselis G, Low NH, El-Aneed A (2016)  
16 794 Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem  
17 795 mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 933:164e174. doi: 10.1016/j.aca.2016.05.041  
18 796

### 797 **Acknowledgments**

798 We should like to address special thanks to INECOL, Instituto di Ecologia di Xalapa, Mexico,  
799 for their technical support, their precious advice for the cultivation of coffee trees, and their  
800 valuable help in facilitating collaboration with CIRAD.

801

### 802 **Funding sources**

803 This work was supported by the European Erasmus Kite program, which contributed to the  
804 financing of Ialy Vestalys' doctoral scholarship, by the French Embassy in Mexico, which  
805 financed several missions for Claudine Campa and Hervé Etienne, and by the Département  
806 Environnement et Ressources at IRD (Robert Arfi), which partly funded the RNAseq analyses  
807 and meteorological sensors.

808

### 809 **Figure legends**

810

811 Figure 1. Diagrammatic representation of the phenolic biosynthesis pathway in coffee plants  
812 on which normalized gene expression, expressed in reads per kilo base per million reads  
813 (RPKM), is mentioned only when statistical differences were noted between elevations  
814 (650 m, 1050 m and 1250 m) at  $p < 0.05$ . Contents of mature leaves harvested in June 2015  
815 for caffeoylquinic acids (CQAs), flavanols and glucosylated flavonoids (Gl-Flav) at the  
816 lowest elevation (L, 650 m), the intermediate elevation (I, 1050 m) and the highest  
817 elevation (H, 1250 m) are boxed separately and expressed as a percentage of dry weight (%  
818 DW). Means followed by the same letter were not significantly different between elevation  
819 at  $p < 0.05$  (Newman–Keuls test).

820

821 Figure 2. Comparison of the expression levels, expressed in log<sub>10</sub> RPKM, of the genes  
822 involved in the phenolic biosynthesis pathway and phenolic content, expressed as a  
823 percentage of dry weight (% DW) between young (YL) and mature (ML) leaves of coffee  
824 trees from the intermediate elevation (I, 1050 m). Significant differences at  $p < 0.05$  are  
825 indicated by an asterisk.

826

827

828 Figure 3. Co-inertia score scatter plots of the data exhibiting the correlation of the  
829 environmental factors with the occurrence of phenolic compounds from mature coffee  
830 leaves analyzed at three different elevations and three months scattered during their  
831 growing season (A) and the occurrence of the three sites for the three harvest dates (B). A -  
832 Phenolic compounds in coffee leaves and related climate factors (in boxes: T =  
833 temperature average; SI = cumulative solar irradiance; RAIN = cumulative rainfall; RH =  
834 relative humidity average). Compounds from the same phenolic family share a similar  
835 color frame. Cat, (+)-catechin; Epicat, (-)-epicatechin; Mang, mangiferin; Mang-OHbenz,  
836 mangiferin parahydroxybenzoate; 5-CQA and 4-CQA, moncaffeoylquinic acids; 3,4-  
837 diCQ, 3,5-diCQ and 4,5-diCQ, dicaffeoylquinic acids; FQA, feruloylquinic acid; F-dihex,  
838 flavone-di-C-hexose; Q-dihex-dhex, quercetin-dihexose-deoxyhexose; Q-diglu, quercetin-  
839 diglucoside; Rutin, quercetin-rutinoside (rutin); K-hex-dhex, kaempferol-hexose-  
840 deoxyhexose; K-dihex-dhex, kaempferol-dihexose-deoxyhexose. B – For the three sites, L  
841 indicates the lowest elevation (650 m asl), I the intermediate elevation (1050 m asl) and H  
842 the highest elevation (1250 m asl); 1 indicates the samplings carried out in April, 2 the  
843 samplings carried out in June and 3 samplings from September.

Table 1. Result of the UPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of a mature leaf methanolic extract of *Coffea arabica* var. Marsellesa. TR, retention time; Wavelength, maximum absorbance in the UV; Compound names followed by an asterisk correspond to metabolites identified by comparison with a pure standard compound.

Peak N°	RT (min)	Mass (Da)	Molecular formula	Wavelength (nm)	Compound name	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	[M-H] <sup>+</sup>	MS/MS
1	2.61	180.1640	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	272	Theobromine*	-		181.072	67 (100) 85 (78) 181 (74) 138 (65)
2	3.00	354.3087	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	353.090	191 (100) 179 (61) 135 (47) 173 (6)	355.100	163 (100) 145 (24) 89 (9)
3	4.03	408.3561	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	286	Iriflophenone 3- <i>C</i> - $\beta$ -glucoside	407.101	287 (100) 317 (23) 245 (61) 193 (47) 125 (8)	409.111	195 (100) 231 (79) 13 (61) 325 (46) 177 (43) 121 (39) 271 (39)
4	4.20	290.2700	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	278	(+)-Catechin*	-		291.086	139 (100) 123 (59) 161 (12) 207 (6)
5	4.43	354.3087	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*	353.090	191 (100) 179 (2) 173 (1)	355.100	163 (100) 145 (11) 117 (4)
6	4.75	354.3087	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	300sh-325	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	353.090	191 (100) 173 (21) 179 (11)	355.100	163 (100) 145 (14) 117 (8) 89 (2)
7	4.90	194.1900	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	272	Caffeine*	-		195.089	138 (100) 110 (36) 195 (29) 69 (21)
8	5.42	290.2700	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	278	(-)-Epicatechin*	289.071	109 (100) 203 (74) 125 (65) 151 (43) 245 (39)		
9	5.62	338.3093	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	310	5- <i>O</i> -Coumaroylquinic acid	337.095	191 (100) 133 (17) 53 (12)	339.109	147 (100) 75 (23) 97 (23) 236 (23)
10	6.09	422.3400	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	257-317-365	Mangiferin*	421.080	301 (100) 331 (85) 259 (12) 421 (15) 273 (10)	423.091	273 (100) 303 (74) 327 (51) 369 (22) 351 (18) 299 (15) 357 (9)
11	6.80	368.3353	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	258-267sh-300sh-327	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	367.106	191 (100) 93 (21) 173 (11) 111 (7) 134 (4)	369.116	177 (100) 145 (42) 117 (5)
12	6.81	594.5181	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	257-300sh-353	Flavone di- <i>C</i> -hexose	593.156	593 (100) 473 (11) 353 (10) 406 (10) 503 (8)	595.164	457 (100) 427 (67) 379 (35) 325 (29) 295 (12)
13	6.86	772.6581	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	257-300sh-353	Quercetin-3- <i>O</i> -dihexose-deoxyhexose	771.204	771 (100) 300 (53) 179 (5) 273 (5) 271 (5)	773.213	303 (100) 125 (53) 84 (26) 194 (13)
14	6.97	626.5169	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	257-300sh-353	Quercetin-3,4-di- <i>O</i> -glucoside*	625.145	625 (100) 300 (72) 271 (10) 179 (3) 445 (3) 463 (3) 505 (3)	627.151	303 (100)
15	7.34	756.6590	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	265-346	Kaempferol 3- <i>O</i> -dihexose-deoxyhexose	-		757.213	287 (100) 449 (6) 129 (6) 757 (6) 612 (1)
16	7.74	610.5175	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	257-353	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside *	609.154	609 (100) 300 (20)	611.160	303 (100)
17	7.90	578.5202	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	257-353	Procyanidin	577.139	289 (100) 577 (83) 407 (72) 125 (61) 161 (17) 451 (11)	579.147	287 (100) 409 (94) 127 (84) 163 (31) 247 (19) 579 (13)
18	7.96	464.3800	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	257-353	Quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside	463.091	300 (100) 463 (48) 191 (19) 271 (10)	465.102	303(100)
19	8.20	594.5181	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	265-346	Kaempferol 3- <i>O</i> -hexose-deoxyhexose	-		596.163	287 (100) 596 (1)
20	8.39	516.4510	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	246-300sh-324	3,4- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid*	-		517.132	163 (100) 63 (27) 140 (18) 191 (18) 370 (11)
21	8.48	516.4510	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	243-297sh-327	3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid*	515.123	191 (100) 353 (91) 179 (63) 135 (13) 173 (6) 515 (3)	517.132	140 (100) 163 (77) 519 (64) 213 (59) 117 (41) 303 (41) 189 (27)
22	8.94	516.4510	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	243-297sh-327	4,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid*	515.123	353 (100) 173 (73) 179 (53) 135 (11) 515 (3)	517.132	163 (100) 111 (18) 383 (14) 435 (14) 224 (5)
23	9.49	542.4451	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	257-317-365	Mangiferin parahydroxybenzoate	541.102	301 (100) 331 (79) 541 (53) 259 (6) 385 (6)	543.112	303 (100) 121 (96) 405 (24) 327 (23) 543 (21)

Table 2. Climate characteristics measured over three consecutive years on the three sites situated at different elevations.

Values are the means (followed by SE) of temperature (T, °C) and relative humidity (RH, %), the cumulative rainfall (RAIN, mm) and the cumulative solar irradiance (SI, kW. m<sup>-2</sup>) sustained by *Coffea arabica* var. Marsellesa plantlets during the four months (120 days) preceding harvest.

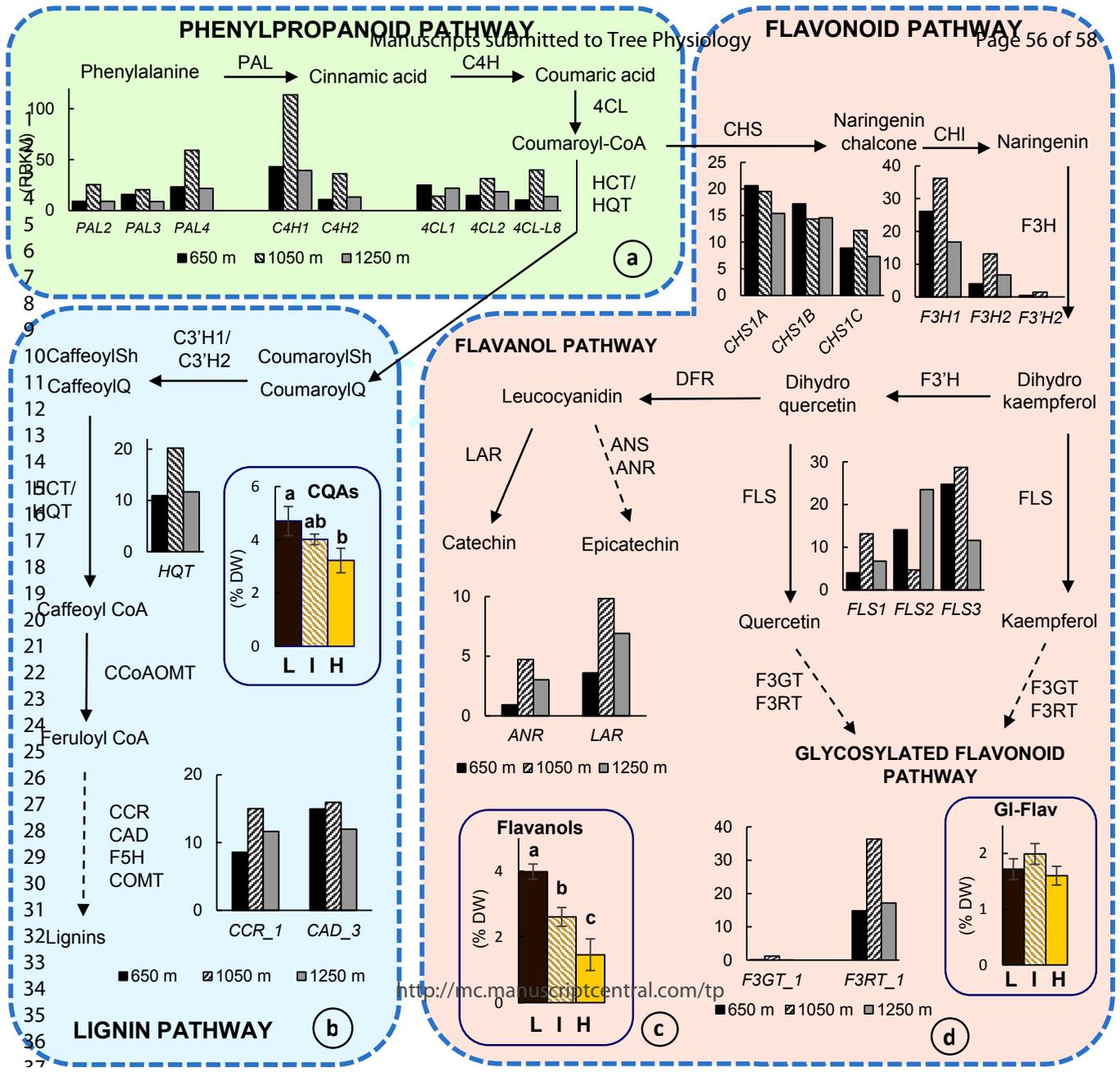
Harvest month	Elevation (m asl)	T (°C)	SI (kW.m <sup>-2</sup> )	RAIN (mm)	RH (%)
April	650	22.05 ± 3.33	40.00	376.80	76.17 ± 9.00
	1050	20.21 ± 3.10	45.09	234.00	77.10 ± 10.58
	1250	18.17 ± 3.05	21.63	331.60	78.58 ± 13.07
June	650	20.04 ± 3.81	25.54	255.20	82.46 ± 8.90
	1050	18.46 ± 3.41	37.02	343.20	84.49 ± 8.03
	1250	16.42 ± 3.34	22.01	444.59	86.14 ± 10.48
September	650	23.30 ± 4.82	43.43	402.00	75.00 ± 18.09
	1050	19.70 ± 3.92	40.25	325.00	76.00 ± 11.92
	1250	19.00 ± 5.23	24.13	427.40	78.50 ± 15.25

Table 3. Pearson's coefficient correlation (R) obtained by linear regression analysis between leaf characteristics (phenolic content as % DW and leaf size) and climate traits (mean or cumulated values) calculated during the last 4 months before leaf harvest at the 3 stations for the 3 years (n=9). Metabolite contents were evaluated on a total of 42 plants for which 5 mature leaves were harvested. T, mean temperature (°C); SI, cumulated solar irradiance (kW. m<sup>-2</sup>); RAIN, cumulated rainfall (mm); RH, mean relative humidity (%). R values followed by \*\*\* indicate *p* value < 0.001; \*\* *p* value < 0.01; \* *p* value < 0.05; ns, not significant relationships. CQAs, caffeoylquinic acids; diCQs, dicaffeoylquinic acids; FQAs, feruloylquinic acid; F-dihex, flavone-di-*C*-hexose; Q-dihex-dhex, quercetin-3-*O*-dihexose-deoxyhexose; Q-diglu, quercetin-3,4-di-*O*-glucoside; K-dihex-dhex, kaempferol-3-*O*-dihexose-deoxyhexose; K-hex-dhex, kaempferol-3-*O*-hexose-deoxyhexose; Epicat, epicatechin; Mang-OHbenz, mangiferin parahydroxybenzoate.

Leaf characteristics	Climate traits			
	T	SI	RAIN	RH
<u>Phenolic compounds</u>				
<i>Total CQAs</i>	0.026ns	-0.088ns	-0.631***	0.114ns
5-CQA	0.010ns	-0.108ns	-0.625***	0.124ns
4-CQA	0.225ns	0.217ns	-0.416***	-0.070ns
<i>Total diCQs</i>	-0.002ns	-0.356*	-0.326*	0.165ns
3,4-diCQ	0.187ns	-0.155ns	-0.449**	-0.002ns
3,5-diCQ	-0.281ns	-0.533***	-0.265ns	0.357*
4,5-diCQ	0.531***	0.201ns	-0.145ns	-0.306*
<i>Total FQAs</i>	0.329*	0.028ns	-0.045ns	-0.554***
<i>Total Glycosylated flavonoids</i>	0.543***	0.435**	0.156ns	-0.302ns
F-dihex	0.706***	0.463**	-0.020ns	-0.299ns
Q-dihex-dhex	0.367*	0.650***	-0.016ns	-0.295ns
Q_diglu	0.416**	0.605***	0.011ns	-0.442**
Rutin	0.137ns	0.077ns	0.304*	-0.064ns
K-dihex-dhex	0.583***	0.339**	0.224ns	-0.348**
K-hex-dhex	0.669***	0.497***	0.180ns	-0.525***
<i>Total Flavanols</i>	0.163ns	0.090ns	-0.582***	0.164ns
Catechin	0.078ns	0.013ns	-0.558***	0.272ns
Epicatechin	0.235ns	0.168ns	-0.481***	-0.009ns
<i>Total Xanthones</i>	0.225ns	-0.130ns	0.030ns	0.121ns
Mangiferin	0.216ns	-0.135ns	0.032ns	0.126ns
Mang-OHbenz	0.410**	0.033ns	-0.037ns	-0.046ns
<u>Leaf size</u>				
Length	-0.525***	-0.406**	0.640***	0.416**
Width	-0.571***	-0.401**	0.655***	0.394**

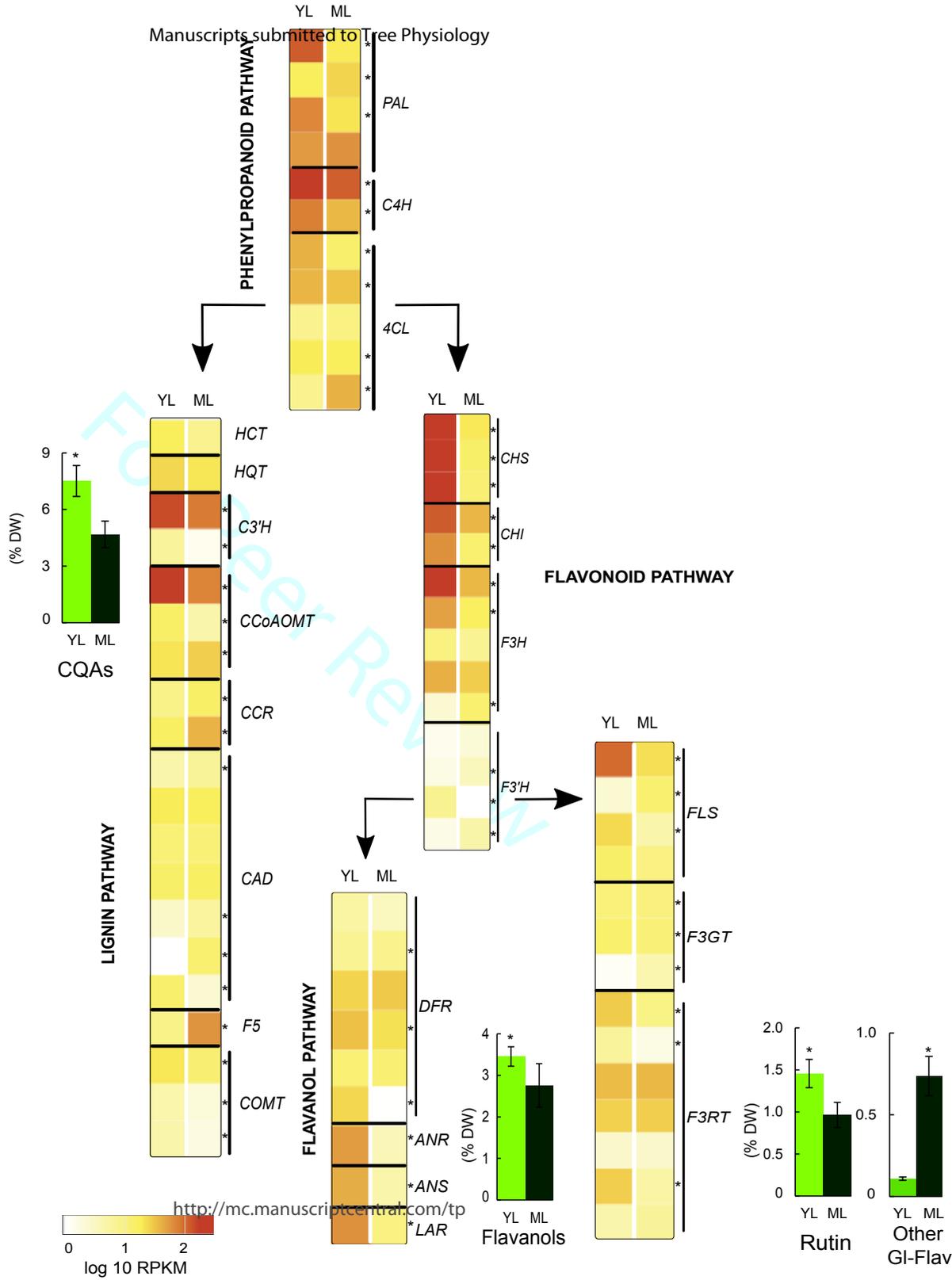
Table 4. Coefficients of a Pearson's linear correlation matrix between mature leaf size and phenolic compound accumulation in leaves of *C. arabica* var. Marsellesa measured three times during the growing season on three sites differing in elevation (n=9). Leaf size (length and width in cm) has been evaluated on a total of 42 plants (n=10 mature leaves). Values followed by \* indicated  $P < 0.001$ ; \*\* indicated  $P < 0.01$ ; \* indicated  $P < 0.05$ .

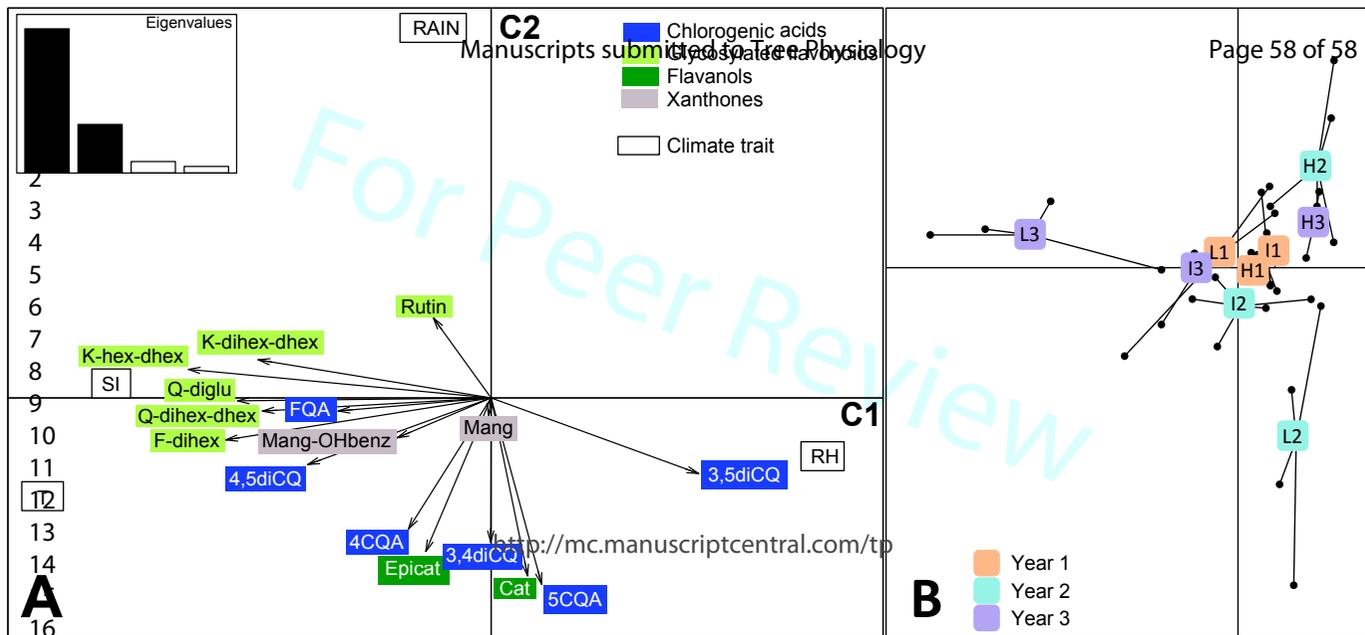
Phenolics content (% DW)	Leaf size	
	Length	Width
CQAs	-0.345*	-0.404**
diCQs	-0.108	-0.191
Glycosylated flavonoids	-0.110	-0.190
Flavanols	-0.301	-0.411**
Xanthonnes	0.094	-0.062



<http://mc.manuscriptcentral.com/tp>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51





## RESUME

La baisse de la production et la prolifération des maladies engendrées par le changement climatique dans la caféiculture, particulièrement pour *Coffea arabica*, conduit à chercher de nouvelles pratiques culturales et étudier la réponse adaptative des caféiers aux modifications environnementales. En se basant sur l'importance des composés phénoliques dans la réponse des plantes aux stress et sur la richesse des caféiers en ces composés antioxydants, la réponse adaptative des caféiers cultivés en plein champ a été étudiée en s'intéressant à l'évolution du contenu des feuilles en ces composés dans différentes conditions de culture simulées par un gradient altitudinal, des cultures sous ombrage ou l'obtention de plants greffés. Les analyses biochimiques montrent que certains composés phénoliques s'accumulent dans les feuilles en réponse à la modification d'un paramètre météorologique spécifique. Ainsi, les acides chlorogéniques et les flavanols sont plus accumulés en cas de sécheresse alors que les flavonols glycosylés s'accumulent sous forte radiation solaire. La comparaison avec *C. canephora* permet de valider ces marqueurs. Les analyses transcriptomiques indiquent une différence d'expression des gènes de biosynthèse de ces composés suivant le stade de croissance de la feuille. Elles montrent également que la réponse à la lumière passe par la surexpression de nombreux gènes codant des HSP ainsi que ceux impliqués dans la photosynthèse et la glycosylation des flavonoïdes. Enfin, ces résultats montrent l'intérêt, suivant l'altitude, de la culture sous ombrage et du greffage pour une meilleure croissance de *C. arabica*.

**Mots clés :** caféiers cultivés, adaptation, marqueurs biochimiques, marqueurs génétiques, composés phénoliques, changement climatique

## ABSTRACT

Decrease in yield and the diseases spread caused by climate change in coffee tree cultivated species, especially for *Coffea arabica*, leads to the look for new cultural practices and to study the adaptive response of coffee trees to environmental changes. Based on the importance of phenolic compounds in the response of plants to stress and the richness of coffee in these antioxidant compounds, the adaptive response of coffee tree cultivated grown in the field was studied by focus on leaves contents evolution in these compounds under different culture conditions simulated by an altitudinal gradient, shaded cultures or grafted plants. Biochemical analyzes show that some phenolic compounds accumulate in the leaves in response to the modification of a specific meteorological parameter. Thus, chlorogenic acids and flavanols are more accumulated in case of drought while glycosylated flavonols accumulate under high solar radiation. The comparison with *C. canephora* validates these markers. Transcriptomic analyzes indicate a difference in expression of the biosynthesis genes of these compounds according to leaf stage of growth. They also show that the response to light is the overexpression of many genes encoding HSPs as well as those involved in photosynthesis and flavonoids glycosylation. Finally, these results show the interest, according to altitude, of shading and grafting culture for a better growth of *C. arabica*.

**Keywords :** coffee cultivated species, adaptation, biochemicals markers, genetics markers, phenolic compounds, climate change