



Tentative de discrimination morphologique, génétique, chimique et sensorielle de poivres sauvages de l'Océan Indien

Action 1. Caractérisation, authentification, amélioration des produits et procédés

Activité 1.4. Authentifier et valoriser la qualité et la typicité des poivres sauvages de l'océan Indien

Livrable : Rapport technique sur les qualités spécifiques et les clefs d'authentification des poivres et poivriers



Auteurs : Harizoly Razafimandimby (FOFIFA, Madagascar), Jean Michel Leong Pock Tsy (FOFIFA, Madagascar), Mathieu Weil (CIRAD, France)

Cette activité a été réalisée dans le cadre du projet Qualinnov 2 cofinancé par l'Union européenne (Feder Interreg-V) et la Région Réunion



La présente publication a été financée par l'Union Européenne et la Région Réunion dans le cadre du projet InterREG-V Qualinnov 2. Le contenu de cette publication relève de la seule responsabilité des auteurs et ne peut en aucun cas être considéré comme reflétant l'opinion de l'Union Européenne

Février 2020

Page 1 sur 33

Table des matières

1. Introduction	3
2. Matériel et méthodes	4
2.1. Echantillons utilisés	4
2.1.1. Tableau des échantillons utilisés.....	4
2.1.2. Répartition géographique des échantillons utilisés	5
2.2. Caractérisation morphologique	6
2.2.1. Matériel végétal.....	6
2.2.2. Morphométrie	6
2.2.3. Traitement et analyses des données.....	8
2.3. Caractérisation génétique	8
2.3.1. Echantillonnage.....	8
2.3.2. Extraction de l'ADN	8
2.3.3. PCR, séquençage et analyse des données	8
2.4. Caractérisation chimique et sensorielle	9
2.4.1. Matière première.....	9
2.4.2. Conservation des échantillons.....	9
2.4.3. Préparation des échantillons.....	9
2.4.4. Méthodes d'analyses.....	9
2.4.5. Traitements statistiques.....	11
3. Résultats	12
3.1. Caractéristiques morphologiques	12
3.1.1. Diversité morphologique.....	12
3.1.2. Description des classes morphologiques.....	16
3.2. Résultats et interprétations des données génétiques	20
3.3. Caractéristiques chimiques et sensorielles des poivres	21
3.3.1. Teneurs en pipérine.....	21
3.3.2. Teneurs en Huile Essentielle	21
3.3.3. Caractérisation et quantification des composés d'arômes de l'HE.....	22
3.3.4. Résultats de l'analyse sensorielle	30
4. Conclusions	30
Références bibliographiques	32

1. Introduction

Les poivres appartiennent au genre *Piper* de la famille des *Piperaceae*, qui est une famille pantropicale. Dans le monde, le genre *Piper* regrouperait 2000 espèces dont 545 seulement sont décrites (Jaramillo et Manos, 2001). La taxonomie de ce genre est donc souvent lacunaire et la dernière tentative de révision mondiale remonte au début du vingtième siècle (De Candolle, 1923). Pour la région de l'Océan Indien, les traitements taxonomiques les plus récemment publiés datent également des travaux de De Candolle (1918; 1923). Cette classification rapporte les poivres sauvages à queue de l'Océan Indien à deux espèces (*Piper borbonense* et *P. pachyphyllum*). Selon cette classification, *P. pachyphyllum* est décrite comme endémique de Madagascar tandis que *P. borbonense* est rencontrée dans les îles de la région (Madagascar, La Réunion, Comores...). *Piper borbonense* a également été décrit comme l'unique *Piper* des îles du sud-ouest l'Océan Indien (Jaramillo et al. 2008, Smith et al. 2008). Des prospections ont par ailleurs montré que les poivres sauvages (à queue) étaient présents aux Comores, à La Réunion, à Madagascar et probablement aussi à Mayotte.

Le constat du désordre de la taxonomie du genre *Piper* à Madagascar et à l'ouest de l'Océan Indien a engendré une première étude associant des critères morphologiques et génétiques sur les poivres à queue de Madagascar. Les analyses génétiques (séquences nucléaires de la région ITS et séquences chloroplastiques de la région *psbJ-petA*) ont montré que les présumés *P. borbonense* de Madagascar et ceux de La Réunion appartiennent à deux clades différents ; ce qui amène l'hypothèse qu'elles n'appartiennent pas à la même espèce (Razafimandimby, 2017).

A ce jour, les poivres malgaches (appelés localement Tsiperifery) sont exploités alors que les poivres réunionnais ou comoriens par exemple, ne le sont pas ; ils pourraient cependant l'être dans un futur proche. Le Tsiperifery a une réputation bien établie sur le marché international des épices. Son exploitation commerciale et traditionnelle lui confère un intérêt économique et social (Razafimandimby et al., 2017). Au-delà de l'intérêt scientifique, il y a donc un réel enjeu commercial à être capable de distinguer ces différentes espèces. Ainsi, les poivres malgaches sont souvent commercialisés comme étant du *Piper borbonense* alors qu'il n'est pas prouvé que cela en soi. De même ce flou sur la taxonomie engendre le fait que le Tsiperifery, un produit de cueillette, soit exporté en tant que produit agricole au même titre que le poivre noir (*Piper nigrum*) (Raharijaona, 2015). Ces deux exemples, montrent l'impact de cette classification lacunaire sur la valorisation et la gestion durable de cette ressource. Une meilleure connaissance et la capacité de distinguer ces différentes espèces permettront à la fois de mieux les protéger, de les valoriser avec d'avantage de pertinence, et d'éviter les erreurs et les fraudes.

L'objectif de cette étude est de tenter de donner des clefs, morphologiques, génétiques, chimiques et sensorielles, d'authentification des espèces de poivres sauvages.

2. Matériel et méthodes

Afin d'avoir une meilleure connaissance et identifier des critères discriminatifs des poivres sauvages de l'OI, 3 types de caractérisation ont été effectués dans le cadre du projet : morphologique, génétique et chimique (et sensorielle).

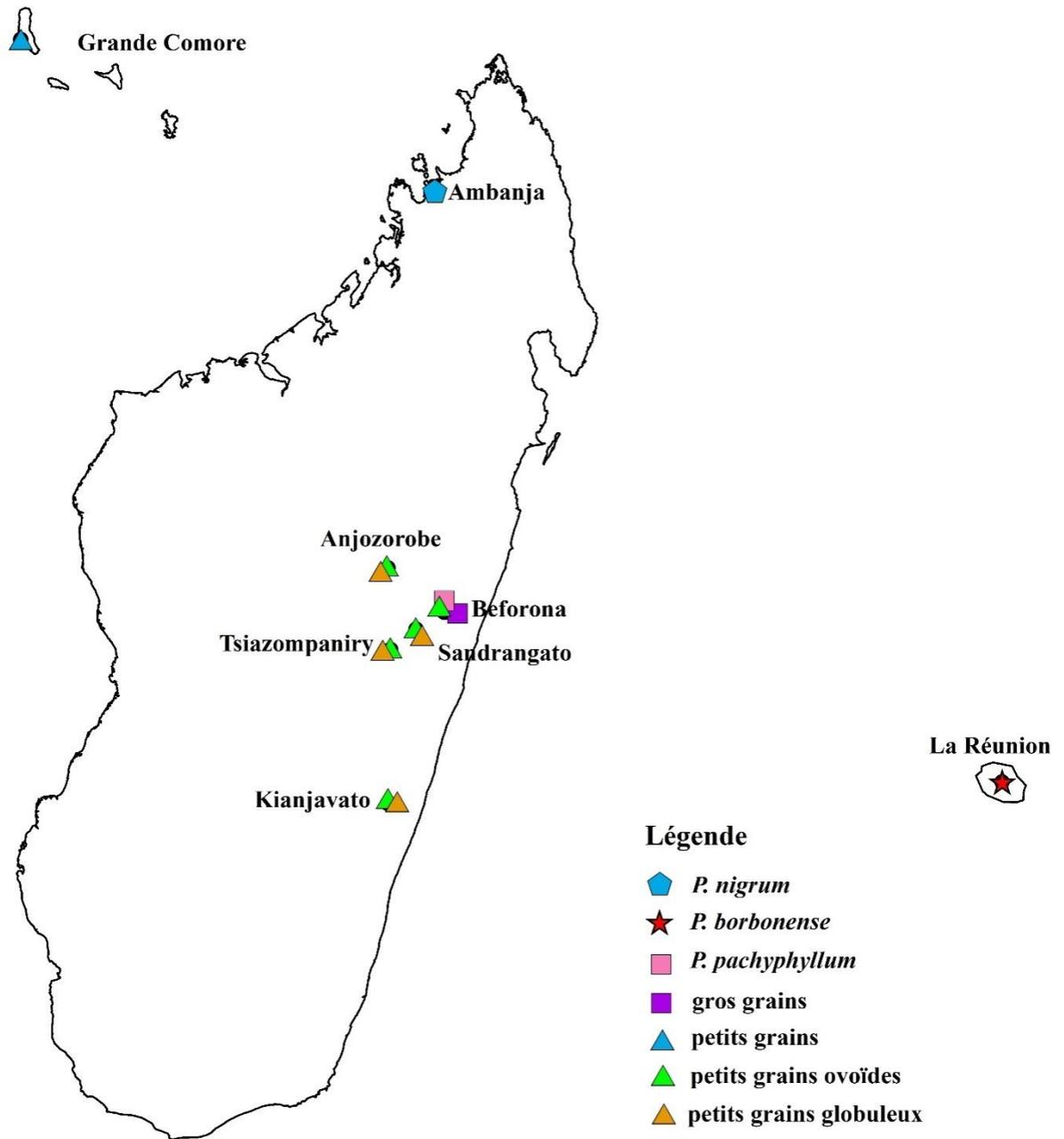
2.1. Echantillons utilisés

2.1.1. Tableau des échantillons utilisés

Nous avons travaillé sur des échantillons de différentes origines (Iles de Madagascar, de la Réunion et des Comores) pouvant potentiellement correspondre à des espèces différentes. Ce tableau synthétise les échantillons sur lesquels des travaux ont été réalisés dans les 3 disciplines : morphologie, génétique et chimie-sensoriel.

Echantillon	Espèce	Origine	Année de récolte ou d'achat	Analyses réalisées et noms abrégés des échantillons		
				Analyses chimiques (et sensorielles)	Analyses morphologiques	Analyses génétiques
<i>Piper nigrum</i>	<i>Piper nigrum</i>	Origine non connue (marque Rustica achat supermarché à la Réunion) pour la chimie Origine Ambanja à Madagascar pour la génétique	2017 pour la chimie 2016 pour la génétique	PN		PNamb
<i>Piper borbonense</i>	<i>Piper borbonense</i>	Rivière Langevin Réunion	2015 pour la chimie et 2018 pour la morphologie et la génétique	PB (= Run)	Run	Run
Madagascar Petits grains globuleux	Non déterminée « Poivre sauvage »	Sandrangato Anjozorobe Tsiacompaniry Kianjavato à Madagascar	2015		M2SDG, M2ANR, M2TZP, M2KJT	
Madagascar Petits grains ovoïdes	Non déterminée « Poivre sauvage »	Beforona Sandrangato Anjozorobe Tsiacompaniry Kianjavato à Madagascar	2015	M3 (= M3BFN)	M3BFN, M3SDG, M3ANR, M3TZP, M3KJT	M3BFN
Madagascar Gros grains et feuilles coriaces	Non déterminée « Poivre sauvage »	Beforona à Madagascar	2015	M1 (= M1BFN)	M1BFN	M1BFN
Madagascar Gros grains	<i>Piper pachyphyllum</i>	Beforona à Madagascar	2015		M4BFN	
Madépices (Petits grains)	Non déterminée « Poivre sauvage »	Madagascar	2016	Mad		
Comores (Petits grains)	Non déterminée « Poivre sauvage »	Comores	2018		COM	COM

2.1.2. Répartition géographique des échantillons utilisés



2.2. Caractérisation morphologique

2.2.1. Matériel végétal

Les échantillons utilisés pour la caractérisation de la diversité ont été collectés dans 3 îles : à Madagascar (5 sites), à la Réunion (3 sites) et aux Comores (1 site). Ils ont été prélevés sur des individus adultes spontanés dans différents types de formations végétales (forêts naturelles conservées, forêts naturelles dégradées, forêts artificielles, plantations ...)

Provenance	Madagascar	Réunion	Comores
Nb échantillons	36	31	8
Code origine	BFN, SDG, TZP, ANR, KJT	RUN	COM

2.2.2. Morphométrie

Les données utilisées pour la caractérisation de la diversité morphologique ont été obtenues par la morphométrie. Elle a été effectuée sur 24 descripteurs quantitatifs et qualitatifs localisés sur la feuille et l'infrutescence (Tableau 5). Ils ont été sélectionnés à partir des clés d'identification et descriptions réalisées sur le genre *Piper* dans le monde, entre autres :

- The Malagasy species of *Piper* (Manjato et al, 2010)
- *Piperacearum clavis analytica* (De Candolle, 1923)
- Flora of China : genus *Piper* (Cheng et al, 1999)
- Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World (Tebbs, 1993)
- Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (*Piperaceae*) (Jaramillo et al, 2001)
- *Piper peltatifolium*, a new species of Piperaceae from Hainan, China (Chao-Yun et al, 2015)

Dix descripteurs ont fait ainsi l'objet d'observations quantitatives. Cela a permis d'évaluer les variations de la taille des organes à travers des mensurations. Des observations qualitatives ont été effectuées sur 14 descripteurs pour évaluer la variation de forme. Leur valeur est ainsi illustrée par les différentes modalités pouvant être observées sur cette forme.

Tableau des descripteurs sélectionnés sur les organes aériens de *Tsiperifery* pour la classification morphologique.

Organe	Observation quantitative		Observation qualitative		
	Descripteur	Code	Descripteur	Code	Modalité
Feuille	Longueur du pétiole	LPt	Epaisseur du limbe	Ep	Membraneuse, moyenne, coriace
			Pubescence de la face supérieure	PbS	Pubescent, glabre
	Largeur du pétiole	IPt	Pubescence de la face inférieure	Pbl	Pubescent, glabre
	Longueur du limbe	LL	Dissymétrie de l'insertion du limbe du pétiole Des deux cotés	SB	Symétrique, dissymétrique
	Largeur du limbe	IL	Courbure de la base du limbe	BL	Cordée, oblique
			Forme De l'apex	FA	Obtus, aigu
	Nombre de nervures secondaires	nbNII	Proéminence des nervures secondaires	PNII	Inférieure, supérieure, 2 faces
Réticulation			Rt	Dense, éparse	
Infructescence	Longueur du pédoncule	LPd	Pubescence du pédoncule	PbPdFr	Pubescent, glabre
	Longueur du pédicelle	LPc	Pubescence du stipe	PbPc	Pubescent, glabre
			Forme de la base du stipe	FPc	Droit, protubérant
	Diamètre du pédicelle	DPc	Forme du stipe	Fst	Courbée, oblique
	Hauteur de la baie	HB	Forme de la baie	FB	Globuleuse, ovoïde, effilée
Diamètre de la baie	DB	Taille de la baie	TB	Petite, grosse	

Pour limiter l'effet du facteur âge sur les variations de taille et de forme, les observations ont été effectuées sur des organes de même âge :

- Sur des feuilles collectées au niveau du troisième nœud à partir de la base du rameau
- Sur des inflorescences mâles à maturité reconnaissables par des sacs polliniques déhiscent
- Sur des inflorescences femelles sur lesquelles les stigmates sont bien développés
- Sur des infructescences mures avec des baies de couleur rouge-orangée.

Les observations ont été faites en trois répétitions sur chaque individu. Ainsi, 537 enregistrements ont été obtenus pour chaque descripteur. Les observations quantitatives ont donné lieu à des valeurs quantitatives tandis que les observations qualitatives sont représentées par des modalités.

2.2.3. Traitement et analyses des données

Le traitement des données et les analyses statistiques ont été effectués avec le logiciel R. La mise en évidence de la diversité morphologique à travers l'existence de groupes morphologiques a été ensuite effectuée avec l'analyse factorielle de données mixtes (AFDM). Cette méthode statistique multivariée a permis à la fois de considérer des données avec des variables quantitatives et qualitatives (données dites mixtes) en tant qu'éléments actifs d'une même analyse factorielle (Pagès, 2004), de prendre en compte la structure des groupes dans le calcul des distances et l'équilibre de l'influence de chacune des données (Escofier et Pagès, 1998). Elle généralise l'ACP et l'ACM. L'AFDM est réalisée avec *FactomineR*, un package de R dédié et adapté à l'analyse multivariée (Lê et al., 2008 ; Husson et al., 2010).

Les résultats de l'AFDM ont été ensuite perfectionnés avec une classification hiérarchique sur composante principale (HCPC) afin de matérialiser le regroupement. La HCPC permet également de faire une description des classes obtenues par les descripteurs via la commande «*reshcpc\$desc.var* » dans R. Pour les descripteurs à valeurs qualitatives, la description est effectuée d'une part par le lien de chaque descripteur aux découpages en classes moyennant le test de χ^2 et par le lien de chaque classe avec une modalité de descripteur, et d'autre part par le pourcentage des individus de la classe correspondant à une modalité (mod/cla). Pour les descripteurs à valeurs quantitatives, la description est obtenue également par le lien de chaque descripteur aux découpages en classes mais moyennant le rapport de corrélation entre un descripteur quantitatif et l'ensemble des descripteurs de la classe (Eta²) et par la moyenne (μ) de chaque descripteur de chaque classe. Aussi, seuls les descripteurs étroitement liés aux découpages en classes ont été retenus afin de mettre en évidence la formation des groupes ainsi que les critères morphologiques distinctifs. Il s'agit des descripteurs dont la valeur de p du test de χ^2 est inférieure à 0,001.

2.3. Caractérisation génétique

2.3.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé sur 3 îles de l'Océan Indien : Grande Comores, Ile de La Réunion et Madagascar. Des échantillons de feuilles ont été prélevés sur chaque liane, à raison de 3 feuilles par liane. Les échantillons ont été conservés dans du silicagel dès leur récolte afin d'éviter les moisissures.

Nous avons pris comme référence l'espèce *Piper nigrum* d'Ambanja (Madagascar) et les espèces *Piper capense*, *Piper guineense* et *Piper umbellatum* (séquences récupérées sur la banque NCBI).

2.3.2. Extraction de l'ADN

Les échantillons feuilles ont fait l'objet de l'extraction d'ADN totaux suivant le protocole modifié de Doyle & Doyle (1991). La matière végétale a été broyée avec de l'Azote liquide et la poudre a ensuite été mise en suspension dans un tampon de lyse CTAB (2% de CTAB, 1,4 mol⁻¹NaCl, 0,1 mol⁻¹ de Tris-HCl pH 8,0, 20 mmol⁻¹ de l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA), 1% Poly Ethylène Glycole 6000, 0,5% de Sulfite de Sodium) pendant 60 min à 64 ° C. La suspension a été incubée avec un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et l'ADN a été précipité de la phase aqueuse par 1 volume d'isopropanol. Après lavage à l'éthanol à 70%, l'ADN a été dissous dans de l'eau distillée stérile et traité avec de la RNase A (250 µg ml⁻¹)

2.3.3. PCR, séquençage et analyse des données

La région ITS (y compris ITS1, 5.8S et ITS2) a été amplifiée par PCR en utilisant la paire d'amorces ITS5-ITS4 (Baldwin, 1992; Baldwin, 1993). L'intron psbJ-petA a été amplifié à l'aide des amorces petA-IGSF et psbJ-IGSF (Linda Prince, Rancho Santa Ana Botanic Garden).

Le séquençage a été réalisé par prestation de service auprès de la Société Genoscreen selon la méthode de SANGER. Les résultats, sous forme de chromatogramme et fasta, sont vérifiés et corrigés manuellement avec le logiciel BioEdit 7.2. L'alignement des séquences a été réalisé

avec le logiciel Mega 7. La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel PHYLIP selon le méthode NeighbourJoining avec 1000 bootraps.

2.4. Caractérisation chimique et sensorielle

2.4.1. Matière première

Nous avons travaillé sur des échantillons de différentes origines correspondant à des espèces potentiellement différentes.

Code	Nom échantillon	Espèce	Origine	Année de récolte ou d'achat
PN	<i>Piper nigrum</i> Rustica	<i>Piper nigrum</i>	Non connue (achat Auchan Réunion)	2017
PB	<i>Piper borbonense</i>	<i>Piper borbonense</i>	Rivière Langevin Réunion	2015
M3	Morphotype M3 « petits grains »	Non déterminée « Poivre sauvage »	Beforona Madagascar	2015
M1	Morphotype M1 « gros grains »	Non déterminée « Poivre sauvage »	Beforona Madagascar	2015
Mad	Madépices Petits grains	Non déterminée « Poivre sauvage »	Anjozorobe Madagascar	2016

PN et Mad sont des échantillons du commerce achetés secs (conditions de séchage inconnues). M1 et M3 ont été séchés dans un séchoir solaire pilote (températures et humidités du séchoir non connues). PB a été séché pendant 24h à 60°C et 20% HR dans une enceinte climatique (BIA Climatic - Type CL 125, Conflans Sainte Honorine, France).

2.4.2. Conservation des échantillons

Les échantillons de poivre sont conservés congelés à -80 °C (Congélateur Froilabo - Bio Memory 690 litres) jusqu'à utilisation pour analyses. Notre objet d'étude étant le grain de poivre avec son pédicelle, les grains de poivre congelés en grappes ont été séparés manuellement de la rafle avant préparation.

2.4.3. Préparation des échantillons

Pour les analyses chimiques et pour les analyses sensorielles sur mouture, les grains de poivre sont broyés (encore congelé et avec de l'azote liquide ajouté en excès) pendant 10 secondes à 10 000 tr/min dans un broyeur à couteaux (Retsch - Grindomix GM200, Retsch GmbH, Allemagne)

Pour les analyses sensorielles sur grains, les grains de poivre sont décongelés pendant une heure à température ambiante.

2.4.4. Méthodes d'analyses

2.4.4.1. Mesure de la teneur en matière sèche

Les teneurs en matière sèche (comprendre matière sèche sans eau et sans huile essentielle) ont été déterminées par séchage de 5g de mouture de poivre à 105°C pendant 30h (jusqu'à masse constante) dans une étuve de laboratoire (ULE 400, Memmert GmbH, Allemagne). Les

masses initiale et finale sont déterminées à l'aide d'une balance de précision (Scaltec SBC 22 model, Scaltec GmbH, Allemagne). Le coefficient de variation est de 0,21% (n=4).

2.4.4.2. Mesure de la teneur en huile essentielle

La teneur en huile essentielle, exprimée en base sèche, a été déterminée selon une méthode adaptée de la norme standard ISO 6571 (International Standard Organization, 2008). La seule modification par rapport à la méthode standardisée réside dans le fait que n'avons pas employé de xylène dans notre protocole. Le coefficient de variation est de 9.78 % (n=4).

2.4.4.3. Mesure de la teneur en eau

Les teneurs en eau sont calculées à partir des teneurs en matière sèche (MS) et des teneurs en huile essentielle : $T_{\text{eau}} = 100 - MS - T_{\text{huile essentielle}}$.

2.4.4.4. Mesure de la teneur en pipérine

La teneur en pipérine, exprimée en base sèche, a été déterminée, à une longueur d'onde de 343 nm, selon la méthode décrite dans la norme ISO-5564 (International Standard Organization, 1982). Le spectrophotomètre utilisé est un Thermospectronic Helios α v4.60 (Thermo Fisher Scientific, USA). Le coefficient de variation est de 4.25% (n=3).

2.4.4.5. Identification et quantification des composés de l'huile essentielle

2.4.4.5.1. Séparation sur colonne polaire (n=1)

Les composés volatils ont été analysés sur une CPG (HP 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, USA), équipée d'une colonne polaire Supelco-Wax (Supelco- 60m x 320 μm x 0,25 μm) couplée à un détecteur SM. Des aliquotes (0,2 μL) d'huile essentielle, obtenus comme décrit en 2.4.2, ont été injectés avec un split (1:100). La température de l'injecteur était de 250°C. La température de la ligne de transfert était de 250°C et le débit du gaz vecteur (hélium) était de 0,7 ml/min. La température du four était programmée comme suit : température initiale de 60°C, augmentation de 2°C/min jusqu'à atteindre une température finale de 250°C maintenue pendant 50 min. Les molécules ont été identifiées par CPG/SM avec une source d'ionisation électronique (70eV). Les masses des composés étaient déterminées par un balayage compris entre 25 et 350 m/z.

2.4.4.5.2. Séparation sur colonne apolaire (n=1)

Les composés volatils ont été analysés sur une CPG (HP 6890 Hewlett Packard, Palo Alto, USA), équipée d'une colonne apolaire SPB-5 (Supelco- 60m x 320 μm x 0,25 μm) couplée à un détecteur SM. Des aliquotes (0,2 μL) d'huile essentielle obtenue comme décrit en 2.4.2., ont été injectés selon 2 méthodes différentes en fonction des échantillons.

Méthode 1 pour PN, PB, M3 et M1 :

- Split (1 :50)
- T°C injecteur : 250°C
- Gaz vecteur : Hélium à 0.7ml/min
- Programmation T°C du four :
 - o Initial : 60°C
 - o 4°C/min
 - o Final : 250°C pendant 50 minutes

Méthode 2 pour Mad :

- Split (1 :100)
- T°C injecteur : 250°C
- Gaz vecteur : Hélium à 0.7ml/min
- Programmation T°C du four :
 - o Initial : 60°C
 - o 2°C/min
 - o Final : 250°C pendant 50 minutes

Les molécules ont été identifiées par CPG/SM avec une source d'ionisation électronique (70eV). Les masses des composés étaient déterminées par un balayage compris entre 20 et 400 m/z.

2.4.4.5.3. Identification

Les composés aromatiques séparés sur les deux colonnes, ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse à ceux disponibles dans les bases de données commerciales (NIST02, WILEY) ou constitués par nos soins et en comparant les indices de rétention calculés à ceux de la littérature (Adams, 1995; Jennings, *et al.*, 1980; Kondjoyan, *et al.*, 1996) et de bases internet (Internet databases, 2014).

2.4.4.5.4. Quantification sur colonne apolaire (n=3)

Les composés aromatiques ont été quantifiés sur une CPG Clarus 580 (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France), équipées d'une colonne apolaire SPB-5 (Supelco- 60m x 320 µm x 0,25 µm) couplées à un détecteur FID. Des aliquotes d'huile essentielle obtenue comme décrit en 2.4.2., ont été injectés selon 2 méthodes différentes en fonction des échantillons.

Méthode 1 pour PN, PB, M3 et M1 :

- Injection de 0.2µL
- Split (1 :100)
- T°C injecteur : 250°C
- Gaz vecteur : Hélium à 1.5ml/min
- Programmation T°C du four :
 - o Initial : 60°C
 - o 4°C/min
 - o Final : 250°C pendant 30 minutes

Méthode 2 pour Mad :

- Injection de 0.2µL
- Split (1 :100)
- T°C injecteur : 250°C
- Gaz vecteur : Hélium à 1.5ml/min
- Programmation T°C du four :
 - o Initial : 60°C
 - o 2°C/min
 - o Final : 250°C pendant 30 minutes

Les quantifications ont été réalisées par rapport à la méthode de normalisation interne (Cachet, *et al.*, 2011). Le coefficient de variation est de 7.8% (n=3).

2.4.4.6. Analyses sensorielles

La méthode utilisée et choisie pour les évaluations sensorielles sur poivre (grain et moulu) est le test de classement (NF ISO 8587, 2006). L'objectif est d'identifier une différence perceptible entre plusieurs produits selon la préférence qualitative associée à des caractéristiques olfactives et gustatives. Le jury expert composé de 8 juges doit classer les échantillons dans l'ordre croissant ou décroissant de leur préférence. Dans ce cas, chaque échantillon est positionné dans un ordre décroissant de 1 à 5 (1 apprécié ... 5 moins apprécié).

Il est également demandé aux juges de caractériser les poivres testés par des descripteurs gustatifs et olfactifs.

2.4.5. Traitements statistiques

2.4.5.1. Traitements statistiques des résultats d'analyses physico-chimiques

Les différences statistiques des moyennes ont été testées par analyse de variance (ANOVA); l'importance des différences entre les échantillons a été déterminée en utilisant le test de Tukey. Le niveau de signification était $P < 0,05$.

2.4.5.2. Traitements statistiques des résultats d'analyses sensorielles

Un test de somme des rangs de Friedman sur données appariées (juges) est appliqué sur les notes dans un premier temps pour détecter s'il y a au moins une différence entre deux produits. En cas de significativité de ce test, un test post-hoc de Wilcoxon (test des rangs signés sur données appariées) avec correction de type Bonferroni a été réalisé pour identifier quels sont les produits significativement différents les uns des autres. Les tests sont réalisés avec un seuil de 5%.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques morphologiques

3.1.1. Diversité morphologique

Descripteurs distinctifs

L'AFDM avec tous les descripteurs morphologiques a permis de présenter 22,11% et 62,50% de la variabilité des individus respectivement par les 2 et les 5 premiers axes. La description des variables issue de la classification hiérarchique du résultat de cette AFDM a montré que les descripteurs quantitatifs ne sont pas significativement liés au découpage en classes ($\text{Eta}^2 > 0,3$). Par contre, les tests de corrélation (Chi^2) entre le découpage en classe et les descripteurs qualitatifs ont montré que les descripteurs qualitatifs contribuent significativement au découpage en classe ($p < 0,001$). En conséquence, les descripteurs qualitatifs ne sont pas considérés comme des critères distinctifs pour la classification des poivres sauvages de l'OI, sauf le nombre de nervures secondaires (NbNII).

Les tableaux ci-dessous expriment la contribution de tous les descripteurs (valeur de p pour les descripteurs qualitatifs et Eta^2 pour les descripteurs quantitatifs) au découpage en classe.

Descripteur qualitatif	valeur de p (Chi^2)
Ep	6.475416e-156
FPc	9.462165e-62
TB	9.462165e-62
PNII	2.602838e-55
Fst	3.588549e-50
SB	1.058894e-43
FB	6.169505e-42
Rt	1.405166e-31
Pbl	1.649927e-31
BL	1.137049e-27
FA	3.317573e-24
PPFr	1.163411e-14
PbS	1.349386e-11
PbPc	4.174730e-06

Descripteur quantitatif	Rapport de corrélation (Eta^2)
nbNII	0.81120427
IPc	0.12886047
IPt	0.19118021
HB	0.2439673
LPd	0.13049219
LL	0.12842030
LPc	0.09178053
DB	0.08956113
LPt	0.00666879
IL	0.04086316

L'AFDM effectuée avec seulement les descripteurs qui ont contribué significativement au découpage en classe a permis une meilleure représentativité de la variabilité des individus sur les premiers axes de l'AFDM. Les deux et cinq premiers axes regroupent respectivement 29,63% et de 89,64% de cette variabilité.

Classification morphologique

La classification hiérarchique des échantillons a mis en évidence la formation de 5 classes, ce qui permet de déduire que les poivres sauvages de l'OI peuvent être répartis en 5 classes sur base des descripteurs morphologiques. Les critères les plus distinctifs sont observés au niveau de:

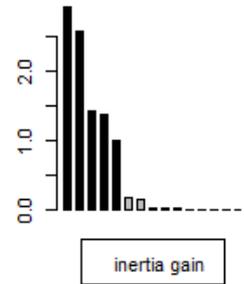
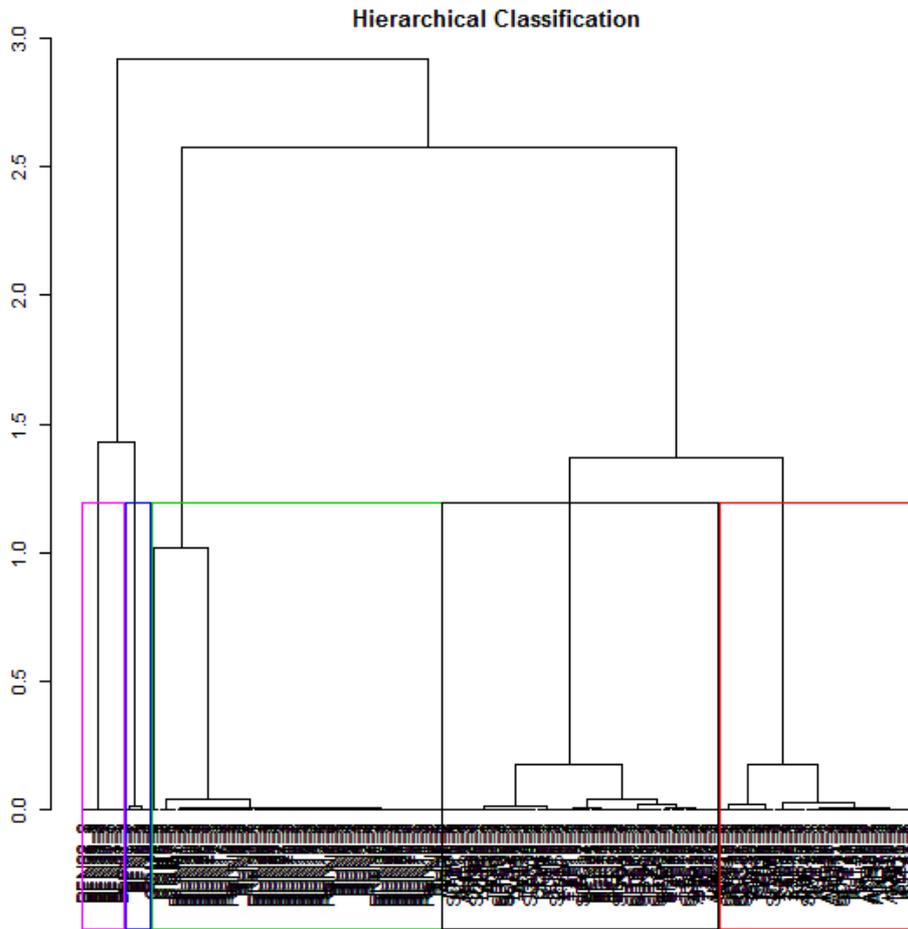
- la feuille par l'épaisseur du limbe foliaire (Ep), la densité de la nervation ou réticulation (Rt), la forme de la bordure du limbe (BL) et le nombre de nervures secondaires (NbNII);
- l'infructescence par la forme du pédicelle (FPc), la taille de la baie (TB), la forme du stipe (Fst) et la forme de la baie (FB).

Ces descripteurs ont contribué significativement au découpage en classes. Ce sont alors les descripteurs distinctifs de la diversité morphologique des poivriers sauvages de l'OI.

La contribution de ces descripteurs (valeur de p pour les descripteurs qualitatifs) au découpage en classe est la suivante.

Descripteur	p (Chi ²)
Ep	9.073530e-173
FPc	9.462165e-62
TB	9.462165e-62
FB	7.089677e-60
Fst	2.158316e-54
Rt	2.343668e-25
BL	4.956344e-22
NbNII	9.236e-09

Hierarchical Clustering



Les classes 1,2,4 et 5 sont composées uniquement des individus collectés à Madagascar (ANR, TZP, SDG, KJT, BFN). La classe 3 ne regroupe que des individus en provenance de l'île de la Réunion et des Comores. Les classes 4 et 5 abritent uniquement des individus issus de Beforona (Madagascar).

Dans cette classification, les 4 morphotypes décrits par Razafimandimby (2017) sont maintenus, la classe 3 avec les échantillons réunionnais et comoriens pourrait alors être le 5^e morphotype de l'OI.

3.1.2. Description des classes morphologiques

Le premier tableau ci-dessous montre la répartition des individus (%) de chaque classe dans chaque modalité des descripteurs distinctifs. Ces modalités constituent alors les caractéristiques morphologiques ou botaniques de chaque classe. Ces modalités ont permis de décrire les 5 classes du deuxième tableau. Ainsi, la combinaison de ces caractéristiques botaniques permet de reconnaître la classe.

Classe	1		2		3		4		5	
variables quantitatives	Mod	M/C	Mod	M/C	Mod	M/C	Mod	M/C	Mod	M/C
	Ep=mem	100	Fst=cor	100	FB=ovo	100	Ep=pco	100	FPc=pro	100
	Fst=cor	100	TB=P	100	BL=cor	100	TB=G	100	Ep=cor	100
	FB=ovo	100	FPc=dro	100	Rt=epa	100	Fst=obl	100	TB=G	100
	TB=P	100	Ep=moy	97,06	TB=P	100	FB=ovo	100	BL=obl	100
	FPc=dro	100	FB=glob	98,04	FPc=dro	100	Rt=epa	100	Fst=obl	100
	Rt=epa	95,32	Rt=den	92,83	Fst=obl	91,18	FPc=dro	100	FB=ovo	100
	BL=obl	97,14	FPc=dro	100	Ep=moy	97,06	FPc=dro	97,84	Rt=epa	100
variable qualitative	nbNII moy	5	nbNII moy	6	nbNII moy	14	nbNII moy	8	nbNII moy	6

Organe	Descripteur	Classe1	Classe2	Classe3	Classe4	Classe5
Feuille	Epaisseur du limbe (Ep)	Membraneuse	Moyenne	Moyenne	Epaisse	Coriace
	Forme de la base du limbe (BL)	Oblique	Cordée	Cordée	Cordée	Oblique
	Réticulation (Rt)	Eparses	Dense	Eparses	Eparses	Eparses
	Nombre de nervures secondaires (NbNII)	5	6	14	8	6
Inflorescence	Forme de la base du stipe (FPc)	Droite	Droite	Droite	Droite	Protubérante
	Forme du stipe (Fst)	Courbée	Courbée	Oblique	Oblique	Oblique
	Forme de la baie (FB)	Ovoïde	Globuleuse	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde
	Taille de la baie (TB)	Petite	Petite	Petite	Grosse	Grosse
Morphotype		M3	M2	M5	M4	M1

Grappes et baies des différents morphotypes de poivres sauvages de l'OI



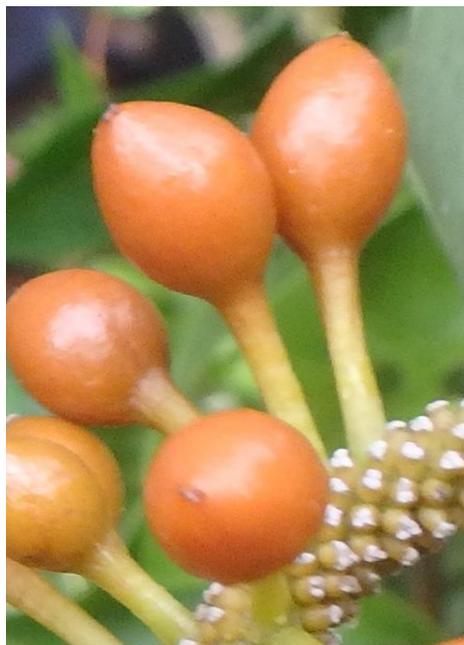
Classe 1, Madagascar M3



Classe 2, Madagascar M2



Classe 3, La Réunion, *Piper borbonense*, M5



Classe 3, Comores, M5



Classe 4, Madagascar M4



Classe 5, Madagascar M1, *Piper pachyphyllum*

3.2. Résultats et interprétations des données génétiques

Les analyses génétiques ont été effectuées sur des échantillons représentatifs des analyses morphologiques ou morphométriques, à raison de 5 individus par sites et par type morphologique.

Les analyses avaient pour objectif (i) vérifier la différence morphologique des individus malgaches (Tsiperifery) qui était basée sur la forme, la grosseur des graines, (ii) positionner les Tsiperifery par rapport au *Piper borbonense* de La Réunion et (iii) de vérifier la proximité génétique des individus de la Grande Comore.

L'arbre phylogénétique ci-dessous montre que les Tsiperifery forment 2 clades ou 2 groupes correspondant à la taille des grains, groupe des petits grains et groupe des gros grains (respectivement M3 et M1).

Les petits grains malgaches (M3) forment un groupe avec l'espèce *Piper borbonense* et les individus de la Grande Comore. Par contre, ce clade se divise en 3 sous clades : une sous clade de La Réunion, un sous clade de Grande Comores et un sous clade de Madagascar (M3).

Les résultats supposent que l'espèce *Piper borbonense* est répartie dans les différentes Iles du sud-ouest de l'Océan Indien. Chaque Ile est caractérisée par un type ou variété dont la spéciation est fonction de l'isolement et des caractères environnementaux de ces Iles.

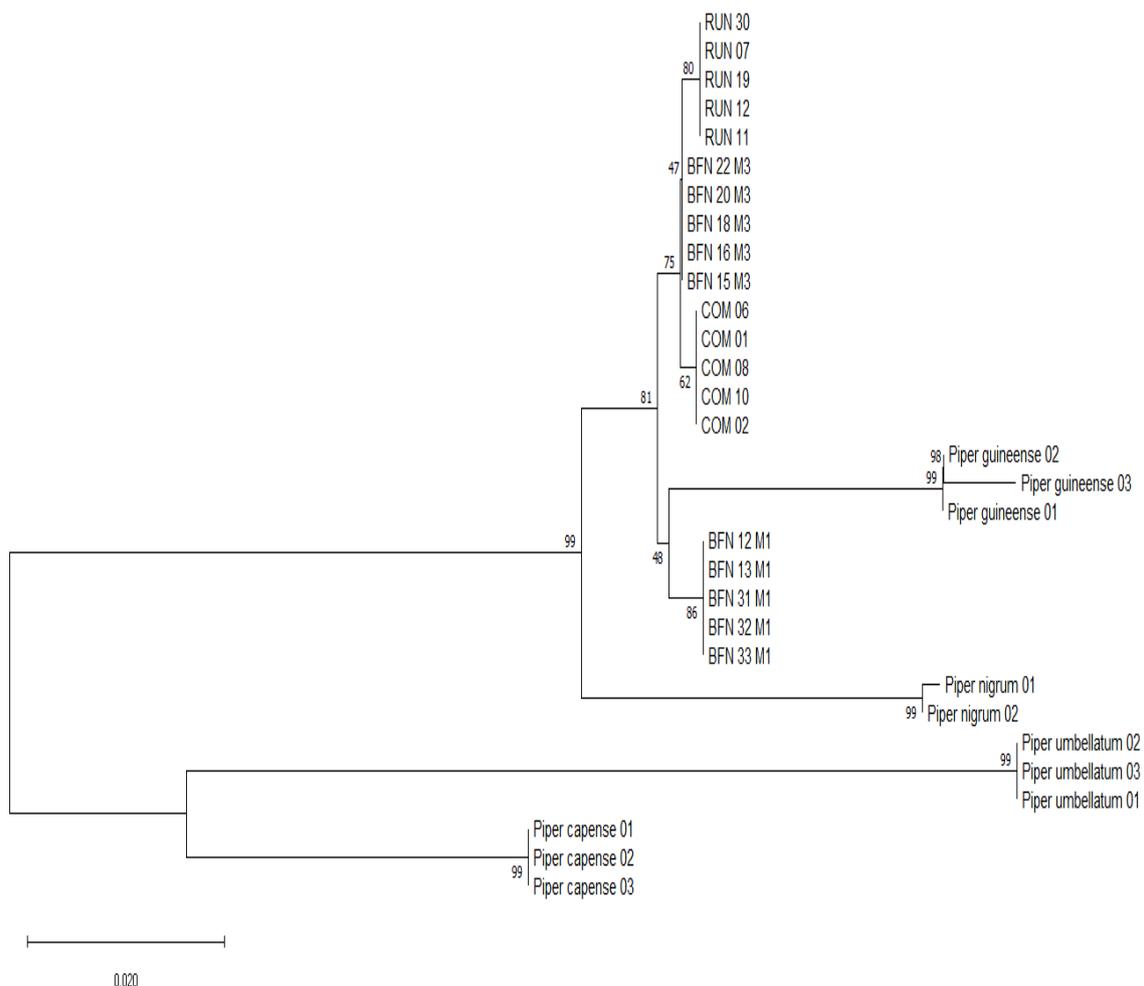
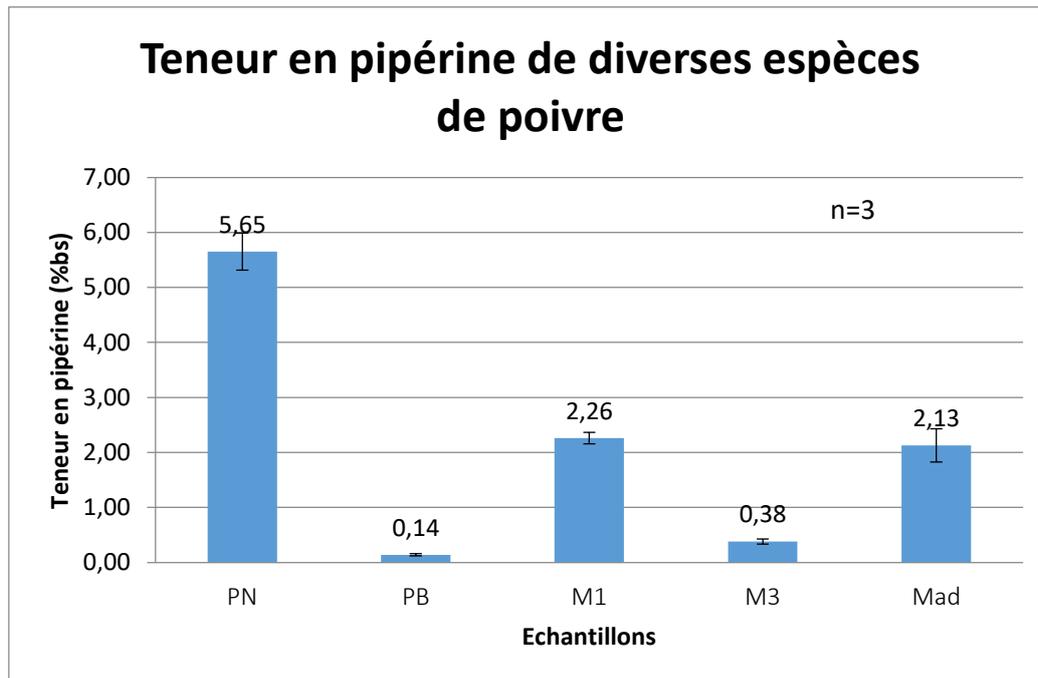


Figure : Arbre phylogénétique à partir de la combinaison des séquences (Its + psbJpetA) selon la méthode neighbourjoining

3.3. Caractéristiques chimiques et sensorielles des poivres

3.3.1. Teneurs en pipérine

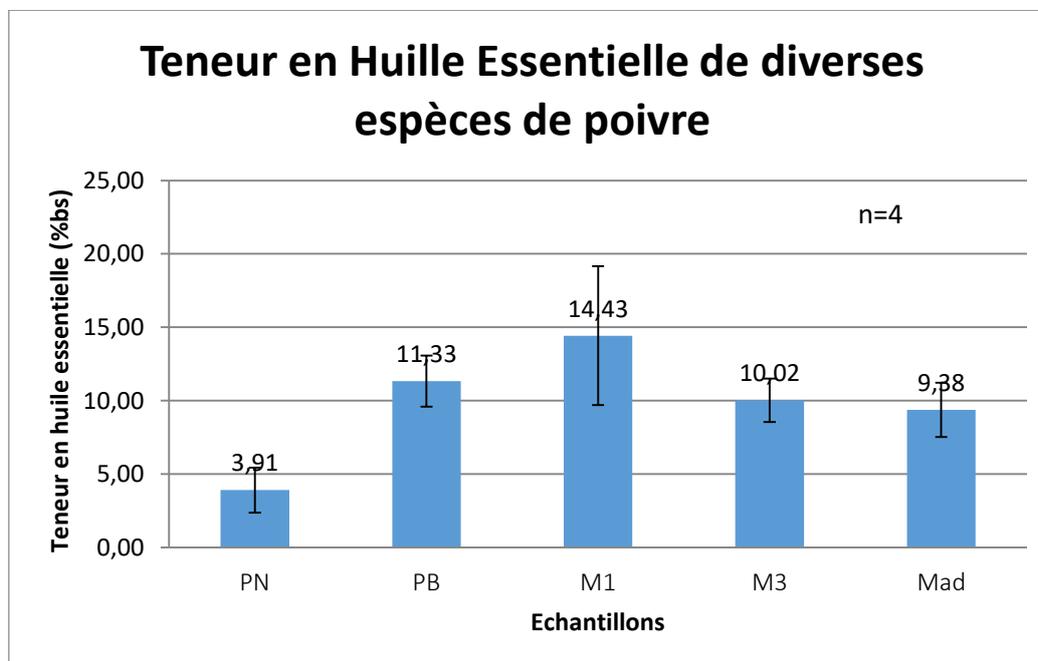


PN est le plus riche en pipérine

M1 et Mad ne sont pas significativement différents

M3 est peu riche en pipérine alors que PB (teneur très proche) est le moins riche de tous

3.3.2. Teneurs en Huile Essentielle



M1 est le plus riche en HE

PB, M3 et Mad ne sont pas significativement différents

PN est le moins riche en HE

3.3.3. Caractérisation et quantification des composés d'arômes de l'HE

Ce tableau donne le nombre de pics intégrés en CG/MSet de composés ayant une présence supérieure à 0.2% (v/v) que nous avons été capables d'identifier. Selon les espèces nous avons donc été capables d'identifier entre 53% (M1) et 93% (PB) du total de chacune des HE.

	PN	PB	M3	M1	Mad
Nb pics intégrés	34	21	40	58	53
%(V/V) HE intégré	96,55	97,4649	96,446	96,509	92,143
Nb pics identifiés	21	14	18	18	33
% (V/V) HE identifié	82,335	93,1099	86,407	53,462	72,358
Nb de pics Non Déterminés	13	7	22	40	20
% (V/V) HE ND	14,215	4,355	10,039	43,047	19,785

Nous avons ensuite pu quantifier en CG-FID nos huiles essentielles pour nos cinq échantillons en % (v/v) sur le total d'huile essentielle :

	PN	PB	M3	M1	Mad
Nb molécules identifiées quantifiées	23	17	21	17	25
% (V/V) HE identifiée quantifiée	90,80	94,91	90,08	77,41	74,26
% non déterminé	9,20	5,09	9,92	22,59	25,74
% total général	100	100	100	100	100

En CG/FID le nombre de molécules identifiées et le pourcentage que cela représente (selon les espèces, entre 74% et 95% du total de l'huile essentielle) est plus élevé qu'en CG/MS. Cela s'explique, car nous avons, en CG/FID injecté plusieurs extractions (3) et que celles-ci présentaient une certaine variabilité.

Concentrations moyennes (% V/V) des composés des huiles essentielles des cinq espèces de poivre

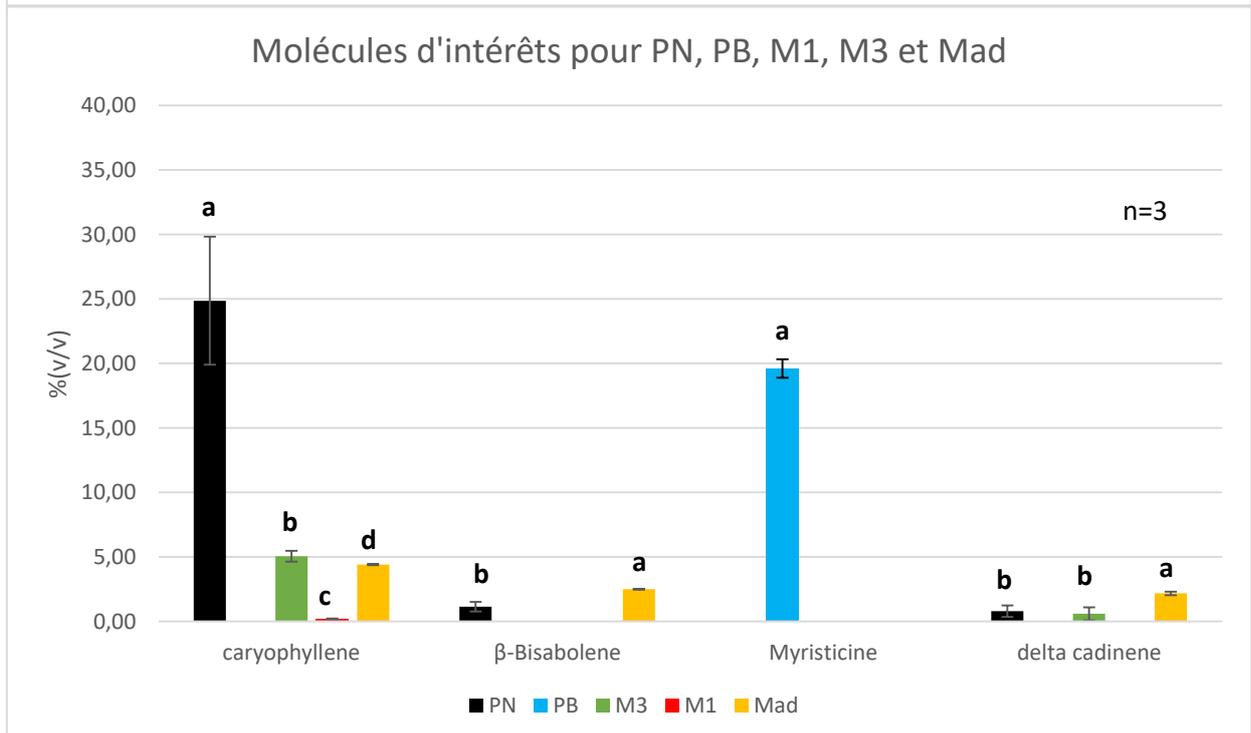
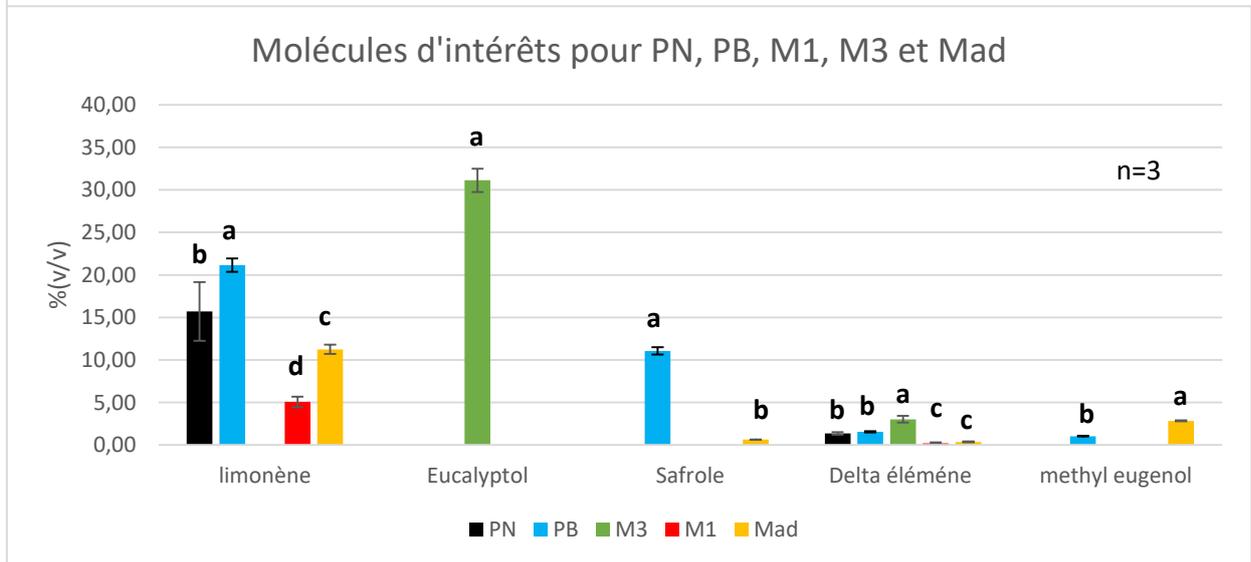
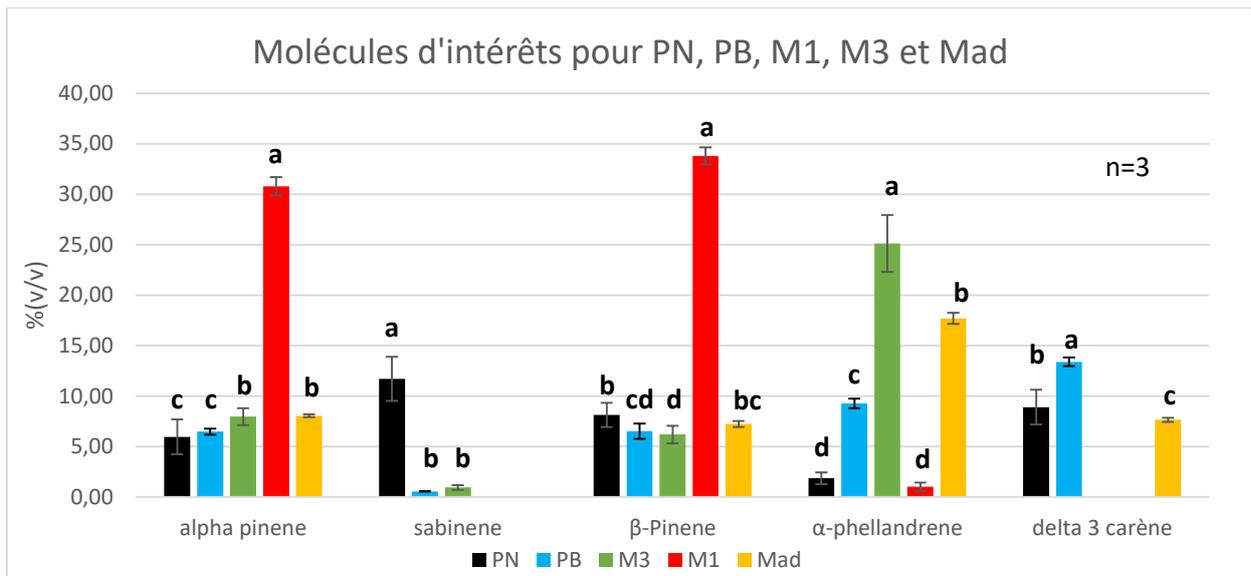
Molécules	N° CAS	Apolaire		Polaire		Moyenne% V/V d'huile essentielle				
		Ki Calculé	Ki littérature	Ki Calculé	Ki littérature	PN	PB	M3	M1	Mad
Monoterpènes						56,36	60,88	43,18	73,28	56,79
Alpha thujene	2867-5-2	922	930	ND	1038	1,50 ± 0,328	0,23 ± 0,014	0,99 ± 0,103	0,21 ± 0,038	0,50 ± 0,014
Alpha pinene	80-56-8	933	939	1013	1007	5,96 ± 1,716	6,47 ± 0,313	7,96 ± 0,846	30,80 ± 0,886	8,05 ± 0,137
Camphene	79-92-5	950	954	1041	1050	0,15 ± 0,063	1,10 ± 0,057	0,12 ± 0,029	0,72 ± 0,108	0,53 ± 0,014
Sabinene	3387-41-5	977	975	1085	1092	11,71 ± 2,174	0,55 ± 0,025	0,94 ± 0,229		
Beta pinene	127-91-3	985	979	1076	1073	8,13 ± 1,205	6,52 ± 0,770	6,19 ± 0,864	33,80 ± 0,834	7,23 ± 0,311
Myrcène	123-35-3	991	991	1125	1148	1,88 ± 0,357	1,78 ± 0,050	1,86 ± 0,141		1,51 ± 0,063
Alpha phellandrene	99-83-2	1012	1003	1131	1152	1,86 ± 0,584	9,27 ± 0,465	25,11 ± 2,809	1,01 ± 0,415	17,70 ± 0,547
Delta 3 carène	13466-78-9	1016	1016	1113	1120	8,90 ± 1,734	13,40 ± 0,434			7,65 ± 0,201
Beta Cymene	535-77-3	1028	1025	1240	1260				1,36 ± 0,240	1,92 ± 0,141
Limonène	138-86-3	1034	1029	1171	1188	15,70 ± 3,456	21,14 ± 0,801		5,07 ± 0,612	11,25 ± 0,531
Terpinolene	586-62-9	1092	1089	1249	1268	0,56 ± 0,165	0,41 ± 0,014		0,32 ± 0,202	0,45 ± 0,025
Monoterpènes oxygénés						1,14	0,22	32,81	3,01	0,34
Eucalyptol	470-82-6	1042	1037	1188	1189			31,11 ± 1,372		
Linalool	78-70-6	1101	1101	1521	1537	0,43 ± 0,146		1,08 ± 0,072	1,30 ± 0,282	0,34 ± 0,000
1-terpinen-4-ol	562-74-3	1187	1177	1573	1591	0,71 ± 0,668		0,17 ± 0,025	0,35 ± 0,063	
Alpha Terpeneol	98-95-5	1198	1189	1668	1650		0,22 ± 0,014	0,31 ± 0,052	0,38 ± 0,043	

Myrtenal	564-94-3	1208	1196	1597	1596			0,15 ± 0,038	0,98 ± 0,423	
Phénylpropanoïdes						0,00	31,70	0,00	0,00	3,47
Safrole	94-59-7	1297	1285	1837	1830		11,05 ± 0,431			0,63 ± 0,014
Methyleugenol	93-15-2	1408	1407	1976	1960		1,04 ± 0,025			2,83 ± 0,052
Myristicine	607-91-0	1511	1520	2155	1930		19,61 ± 0,720			

Molécules	N° CAS	Apolaire		Polaire		Moyenne% V/V d'huile essentielle				
		Ki Calculé	Ki littérature	Ki Calculé	Ki littérature	PN	PB	M3	M1	Mad
Sesquiterpènes						32,15	2,12	13,82	0,92	12,96
Delta éléméne	20307-84-0	1349	1338	1442	1444	1,38 ± 0,150	1,55 ± 0,086	3,03 ± 0,396	0,20 ± 0,114	0,37 ± 0,043
Ylangene	14912-44-8	1377	1377	1451	1460					0,40 ± 0,014
Copaene	3856-25-5	1388	1377	1462	1472	1,31 ± 0,212		1,79 ± 0,180		0,55 ± 0,014
Beta elemene	515-13-9	1403	1406	1559	1573	0,51 ± 0,063		1,52 ± 0,462	0,28 ± 0,038	0,53 ± 0,014
Caryophyllene	87-44-5	1438	1419	1565	1585	24,86 ± 4,966		5,04 ± 0,425	0,20 ± 0,014	4,40 ± 0,052
Gamma elemene	29873-99-2	1447	1445	1605	1619		0,15 ± 0,014			
Humulene	6753-98-6	1472	1470	1632	1640			0,57 ± 0,152	0,24 ± 0,057	1,19 ± 0,143
Beta cubebene	13744-15-5	1472	1458	1506	1538	0,61 ± 0,211	0,42 ± 0,057	0,35 ± 0,043		0,43 ± 0,000
Alpha humulene	6753-98-6	1476	1470	1633	1640	1,34 ± 0,304				
Alpha curcumene	644-30-4	1494	1481	1738	1764	0,23 ± 0,052				
Beta selinene	17066-67-0	1496	1496	1680	1698					0,44 ± 0,000

Alpha muurolene	31983-22-9	1517	1539	1688	1688			0,94 ± 0,493		
Beta bisabolene	495-61-4	1518	1506	1693	1715	1,13 ± 0,372			2,49 ± 0,014	
Delta cadinene	483-76-1	1537	1538	1718	1724	0,79 ± 0,438		0,58 ± 0,512	2,16 ± 0,125	
Sesquiterpènes oxygénés						0,69	0,00	0,00	0,00	0,38
Caryophylleneoxide	1139-30-6	1600	1609	1903	1884	0,69 ± 0,517			0,38 ± 0,087	
Autres						0,46	0,00	0,26	0,20	0,32
E-ocimene	3779-61-1	1048	1048	1207	1234			0,26 ± 0,014	0,32 ± 0,014	
Gamma terpinene	99-85-4	1063	1060	1217	1221	0,46 ± 0,388			0,20 ± 0,052	
Non déterminé						9,20 ± 5,36	5,09 ± 1,65	9,92 ± 2,31	22,59 ± 1,26	25,74 ± 1,93
pourcentage HE (V/V) identifié quantifié						90,80	94,91	90,08	77,41	74,26
Nombre molécules identifiées quantifiées						23	17	21	17	25
Total général						100	100	100	100	100

Molécules d'intérêt (%>2):



Certaines familles aromatiques sont plus ou moins représentées selon les espèces. Ainsi les monoterpènes sont bien représentés (43 à 73% du total) dans les 5 espèces. Les monoterpènes oxygénés sont représentés dans toutes les espèces mais en concentration beaucoup plus importante dans le M3. A noter que cet écart est dû presque exclusivement à l'eucalyptol ; qui est d'ailleurs un composé très proche du limonène (qui est lui un monoterpène), qui lui n'a pas été identifié dans le M3. Les phénylpropanoïdes sont caractéristiques du PB et dans une moindre mesure du Mad.

Certains composés, bien que présents dans toutes les espèces, le sont en concentration beaucoup plus importante dans certains poivres que dans d'autres ; c'est le cas de l'alpha pinène et du beta pinène dans le poivre M1 ou dans une moindre mesure de l'alpha phellandrène dans le M3.

Plusieurs composés d'arôme n'ont été identifiés que dans l'une des cinq espèces de poivre. Le tableau ci-dessous fait la synthèse de ces spécificités.

Molécules	PN	PB	M3	M1	Mad
Eucalyptol			31,11		
Ylangene					0,40
Gamma elemene		0,15			
Alpha humulene	1,34				
Alpha curcumene	0,23				
Beta selinene					0,44
Myristicine		19,61			
Alpha muurolene			0,94		

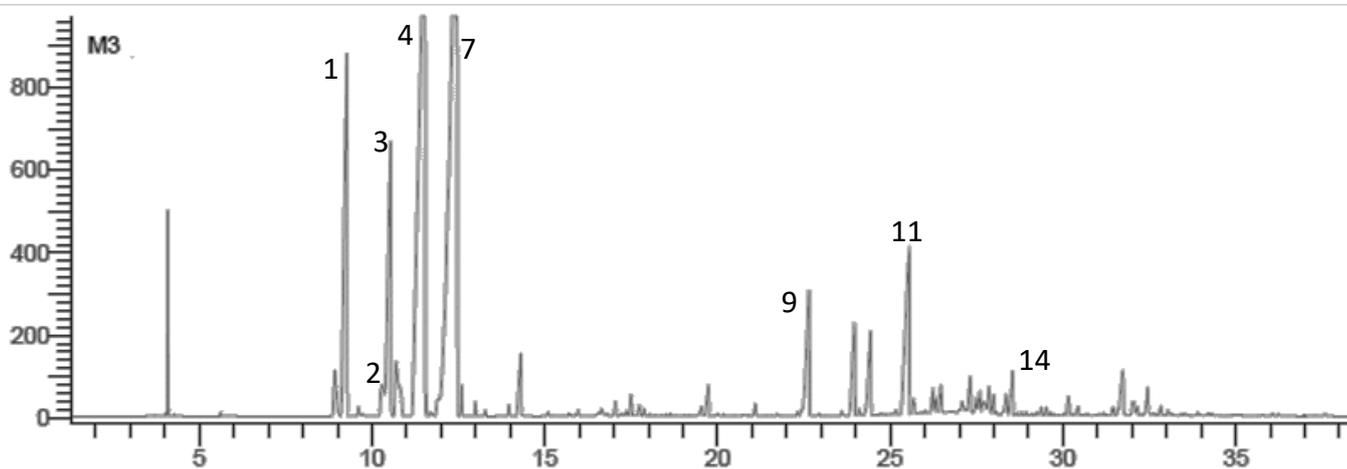
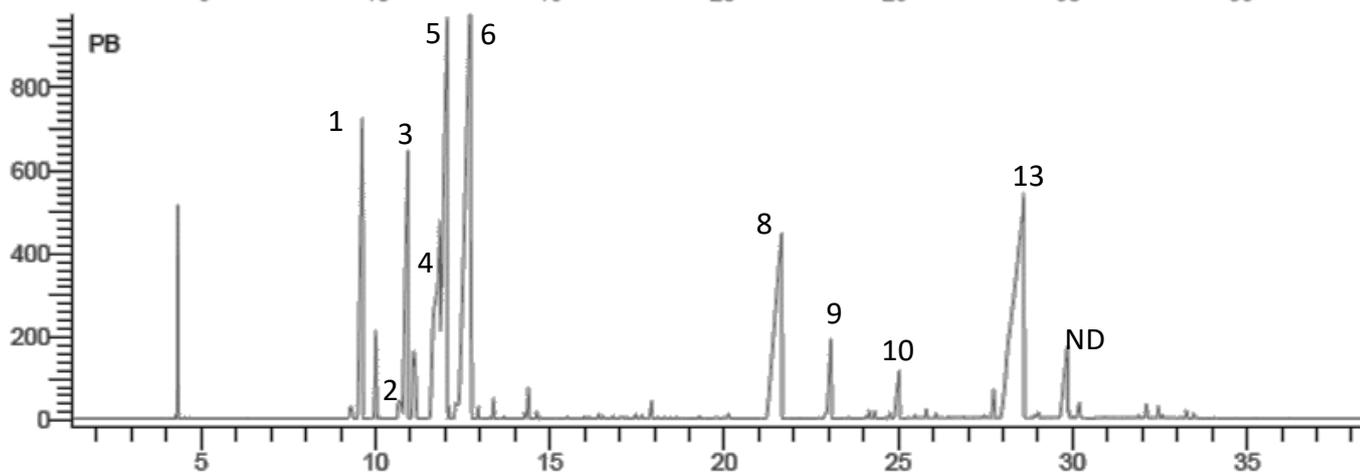
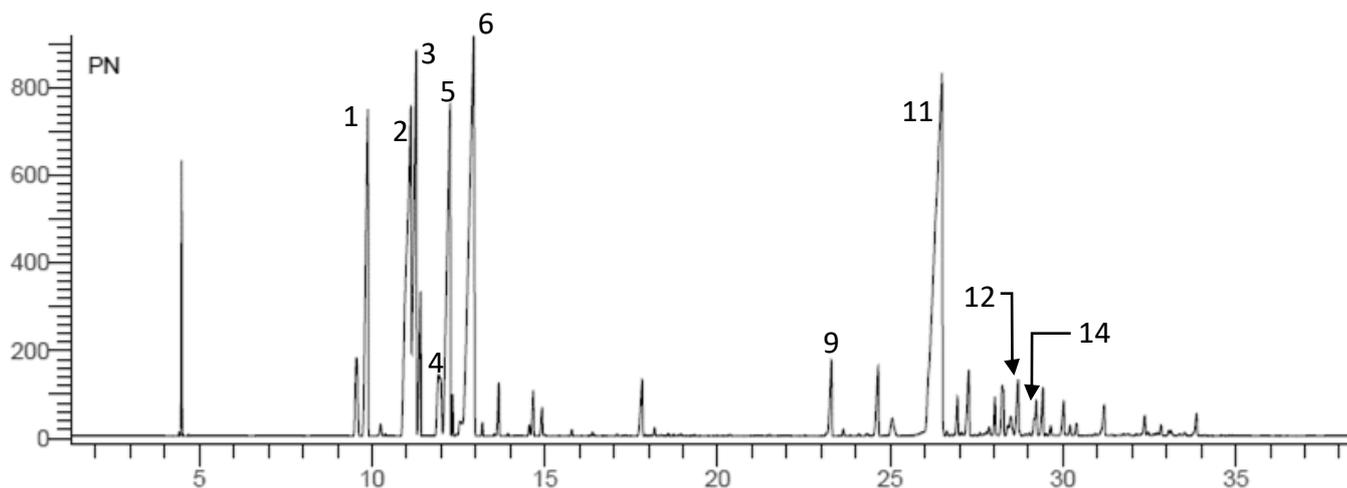
La myristicine semble être caractéristique du *Piper borbonense*.

Dans la mesure où l'eucalyptol est parfois co-élué avec le limonène et parce que les autres composés sont présents en faibles concentrations, on ne peut pas les considérer comme caractéristiques de nos échantillons.

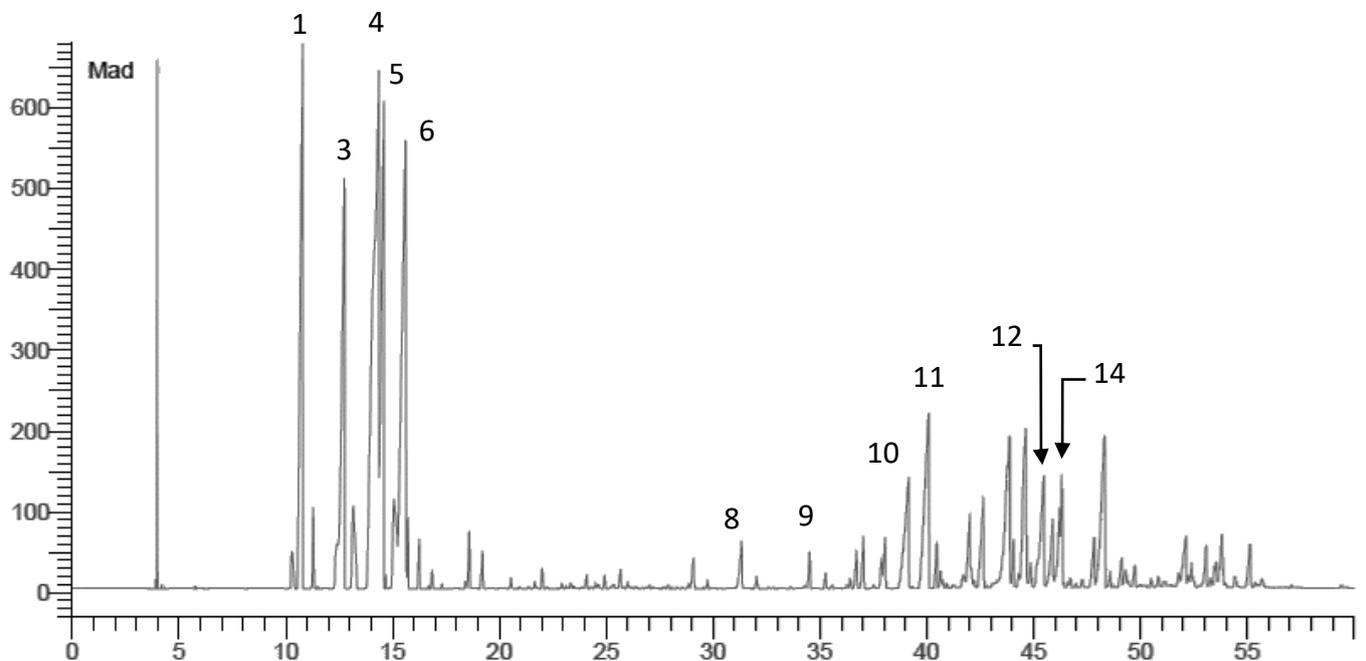
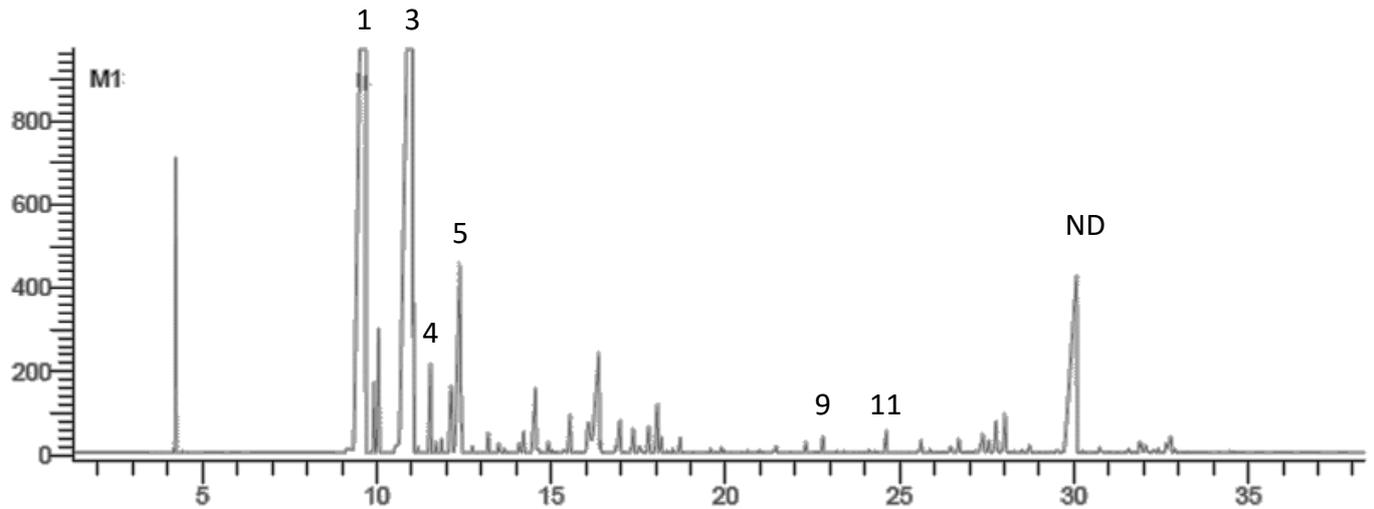
En outre, nous manquons actuellement de données pour pouvoir affirmer que de telles différences aromatiques sont bien dues à l'espèce plutôt qu'à des facteurs abiotiques tels que le climat et le terroir, les conditions de culture ou les procédés de transformation.

Profils chromatographiques (CG/FID colonne apolaire) des 5 espèces de poivre

Les profils de PN, PB, M3 et M1 ont été obtenus avec la méthode 1 (voir matériel et méthodes).
Le profil de MAD a été obtenu avec la méthode 2 (voir matériel et méthodes).



- | | |
|-----------------------|---------------------|
| 1. Alpha pinene | 8. Safrole |
| 2. Sabinene | 9. Delta éléméne |
| 3. Beta pinene | 10. Methyleugenol |
| 4. Alpha phellandrene | 11. Caryophyllene |
| 5. Delta 3 carène | 12. Beta bisabolene |
| 6. Limonène | 13. Myristicine |
| 7. Eucalyptol | 14. Delta cadinene |



Les profils chromatographiques se ressemblent sans être identiques. Ils illustrent les différences mentionnées plus haut. Ainsi, par exemple, on note la présence du pic d'eucalyptol (7) uniquement dans le M3 ou de celui la myristicine (13) seulement dans le PB.

3.3.4. Résultats de l'analyse sensorielle

	Classement poivre grains	Somme des rangs grains	Critères olfactifs grains dominants	Critères gustatifs grains dominants	Classement poivre moulu	Somme des rangs moulu	Critères olfactifs moulu dominants	Critères gustatifs moulu dominants
PN	5	34	agrumes, doux, fleuri	piquant, camphre, épices, piment, poivre	5	34	doux, épices, baie rose	piquant, épices
PB	3	25	doux, foin, garrigue	doux, épices, menthe, eucalyptus	3	21	doux, baie rose, camphre	doux, eucalyptus
M3	2	19	doux, verveine, camphre	doux, camphre, baie rose et eucalyptus	2	20	doux, eucalyptus, camphre	camphre, doux
M1	1	16	verveine, doux, camphre	fruité, doux, eucalyptus et épices	1	17	doux, miel, orange, camphre, menthe	doux, camphre, eucalyptus, fruité
Mad	4	26	camphre et menthe	camphre, épices, piquant	4	28	camphre, eucalyptus, épices	camphre, épices

L'ordre de classement est le même sur le poivre en grains et sur le poivre moulu. Le poivre malgache M1 (petits grains) est le mieux classé alors que le *Piper nigrum* arrive en dernière position. Le poivre réunionnais *Piper borbonense* est classé troisième. Cependant, même si le test statistique à 5 % révèle qu'il y a bien au moins un produit considéré comme très légèrement significativement différent par les juges pour les 2 poivres (test de Friedman, $P = 0.0458$ pour le poivre en grains, et $P = 0.0498$ pour le poivre moulu), le test post-hoc de Wilcoxon ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les produits 2 à 2.

Les descripteurs olfactifs sont le plus souvent les mêmes pour le poivre en grains et pour le poivre moulu d'une même espèce ; idem pour les descripteurs gustatifs. Dans une moindre mesure plusieurs descripteurs olfactifs et gustatifs sont les mêmes pour le poivre en grains d'une même espèce ; idem pour le poivre moulu d'une même espèce. Le camphre est, de loin, le descripteur olfactif et gustatif le plus utilisé, pour le poivre en grains ou moulu, quelle que soit l'espèce de poivre considérée.

4. Conclusions

Les résultats des études morphologiques ont révélé une différenciation entre les échantillons de Madagascar et des Iles de La Réunion et des Comores. La diversité morphologique des poivres sauvages de l'OI est caractérisée par 5 classes morphologiques ; 4 morphotypes proviennent de Madagascar et 1 morphotype est commun à l'île de La Réunion et aux Comores. Le morphotype M5 de La Réunion et des Comores et les morphotypes M2 et M3 de Madagascar sont morphologiquement proches. Les caractères distinctifs sont surtout des descripteurs qualitatifs des feuilles et des infrutescences. Cette étude a permis de documenter la diversité phénotypique de Tsiperifery. Elle incite à la révision taxonomique du genre *Piper* de l'OI. Sachant que l'espèce est l'unité de base de différents dispositifs internationaux pour la conservation et de valorisation durable (domestication, commerce international) des ressources phytogénétiques, la révision taxonomique est incontournable dans l'optique d'une gestion durable de la ressource. Mais pour une classification qui intègre les différentes définitions de l'espèce, on devra considérer la diversité morphologique (espèce morphologique), la diversité génétique (espèce phylogénétique), la diversité écologique (espèce écologique) et la diversité du cycle phénologique (espèce phénétique).

Les résultats de la génétique nous ont permis d'éclaircir la position systématique des poivres sauvages malgaches (Tsiperifery) et comorien par rapport au *Piper borbonense* de l'île de La Réunion.

Ces données confirment la position taxonomique de *Piper pachyphyllum* comme étant du Tsiperifery à « gros grains », très éloigné du *Piper borbonense*. Par contre, les données génétiques ont mis en évidence un groupe rassemblant des populations très proches les unes des autres, composées du *Piper borbonense* de la Réunion, du Tsiperifery à « petits grains » et du poivre sauvage de la Grande Comore, remettant en cause l'hypothèse selon laquelle tous les poivres sauvages malgaches et comorien sont des espèces différentes du *Piper borbonense*. Les différences morphologiques perçues pour ces trois poivres pourraient être d'origine pédoclimatiques. Sur le plan de la classification taxonomique, la distinction serait donc perceptible au niveau variété (var.) ou variation de forme (fa.).

La teneur en pipérine du *Piper nigrum* est au moins deux fois supérieure et jusqu'à 40 fois plus élevée que celle mesurée dans les autres poivres analysés. En revanche la teneur du poivre noir en huile essentielle est environ trois fois moins élevée que dans les autres poivres. Le *Piper nigrum* peut donc être différencié des autres poivres analysés sur ces simples critères. Sur ces mêmes critères (teneur en huile essentielle et en pipérine), le *Piper borbonense* réunionnais est proche du poivre sauvage petits grains malgaches M3. En ce qui concerne les composés d'arômes, les phénylpropanoïdes tels que la myristicine et le safrol semblent caractéristiques du *Piper borbonense* réunionnais.

Des travaux restent à réaliser afin de pouvoir valider des clefs chimiques d'authentification de nos poivres. Il serait notamment nécessaire de pouvoir s'affranchir des conditions abiotiques pour pouvoir confirmer que les différences de compositions chimiques et notamment les compositions aromatiques (chemotypes) observées sont bien liées à l'espèce.

Quoi qu'il en soit, en croisant les résultats obtenus par les analyses morphologiques, génétiques et chimiques, on peut avancer que nos critères permettent :

- de distinguer facilement *Piper nigrum* des autres poivres sauvages de l'Océan Indien étudiés
- de constituer un groupe comprenant le *Piper borbonense* réunionnais, le M3 petits grains malgache et le poivre sauvage des Comores ; groupe qui se distingue nettement du M1 gros grains malgache

Que cela soit fait sur la base de critères morphologiques, génétiques et/ou chimiques, cette capacité à authentifier, de manière fiable, les poivres en général et ceux de l'Océan Indien en particulier, est fondamentale dans une démarche de valorisation durable des poivres sauvages de l'Océan Indien.

Références bibliographiques

ADAMS, R.P. (1995). Identification of essentials oil components by chromatography / quadrupole mass spectrometry (Carol Stream, Illinois, USA, : Allured Publishing Corporation).

BALDWIN, B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.

BALDWIN, B.G. (1993), Molecular Phylogenetics of Calycadenia (Compositae) Based on ITS Sequences of Nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and Morphological Evolution Reexamined. *American Journal of Botany*, Vol. 80, No. 2 (Feb., 1993), pp. 222-238

CACHET, T., & ANAL, I. W. G. M. (2011). Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and Fragrance Journal*, 26(5), 297-299. doi: 10.1002/ffj.2061

CHAO-YUN, H., YUN-HONG, T., LI-SONG, H., LE-HE, T., HAI-PING, C., XIA-WEI, Q., HUA-SONG, W. (2015), *Piper peltatifolium*, a new species of Piperaceae from Hainan, China. *Phytotaxa*, 236(3), 291-295.

CHENG, Y.Q., XIA, N.H., & GILBERT, M.G. (1999), Piperaceae. Flora of China, Cycadaceae through Fagaceae. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri, USA, 110-129.

DE CANDOLLE, A. P. (1918), Théorie élémentaire de la botanique, ou exposition des principales de la classification naturelle et de l'art de décrire et d'étudier les végétaux.

DE CANDOLLE, C. (1923), PIPERACEARUM Clavis analytica, *Candollea* 1, 65-415.

JARAMILLO, M. A., & MANOS, P. S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 706-716.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

ESCOFIER, B., & PAGES, J. (2008), Analyses factorielles simples et multiples: objectifs, méthodes et interprétation. Dunod, 328 p.

HUSSON, F., JOSSE, J., & PAGES, J. (2010), Analyse de données avec R- Complémentarité des méthodes d'analyse factorielle et de classification. In 42èmes Journées de Statistique (p. nc).

Internet databases. (October 2014). Retrieved from <http://www.flavornet.org>, <http://www.pherobase.com>

International Standard Organization (1982). Black pepper and white pepper, whole or ground - Determination of piperine content, ISO 5564.

International Standard Organization (2007). Sensory analysis – methodology - ranking, ISO 8587.

International Standard Organization (2008). Spices, condiments and herbs - Determination of volatile oil content (hydro distillation method), ISO 6571.

- JARAMILLO, M. A., CALLEJAS, R., DAVIDSON, C., SMITH, J. F., STEVENS, A. C., TEPE, E. J. (2008), A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany*, 33(4), 647-660.
- JENNINGS, W., and SHIBAMOTO, T. (1980). Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, N.Y. Academic Press, (London, United Kingdom: Academic Press), p. 480.
- KONDJAYAN, N. and BERDAGUE, J.L. (1996). A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds (Laboratoire Flaveur: INRA de Theix, France,), p. 234.
- LÊ, S., J. JOSSE, AND F. HUSSON (2008), Factominer: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 2 (1), 1–18.
- MANJATO, N., RAMAHEFARIVELO, A., DAVIDSON, C., PHILLIPSON, P. (2010), The Malagasy species of *Piper* (Piperaceae), in: Jeannoda V. H., Razafimandimbison S. G., Petra De Bolck, Résumés du XIX^e congrès de l'AETFAT Madagascar, 25-30 Avril 2010, Antananarivo, Madagascar, pp. 284.
- PAGES, J. (2004), Analyse factorielle de données mixtes. *Revue de statistique appliquée*, 52(4), 93-111.
- RAHARIJAONA, A.S. (2015), L'importance de l'identification juridique des participants à la gestion durable du *Tsiperifery* : Cas d'Anjozorobe, Mémoire Master II, Université d'Antananarivo, Madagascar, 144 p.
- RAZAFIMANDIMBY H., (2017) Etudes de la diversité morphologique, biologique et écologique de *Tsiperifery* (*Piper spp.*) pour la gestion durable des ressources génétiques à Madagascar. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et Environnementales, EDGRND, ESSA, Université d'Antananarivo. 237 p
- RAZAFIMANDIMBY, H., BENARD, A.G., ANDRIANOELISOA, H., LEONG J.M., TOUATI, G., LEVESQUE, A., WEIL M., RANDRIANAIVO, R., RAMAMONJISOA, L., QUESTE, J., AUBERT S., DANFLOUS, J.P., DANTHU, P. (2017), *Tsiperifery*, the wild pepper from Madagascar, emerging on the international spice market whose exploitation is unchecked: current knowledge and future prospects. *Fruits*, 72(6), 331-340.
- SMITH, J.F., STEVENS, A.C., TEPE, E.J., & DAVIDSON, C. (2008), Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 275(1-2), 9-30.
- TEBBS, M.C. (1993), Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 3. The taxonomy of *Piper* sections *Lepianthes* and *Radula*. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany*, 23, 1-50.