

FACULTE DES SCIENCES

**ETUDE DES CIRES DE LA MEMBRANE CUTICULAIRE
DES FEUILLES DE QUELQUES ESPECES ET HYBRIDES
DU CAFEIER**

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES PAR

ENRIQUE ABLANQUE RODRIGUEZ

CHIMISTE DIPLOME
DE L'UNIVERSITE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITE DE
NEUCHATEL

OCTOBRE 1987

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etude des cires de la membrane cuticulaire
des feuilles de quelques espèces et
hybrides du caféier

de Monsieur Enrique Ablanque

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

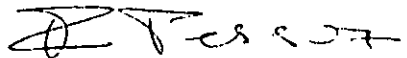
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod,
M. Quijano-Rico (Bogota) et Mme R. Jullien
(Orsay)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 17 juin 1988

Le doyen:



F. Persoz

à Beatriz, à Ursula, à Nicolás

Le présent travail a été effectué de novembre 1983 à octobre 1987 dans les laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel et dans les laboratoires de recherches chimiques du café de la "Federación Nacional de Cafeteros de Colombia" à Bogota - COLOMBIE, sous la direction du Professeur Raffaele Tabacchi, à qui j'exprime ma profonde gratitude pour l'intérêt, les précieux conseils et l'encouragement chaleureux qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Je remercie également les Professeurs André Jacot-Guillarmod, Madame Renée Jullien et le Dr. Marco A. Quijano qui ont bien voulu faire partie de mon jury.

Mes remerciements vont tout particulièrement au Dr. Saturnin Georges Jean Claude pour ses conseils et l'aide efficace qu'il m'a donnée en chromatographie en phase gazeuse ainsi que pour la correction du texte français de ce travail.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont participé à ce travail :

- mes collègues assistants, en particulier le Dr. G. Tsoupras, ainsi que Messieurs P. Allemand et C. Pulgarin,
- Monsieur R. Leon V., laborant au Laboratoire de la "Federación Nacional de Cafeteros de Colombia" à Bogota (Colombie),
- Monsieur V.R. Zamudio, Ingénieur Physicien spécialiste en informatique, pour son aide précieuse dans les traitements des données chromatographiques au moyen du programme "Manoli",

- Monsieur M. Sarmiento, lors de son travail de diplôme fait au Laboratoire de Recherches de la Federación Nacional de Cafeteros,
- Dr. German Valenzuela, subgérant général technique de la "Federación Nacional de Cafeteros de Colombia", qui, par son intérêt pour la recherche scientifique, a donné l'appui nécessaire pour réaliser le présent travail,
- Mademoiselle Brigitte Wipfli qui s'est aimablement chargée de la dactylographie de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

	Page
1. <u>INTRODUCTION</u>	1
1.1. Historique	1
1.2. Botanique	2
1.3. Système aérien	4
1.3.1. Les cires cuticulaires	6
2. <u>ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES DES CIRES CUTICULAIRES</u>	7
2.1. Composition chimique	8
2.2. Facteurs d'influences dans la quantité des cires	8
2.3. Rôle joué par les cires vis-à-vis des fongicides et des agents pathogènes	11
2.4. Cires de feuilles de caféiers	12
2.4.1. Comportement vis-à-vis de la rouille du caféier	12
2.4.2. Variation avec l'âge de la feuille	13
3. <u>JUSTIFICATION DU TRAVAIL</u>	15
4. <u>RECHERCHES ENTREPRISES</u>	16
5. <u>MATERIEL VEGETAL EMPLOYE</u>	17
6. <u>ANALYSE DES CIRES CUTICULAIRES</u>	19
6.1. Méthodes d'extraction des cires	19
6.2. Fractionnement et identification	21

7.	<u>TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE EMPLOYEES</u>	22
7.1.	Préparation des échantillons	22
7.2.	Extraction des cires	22
7.3.	Fractionnement des cires	23
7.4.	Techniques d'analyse des différentes classes de composés	26
7.5.	Traitement mathématiques des données chromatographiques	26
8.	<u>ANALYSES QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DES DIFFERENTES FAMILLES DE COMPOSES DE CIRES ET DISCUSSION DES RESULTATS</u>	30
8.1.	Extraction	30
8.1.1.	Rendement d'extraction	30
8.1.2.	Teneur en cires des différents hybrides, espèces et variétés	33
8.1.3.	Evolution dans la teneur en cires en fonction de l'âge de la feuille	35
8.1.4.	Composition des différentes familles de composés dans les hybrides, espèces et variétés	40
9.	<u>IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES DIFFERENTES FAMILLES DES COMPOSES</u>	41
9.1.	Analyse des hydrocarbures	41
9.1.1.	Extraction	41
9.1.2.	Analyse par chromatographie en phase gazeuse	42
9.1.3.	Spectrométrie de masse	45

III

9.1.4.	Comparaison et discussion des résultats	50
9.1.4.1.	Composition qualitative et quantitative des hybrides, espèces et variétés	50
9.1.4.2.	Composition qualitative et quantitative des hydrocarbures de la première, deuxième, troisième et quatrième paire de feuilles de la variété caturra	52
9.1.5.	Traitement mathématique des données chromatographiques	54
9.1.5.1.	Résultats et discussions	55
9.2.	Analyse des alcools et cétones	61
9.2.1.	Extraction	61
9.2.2.	Analyse par chromatographie en phase gazeuse	63
9.2.3.	Spectrométrie de masse	65
9.2.4.	Comparaison et discussion des résultats	74
9.2.4.1.	Composition qualitative et quantitative des hybrides, espèces et variétés	74
9.2.5.	Traitement mathématique des données chromatographiques	76
9.3.	Analyse des acides libres	79
9.3.1.	Extraction	79
9.3.2.	Identification	80

IV

9.3.3.	Chromatographie en phase gazeuse	81
9.3.4.	Spectrométrie de masse	82
9.3.5.	Comparaison et discussion des résultats	85
9.4.	Analyse des esters	86
9.4.1.	Extraction	86
9.4.2.	Identification	87
9.4.2.1.	Chromatographie sur papier	87
9.4.2.2.	GC-MS des esters	89
9.4.2.3.	Résultats et discussions	94
9.5.	Analyse des acides triterpéniques	95
9.5.1.	Extraction	95
9.5.2.	Identification	96
9.5.2.1.	RMN	96
9.5.2.2.	GC-MS	98
9.5.2.3.	Résultats et discussions	102
10.	<u>BIOSYNTHESE DES CONSTITUANTS DES CIRES</u>	
	<u>CUTICULAIRES</u>	103
10.1.	Hydrocarbures	103
10.2.	Alcools et cétones	104
10.3.	Acides	104
10.4.	Esters	105
10.5.	Acides Triterpéniques	106
11.	<u>RESUME</u>	107
12.	<u>CONCLUSION</u>	107
13.	<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	111

13.1.	Extraction des cires	111
13.1.1.	Solvants	111
13.2.	Fractionnement des cires	111
13.2.1.	Séparation des hydrocarbures et esters	111
13.2.1.1.	Solvants	111
13.2.1.2.	Méthode	111
13.2.2.	Séparation de la fraction des hydrocarbures de celle des esters	112
13.2.2.1.	Appareils	112
13.2.2.2.	Solvants	112
13.2.2.3.	Méthode	112
13.2.3.	Séparation de la fraction des alcools et cétones de celle des acides	113
13.2.3.1.	Solvants et réactifs	113
13.2.3.2.	Méthode	113
13.3.	Analyse qualitative et quantitative des différentes familles des composés des cires cuticulaires	114
13.3.1.	Appareils	114
13.3.2.	Solvants et réactifs	114
13.3.3.	Méthode	115
13.3.3.1.	Hydrocarbures	115
13.3.3.2.	Alcools et cétones	116
13.3.3.3.	Acides	116
13.3.3.4.	Esters	117

VI

13.3.3.5. Acides triterpéniques	117
14. <u>COLLECTION DE SPECTRES</u>	118
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	141

1. INTRODUCTION

1.1. HISTORIQUE

L'emploi du café comme boisson en occident remonte à environ quatre siècles [1]. Sa consommation augmenta de façon rapide [2] et s'étendit principalement à l'Europe continentale et aux Amériques. Actuellement elle prend de l'importance dans des pays asiatiques, comme le Japon, traditionnellement grands buveurs de thé.

Au cours des temps, innombrables ont été les légendes parlant de la découverte du café, une des plus antiques étant celle de l'ancien testament (Genèse-XXV, 30).

En l'année 1300, le café fut connu en Perse, et en 1500 en Turquie. Par la suite, il arriva à Venise par la Mer Méditerranée.

Rauwolf, physicien allemand, fut le premier Européen à parler du café après un voyage au Levant [3].

Certains affirment que le café est d'origine africaine et plus précisément d'Abyssinie, d'autres prétendent qu'il est apparu en même temps au Yemen [4]. Il existe la croyance que le mot café vient d'une province d'Ethiopie du nom de Kaffa.

En 1723, le Français Gabriel Mathieu apporta le café en Martinique et depuis lors sa culture s'est étendue à toute l'Amérique Centrale et du Sud.

Il semble qu'il fut introduit au Brésil en 1726. En Colombie, par contre, sa culture a commencé à être intensive seulement en 1900.

1.2. BOTANIQUE

Le café fait partie de la grande famille des rubiacées et appartient au genre *Coffea* (L.) (figure 1).

Houk en fit une liste de 190 noms spécifiques, mais plus tard, il la réduisit à 86. Il y a environ quatre-vingts ans, W.P. Hiern établit dans ses monographies une liste de quinze espèces Coffea. Huit ans plus tard, Froeher parla de vingt-neuf espèces, mais seulement quelques dix ans après, A. Engler indiqua que le genre était composé de cinquante espèces. En 1901, Wildemand fit une liste de trente-six espèces, mais en 1910, lui-même indiqua qu'il n'y en avait que vingt-sept. Coste (1955) [5] a considéré qu'il y avait 60 espèces. Actuellement, on exploite dans le monde principalement deux espèces : Coffea arabica (L.) et Coffea canephora [5].

Parmi les Coffea arabica, nous pouvons mentionner les variétés : *typica*, *bourbon*, *moka* et *caturra*; cette dernière étant la plus cultivée en Colombie. Parmi les

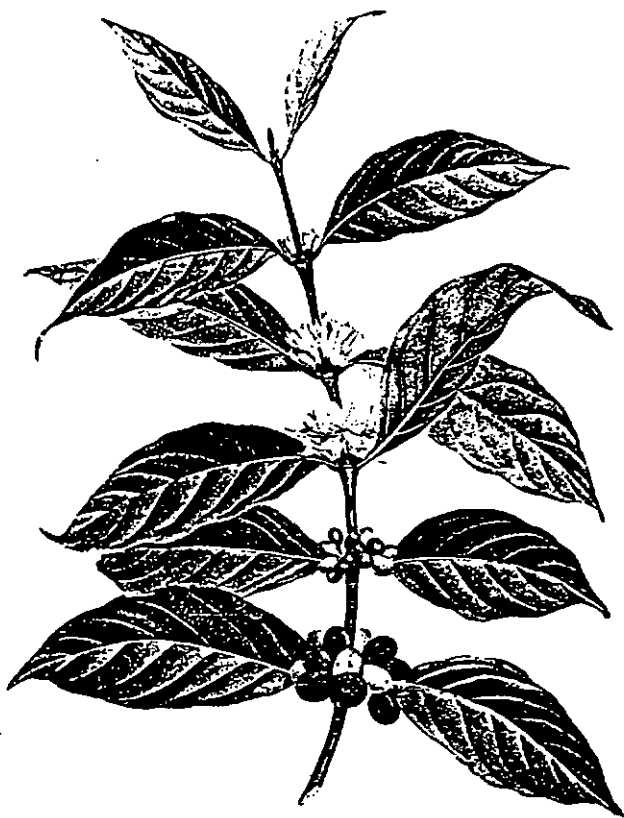


Figure 1. COFFEA ARABICA - Variété Caturra

Coffea canephora, nous trouvons la variété robusta, qui à elle seule, représente au moins le 90 % des plantations de Coffea canephora.

Il faut mentionner des hybrides tels que le Timor et Catimor A.

L'hybride de Timor, originaire de l'île du même nom, est très probablement un croisement spontané entre les espèces Coffea arabica et Coffea canephora. Il se caractérise en ne montrant aucune sensibilité envers les souches connues à ce jour de Hemileia vastatrix (rouille du caféier).

L'hybride Catimor A, appelé aussi variété Colombia, a été obtenu au Centre de Recherches Agronomique du Café, en Colombie, par croisement entre la variété Caturra et l'hybride de Timor. Cet hybride est également résistant à la rouille du caféier et possède un taux de production et une qualité de graine similaires à la variété Caturra.

1.3. SYSTEME AERIEN

La surface foliaire totale d'un caféier adulte dépend de l'espèce, de la lumière, de son état phyto-sanitaire, des conditions de milieu, etc. Selon C.M. FRANCO et R. INFORMAZATO [6], la surface foliaire moyenne du caféier est comprise entre 22 et 45 mètres carrés pour l'espèce Coffea arabica.

Chez Coffea canephora, selon BOYER [7], la vie des feuilles est de sept à dix mois. Le renouvellement des feuilles a été peu étudié.

Les feuilles se trouvent par paires opposées et sont de forme ovale ou lancéolée. Généralement, la grandeur varie entre dix et quinze centimètres de longueur et quatre à six de largeur. Les feuilles ont généralement entre neuf et douze paires de veines latérales placées entre quarante-cinq et cinquante-cinq degrés par rapport à la veine centrale (figure 2).

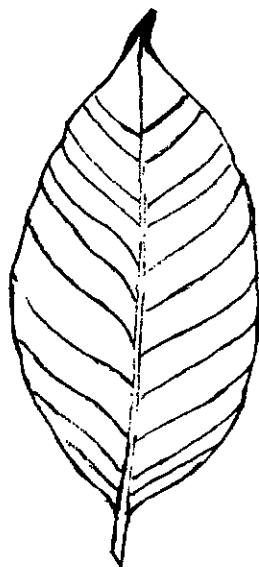


Figure 2. Feuille de Caféier

1.3.1. Les cires cuticulaires

Les faces des feuilles des plantes supérieures sont recouvertes par une couche non cellulaire de composés chimiques hétérogènes : la cuticule. Celle-ci, comme mis en évidence par la microscopie électronique, est formée de deux parties :

- Les cires cuticulaires, constituées par un mélange complexe de composés à longue chaîne (paraffines, esters, cétones, alcools et acides), directement exposé à l'atmosphère.
- La cutine, constituée d'acides gras formant une membrane polymérique où l'on trouve quelques incrustations de cires et parfois d'autres composés tels que flavones et terpènes [7], [8].

L'épaisseur et la composition chimique de la cuticule varie d'une sorte de plante à une autre, ce qui justifie l'utilisation fréquente de ces deux critères pour la classification taxonomique [7], [13], [24].

La figure 3 montre une coupe transversale schématique de la membrane cuticulaire. Cette structure est semblable sur les deux côtés de la feuille, sauf à l'envers de celle-ci où il existe encore des petits canaux de pénétration appelés stomates.

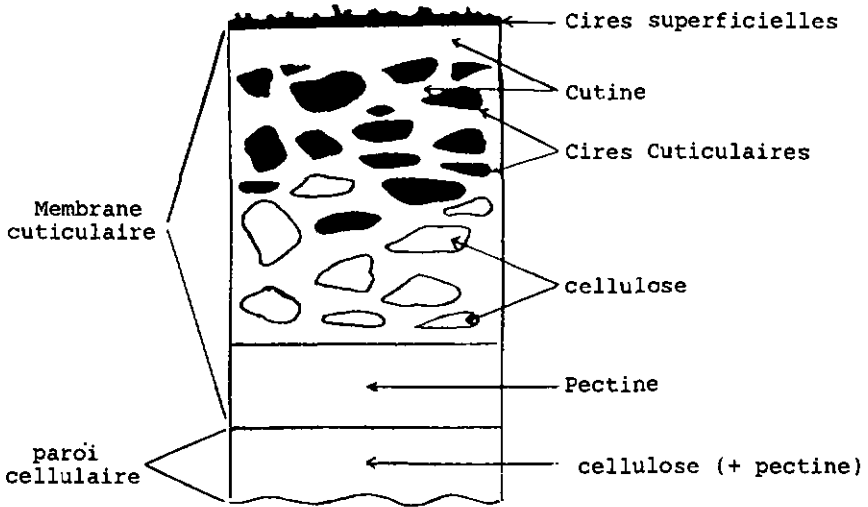


Figure 3. Coupe transversale schématique de la membrane cuticulaire.

2. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES DES CIRES CUTICULAIRES

Au cours de travaux réalisés ces dernières années, il a été démontré le rôle des cires cuticulaires dans la rétention des solutions chimiques, et l'importance de l'épaisseur de la couche de cires s'agissant de la pénétration des produits chimiques dans les plantes. Peu d'études de cette nature ont concerné le caféier.

2.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE CIRES

Il a été procédé à l'étude de la composition chimique de cires cuticulaires de quelques plantes.

Le tableau I indique quelques composés trouvés dans ces cires.

Chez les plantes supérieures, les hydrocarbures aliphatiques sont présents particulièrement dans les feuilles et les tiges. Dans la majorité des cas, la série de n-alcanes, à nombre impair d'atomes de carbone (C_{25} à C_{35}), est la plus abondante [9]. Toutefois dans des plantes comme le raisin, l'avoine et les chênes, on a trouvé des quantités assez importantes de n-alcanes à nombre pair d'atomes de carbone [10]. D'autres plantes comme le tabac et le coton, ainsi que l'ont établi GAMDU et KAWASHIMA [11], [27], renferment des alcanes méthylramifiés dans les positions iso et anti-iso.

Chez les caféiers (variété bourbon) WOLLRAB, V. a trouvé seulement des alcanes normaux entre C_{27} et C_{33} [12].

2.2. FACTEURS D'INFLUENCES DANS LA QUANTITE DE CIRES

La quantité de cires produite dans les parties aériennes de la plante est caractéristique de chaque hybride, espèce ou variété, mais est influencée par les facteurs climatiques. En général, les plantes qui poussent dans des conditions de haute température, de grande intensité

TABLEAU I
COMPOSES CHIMIQUES TROUVES DANS LES CIREs
CUTICULAIRES DES FEUILLES DE DIFFERENTES PLANTES

Composé	Formule	Nbre A.C.	Plus communs	Provenance	Références
n-alcane	$\text{C}_{11}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{15}-\text{C}_{35}$	$\text{C}_{29}-\text{C}_{31}$	Presque toutes les plantes	11,30,42,54 43
iso-alcane	$\text{C}_{11}\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{25}-\text{C}_{35}$	$\text{C}_{27}, \text{C}_{29}, \text{C}_{31}, \text{C}_{33}$	Tabac, coton, noyer	11,21,27
antiso-alcane	$\text{C}_{11}\text{C}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{24}-\text{C}_{36}$	$\text{C}_{28}, \text{C}_{30}, \text{C}_{32}$	Tabac, coton	11,21
alcane ramifiés	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{14}-\text{C}_{34}$	4-méthyl C_{17} 11-méthyl C_{18} 12-méthyl C_{30}	Tabac, coton	21,42
cyclo-alcane	$\text{C}_6\text{H}_{11}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{13}-\text{C}_{33}$		tabac	11,21
1-alcène	$\text{CH}_2 = \text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{17}-\text{C}_{33}$	$\text{C}_{26}, \text{C}_{27}, \text{C}_{28}$	Riz, algues, rose	42,43,54,56
alcène	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{15}-\text{C}_{33}$	$\text{C}_{27}, \text{C}_{29}, \text{C}_{31}$	Riz, algues, rose	42,43,54,56
hydrocarbures aromatiques				Bananiér	57
Monocétone	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{24}-\text{C}_{33}$	$\text{C}_{29}-\text{C}_{31}$	Cacahuète, chou,	58,59
β -Hydroxycétone	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COCH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$		C_{29}	Avoine, cacahuète, chou	14,59,60
β -Dicétone	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$		C_{31} Hentriacontan-16-18-dione	Avoine, cacahuète, eucalyptus	7,14,60,61
Hydroxy- β -dicétone	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_y\text{CO}(\text{CH}_2)_z\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$		C_{31} Hentriacontan-9-ol 14,15-dione	Chou, eucalyptus	24,59

TABLEAU I (suite)

Composé	Formule	Nbre a. C.	Plus communs	Provenance	Références
Alcools secondaires	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{20}\text{-C}_{30}$	C_{17} , hentria- côtan- 18-ol 9-ol nonacosan 10-ol 15-ol	Cacaohuètes, eucalyptus, chou, avoine	15, 24, 37, 28 39, 59
Esters	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{30}\text{-C}_{60}$	$\text{C}_{46}\text{-C}_{54}$, $\text{C}_{48}\text{-C}_{50}$	Presque toutes les plantes	34, 39, 37, 43, 58
Alcools primaires	$\text{Cl}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{C}_{12}\text{-C}_{36}$	$\text{C}_{26}\text{-C}_{28}$	Presque toutes les plantes	12, 37, 38, 55, 62
Aldehydes	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$	$\text{C}_{14}\text{-C}_{34}$	$\text{C}_{26}\text{-C}_{27}\text{-C}_{30}$	Pois, eucalyptus, cacaohuète	7, 15, 22, 24, 39
Ac. aliph. saturés	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	$\text{C}_{12}\text{-C}_{36}$	$\text{C}_{24}\text{-C}_{26}\text{-C}_{28}$	Presque toutes les plantes	20, 34, 39, 60
Ac. aliph. insaturés	$\text{Cl}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	$\text{C}_{16}\text{-C}_{24}$			
ω -Hydroxyacides	$\text{CH}_2(\text{OH})(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	$\text{C}_{10}\text{-C}_{34}$	$\text{C}_{24}\text{-C}_{26}\text{-C}_{28}$	Avoine, raisin	34, 60
α , ω -diols	$\text{Cl}_2(\text{OH})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{C}_{20}\text{-C}_{32}$	$\text{C}_{24}\text{-C}_{28}\text{-C}_{30}$	Carnauba	28, 60, 63
α , β -diols	$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{14}\text{-C}_{32}$		Avoine	60
Terpènes			Ac. urmolique Ac. oléanolique	Raisin, eucalyptus Pommier	24, 25, 34, 35, 64

lumineuse et d'humidité très basse, produisent une plus grande quantité de cires [13], [10], [14].

La nature du sol influence la production de cires. Ainsi, ROA et BASHA ont trouvé que les sols salins induisent l'accumulation de cires et la diminution de la transpiration dans les feuilles des plantes d'arachide [15]. De leur côté, DEMEY et collaborateurs [16] ont établi que des sols traités avec du trichloroacétate de sodium (employé comme herbicide) engendrent une réduction notable de la quantité de cires dans les feuilles de pois.

2.3. ROLE JOUE PAR LES CIRES VIS-A-VIS DES FONGICIDES ET DES AGENTS PATHOGENES

La nature chimique des composés des cires est déterminante pour le caractère hydrophobe des surfaces des feuilles [7], [13], [17].

Des recherches sur le rôle joué par ces cires dans l'efficacité et le mécanisme d'action des fongicides, ont été menées ces dernières années. Parmi les fongicides les plus étudiés, il faut signaler les cuprigues. Ce choix est dû à leur activité reconnue vis-à-vis de différents champignons.

MARTIN et SOMERS [18] ont démontré que les substances acides solubles dans l'eau qui proviennent des cires cuticulaires des feuilles de pommier, jouent un rôle

très important dans la solubilisation du cuivre contenu dans les fongicides. Ils ont établi que les fractions hydrophobes des cires ne semblent pas intervenir directement dans la solubilisation du cuivre, mais plutôt dans le processus d'adsorption de celui-ci.

Ces composés hydrophobes diminuent probablement les lavages des dépôts de fongicides par la pluie [19], [20], [14], [18].

Les cires cuticulaires ont une action fongitoxique. Ce fait a été mis en évidence lors d'études portant sur des feuilles de pommier et sur la cuticule de boutons de fleurs de cotonnier [14], [18], [21]. Toutefois, aucune des substances chimiques responsables de cette action n'a été déterminée.

2.4. CIRES DE FEUILLES DE CAFEIERS

2.4.1. Comportement vis-à-vis de la rouille du caféier

Dans le cas du café, LAMPARD et CARTER [22] ont constaté une activité fongitoxique des cires cuticulaires des graines et des feuilles de différentes variétés de l'espèce Coffea arabica.

Ces mêmes auteurs ont observé qu'en général, ce degré d'activité est plus élevé dans les variétés résistant à la rouille du caféier que dans les non résistantes. Les composés chimiques pouvant être responsables d'un tel comportement n'ont pas été déterminés [22].

Il est bien connu que la rouille du caféier attaque les parties aériennes de la plante et que l'infection se produit indépendamment de l'âge des feuilles, mais pas avec la même acuité. Toutefois, la germination des spores se produit plus vite et plus abondamment sur les feuilles jeunes entièrement développées (deuxième paire), alors qu'elle décroît appréciablement avec l'âge de la feuille.

2.4.2. Variations avec l'âge de la feuille

STOCKER et WANNER [12] ont trouvé que la teneur en alcanes dans les cires des feuilles de la variété bourbon (Coffea arabica) augmente avec l'âge du tissu et que le rapport nonacosane (C_{29})/hentriacontane (C_{31}) passe de 1/1 à 1/2 quand l'âge de la feuille double (de 66 à 118 j.).

Les variations qualitatives et quantitatives des cires avec l'âge de la feuille peuvent être classées en trois catégories :

- Les modifications caractérisées presque exclusivement par une augmentation ou une diminution de la quantité de cires par unité de surface.

Ceci est dû au fait que la vitesse de synthèse des cires est plus faible que la vitesse de croissance de la feuille [24], [21], [29].

- Les différences dans les proportions relatives des classes de constituants des cires, par formation préférentielle de quelques composés pendant la période de croissance [12], [24].

- Les modifications dans la distribution dans une série homologue d'une classe déterminée de composés. Dans ce cas, il y a généralement un déplacement vers les constituants à longues chaînes pendant la période de croissance de la feuille [24], [30], [31], [32], [33].

Notons qu'une étude portant sur la variation de la quantité d'hydrocarbures en fonction de l'âge de la feuille a été également réalisée pour la vigne [34], [35], l'eucalyptus et la betterave [24].

3. JUSTIFICATION DU TRAVAIL

Le café représente environ 50 % des exportations de la COLOMBIE. De ce fait, il constitue la source de revenu la plus importante du pays.

Depuis quelques années, les plantations de café en Colombie souffrent de l'attaque de la rouille du caféier avec comme conséquences une élévation des coûts de production et une diminution de la rentabilité.

Il est bien connu que cette maladie, due au champignon Hemileia vastatrix, attaque les parties aériennes de la plante, principalement les feuilles.

Une fois les spores déposées sur l'envers de la feuille, commence un processus de reproduction jusqu'à l'atteinte des stomates, par où elles attaquent alors les cellules, causant l'infection et la nécrose du tissu végétal. Le résultat est la perte de la feuille.

La cuticule est donc le premier point de contact entre la plante et l'agent pathogène. Selon DEVERALL J. [46], les cires cuticulaires jouent un rôle déterminant dans les interactions qui en résultent.

A côté de l'action fongitoxique signalée auparavant, les cires ont une fonction de régulation de l'humidité et de résistance aux sollicitations mécaniques [20].

Les considérations précédentes permettent de conclure que la cuticule, et en particulier les cires cuticulaires, jouent un rôle très important dans les multiples interactions plante-fongicide et plante-agent pathogène.

Ce travail sera ainsi consacré principalement à l'analyse qualitative et quantitative de cires cuticulaires des feuilles de caféiers dans le dessein de mieux comprendre par la suite le comportement de ces plantes vis-à-vis de la rouille ainsi que des fongicides.

4. RECHERCHES ENTREPRISES

Nous avons étudié des feuilles de 7 variétés de l'espèce Coffea arabica, ainsi que celles de trois autres espèces et de deux hybrides.

La composition des fractions des cires de tous les hybrides, espèces et variétés étudiées, ont été comparées afin de voir s'il existe une différence entre les cires des plantes résistant ou non à la rouille.

Un traitement mathématique des chromatogrammes a été fait pour obtenir des cartes "non linéaires" dans un espace multidimensionnel.

5. MATERIEL VEGETAL EMPLOYE

Nous avons employé des feuilles de la première, deuxième, troisième et quatrième paire des hybrides, variétés et espèces suivantes :

Hybride de Timor

Hybride Catimor A

Coffea arabica, variété Caturra

Coffea arabica, variété Mundo Novo

Coffea arabica, variété Chinchina 22

Coffea arabica, variété Moka X

Coffea arabica, variété purpuracens

Coffea arabica, variété semperflorens

Coffea arabica, variété columnaris

Coffea stenophylla

Coffea liberica

Coffea racemosa

Une partie du matériel végétal utilisé provenait de la collection de la division de phytopathologie du Centre National de Recherches sur le Café : "CENICAFE". Cet organisme se trouve à Chinchina (Colombie), ville située à 1310 mètres d'altitude et où règne une température moyenne de 20,5°C.

S'agissant de la variété Caturra, une partie des feuilles utilisées a été récoltée dans les fermes "Misiones" et "La Granja" situées à Viota et Palestina (Colombie) respectivement.

Aucune des plantations n'avait été traitée par des fongicides.

Pour les différentes plantes qui font l'objet de ce travail, le développement et la qualité de chaque paire de feuilles sélectionnées ont été soigneusement contrôlés. En particulier, toutes celles présentant des imperfections de nature physique ou autre ont été éliminées.

Pour celles des espèces dont les feuilles présentaient des différences de taille notable pour le même âge, (Coffea liberica et Coffea racemosa) (figure 4), nous avons procédé à une normalisation afin de réaliser des extractions sur la même quantité de matériel végétal.

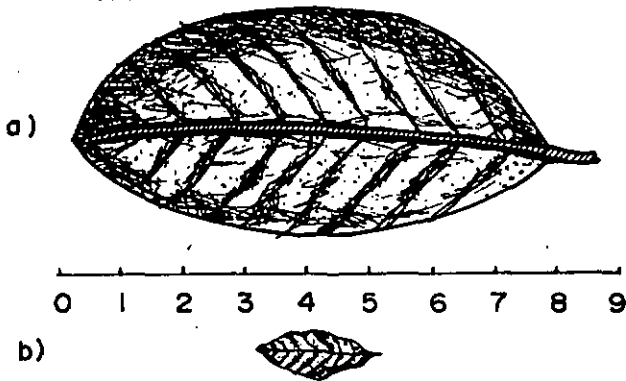


Figure 4. a) feuille de Coffea liberica
b) feuille de Coffea racemosa

6. ANALYSE DES CIRES CUTICULAIRES

6.1. METHODES D'EXTRACTION DES CIRES

L'extraction des cires cuticulaires présente deux difficultés expérimentales : la représentativité de l'échantillon et la non contamination de celui-ci par des restes de tissus internes de la feuille.

Trois méthodes ont été proposées pour l'extraction de cires :

- a) Macération des feuilles dans un solvant organique, ce qui nécessite un traitement additionnel de partition avec d'autres solvants, avec pour conséquence une très grande contamination de l'extrait par des composés intracellulaires [21], [27].
- b) Ecoulement du solvant sur les faces de la feuille maintenue verticalement [24].
- c) Immersion de la feuille dans un solvant organique pendant un temps très court [25]. Cette troisième méthode est la plus employée.

DEWEY et collaborateurs [16] ont trouvé que la presque totalité des cires dans les feuilles de pois était déjà

extraite pendant les 20 premières secondes d'immersion dans du cyclohexane ou du chloroforme. Ce dernier solvant est le plus efficace. Des temps d'extraction plus longs entraînaient la contamination des cires par des produits intra-cellulaires.

L'éther éthylique a été aussi utilisé pour l'extraction de cires, notamment par PURDY et TRUTER [23].

Nous concernant, ce solvant donnait des résultats insatisfaisants.

D'autres solvants ont également été utilisés : hexane [27], [28], mélange éther éthylique-chloroforme [24].

Un des principaux problèmes lors de l'extraction sélective des cires cuticulaires au moyen de solvants organiques, est la rapide pénétration de ceux-ci dans les tissus cellulaires, spécialement à travers les stomates, ce qui engendre une contamination de l'extrait [26].

Certains chercheurs recommandent le séchage des feuilles avant les extractions, afin de diminuer la contamination de l'extrait par des substances intracellulaires.

6.2. FRACTIONNEMENT ET IDENTIFICATION

Une fois l'extraction de cires réalisée, il est procédé à son fractionnement au moyen de solvants, tels que l'acétone [14], [18], l'hexane [13], [36] ou l'éther de pétrole [25], [34], [35], [37].

Ceci permet d'obtenir les différentes classes de composés, lesquelles peuvent être ensuite traitées par chromatographie préparative sur couche mince [19], [23], [28], [34], [38], chromatographie sur colonne [25], [27], [28], [35], [39], [40] ou chromatographie en phase gazeuse [10], [28], [31], [34], [39], [40], [45], [73].

Cette dernière technique combinée à la spectrométrie de masse est aujourd'hui le moyen le plus employé pour l'identification des constituants des cires [27], [28], [42], [43], [44], [45].

7. TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE EMPLOYEES

7.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'aire foliaire AF, a été déterminée au moyen de la formule

$$AF = [(0.65 L)(A)] + 0.48$$

L = longueur de la feuille

A = largeur de la feuille en L/2

rapportée par PARK et BURDEKIN [41]

La valeur trouvée est multipliée par deux, pour tenir compte de ce que l'extraction se fait des deux côtés de chaque feuille. L'aire foliaire pour chaque groupe de feuilles étudiées a aussi été calculée.

La quantité de cires extraites, sur la base de 1000 feuilles, a été exprimée en microgrammes par centimètre carré ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) d'aire foliaire.

7.2. EXTRACTION DES CIRES

Après mesure de l'aire de feuilles fraîches de chaque échantillon, les cires cuticulaires ont été extraites par immersion successive de chaque feuille pendant 10 secondes dans trois béciers contenant chacun 150 ml de CHCl_3 à température ambiante.

Les trois extraits ainsi obtenus ont été réunis, filtrés et laissés pendant une nuit sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration, l'extrait a été concentré et le reste de solvant éliminé sous courant d'azote sec. Le résidu ainsi obtenu a été séché à 35°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

7.3. FRACTIONNEMENT DES CIRES

Pour le fractionnement des cires, nous avons utilisé la méthode rapportée par SILVA, BECQUER et MARTIN [25]. De la sorte, on obtient les paraffines, les esters, les alcools et les cétones, les acides, les terpènes respectivement.

50 mg de chaque échantillon de cires ont été mis à reflux pendant 15 minutes dans 20 ml d'éther de pétrole (40°-60°C) anhydre. Ceci a été réalisé 4 fois. les quatre extraits (E_1) ont été réunis, filtrés et évaporés à sec. D'après le spectre IR, ce résidu (R_2) contient les paraffines et les esters, lesquels sont ensuite séparés sur une colonne (l = 25 cm; \varnothing = 1.4 cm) d'alumine neutre d'activité I (préalablement séchée au four pendant 16 heures à 400°C). La figure 5 représente le schéma d'extraction. Le résidu R_1 où se trouvent les alcools, cétones et acides a été dissous dans de l'éther éthylique et traité selon le schéma présenté dans la figure 6.

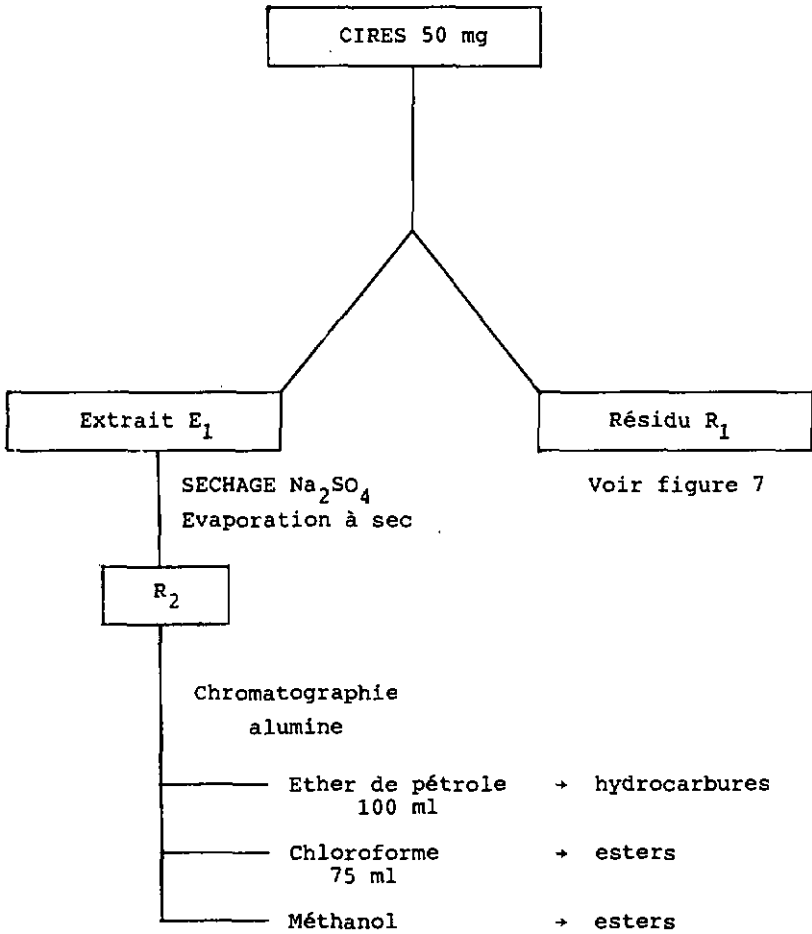


Figure 5

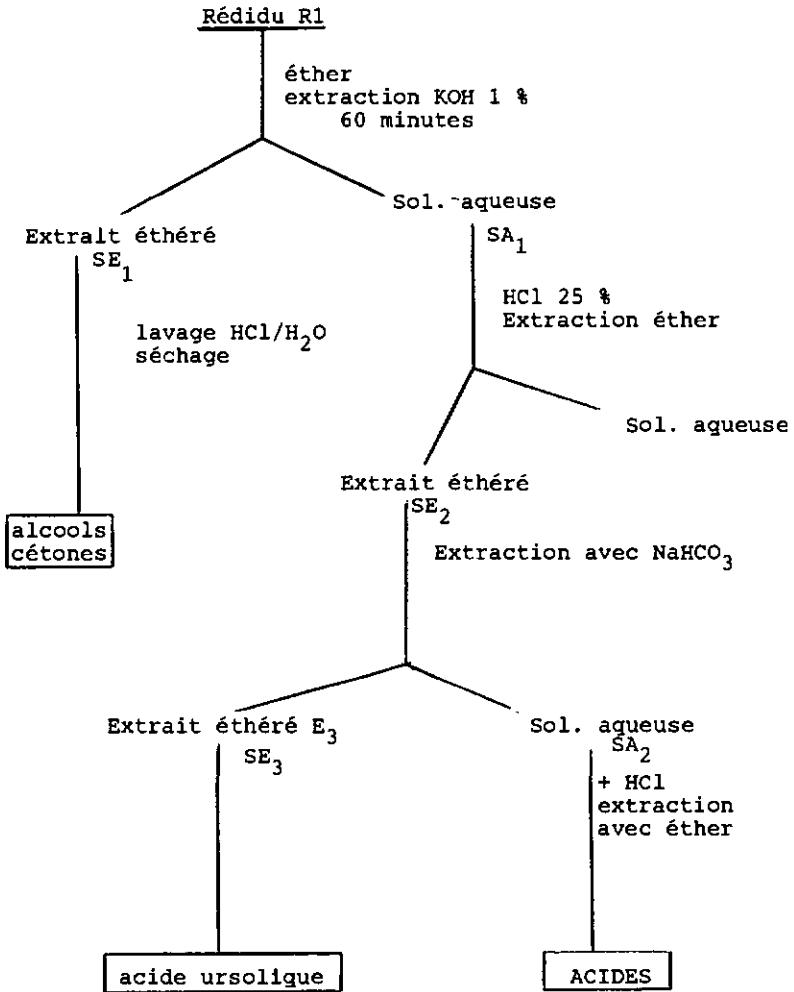


Figure 6

7.4. TECHNIQUES D'ANALYSE DES DIFFERENTES CLASSES DE COMPOSES

Différentes techniques pour l'analyse de mélanges complexes semblables aux nôtres ont été employées [27], [28], [42], [43], [44], [45]. Il s'agit de la chromatographie sur couche mince, de la chromatographie gaz-liquide et de la spectrométrie de masse.

7.5. TRAITEMENT MATHEMATIQUE DES DONNEES CHROMATOGRAPHIQUES

Les valeurs des concentrations relatives des pics obtenus au moyen de l'intégration initiale de chaque chromatogramme ont été traitées par le programme "Manoli" (écrit en Fortran IV), spécialement créé pour le traitement des chromatogrammes en phase gazeuse. Ceci permet d'interpréter de façon claire et simple les résultats en élaborant une carte "non linéaire" à deux dimensions, qui représente un espace de dimensions supérieures [69], [70], [71].

Comme point de départ, nous avons \underline{n} chromatogrammes, chacun avec \underline{m} pics. Ceci définit \underline{n} points dans un espace m -dimensionnel appelé "espace d'origine". Les n chromatogrammes se répartissent en K classes \underline{i} , contenant chacune n_i chromatogrammes du même échantillon.

Pour chaque pic est déterminé le quotient V_i/V_e (avec V_i = variance intra-classe moyenne du pic et V_e = variance inter-classe du pic) et les pics sont ordonnés par ordre décroissant, d'après la valeur de ce quotient.

Parmi les m pics déterminant l'espace d'origine, sont choisis alors les L premiers qui définissent l'espace d'origine réduit. Ceci est répété pour chaque échantillon. Au terme du processus sont choisis les pics sélectionnés communs et présentant une différence d'intensité maximum. Le nombre de pics retenus constitue la dimension de l'espace de représentation. Dans cet espace, les différences entre échantillons sont mises en évidence, car les pics les moins discriminatifs pouvant causer du "bruit" sont laissés de côté.

Dans l'espace d'origine réduit sont calculées les distances Euclidiennes entre les n points et est choisi un plan initial de représentation défini par les axes (pics) les plus sélectifs; ensuite le plan de représentation est déplacé en minimisant la déformation.

Le plan final de représentation est celui où la déformation est minimale et sur lequel on fait une pseudoprojection des distances entre les n points qui représentent les n chromatogrammes. Les n_i points de la classe i définissent ainsi la carte caractéristique de l'échantillon i . Ce programme est employé pour la comparaison des profils chromatographiques des arômes (aromatogrammes) de cafés solubles, également utilisé par ZAMUDIO G. et HAVERKAMP [78] pour l'identification rapide de souches de Hemeleia vastatrix. Le programme "Manoli" permet l'obtention de "cartes non linéaires".

L'analyse chromatographique de la fraction d'hydrocarbures obtenue à partir de la seconde paire de feuilles nous a permis d'établir une "carte"; ceci pour la variété Caturra et les hybrides de Timor et Catimor A respectivement.

Le même travail a été réalisé s'agissant de la fraction d'alcools et cétones, mais cette fois pour chaque hybride espèce et variété.

Les cartes "non linéaires" obtenues pour les différentes fractions d'hydrocarbures ont été comparées entre elles.

Cette comparaison nous a permis de différencier les plantes résistantes des non résistantes. En effet, comme on peut le constater sur la figure 14, les cartes correspondant à ces deux catégories de plantes se trouvent dans des régions distinctes.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé pour la variété Caturra des "cartes" de données chromatographiques de la fraction d'hydrocarbures obtenue pour chacune des paires de feuilles, de la première à la quatrième, de la variété Caturra.

La distribution des "cartes" nous a permis d'établir un rapport entre l'âge de la feuille et le degré d'attaque par la rouille (voir figure 15).

Pour chaque plante, trois échantillons de feuilles ont été constitués, les cires extraites des fractions des hydrocarbures d'une part, et des alcools et cétones d'autre part, réalisés..

Chacune des fractions a été chromatographiée deux fois, ce qui fait un total de six chromatogrammes par plante pour l'établissement des cartes "non linéaires".

8. ANALYSES QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DES DIFFERENTES
FAMILLES DE COMPOSES DE CIRES ET DISCUSSION DES RESULTATS

8.1. EXTRACTION

8.1.1. Rendement d'extraction

Nous avons réalisé l'extraction des cires cuticulaires à partir de feuilles fraîches et de feuilles séchées à l'étuve au moyen de deux solvants différents : l'éther éthylique et le chloroforme.

La figure 7 montre le rendement d'extraction obtenu à partir des deux solvants pour un même poids de feuilles traitées ou non à l'étuve.

Dans le tableau II sont comparés les rendements d'extraction de cires au moyen de chloroforme et d'éther éthylique respectivement pour les deux types précités de feuilles.

Ces résultats montrent que le rendement d'extraction est meilleur avec le chloroforme quel que soit l'état des feuilles. Par ailleurs, le rendement d'extraction est meilleur sur des feuilles non séchées, indépendamment du solvant employé.

Quand on utilise d'autres solvants, par exemple de l'éther de pétrole ou de l'hexane, les hydrocarbures

constituent généralement plus de 30 % du total des cires. La raison en est que, contrairement au chloroforme, ces solvants extraient de préférence les composés de moindre polarité et ne solubilisent que peu les autres constituants plus polaires : acides et alcools.

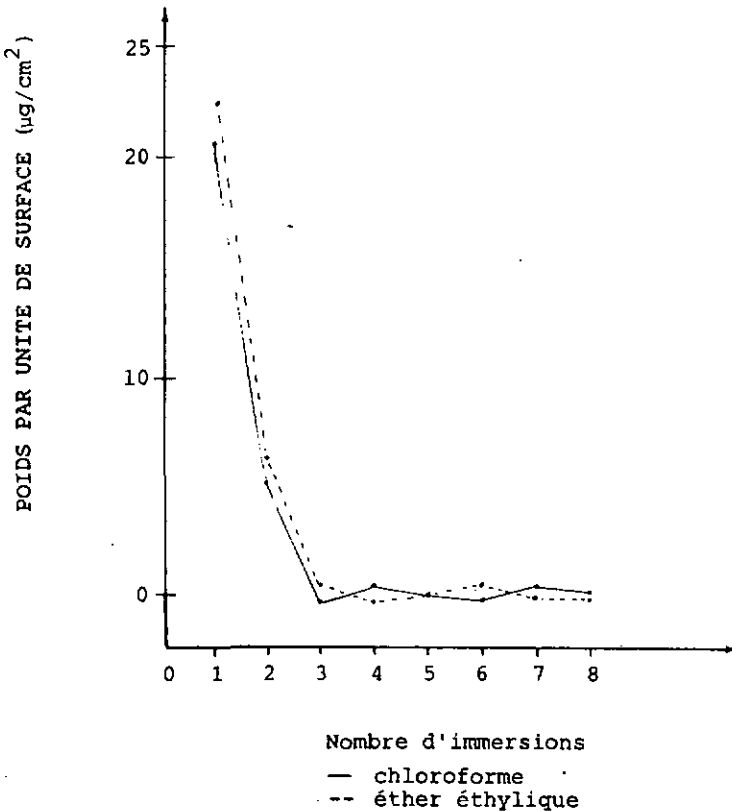


Figure 7. Poids des cires extraites par unité de surface foliaire d'après le solvant et le nombre d'immersions.

En tenant compte de ces résultats, nous avons utilisé le chloroforme comme solvant pour l'extraction de cires qui, ayant une tension de vapeur plus élevée que l'éther, permet d'assurer une meilleure reproductibilité quantitative des résultats.

TABLEAU II

QUOTIENTS DES RENDEMENTS D'EXTRACTION DES CIRES
CUTICULAIRES POUR LES DIFFERENTS ESPECES, VARIETES
ET HYBRIDES SELON LE SOLVANT ET L'ETAT DE LA FEUILLE

ECHANTILLON	FEUILLES SECHÉES CHCl ₃ /Et ₂ O	F. NON SECHÉES CHCl ₃ /Et ₂ O	CHCl ₃ fns/f _s *	Et ₂ O fn _s /f _s
v. Caturra	1.08	1.13	1.18	1.21
v. purpuracens	1.12	1.09	1.21	1.17
<u>C. stenophylla</u>	1.11	1.09	1.18	1.18
Hybride de Timor	1.06	1.15	1.20	1.21
<u>C. Liberica</u>	1.13	1.19	1.18	1.22
Hybride Catimor A	1.08	1.15	1.17	1.20
<u>C. Racemosa</u>	1.10	1.14	1.18	1.21
v. <i>semperflorens</i>	1.03	1.13	1.18	1.21
v. columnaris	1.11	1.12	1.19	1.22
v. Mundo Novo	1.03	1.13	1.17	1.15
v. Chinchina 22	1.05	1.14	1.20	1.21
V. Moka X	1.10	1.14	1.18	1.22

* fns : feuilles non séchées

fs : feuilles séchées

8.1.2. Teneur en cires des différents hybrides, espèces et variétés

Le tableau III indique la teneur en cires pour la seconde paire de feuilles de tous les hybrides, espèces et variétés étudiés. On constate des valeurs comprises entre 16,96 et 21,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ce qui est conforme aux valeurs moyennes admises par BAKER et HUND [24]. Ces auteurs considèrent comme espèces dépourvues de cires celles dont la teneur se trouve autour de 1 à 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, et comme espèces avec grande quantité de cires celles dont la teneur dépasse 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Notons que les variations de teneur en cires, entre les différents hybrides, espèces et variétés, sont faibles, exception faite des hybrides de Timor et Catimor A qui en contiennent environ 11 % de moins. A première vue, cette moindre teneur en cires des variétés résistantes contredit l'idée selon laquelle les cires cuticulaires exercent uniquement une protection physique, proportionnelle à l'épaisseur de la couche [11], [13].

Par contre, elles donnent à penser que la nature et éventuellement la proportion de constituants chimiques de la cire jouent un rôle important. Cette réflexion se trouve corroborée par les travaux de WANG S. et PINCKARD J. [21] et BELL A. [47] qui suggèrent un lien entre la nature chimique des cires et l'action protectrice ainsi qu'une relation entre cires et pathogènes. Selon ces mêmes auteurs, les microorganismes utilisent la cuticule comme source de carbone.

TABLEAU III
TENEUR TOTALE DE CIRES CUTICULAIRES
DANS LA DEUXIEME PAIRE DES FEUILLES DES
ESPECES, VARIETES ET HYBRIDES ETUDIES

ECHANTILLON	POIDS FEUILLES FRAICHES (g)	AIRE FOLIAIRE TOTALE (cm ²)	POIDS TOTAL CIRES (g)	ug cires/cm ²
v. Caturra	853.73	75793,3	1.5781	20.82
v. purpuracens	534.95	57131.2	0.9695	16.96
<u>C. Stenophylla</u>	314.46	34547.3	0.6789	19.65
Hybride de Timor	1009.07	95353.4	1.6744	17.56
<u>C. liberica</u>	3302.60	192112.0	4.0616	21.12
Hybrida Catimor A	960.76	89978.4	1.5890	18.27
<u>C. racemosa</u>	134.25	14081.4	0.2816	20.01
v. semperflorens	926.16	90198.1	1.8368	20.32
v. columnaris	816.78	80657.0	1.6042	19.89
v. Mundo Novo	1012.1	98932.7	2.0973	21.30
v. Chinchina 22	982.31	90618.0	2.8141	20.02
v. Moka X	938.21	81624.2	1.6259	19.92

* calculée par la méthode Park-Boudekin (41)

8.1.3. Evolution dans la teneur en cires en fonction de l'âge de la feuille

D'après les travaux réalisés par les chercheurs de "CENICAFE" [24], concernant le développement de l'aire foliaire de la feuille du caféier (figure 8), il ressort que la taille des feuilles augmente rapidement entre le dixième et le quarantième jour. Au delà, le taux de croissance diminue de façon radicale, et les variations de l'aire foliaire deviennent insignifiantes.

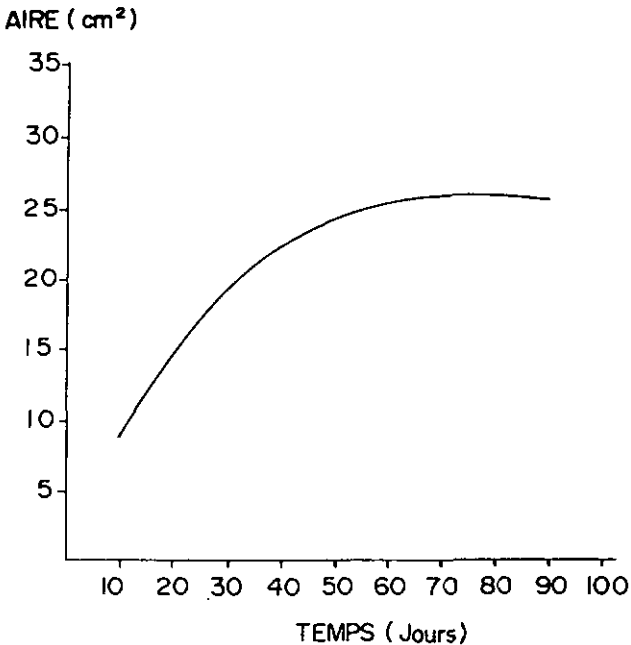


Figure 8 : Variation de l'aire foliaire pendant le développement de la feuille

Nous avons déterminé pour tous les échantillons la quantité de cires par unité de surface en fonction de l'âge de la feuille (tableau IV) et obtenu les courbes de la figure 9.

TABLEAU IV
TENEUR EN CIRES CUTICULAIRES DANS LA PREMIERE
ET LA QUATRIEME PAIRE DE FEUILLES DES ESPECES,
VARIETES ET HYBRIDES ETUDIES ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

ECHANTILLON	1ère paire	2ème paire	3ème paire	4ème paire
Caturra	15.25	20.82	18.82	18.25
<u>C. purpurascens</u>	13.27	16.96	15.04	14.89
<u>C. stenophylla</u>	14.06	18.63	16.65	16.01
H. de Timor	13.95	17.56	15.59	14.98
<u>C. liberica</u>	14.99	21.12	20.46	16.12
Catimor A	13.33	18.27	18.08	15.32
<u>C. racemosa</u>	14.00	20.01	18.20	17.12
<u>C. semperflorens</u>	15.65	20.32	20.42	13.19
<u>C. columnaris</u>	14.98	19.89	18.31	18.35
Mundo Novo	18.32	21.20	18.25	15.76
Chinchina 22	16.15	20.85	20.02	12.42
Moca X	14.87	19.92	19.01	17.73

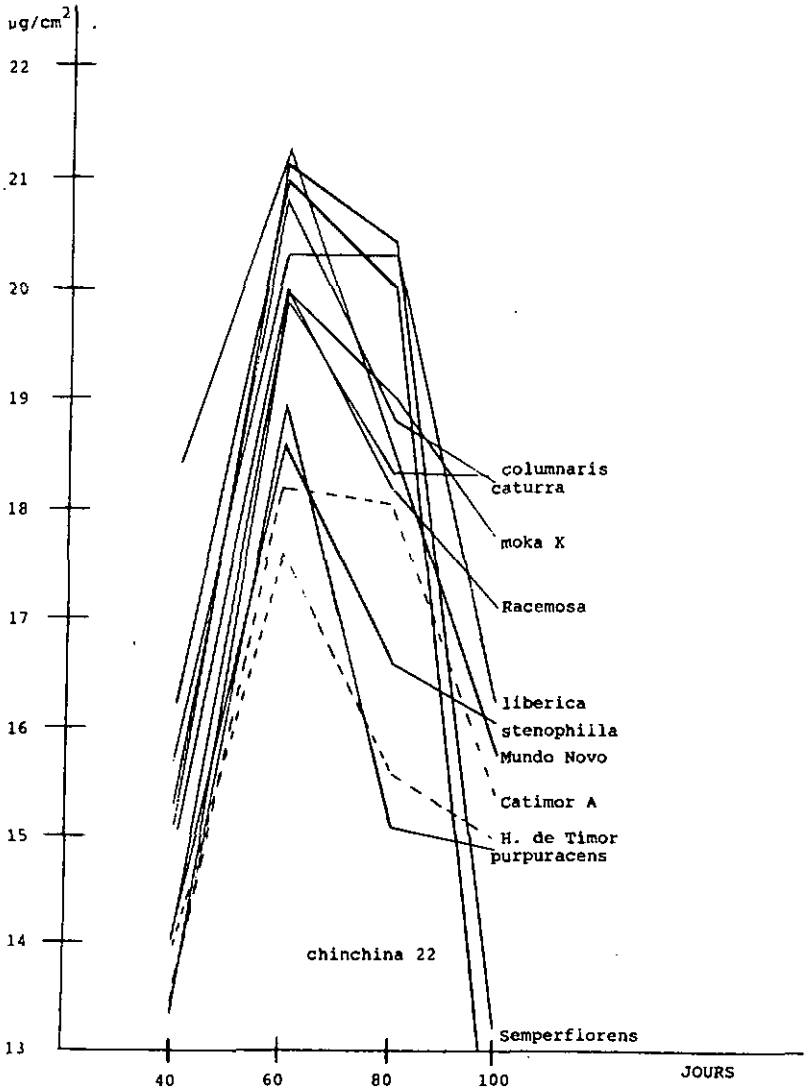


Figure 9 : Variation de la teneur en cires d'après l'âge la feuille pour les différents hybrides, espèces et variétés

---- résistant à la rouille du caféier
— non résistants

La comparaison des figures 8 et 9 montre que la variation de la quantité de cires par cm^2 suit celle de l'augmentation d'aire foliaire, avec un maximum au bout de 60 jours environ.

Par ailleurs, on constate une moindre production de cires par les plantes résistant à l'attaque de la rouille (cf figure 9), ce qui confirme les remarques faites précédemment concernant la relation entre quantité de cires et résistance.

Enfin, la décroissance de la quantité de cire à partir de 70 jours (figure 9) peut être attribuée à un ralentissement du taux de production ainsi qu'à des effets mécaniques (pluie, air, présence d'insectes, etc.).

Quand on utilise d'autres solvants, par exemple de l'éther de pétrole ou de l'hexane, les hydrocarbures constituent généralement plus de 30 % du total des cires. La raison en est que, contrairement au chloroforme, ces solvants extraient de préférence les composés de moindre polarité et ne solubilisent que peu les autres constituants plus polaires : acides et alcools.

Les résultats consignés dans le tableau V révèlent entre les plantes résistantes ou non, pour une même famille de composés, des différences en teneur (%).

TABLEAU V

TENEUR EN HYDROCARBURES, ESTERS, ALCOOLS et CETONES,
 ACIDES LIBRES ET ACIDES TRITERPENIQUES DANS LES CIRES
 CUTICULAIRES DE LA SECONDE PAIRE DE FEUILLES (%)

ECHANTILLON	HYDROCARBURES	ESTERS	ALCOOLS- CETONES	ACIDES L.	A. TRITERPENIQUE
V. Caturra	16.28	33.01	14.64	4.63	31.38
V. Purpuracens	16.01	30.21	14.65	5.29	33.54
<u>C. stenophylla</u>	15.45	31.01	17.01	7.55	28.92
Hib. de Timor	13.57	25.45	7.61	12.91	40.48
<u>C. liberica</u>	15.89	29.82	16.82	4.65	32.80
Catinor A	14.44	22.44	8.54	14.35	40.11
<u>C. lacemosa</u>	16.74	32.24	11.23	6.70	33.10
V. Semperflorens	15.98	30.47	13.82	5.32	34.41
V. Columnaris	16.53	31.85	14.16	6.12	31.34
V. Mundo Novo	15.67	32.28	14.52	4.84	32.69
V. Chinchina 22	16.37	31.32	15.30	5.87	31.09
V. moka X	17.31	29.22	14.24	8.12	31.11

8.1.4. Composition des différentes familles de composés dans les hybrides, espèces et variétés

La teneur en hydrocarbures, esters, alcools et cétones diminue de 13, 23 et 44 % respectivement en passant des plantes résistantes aux non résistantes. S'agissant des acides libres et des acides triterpéniques, nous observons au contraire une teneur supérieure de 56 et 20 % respectivement dans les plantes résistantes.

Ces chiffres font penser qu'il existe certainement une relation entre la composition chimique des cires et la résistance ou non résistance de la plante. Ce comportement peut être dû à une inhibition de la germination des spores de la rouille par manque de certains composés, par l'excès d'autres, ou par la combinaison de ces deux facteurs.

9. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES DIFFERENTES FAMILLES DES COMPOSES

Comme indiqué auparavant, l'examen des cires a été réalisé surtout par chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse, exception faite des acides pour lesquels nous avons également utilisé la chromatographie sur plaque.

9.1. ANALYSE DES HYDROCARBURES

9.1.1. Extraction

La figure 6 représente le schéma d'extraction de ces substances. Un contrôle de leur nature a été fait par IR (figure 10). Nous observons dans ce spectre des bandes de déformations et de valences caractéristiques de cette famille de composés (2800-3000 cm^{-1} : vibrations de valence C-H du groupe méthyle; 800-1200 vibrations de valence C-C du groupe méthyle; 1340-1460 vibrations de déformation H-C-H).

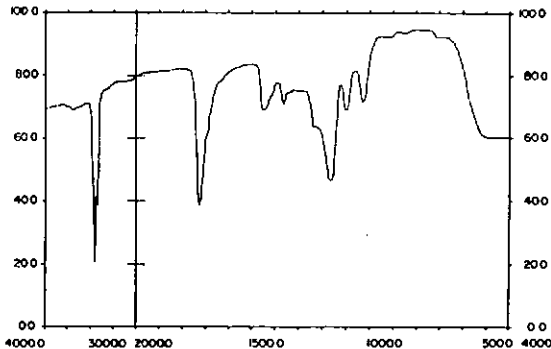


Figure 10 : Spectre IR des hydrocarbures

9.1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La figure 11 représente des chromatogrammes de fractions d'hydrocarbures dans les plantes mentionnées. Notons que tous les chromatogrammes des hybrides, espèces et variétés, présentent un même profil.

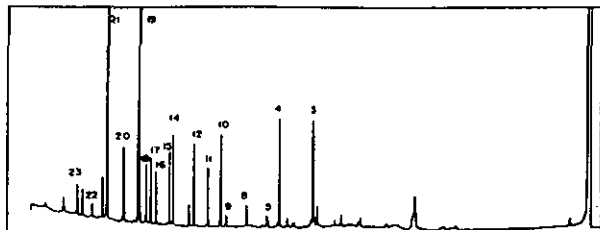
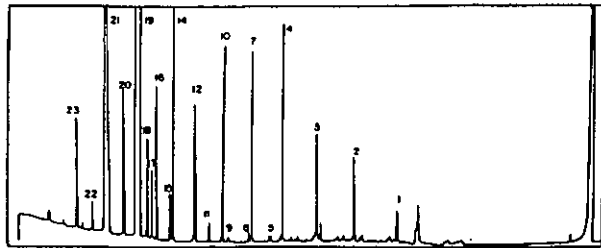


Figure 11 : Chromatogrammes des hydrocarbures

Par ailleurs, à l'exemple de JENNINGS W. [48], HALLANG W. [49], nous basant sur la relation linéaire existant entre le temps de rétention et le nombre d'atomes de carbones dans une série homologue, nous avons par interpolation graphique confirmé l'identité de composés trouvés (fig. 12).

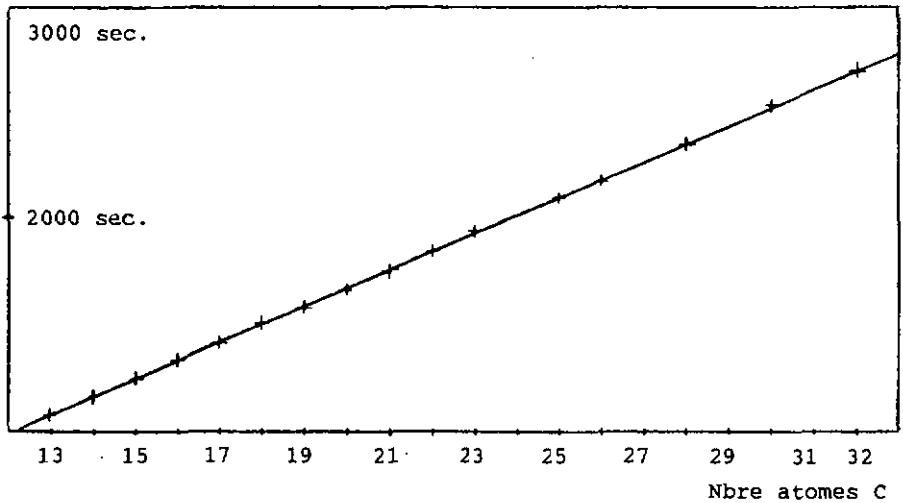


Figure 12 : temps de rétention des hydrocarbures normaux par rapport au nombre d'atomes de carbone

Dans le tableau VI sont indiqués les temps de rétention de composés identifiés dans un premier temps par comparaison avec ceux de témoins purs. Les différences observées entre temps tiennent à des équations personnelles; toutefois, l'identité de nature entre composés et témoins est confirmée par dopage.

TABLEAU VI
TEMPS DE RETENTION DES HYDROCARBURES ISOLEES ET
DES HYDROCARBURES TEMOINS

TEMPS DE RET.* DES HYD. ISOL.	TEMPS DE RET.* TEMOINS	HYDROCARBURES IOENTIFIES
1080	1078	n-tridécane
1158	1160	n-tetradécane
1252	1250	n-pentadécane
1342	1345	n-hexadécane
1415	1420	n-heptadécane
1522	1521	n-octadécane
1591	1590	n-nonadécane
1674	1672	n-eicosane
1782	1778	n-heneicosane
1867	1863	n-docosane
1972	1968	n-tricosane
2103	2100	n-pentacosane
2178	2181	n-hexacosane
2281		n-heptacosane
2385	2378	n-octacosane
2468		n-nonacosane
2531	2539	n-tricontane
2629		n-hentriacontane
2687	2693	n-dotriacontane

* temps de rétention en secondes

9.1.3. Spectrométrie de masse

Nous avons procédé à l'analyse par GC-MS des fractions d'hydrocarbures et des témoins dans le double but de confirmer les résultats établis par chromatographie gazeuse et de procéder à l'étude de la fragmentation de différents composés. A titre d'exemple, le spectre de la figure 13 représente le n-triacontane. L'intégralité des spectres de masse se trouve à la fin du manuscrit.

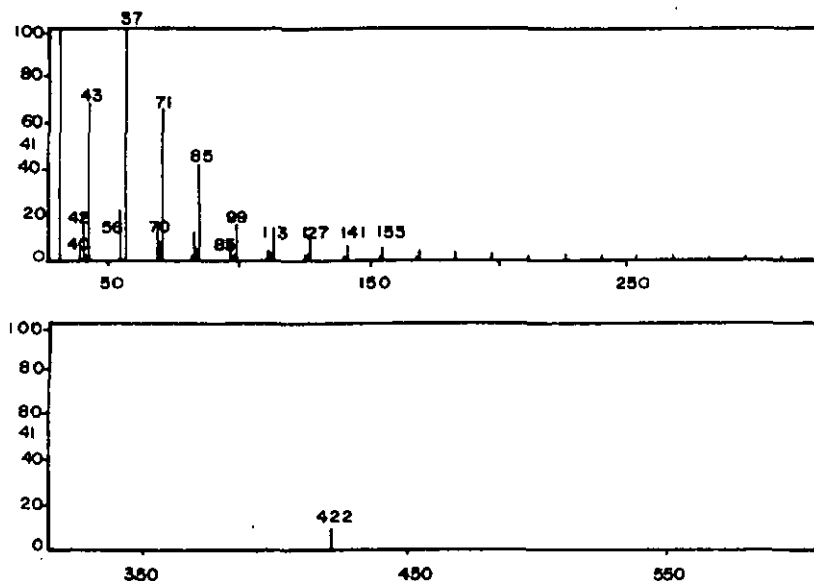


Figure 13 : Spectre de masse du n-triacontane trouvé dans la fraction d'hydrocarbures

Les spectres obtenus présentent le profil bien connu des hydrocarbures. De même, les séquences caractéristiques, à savoir pic de base m/z 57 et série de signaux espacés de 14 unités de masse s'y trouvent. L'intensité de l'ion moléculaire est invariablement faible.

Les spectres de masse (tableau VII) des composés séparés par GC comparés à ceux des témoins, indiquent qu'il s'agit d'hydrocarbures linéaires non ramifiés.

HYDROCARBURES	NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE	MASSE
n-tridécane	13	184
n-tetradécane	14	198
n-pentadécane	15	212
n-hexadécane	16	226
n-heptadécane	17	240
n-octadécane	18	254
n-nonadécane	19	268
n-eicosane	20	282
n-heneicosane	21	296
n-docosane	22	310
n-tricosane	23	324
n-pentacosane	25	352
n-hexacosane	26	366
n-heptacosane	27	380
n-octacosane	28	394
n-nonacosane	29	408
n-triacontane	30	422
n-hentriacontane	31	436
n-dotriacontane	32	450

TABLEAU VII

PRINCIPAUX SIGNAUX DES SPECTRES DE MASSE CORRESPONDANT AUX
HYDROCARBURES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Spectre	Pic No.	m/z
1	1	57(100), 71(50), 85(32), 99(8), 113(3), 127(1), 141(1), 151(1); M^+ = 184(1).
2	2	57(100)*, 71(53), 85(35), 99(6), 113(2), 127(1), 141(1), 155(1), 169(1); M^+ = 198(1).
3	3	57(100), 71(55), 85(32), 99(7), 113(3), 127(2), 141(2), 155(1), 169(1); M^+ = 212(2).
4	4	57(100), 71(57), 85(35), 99(9), 113(5), 127(3), 141(2), 155(2), 169(1), 183(1), 197(1); M^+ = 226(3).
5	5	57(100), 71(54), 85(31), 99(8), 113(5), 127(3), 141(2), 155(1), 169(1), 183(1), 197(1), 211(1); M^+ = 240(1).
6	6	57(100), 71(60), 85(38), 99(11), 113(6), 127(4), 141(3), 155(2), 169(2), 183(1), 197(1), 211(1), 225(1); M^+ = 254(3).
7	7	57(100), 71(56), 85(35), 99(10), 113(6), 127(4), 141(3), 155(2), 169(1), 183(1), 197(1), 211(1); M^+ = 268(1).
8	8	57(100), 71(58), 85(37), 99(12), 113(8), 127(5), 141(4), 155(2), 169(2), 183(2), 197(1), 211(1), 225(1), 239(1); M^+ = 282(1).

TABLEAU VII (suite)

9	57(100), 71(62), 85(40), 99(13), 113(9), 127(5), 141(4), 155(3), 169(3), 183(2), 197(2), 211(2), 225(1), 239(1); $M^+ = 296(2)$.
10	57(100), 71(64), 85(42), 99(13), 113(8), 127(6), 141(4), 155(3), 169(2), 183(2), 197(1), 211(1), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1); $M^+ = 310(1)$.
11	57(100), 71(62), 85(40), 99(14), 113(8), 127(6), 141(4), 155(3), 169(3), 183(2), 197(2), 211(1), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1), 281(1); $M^+ = 324(1)$.
12	57(100), 71(62), 85(39), 99(14), 113(9), 127(6), 141(5), 155(3), 169(3), 183(2), 197(2), 211(1), 225(1), 239(1), 153(1), 267(1), 295(1), 309(1), $M^+ = 352(1)$.
13	57(100), 71(62), 85(37), 99(13), 113(11), 127(5), 141(4), 155(3), 169(2), 183(2), 197(1), 211(1), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1), 281(1), 295(1), 309(1); $M^+ = 366(1)$.
14	57(100), 71(65), 85(45), 99(15), 113(9), 127(7), 141(5), 155(4), 169(3), 183(2), 197(1), 211(1), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1), 281(1), 295(1), 309(1), 323(1); $M^+ = 380(1)$.
15	57(100), 71(63), 85(48), 99(15), 113(9), 127(6), 141(5), 155(4), 169(2), 183(2), 197(2), 211(1), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1), 281(1), 323(1); $M^+ = 394(1)$.

TABLEAU VII (suite)

16	57(100), 71(64), 85(43), 99(15), 113(10), 127(7), 141(5), 155(4), 169(3), 183(2), 197(2), 211(2), 225(1), 239(1), 253(1), 267(1), 281(1), 295(1), 323(1), 337(1), 351(1), 365(1); $M^+ = 408(1)$.
17	57(100), 71(57), 83(38), 99(23), 113(12), 127(8), 141(6), 155(5), 169(4), 183(3), 197(3), 211(3), 225(2), 239(2), 253(1), 281(1), 295(1), 309(1), 323(1), 337(1), 365(1), 379(1), 393(1); $M^+ = 422(1)$.
18	57(100), 71(62), 85(42), 99(15), 113(10), 127(6), 141(5), 155(4), 169(3), 183(2), 197(2), 211(2), 225(1), 239(1), 253(1), 281(1), 295(1), 309(1), 323(1), 337(1), 365(1), 379(1), 393(1), 407(1), 421(1); $M^+ = 436(1)$.
19	57(100), 71(64), 85(40), 99(15), 113(10), 127(8), 141(5), 155(4), 169(2), 183(3), 192(2), 211(2), 239(1), 253(1), 281(1), 295(1), 309(1), 323(1), 337(1), 365(1), 379(1), 393(1), 407(1), 421(1); $M^+ = 450(1)$.

* Les valeurs entre parenthèses signifient les intensités relatives.

9.1.4. Comparaison et discussion des résultats des hydrocarbures

9.1.4.1. Composition qualitative et quantitative des hybrides, espèces et variétés

L'examen du tableau VIII révèle que dans les plantes résistantes certains des hydrocarbures identifiés figurent à l'état de traces (n-nonadécane par exemple), tandis que d'autres ne sont pas détectés (n-tétradécane, n-heptadécane).

Deux composés, à savoir le n-nonacosane et le n-hentriacontane, tout en étant majoritaires dans toutes les plantes, figurent comparativement en plus forte teneur dans les résistantes. Par ailleurs, abstraction faite du n-dotriacontane, les produits identifiés existent en quantité moindre (souvent de façon significative) dans Timor et Catimor A. Il peut être remarqué que le n-dotriacontane est beaucoup plus abondant dans le Catimor A que dans toutes les autres plantes, sans qu'il soit possible de lui reconnaître une influence particulière dans la résistance affichée par cet hybride.

Les plantes résistantes ont une teneur globale en hydrocarbures plus basse que les autres. Compte tenu de ce fait et sachant que l'attaque maximale de la rouille se situe au niveau de la seconde paire de feuilles, il nous semble possible d'admettre, en accord avec PINCKARD J. [21] et BELL A. [47], que les cires cuticulaires sont une source de carbone pour les microorganismes.

TABLEAU VIII

COMPOSITION EN POURCENTS DES FRACTIONS
D'HYDROCARBURES DES HYBRIDES, ESPECES ET VARIETES

COMPOSES	H.de Timor	Catimor A	Caturea	Purpuras.	Stenoph.	Libertica	Racemosa	Semperflorens	Columnaris	Mundo Novo	Chinchina 22	Moka K
n-tridécane	0.24	----	0.18	0.20	0.15	0.23	0.19	----	0.28	0.19	0.22	0.18
n-tétradécane	----	----	0.56	0.61	0.88	0.60	0.48	0.89	0.88	0.55	0.69	0.60
n-pentadécane	0.22	0.08	0.89	0.81	0.91	1.02	1.00	1.12	0.98	0.96	1.10	0.95
n-hexadécane	----	0.05	4.31	4.21	4.42	4.26	4.42	4.50	4.45	4.48	4.46	4.35
n-heptadécane	0.04	----	0.10	0.18	0.12	0.10	0.09	0.18	0.16	0.14	0.12	0.13
n-octadécane	1.80	----	2.43	2.51	2.48	2.43	2.45	2.32	2.48	2.40	2.42	2.48
n-nonadécane	0.06	0.08	0.16	0.21	0.22	0.18	0.22	0.25	0.28	0.25	0.21	0.25
n-eicosane	0.04	0.04	0.22	0.18	0.31	0.75	0.15	0.20	0.19	0.29	0.31	0.28
n-hénelicosane	0.09	0.10	2.64	2.88	2.85	2.60	2.70	2.91	2.60	2.69	2.60	2.63
n-docosane	0.15	0.04	0.35	0.42	0.40	0.55	0.25	0.32	0.40	0.40	0.54	0.35
n-tricosane	0.19	0.18	1.28	1.32	1.38	1.26	1.20	1.25	1.32	1.35	1.33	1.30
n-pentacosane	0.26	0.11	0.89	0.93	0.90	0.96	1.00	0.85	0.92	0.81	0.87	0.98
n-hexacosane	1.16	0.84	1.90	2.12	2.12	2.15	2.18	2.00	2.16	2.10	2.00	1.96
n-heptacosane	1.03	0.36	1.10	1.00	1.12	1.10	1.10	0.89	0.98	1.10	0.97	1.12
n-octacosane	1.91	0.57	1.87	1.81	1.98	1.85	1.92	2.00	1.95	1.93	1.90	1.88
n-nénaocosane	51.17	57.86	47.85	47.50	46.90	46.20	47.80	46.80	47.20	47.10	46.80	47.20
n-triacontane	4.80	4.58	5.22	5.31	5.38	5.30	5.25	5.42	5.40	5.67	5.60	5.55
n-bentriacontane	33.34	31.80	25.60	26.12	25.10	26.50	25.82	26.54	25.93	26.12	26.90	25.95
n-dotriacontane	0.45	3.13	0.65	0.70	0.78	0.62	0.89	0.53	0.70	0.50	0.70	0.65

9.1.4.2. Composition qualitative et quantitative des hydrocarbures de la première, deuxième, troisième et quatrième paire de feuilles de la variété caturra

Nous avons procédé à une analyse qualitative et quantitative de la teneur en hydrocarbures de la première, deuxième, troisième et quatrième paire de feuilles de la variété Caturra.

Les résultats consignés dans le tableau IX enseignent que la composition varie à la fois en qualité et en quantité d'une paire de feuilles à l'autre.

La teneur en certains composés augmente considérablement dans la deuxième paire par rapport à la première. A titre d'exemple, citons l'hexadécane dont la quantité augmente 40 fois plus et que l'on ne retrouve plus dans la troisième paire. Il en va de même pour le n-octadécane, n-heneicosane et n-tricosane, mais dans des proportions moindres.

Comme on peut aussi le remarquer dans le tableau IX, un grand nombre d'hydrocarbures sont totalement absents dans la troisième et la quatrième paire de feuilles. Il ressort également que la deuxième paire de feuilles est la plus riche en hydrocarbures.

La remarque faite à la fin du paragraphe 10.2. à propos de la relation entre hydrocarbures et pathogènes semble confirmée.

TABLEAU IX

COMPOSITION DU MELANGE D'HYDROCARBURES DE LA PREMIERE A LA
QUATRIEME PAIRE DES FEUILLES DE LA VARIETE CATURRA

HYDROCARBURES	1ère paire CONCENTRATION %	2ème paire CONCENTRATION %	3ème paire CONCENTRATION %	4ème paire CONCENTRATION %
n-tridécane	----	0.18	----	----
n-tétradécane	0.15	0.56	0.16	----
n-pentadécane	0.26	0.89	----	----
n-hexadécane	0.13	4.31	----	----
n-heptadécane	0.07	0.10	----	----
n-octadécane	0.20	2.43	0.18	----
n-nonadécane	0.28	0.16	----	----
n-eicosane	0.21	0.22	----	----
n-heneicosane	0.31	2.64	----	----
n-docosane	----	0.39	----	----
n-tricosane	0.19	1.28	----	----
n-pentacosane	0.46	0.89	0.31	0.24
n-hexacosane	0.68	2.00	0.48	0.24
n-heptacosane	2.49	1.10	1.03	0.90
n-octacosane	0.69	1.87	1.41	1.15
n-nonacosane	57.07	47.85	57.71	59.21
n-triacontane	4.97	5.22	4.81	4.86
n-hentriacontane	29.68	25.60	30.98	29.88
n-dotriacontane	0.85	0.65	1.58	1.49

Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, le comportement de ces hybrides vis-à-vis des souches pathogènes.

9.1.5. Traitement mathématique des données chromatographiques

La figure 14 représente les cartes "non linéaires" obtenues par application du programme "MANOLI" exposé dans le paragraphe 7.5.

Elles résultent du traitement des fractions d'hydrocarbures provenant de la deuxième paire de feuilles de la variété Caturra et des hybrides de Timor et Catimor A. Les concentrations relatives des pics correspondant aux différents hydrocarbures détectés, constituent les données d'entrée. Le rapport V_i/V_e est calculé pour chaque pic. Ce rapport est utilisé comme critère de discrimination. Une valeur très petite de celui-ci indique que le pic correspondant est hautement reproductible à l'intérieur d'une variété et est retenu par le programme. Dans le cas des hydrocarbures, des cires de la variété caturra et des hybrides de Timor et Catimor A, le programme a sélectionné les pics correspondant aux composés suivants : n-heneicosane, n-pentacosane, n-tricosane, n-hexacosane, n-nonacosane et n-nonadécane.

Par conséquent, chaque composé choisi par "MANOLI" est représenté par un point dans un espace hexadimensionnel. La projection sur un plan sélectionné par le programme de l'ensemble des points constitue une carte "non linéaire".

9.1.5.1. Résultats et discussions

Nous observons sur la figure 14 que les cartes correspondant aux plantes résistant à la rouille se trouvent dans une région bien distincte de celle où se trouve la carte correspondant à la variété sensible.

Ainsi, entre les cires cuticulaires des deux groupes de plantes, il est aisément mis en évidence les différences en teneur des hydrocarbures sélectionnés.

Nous avons construit les cartes "non linéaires" correspondant aux hydrocarbures de la première, deuxième, troisième et quatrième paire des feuilles de Caturra, seule variété cultivée en Colombie (fig. 15). Les pics sélectionnés dans ce cas par le programme sont les suivants : n-pentacosane, n-hexacosane, n-octacosane, n-nonacosane, n-triacontane et n-hentriacontane.

Nous remarquons que la carte correspondant aux hydrocarbures de la deuxième paire se trouve appréciablement séparée des cartes se rapportant aux trois autres paires.

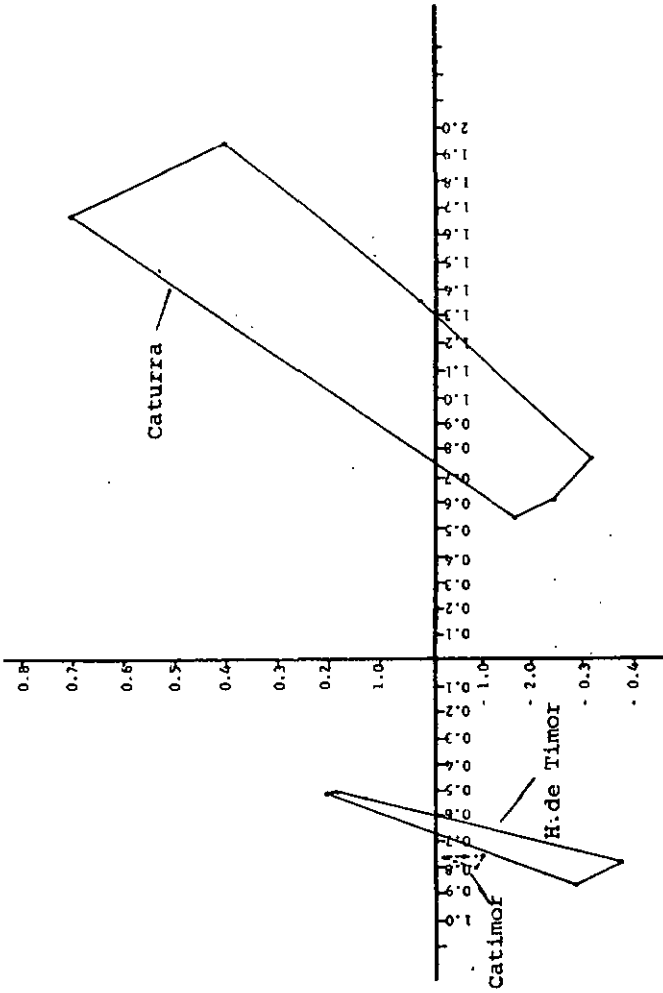


Figure 14 : cartes correspondant aux chromatogrammes des hydrocarbures de cires de la deuxième paire de feuilles des hybrides de Timor, Catimor A et de la variété Caturra

Si on tient compte du fait que la deuxième paire est la plus attaquée par la rouille et si l'on compare les figures 14 et 15, on constate que la carte caturra se situe dans la même région que celle de la deuxième paire et que les cartes de Catimor A et de Timor occupent la même région que celles des première, troisième et quatrième paire. Or, ces paires sont reconnues peu sensibles à la rouille.

Ainsi donc, il existerait un rapport direct entre la situation de la carte et le caractère résistant. On peut dès lors, en se basant sur la région de l'espace où se situent les cartes, envisager l'utilisation de celles-ci comme critères taxonomiques.

On peut également envisager de les employer pour prévoir le comportement de nouveaux hybrides ou variétés vis-à-vis de Hemileia vastatrix. Ceci éviterait le recours à de longs tests biologiques comme cela a été le cas pour la variété COLOMBIA (Catimor A).

Une remarque s'impose concernant le pic 14 figurant dans les chromatogrammes présentés dans la figure 11 : en effet, il ne s'agit pas d'un hydrocarbure, mais de l'adipate de dioctyle dont la masse moléculaire est de 370.

Cela a pu être établi par l'examen attentif du spectre de masse ci-dessous (figure 16) et en référence à la littérature [79].

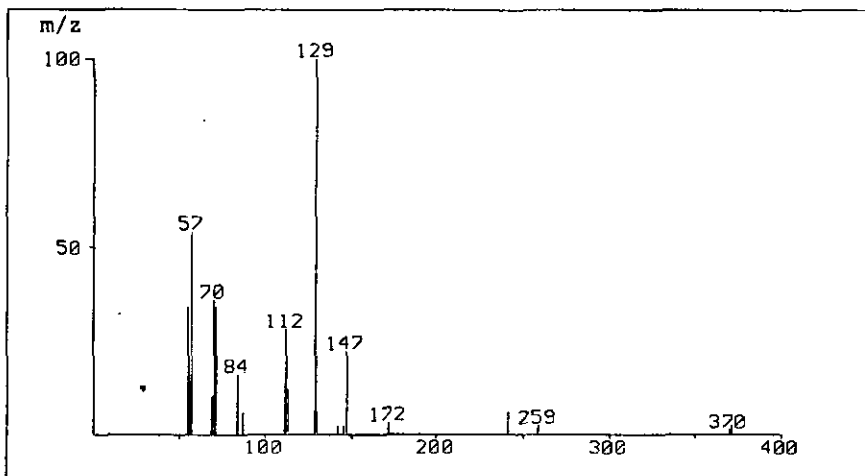
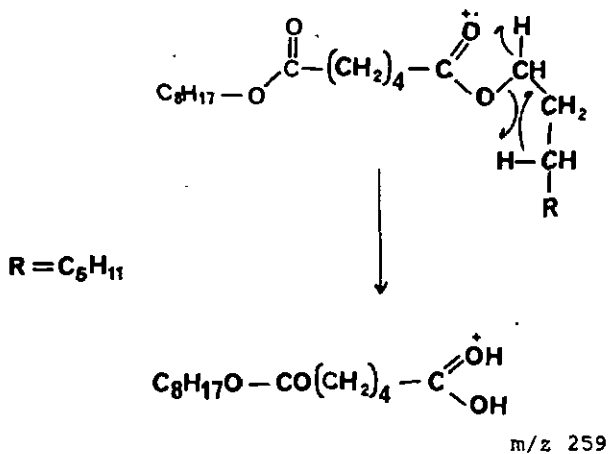
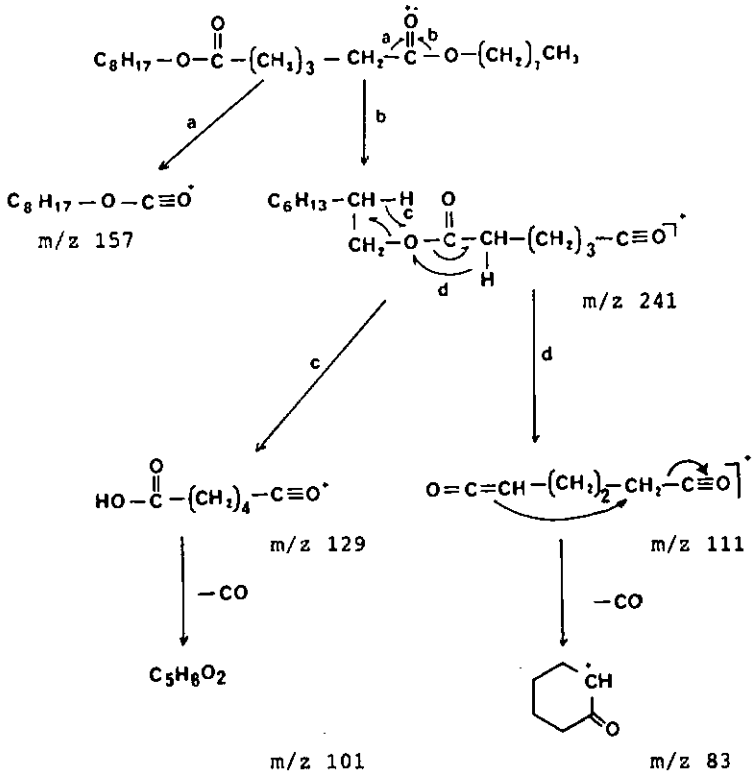
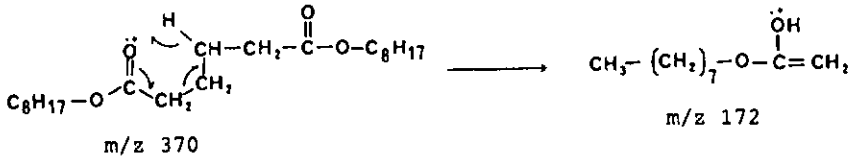


Figure 16 : spectre de masse du composé correspondant au pic No. 14 : Adipate de dioctyle

Schéma de fragmentation :





9.2. ANALYSE DES ALCOOLS ET CETONES

9.2.1. Extraction

Le schéma d'extraction de ces substances est représenté sur la figure 6.

Le spectre IR de la fraction totale ainsi isolée indique la présence de fonctions alcools et cétones (figure 17) caractérisées par les bandes à environ 1060 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} .

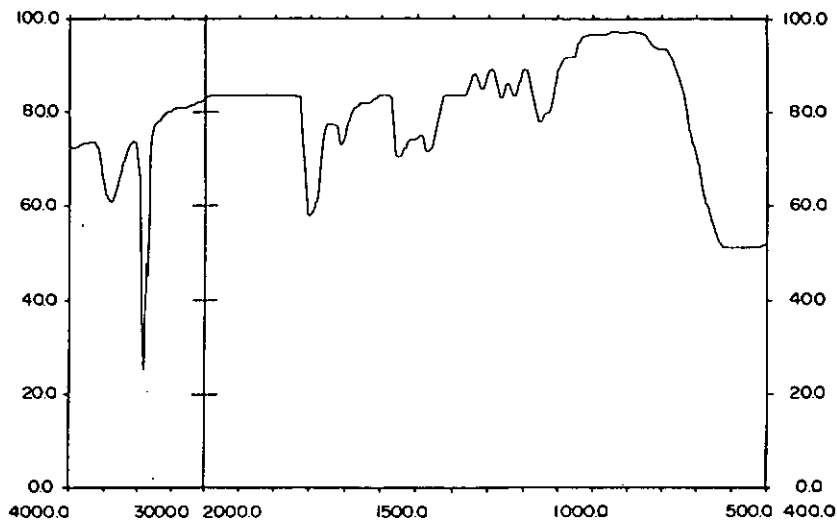


Figure 17 : IR de la fraction d'alcools et cétones

Un contrôle subséquent de cette fraction par chromatographie sur couche mince au moyen de témoins constitués par les composés mentionnés dans la figure 18, permet d'établir la présence de cétones, d'alcools secondaires et d'alcools primaires.

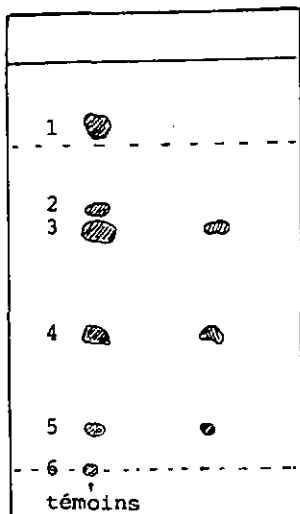


Figure 18 : Chromatographie en couche mince de la fraction d'alcools et cétones. (1) paraffines; (2) esters; (3) cétones; (4) alcools secondaires; (5) alcools primaires; (6) acides libres
Plaque de Silica Gel G; une première élution avec de l'hexane, suivie d'une deuxième avec de benzène.

Reste donc à établir l'identité de ces différents composés. Pour cela, il est recouru à la GC et à la GC-MS.

9.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Les chromatogrammes de ce mélange d'alcools et de cétones pour toutes les plantes étudiées présentent le même profil. (Figure 19 - chromatogramme des alcools et cétones)

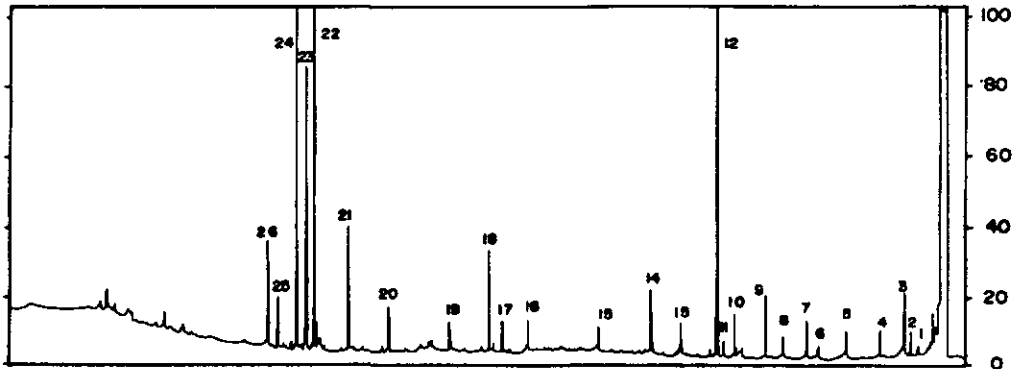


Figure 19 : Chromatogramme de la fraction d'alcools et cétones de la variété caturra

Nous avons procédé à une comparaison de temps de rétention de constituants de l'échantillon et de ceux de témoins. Ces résultats combinés avec des dopages ont permis l'identification des composés mentionnés dans le tableau X.

TABLEAU X
TEMPS DE RETENTION DES ALCOOLS
ET CETONES ISOLEES ET DES TMOINS

Pic No.	ALCOOLS ET CETONES IDENTIFIES	TEMPS DE RET. DES ALCOOLS ET CETONES ISOL.	TEMPS DE RET. TMOINS
1	Octanol	176	178
2	Nonanol	220	222
3	Décanol	275	275
4	Undécanol	430	432
5	Undécane-5-one	617	621
6	Tridécane-7-one	815	821
7	Dodécanol	882	884
8	Tridécanol	915	918
9	Octadécanol	1135	1139
10	Heneicosane-11-one	1322	
11	Nonadécanol	1388	1390
12	Docosanol	1432	1435
13	Tétracosanol	1653	1654
14	Hexacosanol	1829	1831
15	Heptacosanol	2160	
16	Tétracosanodiol	2589	2592
17	Triacotane-16,18-dione	2744	2747
18	Nonacosane-15-one	2832	2834
19	Nonacosane-15 ol	3085	3088
20	Nonacosanol	3427	3434
21	Hentriacontane-9-one	3680	
22	Triacontanol	3901	
23	Hentriacontanol	3957	3962
24	Dotriacontanol	4010	4016
25	Trtriacontanol	4120	4124
26	Tetratriacontanol	4184	4187

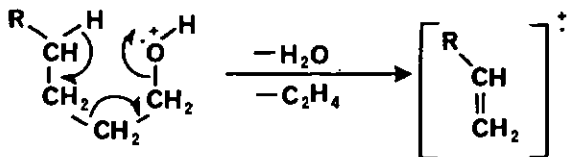
9.2.3. Spectrométrie de masse

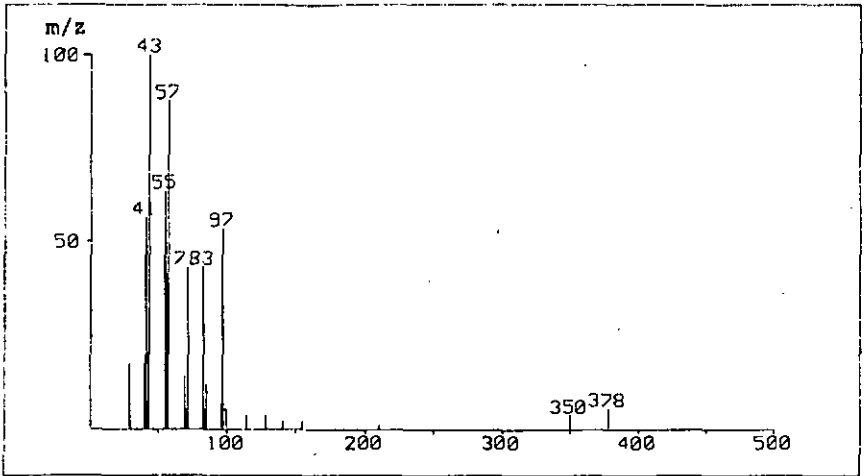
L'analyse par GC-MS des constituants de la fraction et des différents témoins utilisés confirment les résultats établis précédemment.

A titre d'exemple, les spectres du heptacosanol et du nonacosane-15-ol se trouvent sur la figure 20. Le reste de spectres de masse se trouve à la fin du manuscrit, dans la partie expérimentale.

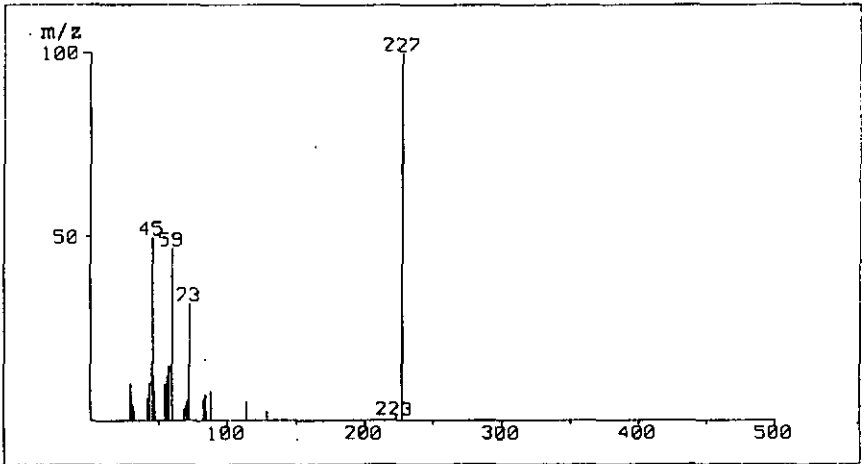
Pour les alcools, l'intensité de l'ion moléculaire $[M^+]$ est très faible. Souvent, ce pic est absent.

L'élimination d'eau est généralement accompagnée par une perte d'éthylène conduisant à un un ion M^+-46 .





(a)



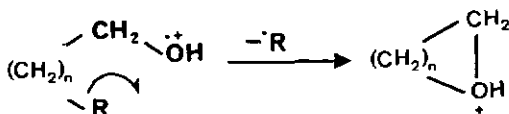
(b)

Figure 20 : Spectres de masse de l'heptacosanol (a) et du nonacosane 15-ol (b)

Pour les alcools à longues chaînes, l'élimination d'eau est très fréquente, bien que les fragments $M^{+}-18$ ne soient jamais très intenses.

Les spectres des alcools primaires ressemblent aussi à ceux des hydrocarbures avec la seule différence qu'ils contiennent des fragments oxonium $C_nH_{2n+1}O$. Ces fragments proviennent des scissions α -, β -, γ -, δ -, ... en donnant pour résultat la série des pics m/z 31, 45, 59, 73....

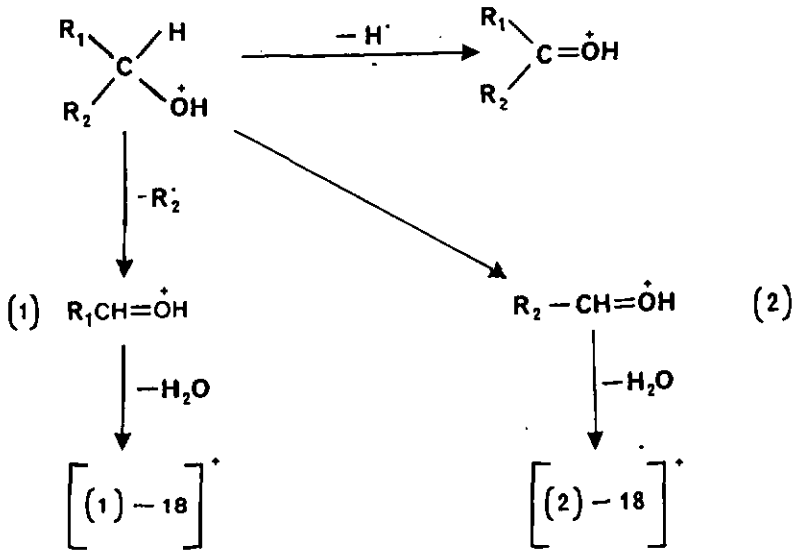
Des ions oxonium cycliques peuvent aussi se former.



Les cycles à cinq et six membres ($n = 3$ ou 4) sont favorisés.

Pour les cétones à longue chaîne, on observe un réarrangement du type Mc Lafferty, lequel donne lieu à la série de masse m/z 58, 72, 86... . L'ion m/z 43 (CH_3CO^+) est très intense quand on est en présence de méthylcétone.

Le schéma de fragmentation des alcools secondaires est le suivant :



Pour les cétones alifatiques, le pic moléculaire est généralement observable. La scission la plus importante a lieu dans la position α du groupe carbonyle.

Le schéma de fragmentation de ces cétones aliphatiques est le suivant :

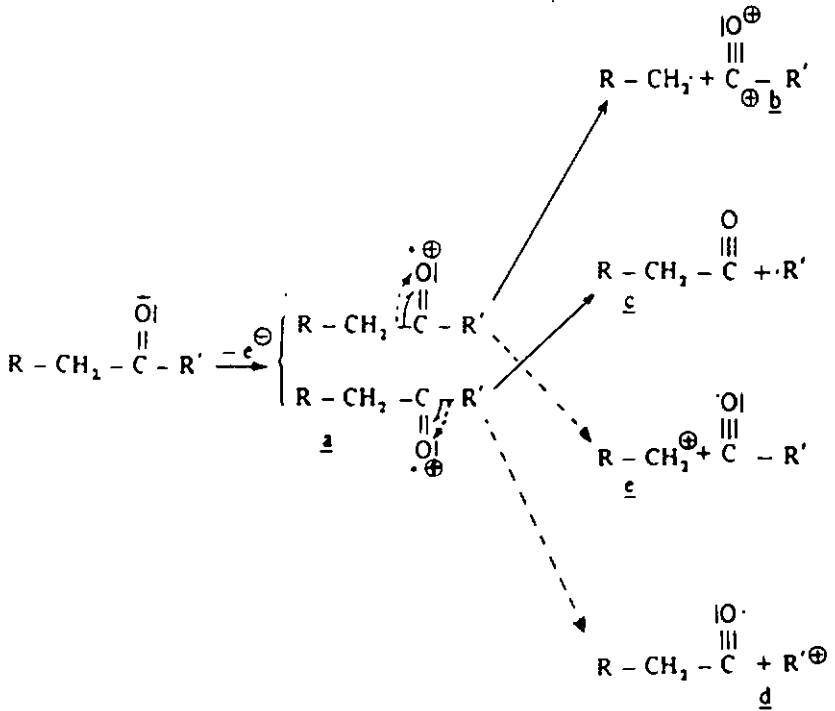


TABLEAU XI

PRINCIPAUX SIGNAUX DES SPECTRES DE MASSE CORRESPONDANT AUX
ALCOOLS ET CETONES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

m/z(Intensité relative).....Nom

41(100), 56(89), 55(82), 43(82), 70(67), 29(62), 69(61),
84(51), [M⁺] 130(0) OCTANOL

41(100), 56(92), 55(91), 43(91), 29(69), 70(65), 31(60),
69(58), 84(51), 83(47), [M⁺] 144(0) NONANOL

41(100), 43(91), 69(85), 55(76), 57(52), 29(51), 56(51),
70(43), [M⁺] 158(0) DECANOL

43(100), 55(93), 41(86), 56(71), 69(66), 57(58), 70(58),
29(54), [M⁺] 172(0) UNDECANOL

43(100), 58(94), 29(85), 57(75), 41(62), 85(60), 27(57),
113(40), [M⁺] 170(3,1) UNDECANE-5-ONE

43(100), 55(92), 41(90), 56(82), 69(76), 70(68), 57(62),
83(59), 168(55), 111(50), 140(18), [M⁺] 186(2,5) DODECANOL

43(100), 113(50), 58(42), 41(38), 29(30), 27(27), 71(27),
85(24), [M⁺] 198(2,01) TRIDECANE-7-ONE

43(100), 41(93), 55(93), 69(65), 57(64), 56(60), 83(57),
29(52), [M⁺] 200(1,5) TRIDECANOL

43(100), 83(88), 41(81), 55(77), 57(70), 29(49), 69(49),
[M⁺] 270(0) OCTADECANOL

43(100), 41(83), 57(76), 55(65), 29(53), 69(42), 83(36),
71(30), [M⁺] 284(0) NONADECANOL

43(100), 57(70), 41(58), 58(58), 71(56), 169(48), 55(41),
29(38), [M⁺] 310(2,25) HENEICOSANE-11-ONE

43(100), 55(90), 57(84), 41(77), 97(76), 83(71), 69(60),
71(43), [M⁺] 326(0) DOCOSANOL

43(100), 57(82), 55(76), 41(73), 83(49), 69(47), 29(30),
71(28), [M⁺] 354(0) TETRACOSANOL

31(100), 41(98), 56(76), 69(45), 83(45), 97(42), 69(40),
71(22), [M⁺] 370(0) TETRACOSANODIOL

43(100), 57(85), 55(70), 41(62), 83(41), 69(40), 71(35),
29(28), [M⁺] 382(0) HEXACOSANOL

43(100), 57(90), 55(66), 41(60), 97(55), 71(45), 83(45),
[M⁺] 396(0) HEPTACOSANOL

43(100), 255(50), 58(47), 41(32), 29(25), 71(24),
[M⁺] 422(4,5) NONACOSANE-15-ONE

227(100), 45(50), 59(47), 73(32), 423(0,5), [M⁺] 424(0)
NONACOSANE-15-OL

43(100), 57(84), 55(76), 97(52), 41(52), 83(48), 69(46),
[M⁺] 424(0) NONACOSANOL

43(100), 57(90), 55(89), 83(80), 69(62), 47(51), 71(48),
56(40), [M⁺] 438(0) TRIACONTANOL

57(100), 141(81), 71(76), 58(50), 157(50), 51(48), 59(42),
337(31), [M⁺] 450(0) HENTRIACONTANE-9-ONE

43(100), 57(86), 55(84), 41(62), 83(48), 69(40), 71(38),
56(35), [M⁺] 452(0) HENTRIACONTANOL

57(100), 55(82), 83(69), 69(62), 97(45), 71(44), 56(39),
[M⁺] 466(0) DOTRIACONTANOL

43(100), 57(98), 55(84), 83(65), 69(64), 97(48), 71(46),
56(35), [M⁺] 48(0,1) TRIACONTANOL

239(100), 43(90), 253(42), 41(38), 281(30), [M⁺] 492(9)
TRIACONTANE-16,18-DIONE

43(100), 57(98), 69(42), 83(42), 97(22), 31(21), [M⁺]
494(0) TETRATRIACONTANOL

Les spectres de masse (tableau XI) des composés séparés par GS comparés à ceux de témoins, indiquent qu'il s'agit des alcools et cétones suivants :

TABLEAU XII

ALCOOLS ET CETONES IDENTIFIES

	F.B.	P.M.	
Octanol	(C ₈ H ₁₈ O)	130	CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂ OH
Nonanol	(C ₉ H ₂₀ O)	144	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH ₂ OH
Décanol	(C ₁₀ H ₂₂ O)	158	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH ₂ OH
Undécanol	(C ₁₁ H ₂₄ O)	172	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH ₂ OH
Undécane-5-one	(C ₁₁ H ₂₂ O)	170	CH ₃ (CH ₂) ₃ CO(CH ₂) ₅ CH ₃
Tridécanne-7-one	(C ₁₃ H ₂₆ O)	198	CH ₃ (CH ₂) ₅ CO(CH ₂) ₅ CH ₃
Dodécanol	(C ₁₂ H ₂₆ O)	186	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ OH
Tridécanol	(C ₁₃ H ₂₈ O)	200	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ OH
Octadécanol	(C ₁₈ H ₃₈ O)	270	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CH ₂ OH
Heneicosane-11-one	(C ₂₁ H ₄₂ O)	310	CH ₃ (CH ₂) ₉ CO(CH ₂) ₉ CH ₃
Nonadécanol	(C ₁₉ H ₃₈ O)	284	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ CH ₂ OH
Docosanol	(C ₂₂ H ₄₆ O)	326	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ CH ₂ OH
Tétracosanol	(C ₂₄ H ₅₀ O)	354	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ CH ₂ OH
Hexacosanol	(C ₂₆ H ₅₄ O)	382	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ CH ₂ OH
Heptacosanol	(C ₂₇ H ₅₆ O)	396	CH ₃ (CH ₂) ₂₅ CH ₂ OH
Tétracosanodiol	(C ₂₄ H ₅₅ O ₂)	370	CH ₂ OH(CH ₂) ₂₂ CH ₂ OH
Triaccontanol-16,18-dione	(C ₃₃ H ₆₄ O ₂)	492	CH ₃ 8ch ₂ ₁₄ COCH ₂ CO(CH ₂) ₁₄ CH ₃
Nonacosane-15-one	(C ₂₉ H ₅₈ O)	422	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CO(CH ₂) ₁₃ CH ₃
Nonacosane-15-ol	(C ₂₉ H ₆₀ O)	424	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CHOH(CH ₂) ₁₃ CH ₃
Honacosanol	(C ₂₉ H ₆₀ O)	424	CH ₃ (CH ₂) ₂₇ CH ₂ OH
Hentriacontane-9-one	(C ₃₁ H ₆₂ O)	450	CH ₃ (CH ₂) ₇ CO(CH ₂) ₂₁ CH ₃
Triaccontanol	(C ₃₃ H ₆₂ O)	438	CH ₃ (CH ₂) ₂₈ CH ₂ OH
Hentriacontanol	(C ₃₁ H ₆₄ O)	452	CH ₃ (CH ₂) ₂₉ CH ₂ OH
Dotriaccontanol	(C ₃₂ H ₆₆ O)	466	CH ₃ (CH ₂) ₃₀ CH ₂ OH
Triaccontanol	(C ₃₃ H ₆₈ O)	480	CH ₃ (CH ₂) ₃₁ CH ₂ OH
Tétratriacontanol	(C ₃₄ H ₇₀ O)	494	CH ₃ (CH ₂) ₃₂ CH ₂ OH

9.2.4. Comparaison et discussion des résultats

Dans le tableau XIII sont indiqués les teneurs en pourcent des constituants des fractions d'alcools et de cétones obtenues à partir de chacune des plantes étudiées.

9.2.4.1. Composition qualitative et quantitative des hybrides, espèces et variétés.

Dans toutes les plantes, la teneur en triacontanol, docosanol et dotriacontanol domine en moyenne celle des autres substances. Les deux dernières citées figurent en quantité plus importante dans Timor et Catimor A, tandis qu'à l'inverse, décanol, undécanol et dodécanol s'y trouvent en nettement moindre proportion.

En règle générale, hormis les trois premiers alcools indiqués auxquels il convient d'ajouter l'hexacontanol, les différents composés alcooliques sont en petites quantités avec des variations pas toujours significatives.

Le rapport [alcools]/[cétones] est nettement en faveur des premiers. Enfin, parmi les cétones, seul l'hentriacontane-9-one figure en quantité notable, ceci invariablement.

TABLEAU XIII

COMPOSITION EN POURCENTS DES
FRACTIONS DES ALCOOLS ET CETONES

Pic. No.	COMPOSE	H. de Tinor	Catimor A	Caturra	Purpurascens	Stenoph.	Liberica	Racemosa	Semperfl.	Columna	Mundo Novo	Chinch.	22	Poke X
1	Octanol	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	Nonanol	0.04	0.02	0.14	0.10	0.18	0.11	0.19	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.17
3	Décanol	0.20	0.05	2.10	1.80	2.00	2.84	1.96	1.84	1.57	1.36	1.38	1.38	1.52
4	Undécanol	0.05	0.04	0.52	0.36	0.37	0.27	0.39	0.42	0.38	0.39	0.22	0.22	0.44
5	Undécane-5-one	0.94	0.65	0.89	1.00	0.78	0.66	1.02	1.00	1.05	1.16	0.66	0.66	0.69
4	Tridécane-7-one	0.05	0.01	0.02	0.09	0.10	0.08	0.12	0.16	0.05	0.09	0.07	0.07	0.06
7	Dodécanol	0.18	0.09	1.32	1.11	1.28	1.10	1.22	1.42	1.40	1.38	1.30	1.30	1.37
6	Tridécanol	0.08	0.04	0.07	0.03	0.08	0.02	0.08	0.03	0.07	0.05	0.03	0.03	0.05
9	Octadécanol	0.66	0.66	1.12	1.00	0.94	0.89	0.89	0.76	0.98	0.84	1.00	1.00	1.05
10	Renéicosane-11-one	0.08	0.11	0.12	0.06	0.06	0.13	0.08	0.09	0.07	0.06	0.08	0.08	0.08
11	Nonadécanol	0.66	0.67	0.01	0.03	0.03	0.09	0.02	0.06	0.03	0.06	0.09	0.09	0.06
12	Docosanol	22.40	21.01	18.30	17.26	16.00	16.40	19.10	18.92	17.25	18.15	17.63	17.63	18.45
13	Tétracosanol	0.66	0.45	0.80	0.68	0.82	0.78	0.63	0.41	0.79	0.69	0.88	0.88	0.90
14	Hexacosanol	1.72	1.94	2.60	2.35	2.54	2.16	2.00	2.39	2.65	2.16	1.99	1.99	2.64
15	Heptacosanol	0.22	0.20	0.17	0.16	0.24	0.19	0.31	0.21	0.19	0.17	0.22	0.22	0.19
16	Tétracosanediol	0.37	0.27	0.36	0.24	0.27	0.29	0.19	0.29	0.21	0.32	0.28	0.28	0.45
17	Trilacontane 16,18-dione	0.03	0.05	0.06	0.09	0.07	0.09	0.09	0.09	0.12	0.12	0.08	0.08	0.12
18	Nonacosane 15-one	0.26	0.27	0.21	0.38	0.35	0.18	0.15	0.32	0.29	0.16	0.32	0.32	0.24
19	Nonacosane 15-ole	0.03	0.06	0.07	0.09	0.06	0.05	0.04	0.06	0.07	0.07	0.02	0.02	0.06
20	Nonacosanol	0.09	0.12	0.08	0.11	0.13	0.08	0.05	0.08	0.09	0.05	0.13	0.13	0.09
21	Hentriacontane-9-one	2.32	2.36	2.25	2.56	1.96	2.21	2.73	2.81	2.16	2.01	2.15	2.15	2.18
22	Trilacontanol	16.20	15.12	17.90	18.36	18.52	19.32	16.16	20.01	19.16	20.00	18.56	18.56	19.20
23	Hentriacontanol	3.09	2.62	3.10	2.65	3.16	3.00	2.74	3.07	2.65	3.15	2.65	2.65	2.15
24	Dotriacontanol	46.25	47.20	42.01	39.98	41.40	40.22	39.16	39.25	41.74	40.18	43.15	43.15	38.24
25	Tétriacontanol	2.42	2.74	2.31	2.56	1.81	2.85	3.05	1.00	2.71	2.77	2.61	2.61	2.64
26	Tétriacontanol	----	0.09	0.04	0.06	0.04	0.06	0.08	0.12	0.07	----	----	----	0.16

Au vu de ces résultats chromatographiques, et faute d'expérimentations annexes, dont il sera débattu plus tard, il reste difficile de dégager des conclusions à la fois explicatives et pratiques s'agissant du caractère résistant ou non.

9.2.5. Traitement mathématique des données chromatographiques

Les données chromatographiques correspondant aux fractions alcools-cétones pour chacun des hybrides, espèces et variétés ont été également traités par le programme Manoli, avec pour résultats les cartes se trouvant sur la figure 21. Pour l'élaboration de ces cartes, le programme a retenu les six composés suivants : décanol, undécanol, dodécanol, nonadécanol, hexacosanol et dotriacontanol.

Dans les conditions de travail définies, le programme n'a sélectionné que les alcools, car eux seuls répondaient aux critères de détection. Par manque de disponibilité du dispositif informatique, il n'a pas été possible de répéter l'expérience en vue d'établir la carte des cétones.

9.2.5.1. Résultats et discussion

De nouveau à l'image des hydrocarbures, les cartes correspondant aux plantes résistantes se trouvent dans le cadran inférieur gauche, et bien espacées de celles représentant les plantes sensibles.

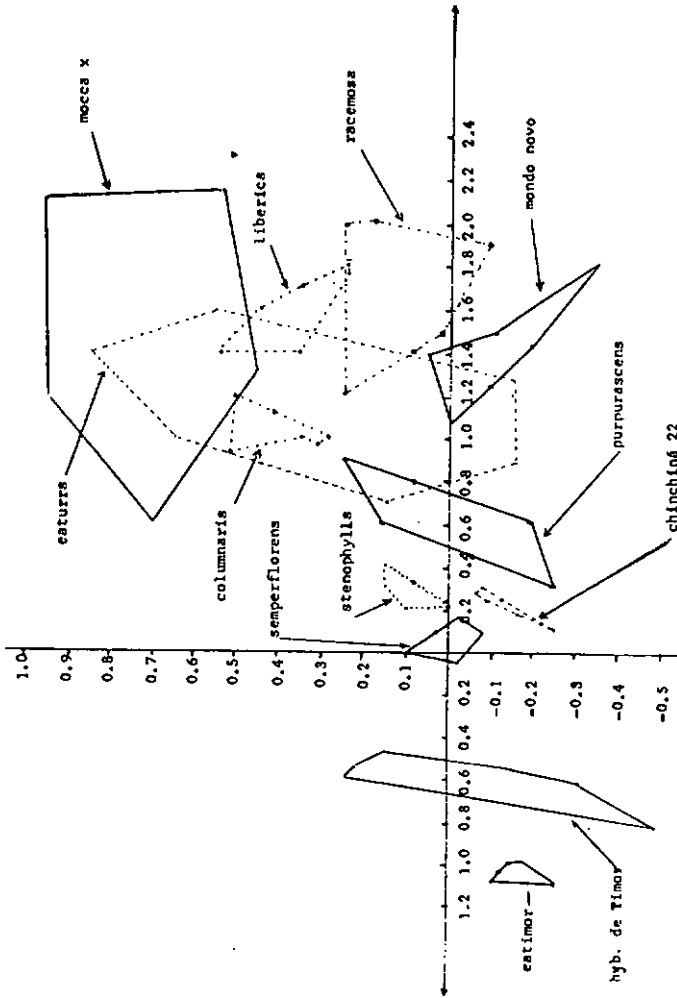


Figure 21 : Cartes correspondant aux alcools des cires cuticulaires

Ceci établit une différence non équivoque entre la composition des cires cuticulaires des deux catégories de plantes.

De plus, un rapport certain peut être avancé entre constitution des cires et comportement des plantes vis-à-vis de Hemileia vastatrix.

Ces résultats constituent un argument supplémentaire pour l'emploi des cartes "non linéaires", à la fois comme critères taxonomiques et comme moyen de prévoir dans un délai raisonnable le comportement de nouvelles variétés face à Hemileia vastatrix.

9.3. ANALYSE DES ACIDES LIBRES

9.3.1. Extraction

La méthode d'obtention de la fraction est indiquée dans les figures 5 et 6.

La nature de la fraction a été contrôlée par IR (figure 22). Les bandes à $3350-3450 \nu \text{OH cm}^{-1}$ et $1710 \nu \text{CO cm}^{-1}$ indiquent la présence d'acides.

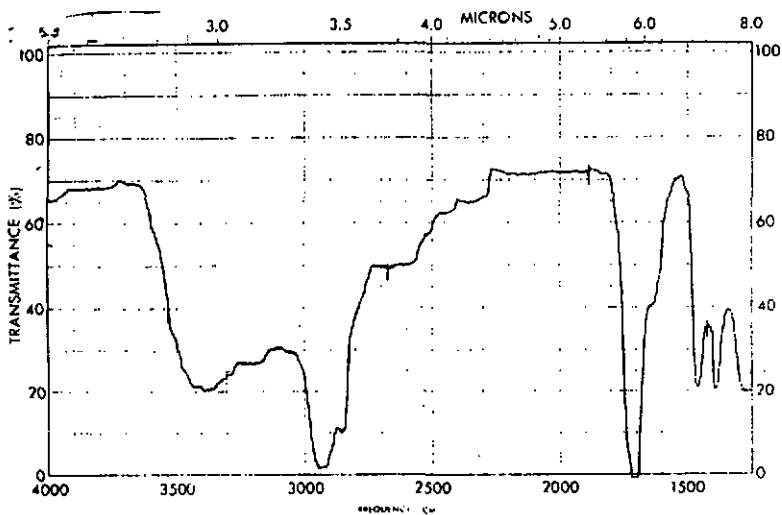


Figure 22 : IR de la fraction d'acides

9.3.2. Identification

Le recours à la chromatographie sur papier et la comparaison des Rf des différents constituants séparés avec ceux de témoins purs (fig. 23) a permis d'identifier cinq acides : béhénique (C₂₂), arachidique (20), stearique (18), palmitique (16) et myristique (14).

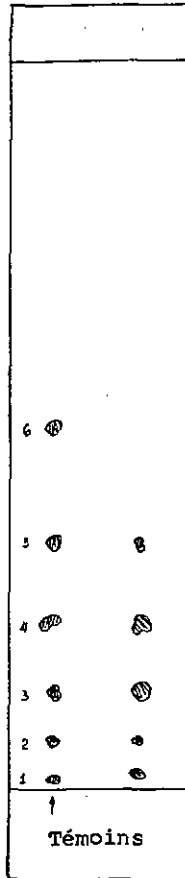


Figure 23 : Chromatographie sur bande de papier imprégnée de paraffine : éluant acide acétique 90 %
1 behénique (C₂₂); 2 arachidique (C₂₀); 3 stearique (C₁₈); 4 palmitique (C₁₆); 5 myristique (C₁₄); 6 laurique (C₁₂)

9.3.3. Chromatographie en phase gazeuse

Les acides ont été transformés en esters méthyliques au moyen de $\text{BF}_3\text{-MeOH}$. La comparaison des temps de rétention des esters méthyliques ainsi obtenus avec ceux des esters méthyliques de témoins nous a permis de confirmer l'identité des acides précités (fig. 24).

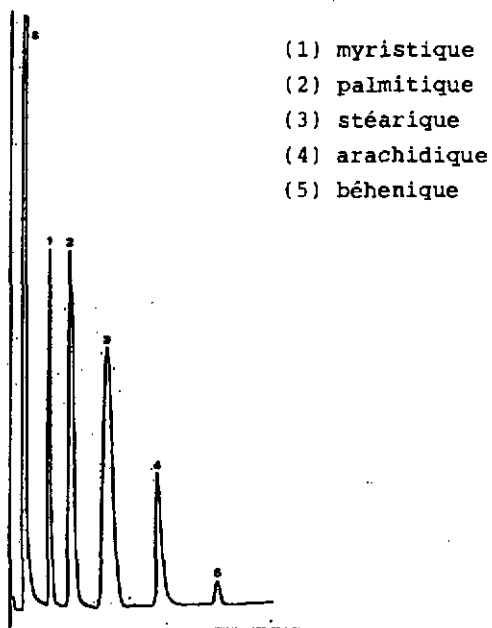


Figure 24 : Chromatogramme des esters méthyliques des acides

9.3.4. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse réalisés par GC-MS confirment les résultats établis par CP et GC. On montre une identité parfaite entre les spectres des produits de la fraction acide estérifié et ceux des témoins.

Sur la figure 25, nous pouvons voir le spectre de masse correspondant au stéarate de méthyle.

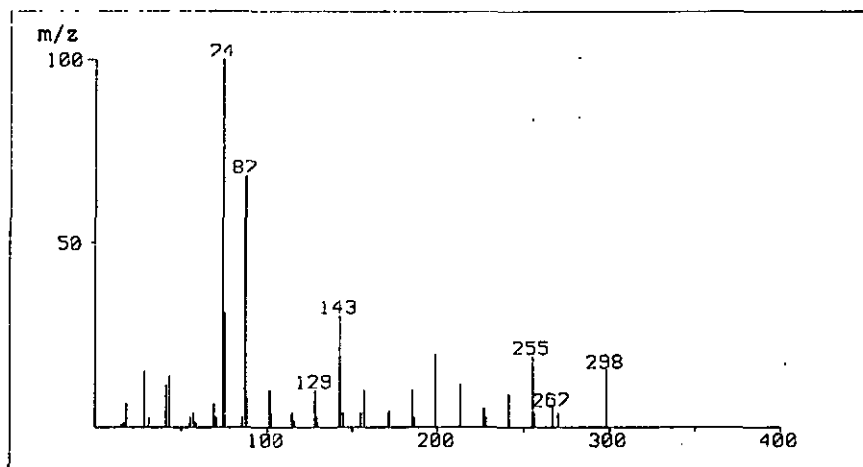
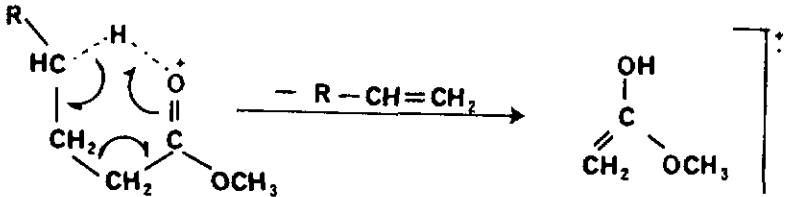


Figure 25 : Spectre de masse du stéarate de méthyle

Les esters méthyliques donnent un pic de base caractéristique à m/z 74, résultant d'un réarrangement du type Mac Lafferty.



Les autres processus de fragmentation induite par la fonction carbonyle sont indiqués dans le schéma suivant :

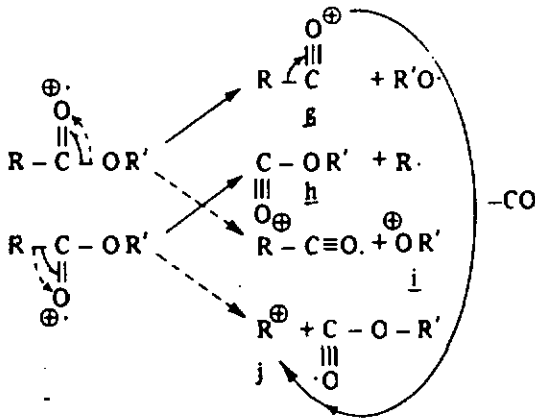


TABLEAU XIV

COMPOSITION QUALITATIVE ET
QUANTITATIVE EN POURCENTS
DANS LES FRACTIONS DES ACIDES

Hybrides, espèces ou variétés	Acide Myristique	Acide Palmitique	Acide Stéarique	Acide Arachidique	Acide Béhenique
H. de Timor	6.98	31.95	49.06	8.99	3.02
Catimor A	7.02	32.01	49.01	8.98	2.98
Caturra	7.00	32.04	48.89	9.02	3.05
Purpuracens	6.95	31.98	49.09	8.99	2.99
Stenophylla	6.98	32.14	48.85	9.03	3.00
Liberica	7.05	32.00	48.98	9.01	3.00
Racemosa	6.95	32.18	49.07	8.83	2.97
Semperflorens	7.01	31.97	48.99	9.02	3.01
Columnaris	6.95	32.05	49.02	9.00	2.98
Mundo Novo	7.01	31.97	49.00	9.01	3.01
Chinchina 22	6.95	32.01	48.87	8.96	3.21
Moka X	7.03	31.96	49.05	8.99	2.97

Les composés trouvés comportant une longue chaîne hydrocarbonée présentent les coupures caractéristiques de celle-ci.

9.3.5. Comparaison et discussion des résultats

Aucune différence qualitative et quantitative dans les fractions acides entre les plantes résistant ou non à la rouille n'a été trouvée, compte tenu des manipulations réalisées (tableau XIV).

Deux acides, le palmitique et le stearique, sont majoritaires dans les deux catégories des plantes (résistantes et non résistantes). L'acide stéarique représente en moyenne 49 % de la fraction acide.

Globalement, cette fraction représente le 14 % des cires de plantes résistantes contre 10 % pour les non résistantes.

Il se peut que cette forte teneur en acides concoure à l'inhibition du développement de Hemileia vastatrix. Ceci reste à prouver par des tests biologiques.

9.4. ANALYSE DES ESTERS

9.4.1. Extraction

L'extraction réalisée au moyen d'éther de pétrole (figure 5) contient les hydrocarbures et les esters. L'extrait est évaporé à sec sous courant d'azote et chromatographié sur colonne ($l = 20$ cm, $\varnothing = 1,5$ cm) d'alumine neutre (activité 90 Merck). La première élution avec 100 ml d'éther de pétrole (40° - 60° C) permet d'éliminer les hydrocarbures. Par élutions successives avec 5 portions de 15 ml de CHCl_3 et 5 portions de 15 ml de méthanol (99 %) respectivement, nous récupérons les esters.

Les fractions obtenues ont été réunies, séchées, concentrées et analysées par IR (figure 26). Les bandes à 1730 cm^{-1} et 1175 cm^{-1} sont caractéristiques de cette famille de composés.

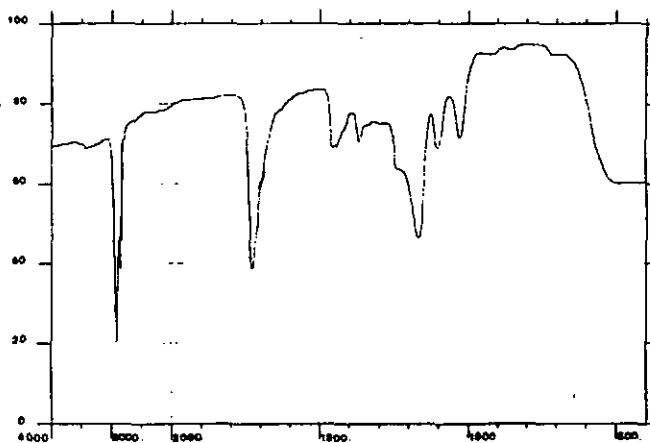


Figure 26 : spectre IR de la fraction des esters

9.4.2. Identification

9.4.2.1. Chromatographie sur papier

Une partie des esters a été saponifiée (2 heures - KOH dans méthanol), les acides libérés extraits. Après concentration puis séchage sur Na_2SO_4 , on a procédé à l'analyse par chromatographie sur papier (figure 27).

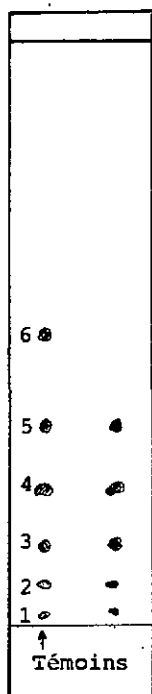


Figure 27 : Chromatographie sur bande de papier imprégnée de paraffine : éluant acide acétique 90 %
1 béhénique (C_{22}); 2 arachidique (C_{20}); 3 stearique (C_{18}); 4 palmitique (C_{16}); 5 myristique (C_{14}); 6 laurique (C_{12})

Nous avons pu ainsi, par comparaison des Rf avec ceux des témoins purs, établir la présence de 5 acides : myristique, palmitique, stéarique, arachidique et béhénique.

Une partie des acides libérés a été transformée en esters méthyliques avec $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ et les esters analysés par GC-MS.

La comparaison avec le temps de rétention d'esters méthyliques témoins, ainsi que le dopage au moyen de ceux-ci a confirmé l'identité des esters formés.

La comparaison des spectres de masse de ces esters avec ceux de la littérature et de témoins nous a confirmé la nature des acides (tableau XV).

TABLEAU XV

ACIDES ET ALCOOLS OBTENUS PAR
SAPONIFICATION DE LA FRACTION D'ESTERS

Acides	Alcools
Docosanoïque (C_{22}) (Béhénique)	Octanol
Eicosanoïque (C_{20}) (Arachidique)	Décanol
Octadécanoïque (C_{18}) (Stéarique)	Nonanol
Hexadécanoïque (C_{16}) (Palmitique)	Dedécanol
Tetradécanoïque (C_{14}) (myristique)	Octadécanol
	Tétracosanol

Les alcools ont également été récupérés et analysés par GC-MS. La comparaison des temps de rétention avec ceux des témoins purs, ainsi que leur dopage par les mêmes témoins, suivis de l'étude des spectres de masse (comparaison avec ceux des témoins et analyses de leur mode de fragmentation) nous a permis d'identifier six alcools primaires : C_8 à C_{24} , présentés dans le tableau XV.

9.4.2.2. GC-MS des esters

Une chromatographie gazeuse de la fraction ester a été faite (figure 28).

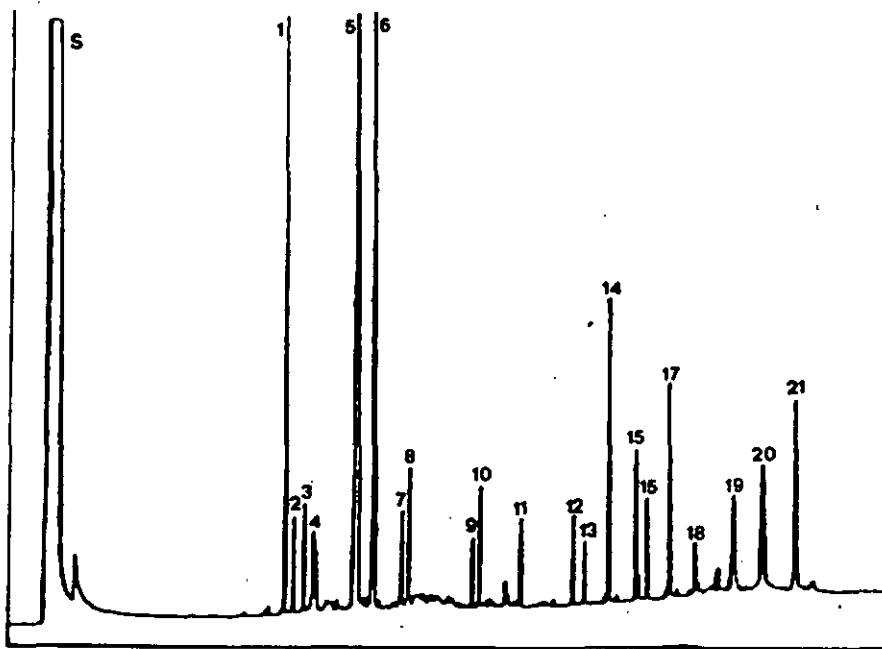
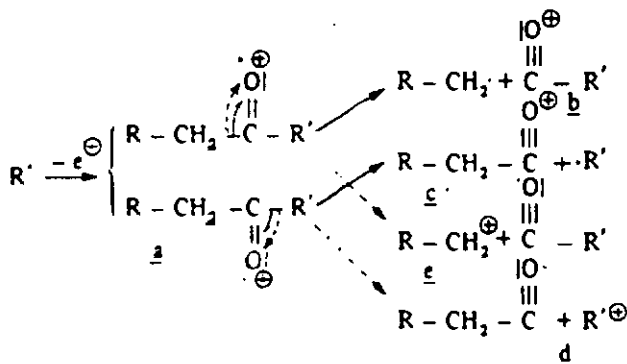


Figure 28 : Chromatogramme de la fraction d'esters

La comparaison des temps de rétention de ces esters et de leur spectre de masse avec ceux de témoins purs (U.N.) révèle une parfaite similitude.

Dans quelques cas, l'ion moléculaire est très faible, ce pic étant généralement accompagné de l'ion M^{+1} . Une tendance à la protonation est très grande.

Les esters présentent une rupture en α du groupement carbonyle typique de cette classe de substances.



De même, le pic m/z 74 est dû au réarrangement du type Mc-Lafferty.

Par ailleurs s'observent les ions m/z 60 et 61 très typiques de certains esters aliphatiques.

Les fragments m/z 112 et m/z 157 correspondent à $[\text{R}'-1]^+$ et $[\text{CO}_2\text{R}']^+$.

Nous avons identifié les esters suivants :

TABLEAU XVI

COMPOSITION DE LA FRACTION D'ESTER
DES CIRES CUTICULAIRES

Pic No.	Composé	
1	Tétradécanoate d'octanoyle	$C_{22}H_{44}O_2$
2	Tétradécanoate de décanoyle	$C_{24}H_{48}O_2$
3	Hexadécanoate d'octanoyle	$C_{24}H_{48}O_2$
4	Hexadécanoate de nonanoyle	$C_{25}H_{50}O_2$
5	Tétradécanoate de dodécanoyle	$C_{26}H_{52}O_2$
6	Octadécanoate d'octanoyle	$C_{26}H_{52}O_2$
7	Octadécanoate de nonanoyle	$C_{27}H_{54}O_2$
8	Hexadécanoate de dodécanoyle	$C_{28}H_{56}O_2$
9	Octadécanoate de décanoyle	$C_{28}H_{56}O_2$
10	Docosanoate d'octanoyle	$C_{28}H_{56}O_2$
11	Eicosanoate d'octanoyle	$C_{28}H_{56}O_2$
12	Eicosanoate de nonanoyle	$C_{29}H_{58}O_2$
13	Octadécanoate de dodécanoyle	$C_{30}H_{60}O_2$
14	Eicosanoate de décanoyle	$C_{30}H_{60}O_2$
15	Tétradécanoate d'octadécanoyle	$C_{32}H_{64}O_2$
16	Eicosanoate de dodécanoyle	$C_{32}H_{64}O_2$
17	Docosanoate de décanoyle	$C_{32}H_{64}O_2$
18	Hexadécanoate d'octadécanoyle	$C_{34}H_{68}O_2$
19	Docosanoate de dodécanoyle	$C_{34}H_{68}O_2$
20	Octadécanoate d'octadécanoyle	$C_{36}H_{72}O_2$
21	Eicosanoate d'octadécanoyle	$C_{38}H_{76}O_2$

Le schéma du traitement de la fraction d'ester est indiqué sur la figure 29.

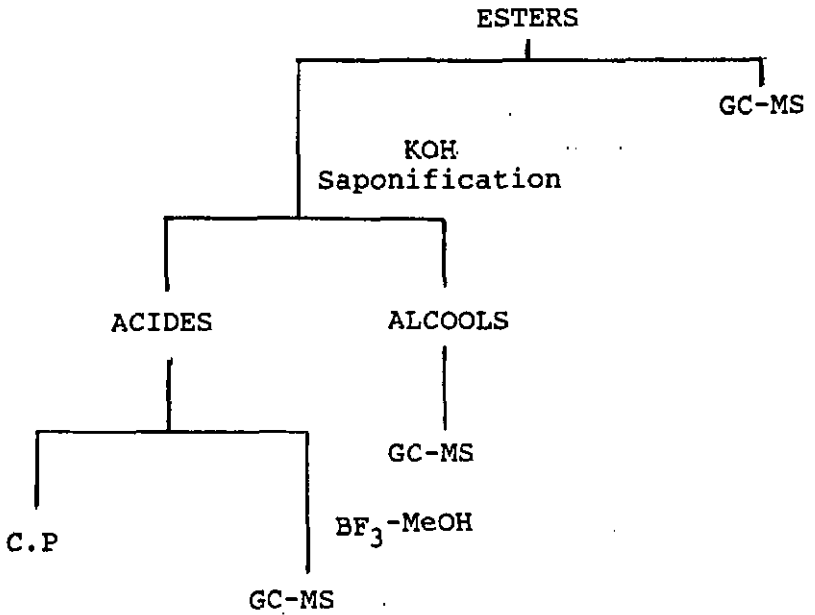


Figure 29

TABLEAU XVII

COMPOSITION EN POURCENTS
DES FRACTIONS DES ESTERS

Pic No.	H. de Timor	Catimor	Caturca	Mundo Novo	Chinch. 22	Moka X	Purpuraz.	Sempreflorens	Columnaris	Stenophylla	Liberica	Racemosa
1	14.28	14.18	14.12	14.10	14.30	14.15	14.22	14.30	14.31	14.26	14.12	14.25
2	2.24	2.10	2.15	2.10	2.25	2.18	2.26	2.21	2.24	2.10	2.18	2.14
3	2.52	2.52	2.25	2.50	2.40	2.48	2.56	2.51	2.54	2.48	2.45	2.50
4	1.96	1.87	1.90	1.93	1.85	1.98	2.00	1.87	1.99	1.98	1.87	1.89
5	18.20	18.35	18.18	18.22	18.20	18.22	18.15	18.52	18.21	18.42	18.36	18.18
6	15.40	15.50	15.42	15.39	15.35	15.38	14.50	15.22	15.38	15.20	15.32	15.45
7	2.10	2.02	2.10	2.12	2.05	1.98	2.00	2.00	2.04	2.01	2.10	1.99
8	3.22	3.18	3.20	3.21	3.30	3.24	3.18	3.25	3.20	3.18	3.22	3.20
9	1.54	1.62	1.51	1.57	1.52	1.54	1.50	1.47	1.55	1.50	1.51	1.54
10	2.80	2.82	2.79	2.78	2.80	2.78	2.81	2.79	2.80	2.75	2.81	2.78
11	2.10	2.12	2.15	2.12	2.11	2.11	2.09	2.10	2.11	2.14	2.09	2.10
12	2.24	2.28	2.22	2.20	2.25	2.20	2.20	2.10	2.15	2.14	2.18	2.11
13	1.54	1.50	1.51	1.56	1.50	1.43	1.60	1.55	1.52	1.60	1.57	1.52
14	7.28	7.16	7.18	7.19	7.26	7.32	7.88	7.21	7.25	7.16	7.28	7.20
15	3.64	3.60	3.65	3.62	3.60	3.67	3.61	3.63	3.60	3.61	3.55	3.64
16	2.38	2.12	2.28	2.40	2.36	2.30	2.39	2.40	2.36	2.41	2.36	2.25
17	5.04	5.10	5.00	5.03	5.00	5.18	5.00	5.02	5.00	5.04	5.09	5.10
18	1.12	1.16	1.15	1.12	1.18	1.18	1.10	1.16	1.12	1.19	1.21	1.10
19	2.52	2.50	2.51	2.53	2.51	2.58	2.50	2.48	2.46	2.46	2.51	2.50
20	3.22	3.35	3.21	3.22	3.30	3.24	3.21	3.21	3.22	3.31	3.18	3.30
21	4.62	4.26	4.82	4.55	4.57	4.60	4.60	4.56	4.60	4.31	4.26	4.66

Les esters qui proviennent de l'acide Tétradécanoïque se trouvent en plus grande quantité (37 %) (voir tableau XVII). Les esters avec 26, 28, 30 et 32 atomes de carbone représentent le 40 % de la fraction.

9.4.2.3. Résultats et discussion

Contrairement aux hydrocarbures, alcools et cétones, la teneur en esters des cires ne présente pas de différence notable entre les différents échantillons provenant de plantes résistant à la rouille ou non.

9.5. ANALYSE DES ACIDES TRITERPENIQUES

9.5.1. Extraction

La fraction des acides triterpéniques a été extraite et séparée selon les schémas des figures 5 et 6.

Le spectre IR de cette fraction (figure 30) montre les bandes correspondant aux fonction hydroxyle 3450 cm^{-1} , carbonyle 1700 cm^{-1} et celle du groupe méthyle (1380 cm^{-1} et 1460 cm^{-1}). Il s'agit de composés acides.

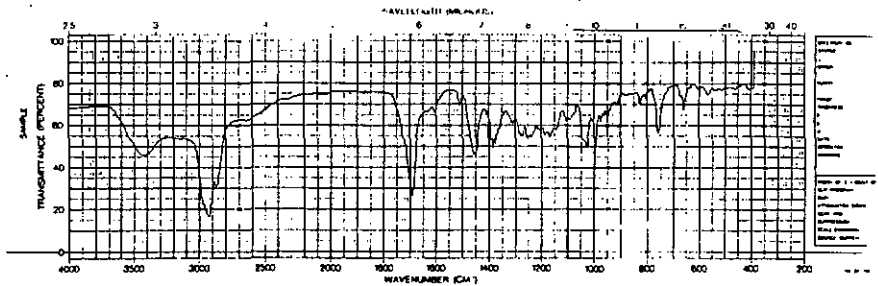


Figure 30 : IR de la fraction des acides triterpéniques

9.5.2. Identification

9.5.2.1. RMN

On a réalisé le spectre RMN de la fraction
(fig. 31).

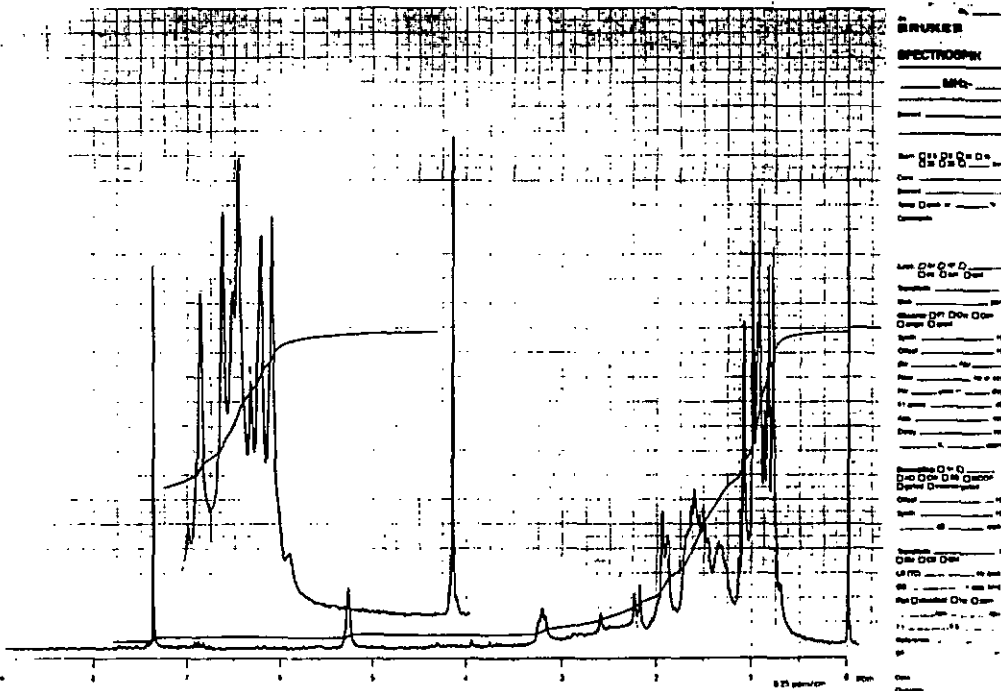


Figure 31 : spectre RMN de la fraction des acides triterpéniques

Ce spectre possède l'allure caractéristique de composés triterpéniques. Par TLC, nous avons établi qu'il s'agit d'un produit majoritaire accompagné d'une ou deux impuretés de même nature. Dans le dessein de disposer de composés volatils, il a été procédé à la dérivatisation d'une partie de l'échantillon au moyen du sulfate de diméthyl dans le DMF et à une analyse chromatographique.

Le chromatogramme montre 4 pics numérotés de 1 à 4 (figure 32).

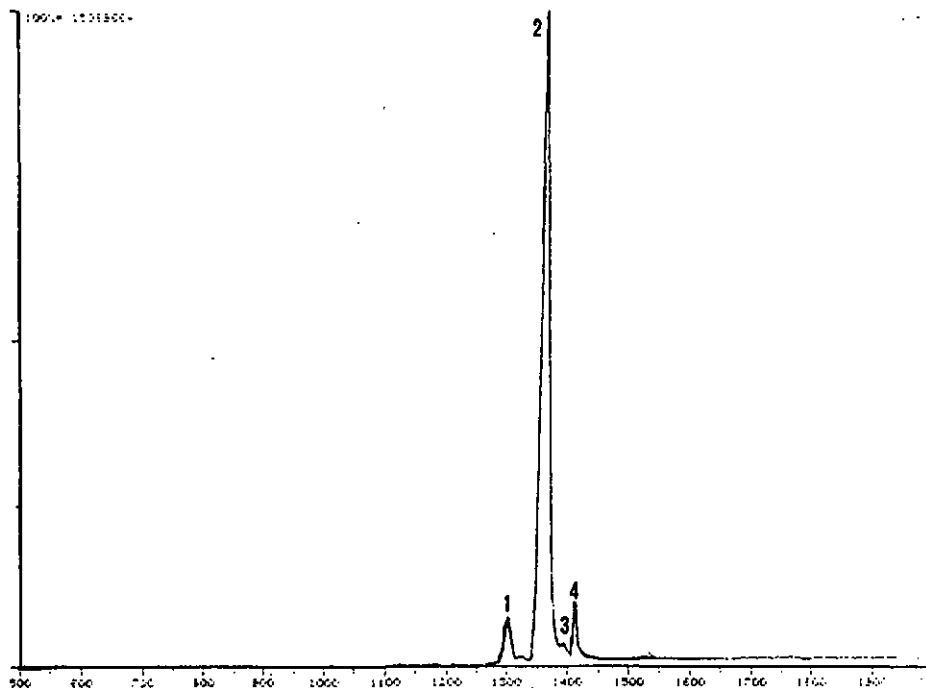


Figure 32 : Chromatogramme des esters méthyliques de la fraction des acides triterpéniques

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par TOSHIRO ITOT et coll. [74] donne à penser que les pics 1 et 2 correspondent aux dérivés méthyliques des acides ursolique et oléanolique respectivement, et les pics 3 et 4 aux dérivés formylés de ces deux mêmes acides.

Il est à noter que le composé 2 représente le 91 % de la fraction, ce qui donne à penser que le spectre RMN obtenu est pratiquement celui de ce composé.

Le spectre RMN-¹H révèle en effet la présence de cinq méthyles tertiaires :

$\delta^* = 0.989$ pour le méthyle C₂₃

$\delta = 0.778$ pour le méthyle C₂₄

$\delta = 0.923$ pour le méthyle C₂₅

$\delta = 1.081$ pour le méthyle C₂₆

$\delta = 0.826$ pour le méthyle C₂₇

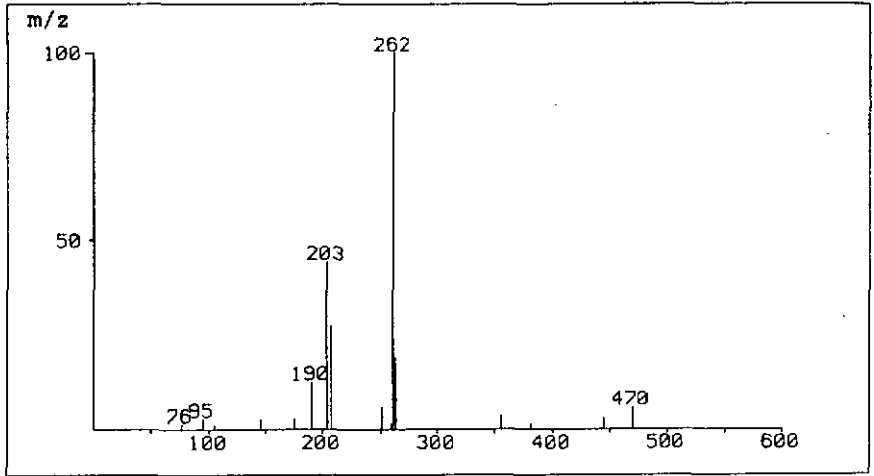
* déplacement chimique en δ [ppm]

ainsi que celles de deux protons en α d'une double liaison à $\delta = 2.24$ en C₁₈ et d'un proton vinylique à $\delta = 5.25$ en C₁₁.

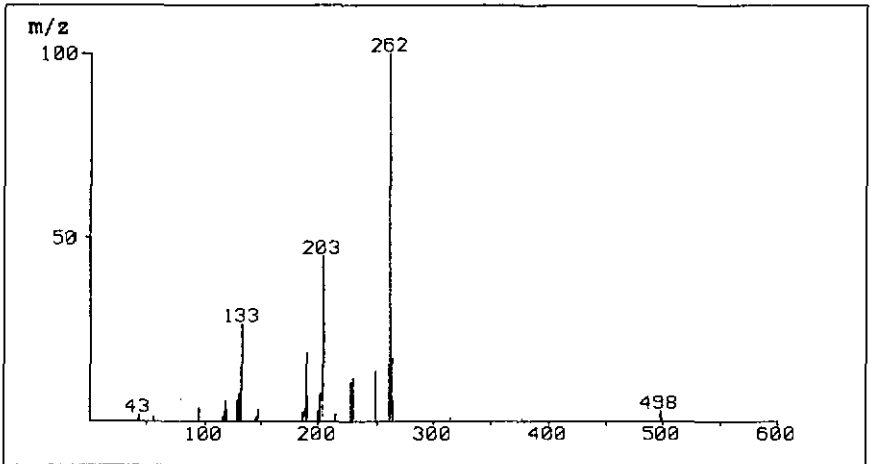
Ces valeurs comparées avec celles de la littérature [80] indiquent qu'il s'agit de l'acide ursolique.

9.5.2.2. GC-MS

L'analyse par GC-MS de la partie dérivatisée permet d'obtenir les spectres suivants :



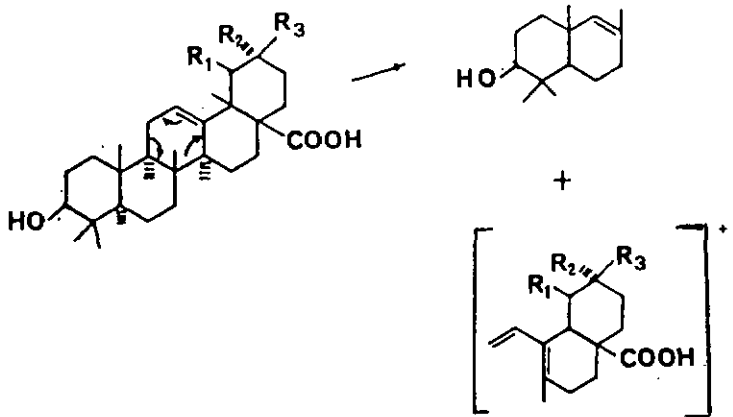
a) spectre de masse du dérivé méthyle



b) spectre de masse du dérivé formylé

qui sont en parfaite conformité avec ceux obtenus par TOSHIHIRO ITOT et al. [74].

Le schéma de fragmentation le plus caractéristique de ces composés est le suivant :



Acide Ursolique

R₁ = Me

R₂ = H

R₃ = Me

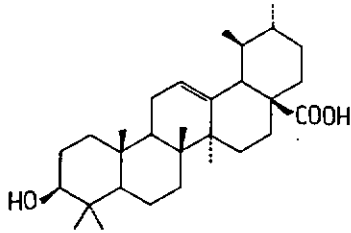
Acide Oléanolique

R₁ = H

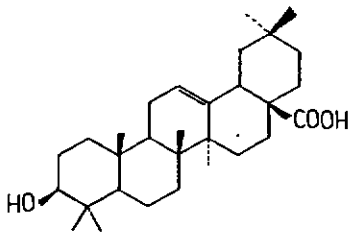
R₂ = Me

R₃ = Me

Ainsi, la fraction triterpénique isolée de la cire contient les acides ursolique et oléanolique (fig. 34).



(a)



(b)

Figure 34 : (a) acide ursolique
(b) acide oléanolique

9.5.2.3. Résultats et discussion

Les analyses précédentes ont été répétées sur les cires de différentes plantes, les mêmes acides triterpéniques ont été trouvés avec toujours une prépondérance de l'acide ursolique.

Dans les cas de plantes résistantes, les acides triterpéniques représentent le pourcentage le plus important des cires.

10. BIOSYNTHESE DES CONSTITUANTS DES CIRES CUTICULAIRES

10.1. HYDROCARBURES

La majorité des alcanes constituant les cires cuticulaires (C_{29} et C_{31}) ont approximativement des chaînes deux fois plus longues que certains acides gras.

D'après la littérature [75], [26], le schéma de biosynthèse des n-alcanes est le suivant :

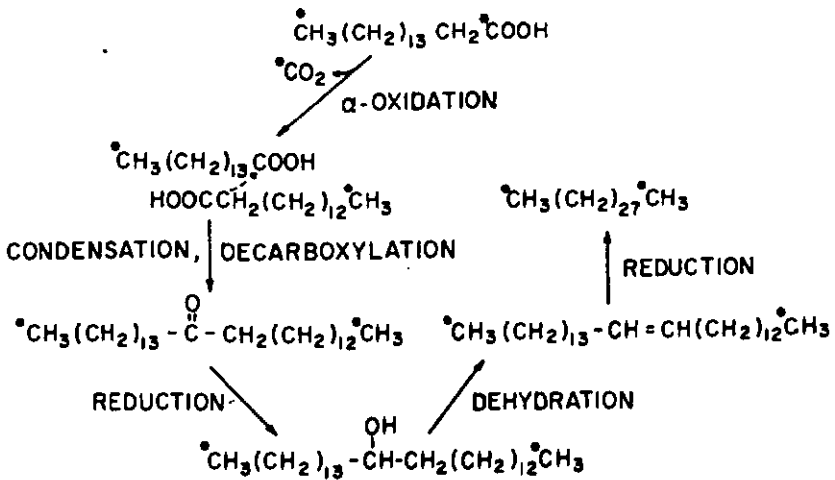


Figure 35 : schéma de biosynthèse des hydrocarbures

La condensation de deux molécules d'un acide génère une cétone qui par réduction donne un alcool secondaire. La déshydratation de celui-ci suivie d'une réduction conduit à un alcane. Ainsi, par ce mécanisme, deux molécules d'acide n-C₁₅ conduisent au n-nonacosane, un des alcanes prédominant des cires. Il est à noter que les acides concernés peuvent être de natures différentes.

10.2. ALCOOLS ET CETONES

Les alcools primaires peuvent résulter de l'hydroxylation des hydrocarbures, et les cétones de la condensation et décarboxylation de deux acides [77].

10.3. ACIDES

Les acides peuvent provenir des alcools [78] selon le schéma de la figure 36.

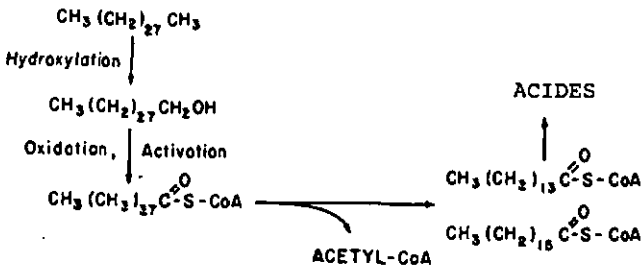


Figure 36 : Schéma de biosynthèse des acides gras

10.4. ESTERS

La formation des esters nécessite généralement une activation des acides. Les réactions concernant leur biosynthèse sont résumées sur la figure 37 [79].

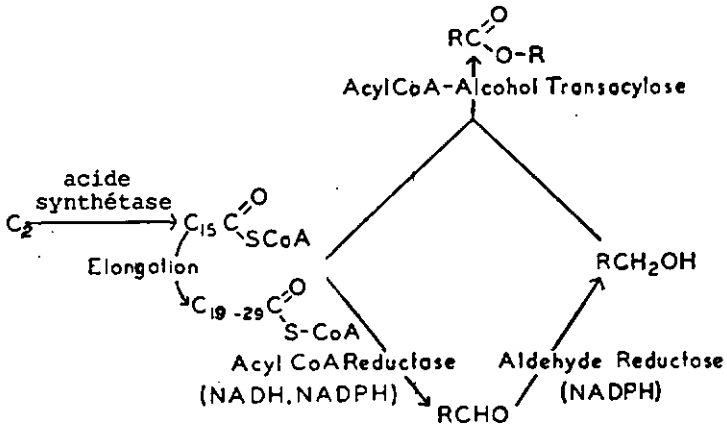


Figure 37 : biosynthèse des esters

10.5. ACIDES TRITERPENIQUES

Les acides oléanoliques et ursoliques sont très probablement formés par oxydation du groupe méthyle en C₁₇ de l' α -amyrine et du β -amyrine (figure 38).

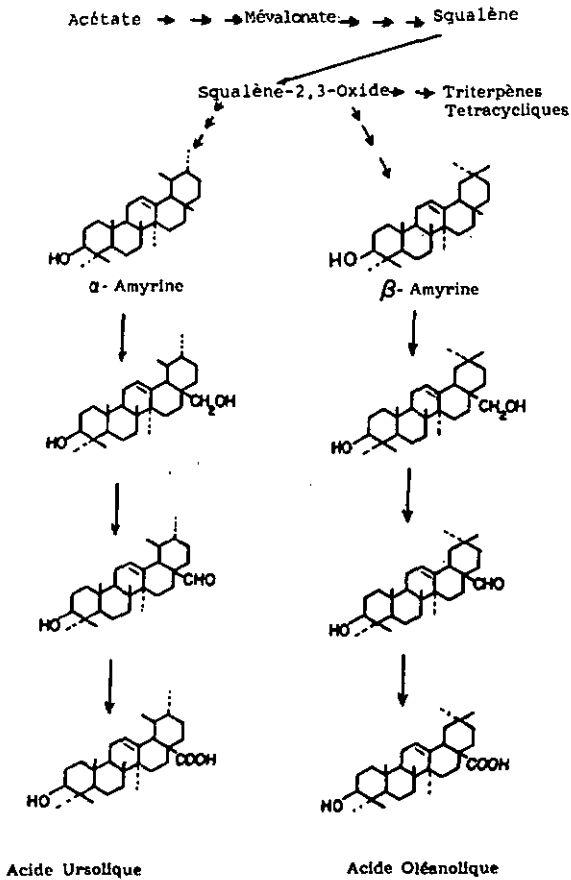


Figure 38 : schéma de biosynthèse des acides triterpéniques dans les plantes

11. RESUME

Notre travail a été présenté au 12^e colloque Scientifique International du Café à Montreux, Suisse (29.6-3.7.1987).

L'article figurant en annexe, qui va être publié dans les acts de ce colloque, résume notre recherche.

12. CONCLUSION

Notre travail a permis d'établir que les caféiers considérés comme résistant à la rouille (Hemileia vastatrix), ont une teneur totale en cires cuticulaires inférieure à celle des caféiers non résistants.

Au cours du développement des feuilles, la teneur en cires cuticulaires augmente pendant les premiers 60-70 jours, puis décroît rapidement.

Il ressort de la comparaison des diagrammes de répartition présentés dans la figure 39 une nette différence de teneur globale en acides entre les plantes résistant ou non à la rouille. De même, mais à un degré moindre, la proportion de composés hydroxylés et carbonylés dans les deux catégories de plantes diffère. Pour les autres familles de composés, les quantités sont du même ordre de grandeur, et il ne semble pas possible d'en tirer un enseignement pratique.

Cependant, on ne peut préjuger de l'influence de différents composants quant à leur proportion, à l'intérieur de ces familles. Une remarque s'impose concernant le triacontanol. Ce composé reconnu par plusieurs auteurs [81], [82], [83], [84] comme accélérateur de croissance dans les plantes, se trouve en moindre quantité dans les deux hybrides résistants.

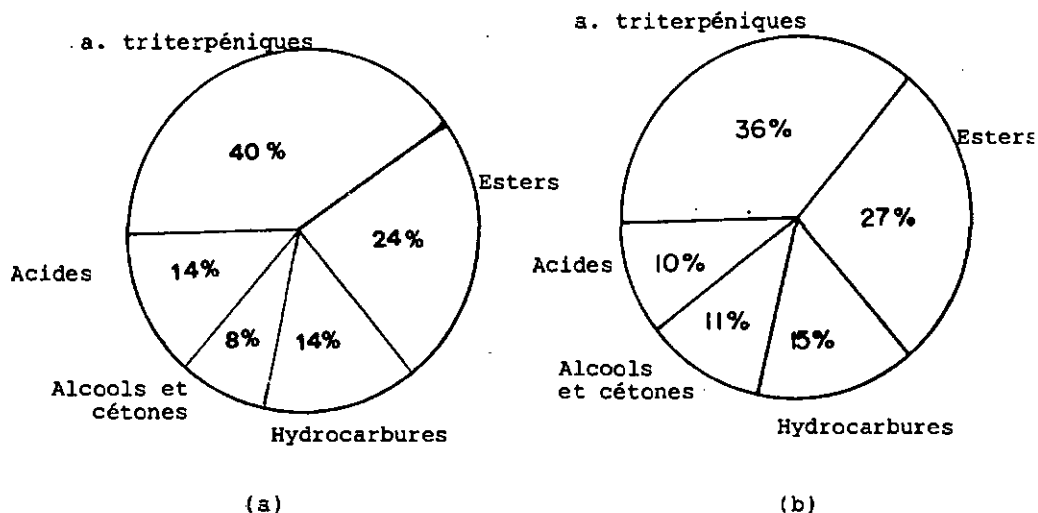


Figure 39 : composition moyenne en pourcents de différentes fractions dans les cires de plantes résistantes (a) ou non résistantes (b) à la rouille du caféier

La théorie mentionnée par la littérature, selon laquelle les cires, donc leurs composants, sont une source de carbone pour les microorganismes, est sûrement valable. Cependant, nous la jugeons insuffisante pour justifier complètement la réaction des plantes examinées vis-à-vis des agents pathogènes.

Les différences quantitatives entre les cires cuticulaires des plantes résistantes ou non à la rouille ont été mises en évidence par un traitement statistique des résultats de l'analyse chromatographique. Les cartes non linéaires obtenues se sont révélées un outil très pratique pour la différenciation entre les deux catégories de plantes.

Elles peuvent aussi être considérées comme un critère chimio-taxonomique.

Les raisons de ces différences sont probablement d'origine génétique. En tant que chimistes, il nous est assez difficile de donner une explication exhaustive.

La méthode utilisée pour la mise en évidence de ces différences est tout à fait originale.

Signalons d'ailleurs qu'une extension de son usage est en cours de réalisation dans le domaine de la comparaison des arômes de café soluble, avec des résultats prometteurs.

Ce travail représente l'unique étude concernant la composition chimique des cires de caféier. C'est aussi la première tentative de caractérisation du point de vue chimique, de la différence entre caféiers réputés résistants ou non. Bien qu'ayant pu mettre en évidence quelques différences chimiques quantitatives entre ces deux catégories de plantes, nous n'avons pas d'éléments déterminants nous permettant une caractérisation effective et univoque. Seules les cartes non linéaires ont conduit à une nette différenciation.

Il demeure que cette technique devrait permettre un test rapide de tout nouvel hybride, s'agissant de la résistance aux agents pathogènes. Par ailleurs, l'exploitation des résultats obtenus au terme de notre travail est du ressort des biogénéticiens.

En conclusion, le problème de la rouille du caféier pourrait être envisagé sous deux angles : l'un concernerait la sélection d'hybrides résistants (exploitation des cartes non linéaires), l'autre prendrait en compte la composition des cires en vue de traitements chimiques. Ce dernier aspect débouche sur le problème de la pollution éventuelle des plantes et des sols.

Il demeure que les motifs de ce travail sont d'une actualité cuisante, si l'on prend en considération l'importance économique de la culture du café, qui pour bien des pays sous-développés représente la seule et unique ressource.

13. PARTIE EXPERIMENTALE

13.1. EXTRACTION DES CIRES

13.1.1. Solvants

- chloroforme pour analyse (Merck)
- acétate d'éthyle
- éther éthylique

13.2. FRACTIONNEMENT DES CIRES

13.2.1. Séparation des hydrocarbures et esters

13.2.1.1. Solvants

- éther de pétrole (40^o-60^oC) (Merck), séché sur potassium - Na₂SO₄ anhydre (Merck)

13.2.1.2. Méthode

50 mg de cires sont mis à reflux pendant 15 minutes dans 20 ml d'éther de pétrole (40^o-60^oC). L'opération est répétée 4 fois. Les extraits sont réunis, séchés sur Na₂SO₄ et le solvant évaporé sous courant d'azote (U.C. 9.9999). Le résidu restant dans le ballon après l'extraction contient les alcools, les cétones et les acides.

13.2.2. Séparation de la fraction des hydrocarbures de celle des esters

13.2.2.1. Appareils

- colonne (L = 25 cm, \varnothing = 1.4 cm) remplie d'alumine neutre d'activité I

13.2.2.2. Solvants

Tous les solvants utilisés sont de pureté analytique.

- éther de pétrole (40^o-60^oC) (Merck) séché sur potassium
- chloroforme p.a. (Merck)
- méthanol (Merck)

13.2.2.3. Méthode

La fraction contenant les hydrocarbures et les esters est soumise à chromatographie sur alumine. L'alumine a été calcinée pendant 16 heures à 400 °C et gardée dans un dessiccateur contenant du silica gel. L'alumine avec une activité inférieure à I ne donne pas une bonne séparation des paraffines et des esters. Lors d'une première élution avec 100 ml d'éther de pétrole, nous récupérons les hydrocarbures. Une deuxième élution avec 75 ml de chloroforme, suivie d'une troisième avec 75 ml de méthanol, nous permet la récupération des esters.

13.2.3. Séparation de la fraction des alcools et cétones de celle des acides

13.2.3.1. Solvants et réactifs

- éther éthylique p.a. (Merck)
- solution KOH 1 %
- HCl 25 %
- NaHCO_3 5 %
- eau désionisée et bidistillée

13.2.3.2. Méthode

Le résidu contenant les acides, les alcools et les cétones est dissous dans 10 ml d'éther éthylique. La solution étherée est extraite quatre fois avec 4 portions de 10 ml de KOH + %. Nous obtenons une solution étherée (SE1) et une solution alcaline (SA1). La solution alcaline SA1 est acidifiée avec HCl 25 %. Les acides précipités sont récupérés par de l'éther éthylique. La solution étherée SE2 est extraite 4 fois avec 10 ml de NHCO_3 5 %. Nous obtenons une solution alcaline SA2 et une solution étherée SE3. La solution alcaline SA2 est acidifiée avec HCl 25 % et les acides libres récupérés avec de l'éther. Dans la solution SE3 restent les acides triterpéniques. La solution étherée SE1 est traitée avec HCl jusqu'à neutralité et lavée avec de l'eau distillée. Dans cette solution, nous avons les alcools et cétones (fig. 6).

13.3. ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES DIFFERENTES FAMILLES
DES COMPOSES DES CIRES CUTICULAIRES

13.3.1. Appareils

- spectromètre IR Zeiss 2M
- chromatographe Varian Vista 6.000 avec détecteur FID
- intégrateur Vista 401
- chromatographe Dani 3.900 avec détecteur FID
- chromatographe Dani 6.500 avec détecteur FID
- colonne capillaire -silice fondue- CP WAX 51 (L = 40 m;
DI = 0.32 mm; épaisseur du film : 0.2 mm - CHROMPACK)
- colonne capillaire en silice fondue OV1 (L = 30 m;
DI = 0.32 mm; épaisseur du film : 0.3 mm)
- colonne en verre (L = 3 m; DI = 4 mm) remplie de DEGS
18 % sur chromosorb W. 60/80
- spectromètre de masse et JMS-01SG-2 avec Data system
VG-250
- spectromètre de masse Nermag R30-10
- spectromètre de résonance magnétique nucléaire Bruker
WP 200
- ordinateur Olivetti 20M
- ordinateur IBM 340

13.3.2. Solvants et réactifs

Tous les solvants et réactifs utilisés sont de pureté analytique. Tous les solvants ont été séchés sur tamis moléculaire.

- éther éthylique p.a. (Merck)
- chloroforme p.a. (Merck)
- benzène p.a. (Merck)
- méthanol p.a. (Merck)
- hexane p.a. (Merck)
- acide acétique p.a. (Merck)
- $H_2Cr_2O_7$ p.a. (Merck)
- solution KOH 1 %
- HCl 25 %
- $NaHCO_3$ 5 %
- BF_3 -MeOH
- sulfate de méthyle p.a. (Merck)
- eau désionisée et bidistillée
- silica gel G (Merck)
- témoins hydrocarbures (Poliscience-U.N)
- témoins alcools et cétones (Poliscience-U.N)
- témoins acides (U.N.-E.K.)

13.3.3. Méthodes

13.3.3.1. Hydrocarbures

(CGL) Colonne CP WAX 51 (capillaire)

gaz vecteur He: pression 1.2 bar

détecteur F.I.D.

T. inj. : 200

T. dect. : 200°

Programme Isotherme 120°C pendant 8 minutes, puis
5°/min + 250°C

Le traitement mathématique des données chromatographiques a été fait avec l'ordinateur IBM 370.

13.3.3.2. Alcools et cétones

Un contrôle de la fraction a été fait par chromatographie sur couche mince. Des plaques de silica gel G de 250 μ d'épaisseur ont été préparées au laboratoire. Après activation pendant 24 heures à 100°C, elles ont été gardées dans un dessiccateur. Les plaques ont été éluées d'abord avec de l'hexane, puis avec du benzène. La détection a été faite au moyen de H₂SO₄ 50 %, puis les plaques ont été chauffées à 180°C pendant 30 minutes pour la révélation.

(CGL) - colonne CP WAX 51 (capillaire)

- gaz vecteur He; pression 1.3 bar

- détecteur : F.I.D.

- T. inject. : 180°C

- T. dect. : 180°C

- Programme Isotherme 60°C pendant 10 minutes,
puis 3°C/minutes \rightarrow 100°C pendant 2 minutes,
puis 4°C/minutes \rightarrow 230°C.

Le traitement mathématique des données chromatographiques a été fait avec l'ordinateur IBM 370.

13.3.3.3. Acides

Chromatographie sur papier :

Nous avons employé des bandes de papier Whatmann II.

L'élution a été faite avec CH_3COOH 90 %. Les taches sont mises en évidence au moyen d'une solution de bichromate de potassium (5 %) dans H_2SO_4 (40 %).

GCL : - colonne DEGS (18 % en Chromosorb W 60/80
- gaz vecteur N_2 ; 30 ml/min.
- détecteur F.I.D.
- t. injecteur 210°C
- t. détecteur 210°C
- isotherme 200°C

13.3.3.4. Esters

GCL : - colonne CP Sil 5 (capillaire)
- gaz vecteur He, pression 1.2 bar
- détecteur F.I.D.
- T. injecteur 190°C
- T. détecteur : 190°C
- Programme : Isotherme 150°C pendant 5 minutes, puis $5^\circ/\text{min.} \rightarrow 325^\circ\text{C}$.

13.3.3.5. Acides triterpéniques

GCL : - colonne OV 1 (capillaire)
- gaz vecteur He
- T. injecteur 170°C
- T. détecteur 170°C
- Programme : Isotherme 120°C pendant 5 minutes, puis $3^\circ/\text{minutes} \rightarrow 310^\circ\text{C}$.

14. COLLECTION DE SPECTRES

HYDROCARBURES

1. n-nonadécane
2. n-eicosane
3. n-heneicosane
4. n-tétracontane
5. n-pentacosane
6. n-octacosane
7. n-triacontane

ALCOOLS ET CETONES

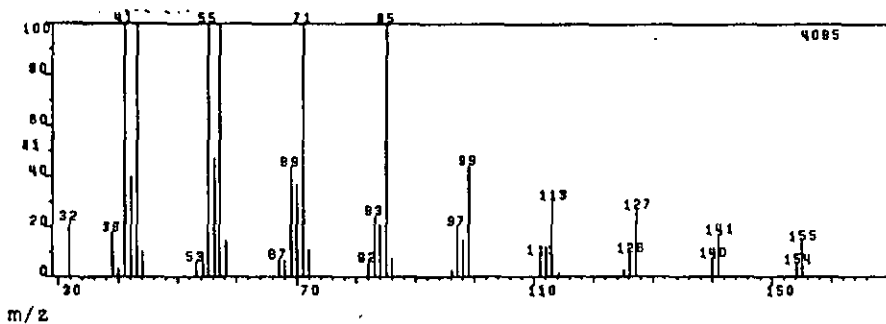
8. 1-octanol
9. 1-nonanol
10. 1-décanol
11. 1-undécanol
12. undécane-5-one
13. tridécane-7-one
14. 1-dodécanol
15. 1-tridécanol
16. 1-octadécanol
17. 1-nonadécanol
18. heicosane 11-one
19. docosanol
20. 1-tétracosanol
21. 1-hexacosanol
22. tétracosanediol
23. Nonacosane-15-ol
24. 1-nonacosanol
26. Hentriacontane-9-one
27. 1-hentriacontanol
28. 1-dotriacontanol
29. 1-tritriacontanol
30. tritriacontane-16,18-dione
31. 1-tétratriacontanol

ESTERS

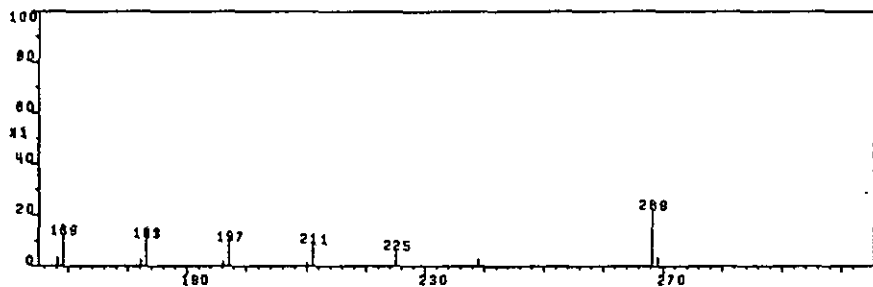
32. docosanoate d'octanoyle
33. octacosanoate d'octanoyle
34. eicosanoate d'octadécanoyle
35. hexadécanoate d'octadécanoyle
36. octadécanoate de dodécanoyle

ESTERS METHYLIQUES

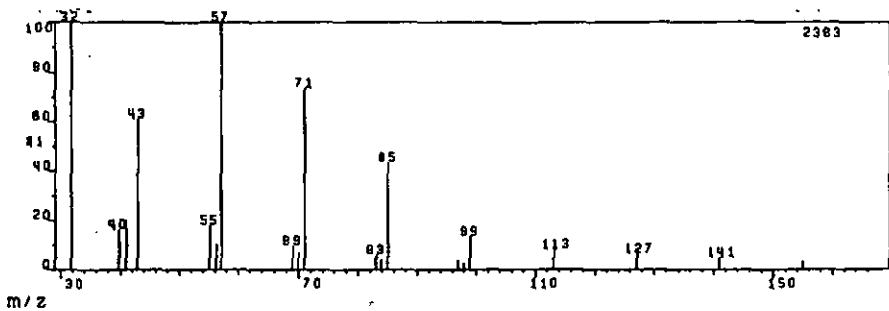
37. myristate de méthyle
38. palmitate de méthyle
39. arachidate de méthyle



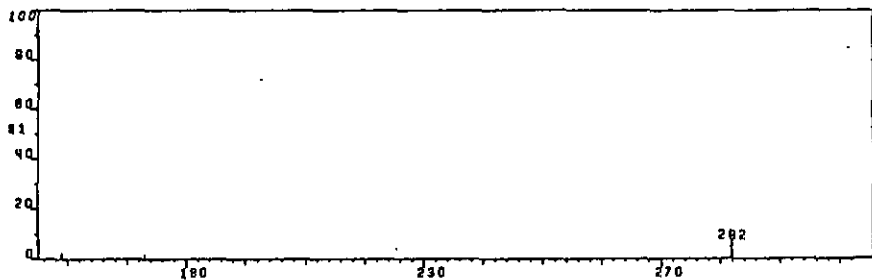
m/z



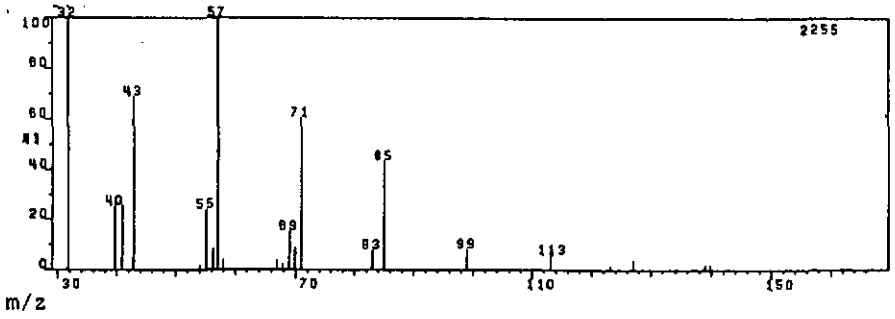
1. n-nonadécane



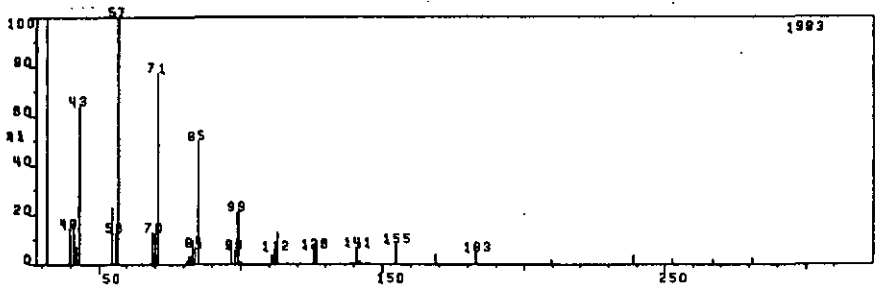
m/z



2. n-eicosane

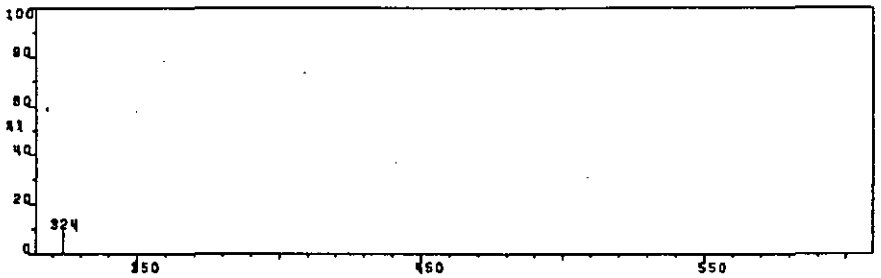


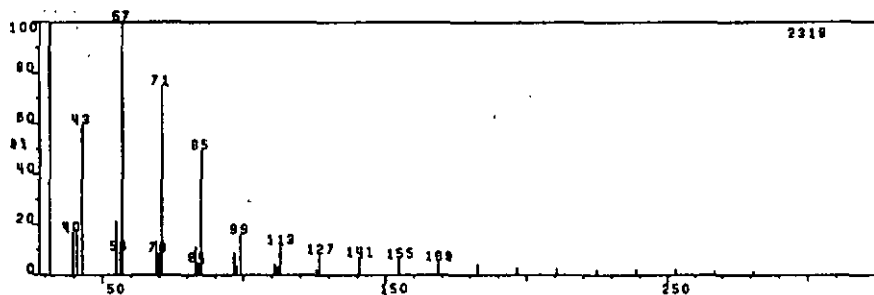
3. n-heneicosane



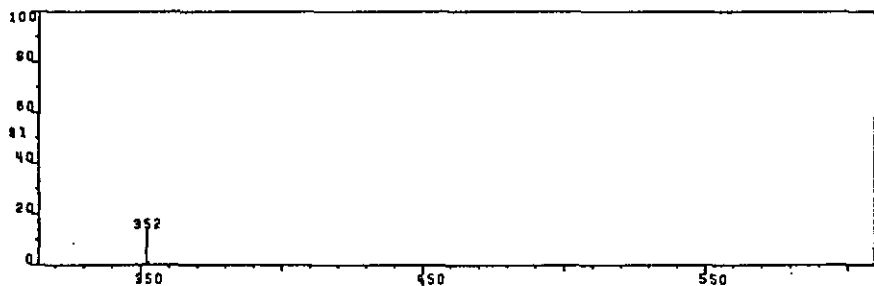
m/z

4. n-tétracosane

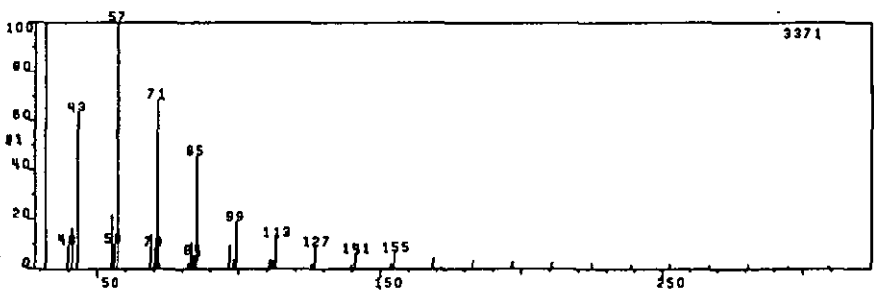




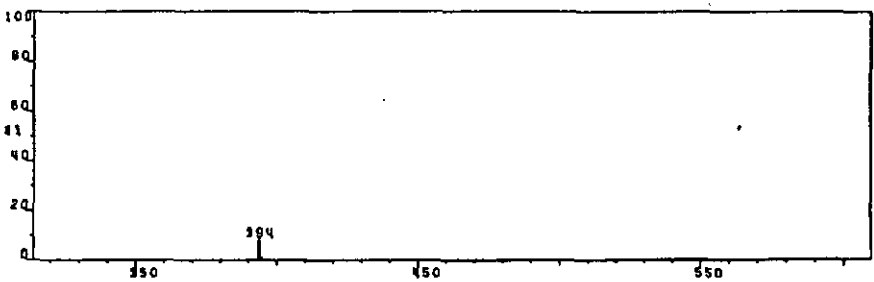
m/z



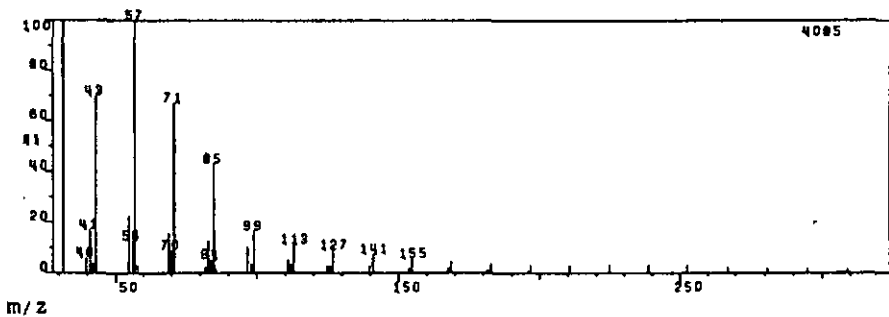
5. n-pentacosane



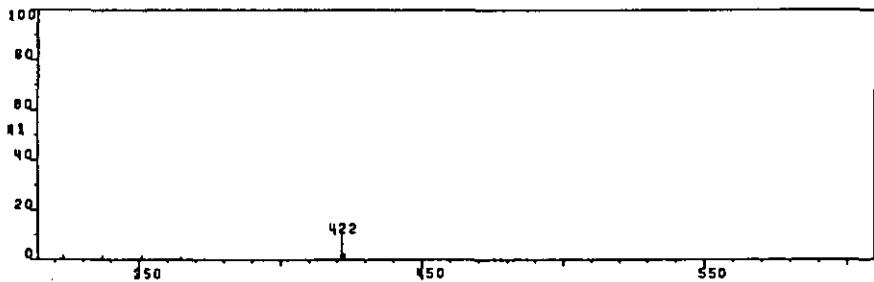
m/z



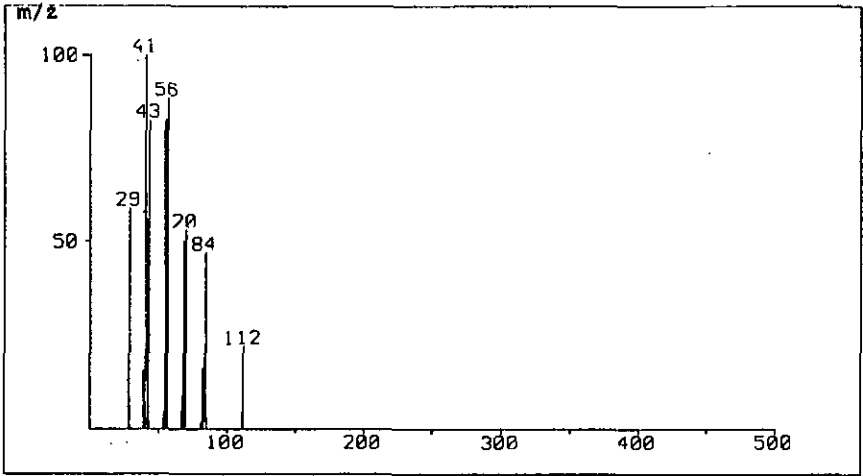
6. n-octacosane



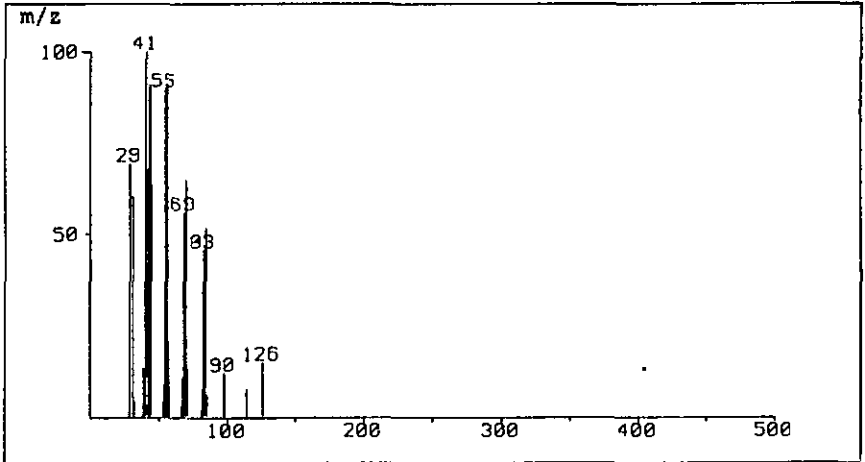
m/z



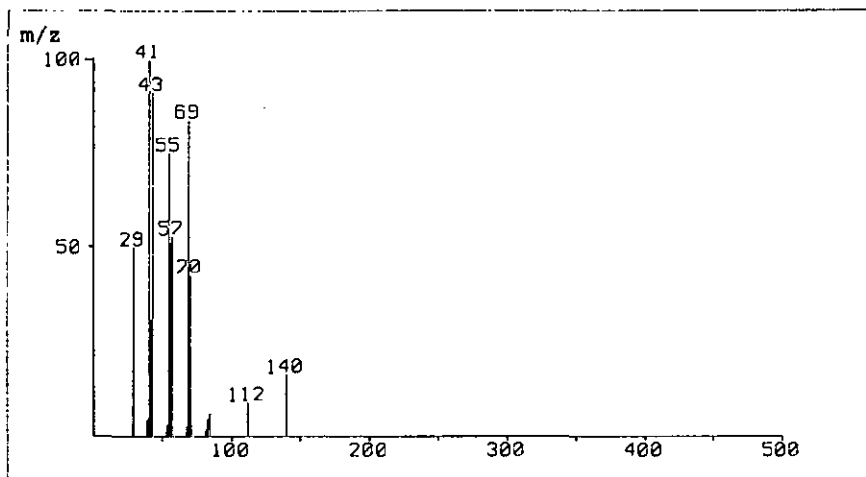
7. n-triacontane



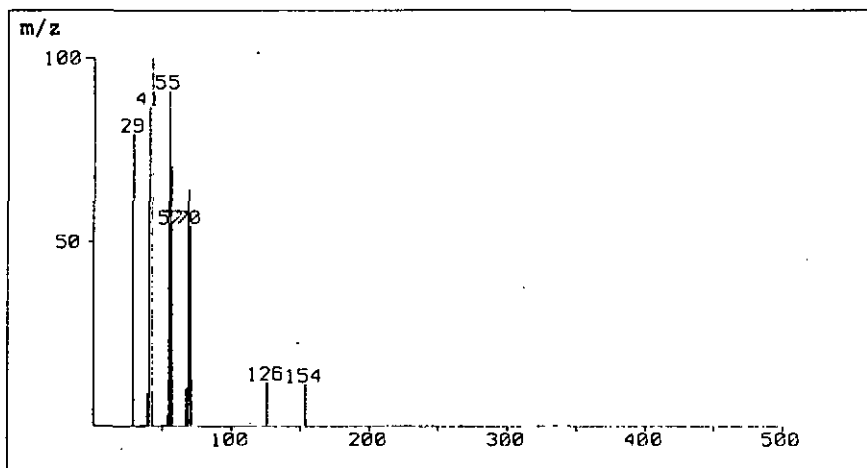
8. 1-octanol



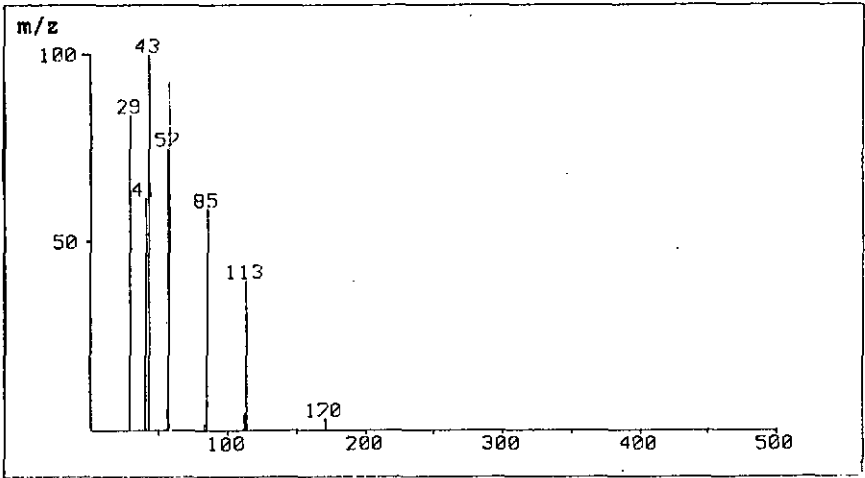
9. 1-nonanol



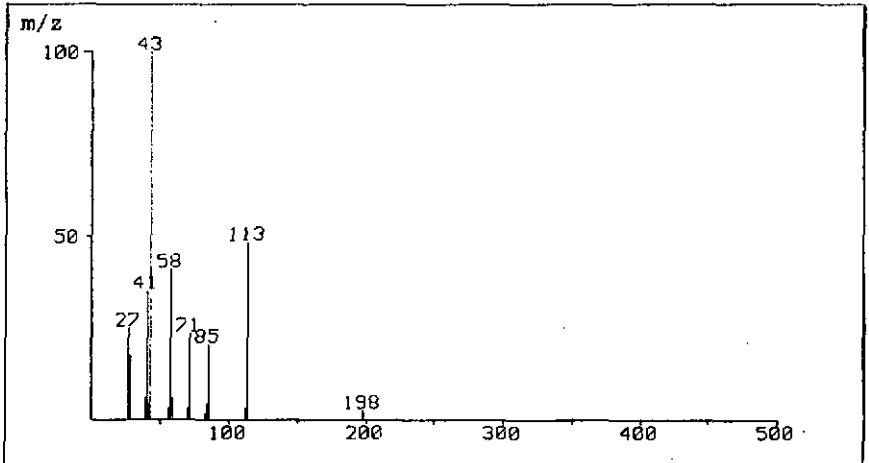
10. 1-décanol



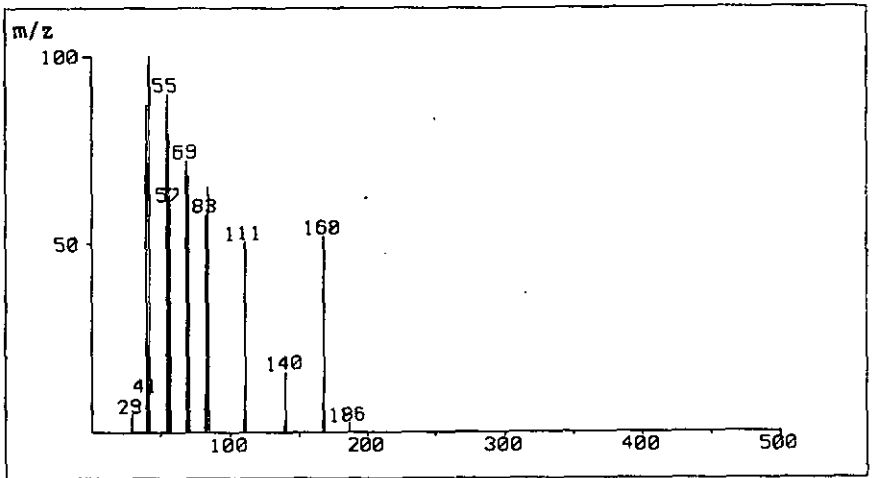
11. 1-undécanol



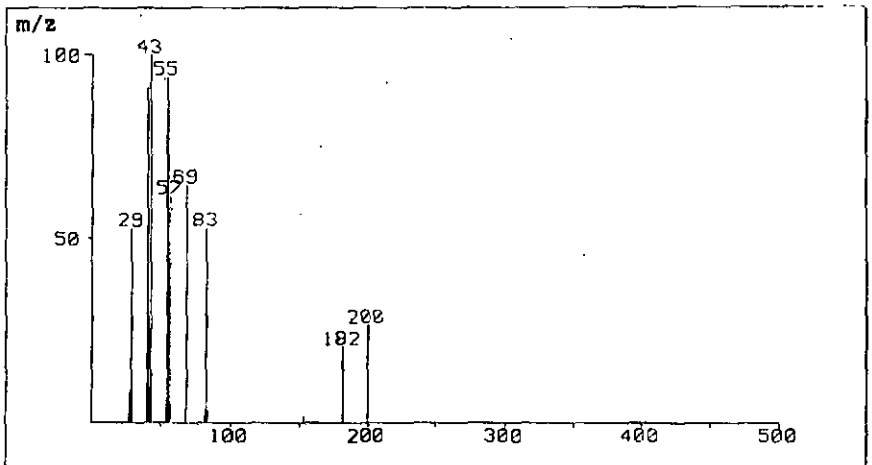
12. undécane 5-one



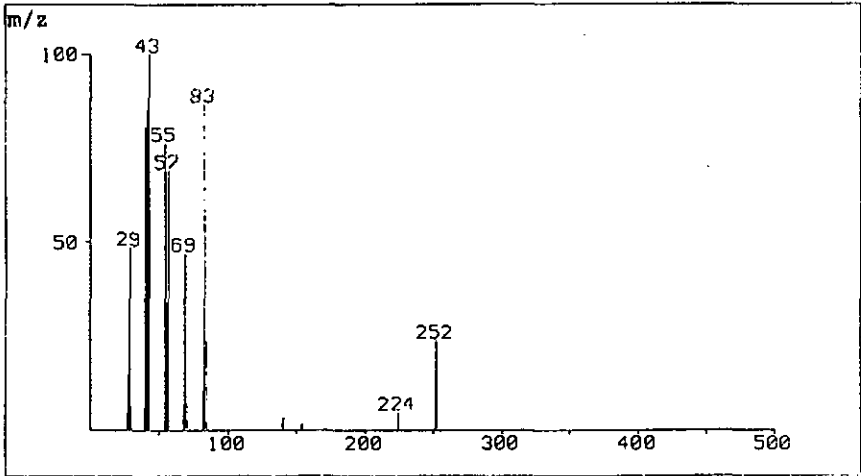
13. tridécane 7-one



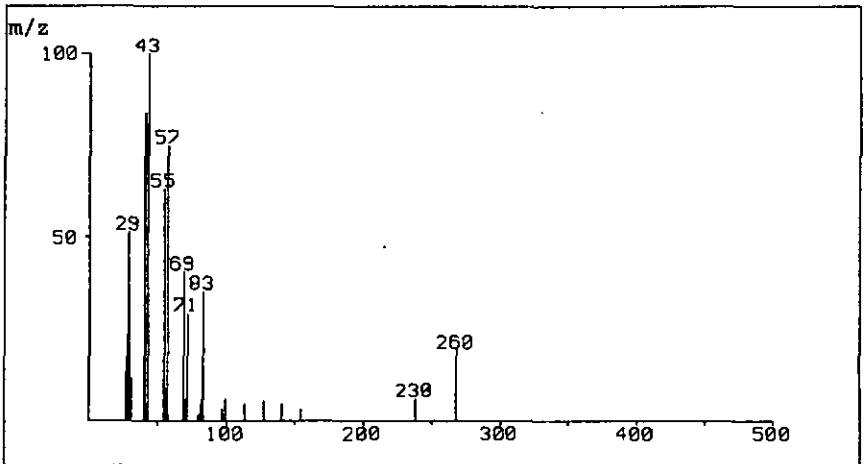
14. 1-dodécanol



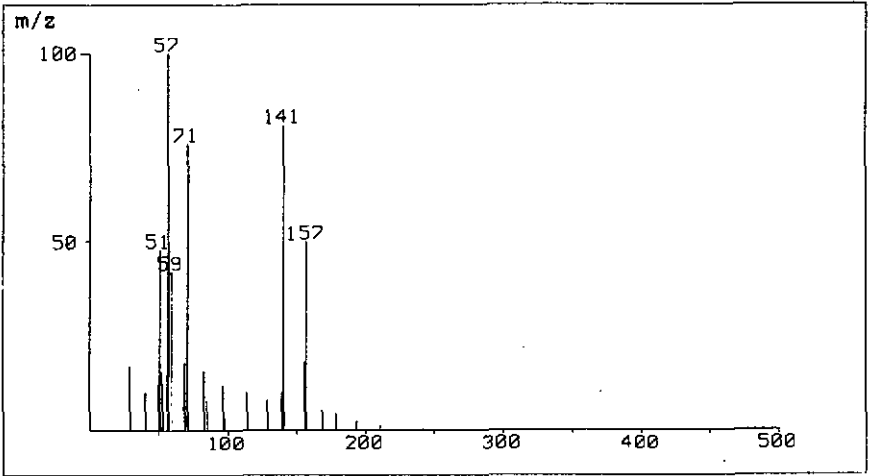
15. 1-tridécanol



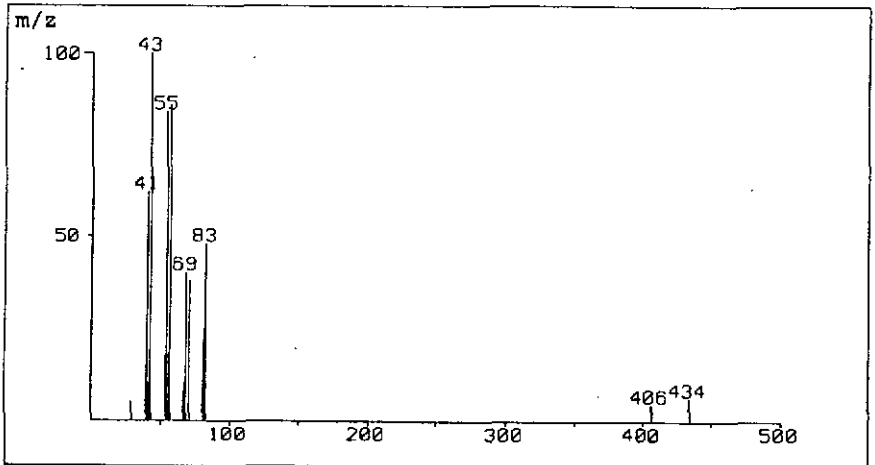
16. 1-octadécanol



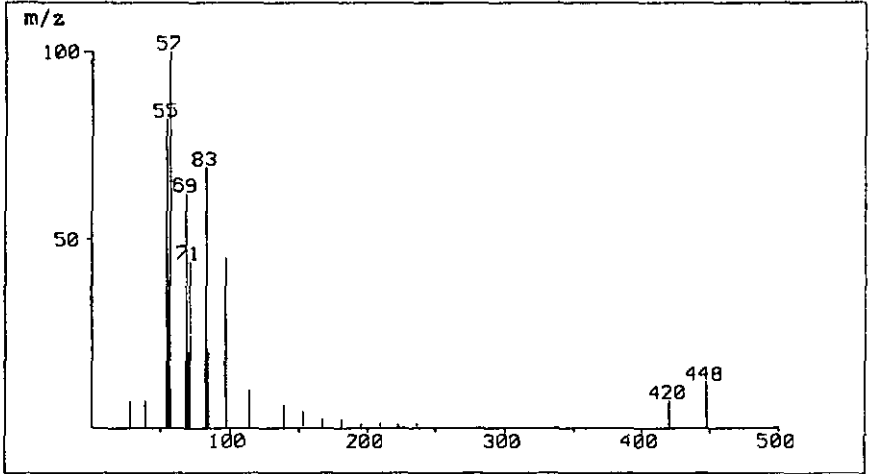
17. 1-nonadécanol



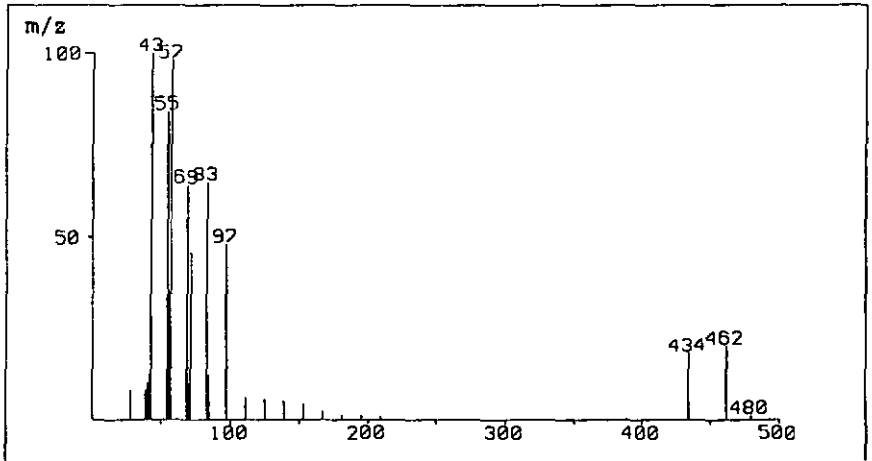
26. hentriacontane-9 one



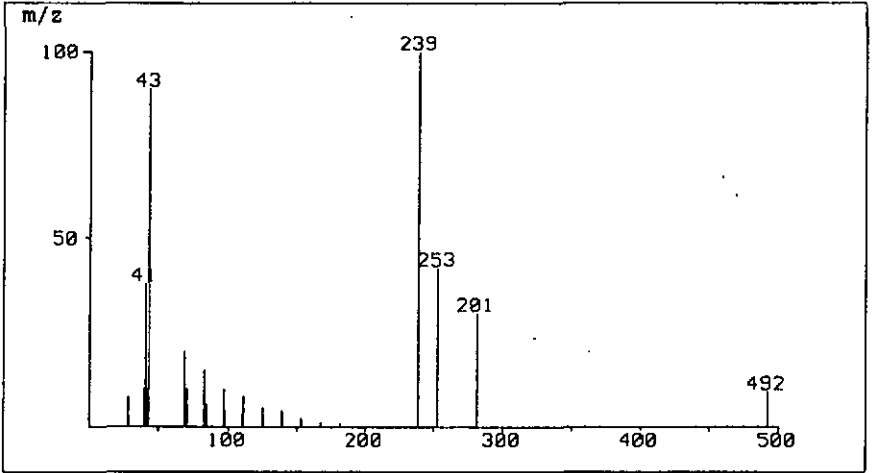
27. 1-hentriacontanol



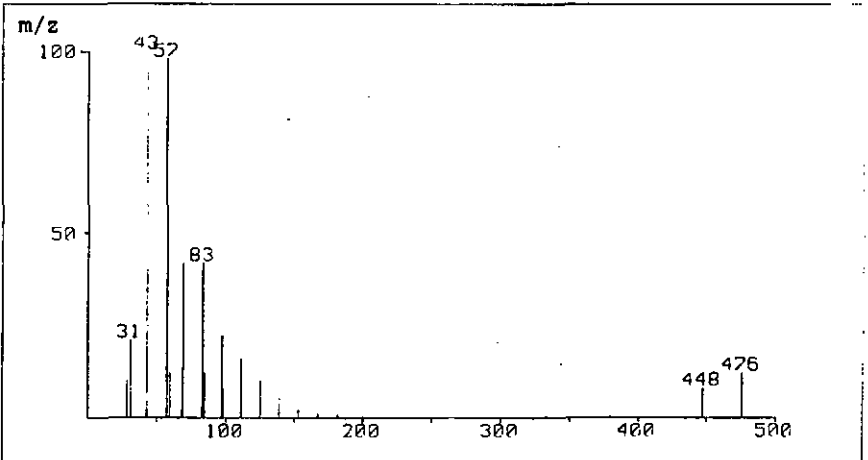
28. 1-dotriacontanol



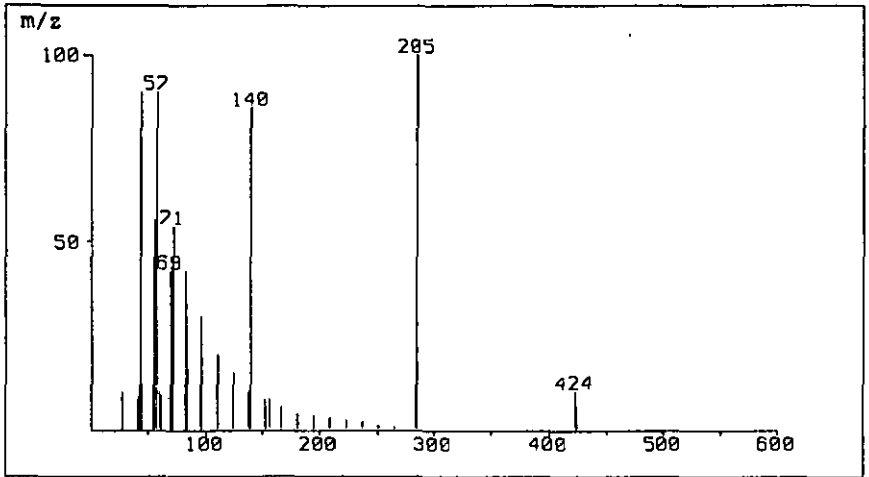
29. 1-tritriacontanol



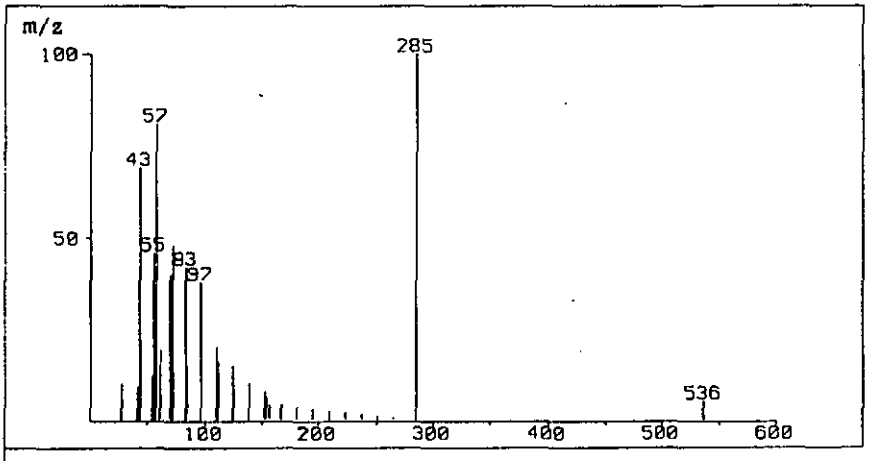
30. tritriacontane-16,18-dione



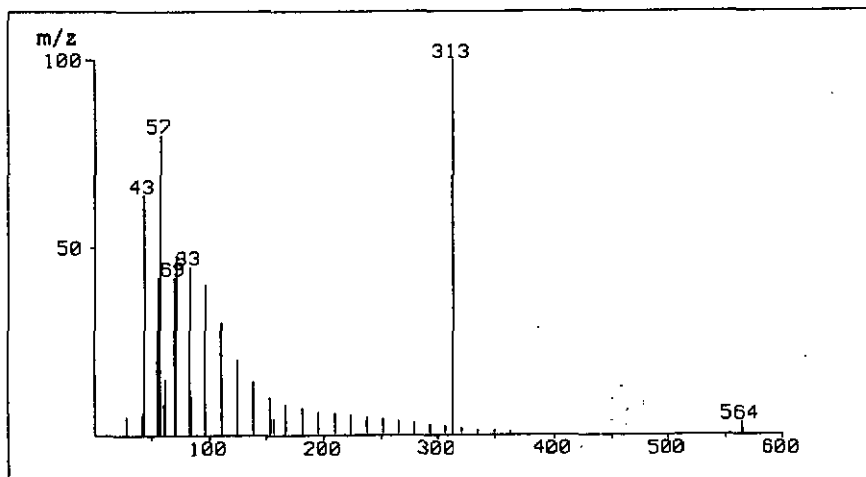
31. 1-tétratriacontanol



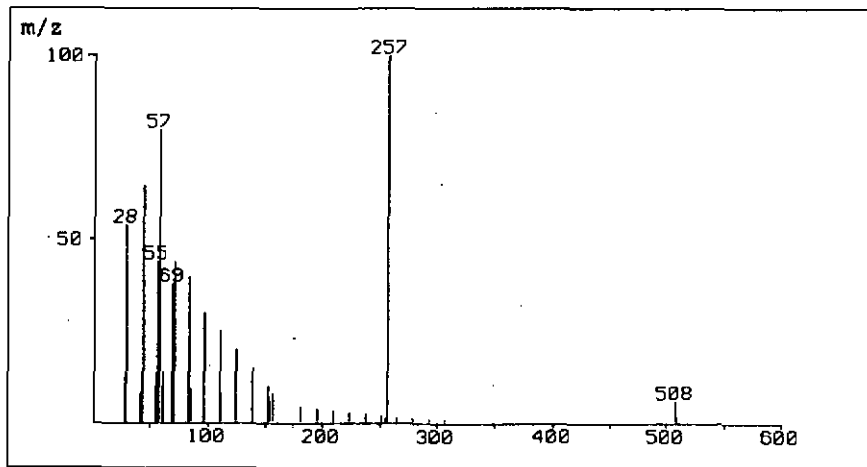
32. docosanoate d'octanoyle



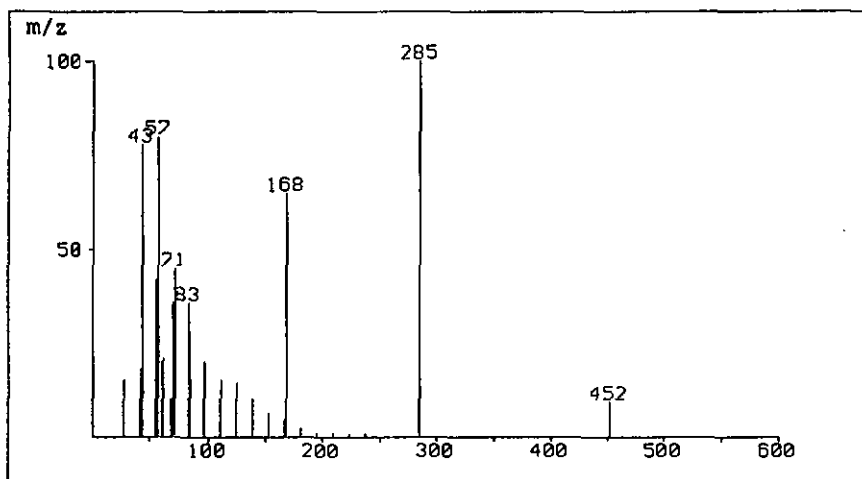
33. octacosanoate de décyle



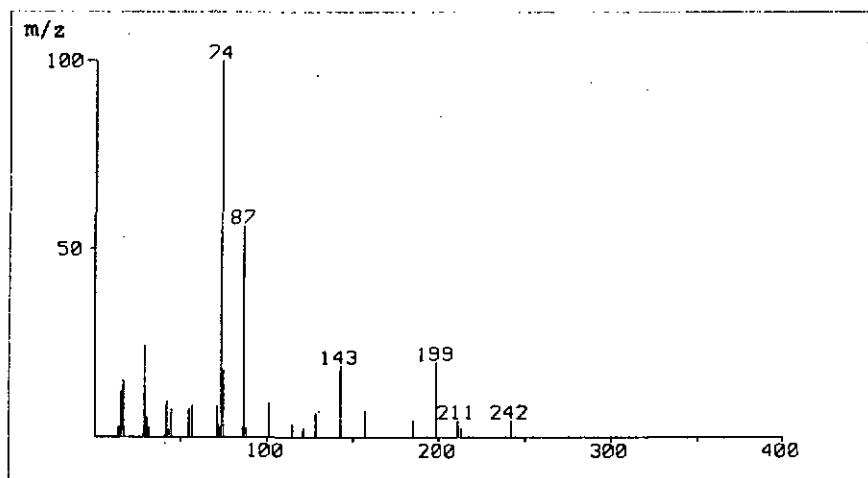
34. eicosanoate d'octadécanoyle



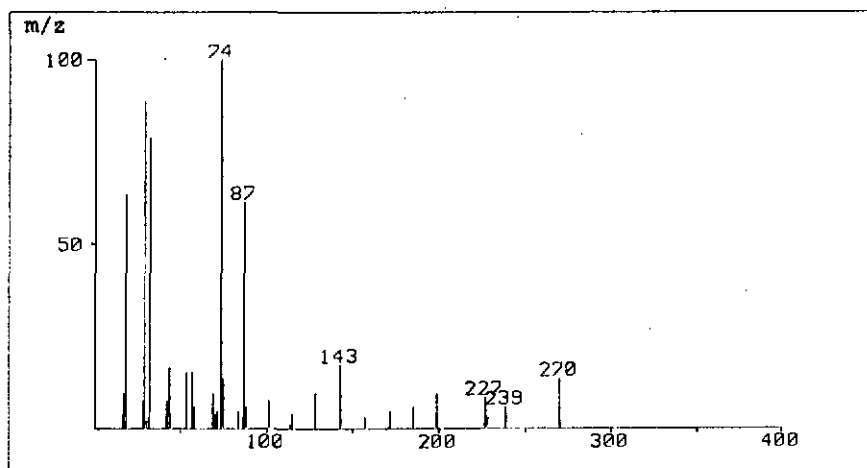
35. hexadécanoate d'octadécanoyle



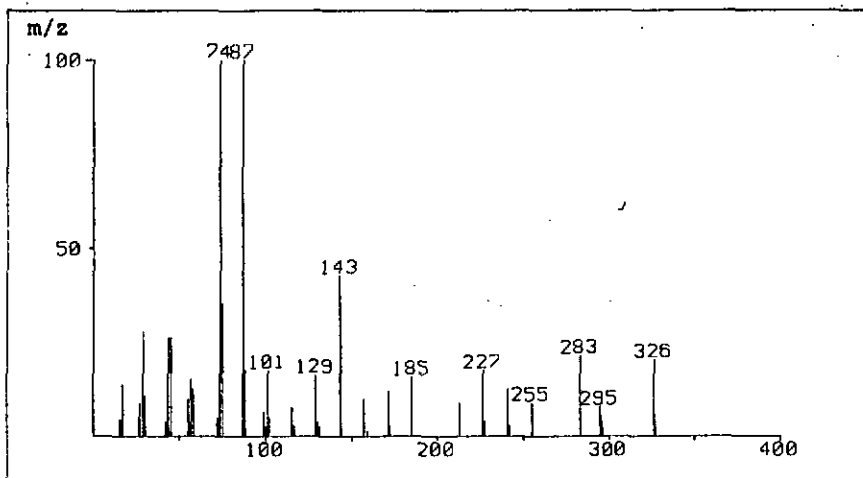
36. octadécanoate de dodécanoyle



37. myristate de méthyle



38. palmitate de méthyle



39. arachidate de méthyle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COSTE R., *Le caféier et les cafés dans le monde*, Editions Larose, Paris (1955)
- [2] BERNHARD R. *Coffee Production*, GORDIAN-Max-Rieck GmbH, Hamburg (1980)
- [3] SIVETZ M., DESROSIER, NORMAN W., *Coffee technology*. AVI Publishing Company INC. Westport. Connecticut (1979)
- [4] CHALARCA J., HERNANDEZ S., *EL CAFE - IMPRENTA RETRO-GRABADO*, BOGOTA 1974
- [5] COSTE R., *El Café* Editorial Blume, Barcelona, 1968
- [6] FRANCO C.M., *Influence of temperature on growth of Coffee plant*. I.B.E.C. Res. Inst. Bull. no. 16, 24 p., 1958
- [7] HALLAM N., *In Ecology of Leaf surface*, Edited by Preece T., Dickinson C., Academic Press, London, 1971, pp. 39-53
- [8] BOYER J. - *Comportement hydriques de deux grands groupes de Coffea canephora de Côte-d'Ivoire*. Café, Cacao, Thé, no. 4, oct-dic 1965, p. 263-281
- [9] KANEDA T., *Biochemistry* 6, p. 2023-2032, 1967)
- [10] KOLATTUKUDY P., WALTON T., *Progress Chemistry Fats other Lipids*, 13, p. 119-173, 1972
- [11] GANOU K., KAWASHIMA N., *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, No. 3, p. 645-652, 1981
- [12] STOCKER H., WANNER H., *Phytochemistry*, 14, 1919, 1975
- [13] EGLINTON G., HAMILTON R., *Science*, 156, p. 1322-1335, 1967
- [14] MARTIN J., BATT R. *Annals Applied Biology*, 46, (3), p. 375-387, 1958
- [15] RAO G., BASHA M., RAO R., *Indian Journal of Experimental Biology*, 19, p. 880-881, 1981
- [16] DEWEY O., HARTLEY G., Mac LAUCHLAN J., *Proceedings of the Royal Society*, 55, 532, 1962
- [17] MITCHELL J., SMALE B, METCALF R., *Advances in pest Control Research*, 3, 359, 1960
- [18] MARTIN J. et al., *Nature*, 180, p. 797-799, 1957

- [19] MOYNA P., RAMOS G, TOTN J., *Phytochemistry*, 17, p. 556-557, 1978
- [20] MARTIN J., *Plant Protection Conference*, Butter, worth's Scientific Publication, London, 1956, pp. 104-112
- [21] WANG S., PINCKARD J., *Phytopathology*, 63, p. 315-319, 1913
- [22] LAMPARD J., CARTER A., *Annals Applied Biolog.*, 73, p. 31-37, 1937
- [23] PURDY J., TRUTER V., *Proceeding of the Royal Society*, 158, p. 536-543, 1963
- [24] BAKER E., NUNT G., *New Phytologist.*, 88, p. 731-747, 1981
- [25] SILVA M., BAKER E., MARTIN J., *Annals Applied Biology*, 53, p. 43-58, 1964
- [26] ROBERTS M., MARTIN J., PERIES O., *Annu. Rep. Long Ashton Res. Sta. for 1960*, p. 102, 1961
- [27] MOLD J. et al., *Biochemistry*, 3, 1293, 1964
- [28] TOLLOCH A., BERGTER L., *Phytochemistry*, 20, p. 2711-2716, 1981
- [29] TULLOCH A., *Phytochemistry*, 12, p. 2225-2232, 1973
- [30] FABOYA J., OKOGUN J., GODDARD D., *Phytochemistry*, 19, p. 2462-2463, 1980
- [31] BIACS A., *In Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, Edited by Appelquist L., Lillienberg C., North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979, pp. 275-280
- [32] BAKER E., PROCOPIOV J., NUNT G., *Journal of the Sciences of food and Agriculture*, 26, p. 1093-1109
- [33] FREEMAN B., ALBRIGO L., BIGGS R., *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104, p. 398-403, 1979
- [34] RADLER F., HORN D., *Australian Journal Chemistry*, 18, p. 1059-1069, 1965
- [35] RADLER F., *Australian Journal of Biology*, 18, p. 1045-1056, 1965
- [36] KENEDA T., *Biochemistry*, 6, p. 2023-2032, 1967
- [37] CASAL H., MOYNA P., *Phytochemistry*, 18, p. 1738-1739, 1979

- [38] UCHIYAMA T., OGASANARD N., Agricultural and Biological Chemistry, 45, No. 5, p. 1261-1263, 1981
- [39] KOLATTUKUDY P., Lipids, 5, p. 398-402, 1964
- [40] KOLATTUKUDY P., Biochemistry, 4, p. 1844-1855, 1965
- [41] LEHMANN H., Asesoría para el proyecto de la GT2, Control de la Roya del Cafeto en Colombia, Institut für Pflanzen Pathologie der Georg-August-Universität, 1979, pp. 35-38
- [42] STRASKY K., STREIBL M., KUBELKA V., Collection Czechoslovak Chemistry Commun., 35, p. 882-819, 1970
- [43] ITD S., SUZUKI T., FUJINO Y., Nippon Nogeikagaku Karshi, 55, No. 3, p. 247-253, 1981
- [44] SALASOO I., Journal Bptamy. 59, No. 7, p. 1189-1191, 1981
- [45] EGLINTON G., HUNNEMAN D., Phytochemistry, 7, p. 313-322, 1968
- [46] DEVERALL J., Defence Mechanisms of Plants 1a. edition, Ed. Cambridge Press, London, 1977; p. 12
- [47] BELL A., Annula Review of Plant Physiology, 32, p. 21-81, 1981
- [48] JENNINGS W., Gas chromatography with Glass Capillary Columns, 2a Ed., Academic Press, New York, 1980, pp. 119-127
- [49] HALDANG W., LANGLAIS R., KUGLER E., Analytical Chemistry, 150, No. 13, p. 1829-1832, 1978
- [50] SPITELLER M., SPITELLER G., Massenspektrensammlung, Springer-Verlag, Wien, 1973
- [51] NAKANISHI K., Practical Infrared Absorption Spectroscopy, Ed. Nakado Company, Tokio, 1962
- [52] SILVERSTEIN R., BASSLER G., MORRLL T., Spectrometric identification of organic compounds, third edition, John Wiley, New York, 1974
- [53] GRASSELLI J., Atlas of spectral date and Physical constants for organic compounds, CRC Press, Ohio, 1974
- [54] WOLLRAB V., Collection Cechoslovak Chemistry Commun., 33, p. 1584-1600, 1968
- [55] SCHMIDT H., Fette-Seifen-Anstrichmittel., 83, p. 395-401, 1981

- [56] STRANSKY K., STREIBL M., SORM F., Collection Cechoslovak Commun. 33, p. 416-424, 1968
- [57] NAGY B., NODZELISKY V., MURPHY M., Phytochemistry, 4, p. 945-950, 1965
- [58] MAGGON K. et al., Journal Genetical Microbiological, 59, 119, 1969
- [59] PURDY Y, TRUTER V., Proceedings of the Royal Society 158, p. 553-565, 1963
- [60] TULLOCH A., HOFFMAN L., Lipids, 8, 617, 1973
- [61] OSAWA T., NAMIKI M., Agricultural and Biological Chemistry, 45, p. 735-739, 1981
- [62] PURDY J.-TRUTER V., Proceedings of the Royal Society, 158, p. 542-544, 1963
- [63] MURRAY K.E., SCHULTEN H.R., Chemistry and Physics of Lipids, 29, p. 11-21, 1968
- [64] GARCIA B. et al., Journal of Natural Products, 44, p. 111-113, 1981
- [65] MARTIN J., JUNIPER L., The cuticle of plants. 1ère édition. Ed. Edward Arnold, London, 1970, p. 267
- [66] MORENO R. "Avances en la obtención de variedades de café resistentes a la roya del Cafeto", Federación Nacional de Cafeteros, Manizales, 1982
- [67] BUITRAGO DE SERNA H., Informe de Labores, CENICAFE, 1982
- [68] KRISHEN A. Journal of Chromatographic Science, 15, p. 434-439, 1977
- [69] KRUSKAL J., Psychometrika, 29, No. 2, 1964
- [70] ESHUIS W., KISTEMAKER P1, MEUZELAAR H., In some Numerical Aspects of Reproducibility and Specificity. Edited by ROLAND C. and CRAMERS C., Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, 1977, pp. 151-166
- [71] ZAMUDIO V., Informe Interno L.I.Q.C. Programa para la interpretación de datos multidimensionales reduciéndolos a 2 dimensiones, Bogota, Novembre 1979
- [72] P.E. KOLATTUKUDY, R. CROTEAU and J.S. BUCKNER, Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes (Book), 1976
- [73] HIROSHI NAKAGAWA and SHIN TSUGE, Characterization of hydrocarbon waxes by Gaz-liquid Chromatography with a high-resolution glass capillary column. Chrom, 15, 393-409, 1983

- [74] TOSHIHIRO ITOH, HIROVUKI TANI, KOICHI FUKUSIMA, TOSHITATE TAMURA, TARO MATSUMOTO, Structure-retention Relationship of Sterols and triterpenes alcohols in gas Chromatography on a glass capillary column, Journal of Chromatography 234, 1982, 65-76
- [75] H.J. CANNON and A.C. CHIBNALL, Biochem. J., 23, 1929, 168
- [76] E. CLENSHAW and I. SMEDLEY-MAC LEAN, Ibid., 28, 1956, 107
- [77] P.E. KOLATTUKUDY, Science, 159, 1968, 498
- [78] ZAMUDIO V., HAVERKAMP J., Estudio por Pirolysis-Espectrometria de masas del hongo Hemileia vastatrix y de su acción sobre las hojas de cafetos, L.I.Q.C. Bogota, 1981
- [79] EIGHT PEAK INDEX OF MASS SPECTRA, Third edition, Vol. 1, Part 2, Mol WT 240-END, 1983
- [80] SHÔ ITÔ et coll. Substituent effect on the methyl signals in the NMR Spectra of Olean-12-EN-3 β -Ols EFFECT OF THE HYDROXYL AND ACETOXYL GROUPS, Tetrahedron Letters No. 34, 1969
- [81] Ries-Stanley K., Wert-Violet, Sweeley-Charles C., Leavitt-Richard A., Triacontanol : a new naturally occurring plant growth regulator, Science, vol. 195 (4284), p. 1339-41.
- [82] Nilsen-Stein, Eriksen-Berglen, Is triacontanol a growth regulator in plants ?, Naturen (3), p. 71-4
- [83] Hoagland-Robert-E., Effects of triacontanol on seed germination and early growth, Bot Gaz (Chicago), vol. 141(1), p. 53-5
- [84] Ries-Stanley, Houtz-Robert, Triacontanol as a plant growth regulator, HortScience, vol. 18(5), p. 654-62