

**Tableau 1.** Caractères distinctifs des Cinchonoideae et des Rubioideae (Robbrecht & Manen 2006).

Caractères	Cinchonoideae <i>sensu lato</i>	Rubioideae
<b>Port</b>	majoritairement ligneux <sup>(a)</sup>	ligneux ou herbacé <sup>(b)</sup>
<b>Cristaux d'oxalate de calcium</b>	majoritairement cristaux de sable et rarement raphides	raphides
<b>Trichomes d'indumentum extérieur</b>	majoritairement de type cylindrique	majoritairement de type articulé
<b>Estivation des lobes corollaires</b>	variable (contorté, imbriqué, valvaire)	majoritairement valvaire
<b>Biologie florale</b>	transfert secondaire du pollen (chez certains membres des Ixoroideae s.s.)	hétérostylie (extrêmement rare chez les Cinchonoideae s.l.)
<b>Accumulation de l'aluminium</b>	seulement chez quelques représentants	fréquente et intense
<b>Composés chimiques</b>	iridoïdes et alcaloïdes indolés	anthraquinones
<b>Niveau de ploïdie</b>	majoritairement 2× et 4×	niveau de ploïdie élevé pas rare

<sup>(a)</sup> si herbacée, très rarement annuelle (quelques espèces dans les genres *Sipanea* Aubl. et *Limnosipanea* Hook.f.

<sup>(b)</sup> annuelles très fréquentes.

chloroplastiques, Rydin *et al.* (2017) ont contribué à démontrer que la phylogénie de la famille des Rubiaceae était encore loin d'être résolue.

Les Rubioideae se distinguent des Cinchonoideae par des caractères liés au port, à la biologie florale, à la faculté d'accumuler l'aluminium, à la présence de divers composés chimiques, etc. (tableau 1).

### 1.5. *Craterispermum* Benth.

Le genre *Craterispermum* a été décrit à partir d'une seule espèce [*C. laurinum* (Poir.) Benth.] (Bentham 1849) avec comme spécimen type « *Poiret* s.n. [P00553429] ». Ce spécimen avait été par le passé identifié et décrit comme étant *Coffea laurina* Poir. (Lamarck 1811).

C'est la forme généralement creuse des graines de *Craterispermum* à maturité qui lui a valu son nom (étymologie : *crater* = creux et *spermum* = graine).

La position taxonomique du genre *Craterispermum* au sein de la famille des Rubiaceae a de tout temps été problématique. Cependant l'hypothèse la

plus acceptée aujourd'hui place le genre dans la tribu monogénérique des *Craterispermeae* (Robbrecht & Manen 2006 ; Razafimandimbison *et al.* 2008 ; Bremer & Eriksson 2009) qui appartient à la supertribu des *Psychotriidinae* (Robbrecht & Manen 2006). La supertribu des *Psychotriidinae* est caractérisée par un port essentiellement ligneux, des inflorescences principalement terminales, 1(-2) ovules par locule et des fruits à prédominance charnue (drupes).

Le genre *Craterispermum* est distribué en Afrique tropicale continentale, dans les îles du golfe de Guinée (Annobon, São Tomé et Príncipe) et dans les îles de l'océan Indien (Madagascar et Seychelles) (Robbrecht 1988 ; Taedoumg *et al.* 2011 ; De Block & Randriamboavonjy 2015 ; Razafimandimbison *et al.* 2017).

*Craterispermum* se distingue au sein des *Rubiaceae* par ses inflorescences souvent très compactes, axillaires et disposées par paires au niveau des nœuds. L'ovaire est à deux loges comportant chacun un seul ovule. Le fruit charnu contient une seule graine (un seul ovule se développe alors que le second avorte) de forme plus ou moins sphérique et généralement cratériforme. Ces graines possèdent un tégument spécial, discontinu avec des cellules isolées présentant des épaissements sur les bords (Igersheim 1992). L'accumulation de l'aluminium dans les parties végétatives, caractéristique chez *Craterispermum* (Jansen *et al.* 2000a), est révélée dans le matériel sec par une teinte jaune ou vert-olive.

Les caractères listés ci-dessus rendent les espèces du genre *Craterispermum* assez aisément reconnaissables au niveau générique. Cependant, les nombreuses similitudes morphologiques au sein du genre rendent très difficile l'établissement des frontières taxonomiques. Hormis quelques flores locales telles que *Flora Zambesiaca* (Verdcourt 1989), *Flora of Tropical East Africa* (Verdcourt 1976), et quelques traitements sommaires, notamment les checklists (par exemple : Aubréville 1959 ; Sosef *et al.* 2006 ; Figueiredo 2005), il n'existe aucune étude qui couvre toute l'aire de distribution du genre. Les seuls travaux taxonomiques conduits à ce jour dans ce groupe concernent les études succinctes de Verdcourt (1973) et de Robbrecht (1994). La première consiste en une étude synoptique du genre et la seconde traite de l'infra-spécificité d'un taxon. Un nombre important de spécimens a pourtant été collecté à travers le continent africain au cours des deux derniers siècles, mais la majeure partie d'entre eux restaient non ou mal identifiés avant le présent travail.

Comme dans beaucoup de groupes de plantes, l'hétérostylie a tout d'abord été ignorée dans ce genre, ce qui a conduit à la description d'espèces qui ne représentaient, en fait, qu'un polymorphisme génétique et fonctionnel. De Wildeman (1923) a été le premier à évoquer la possible existence de l'hétérostylie chez *Craterispermum* en notant que certaines espèces décrites semblaient très proches et ne différaient que par les caractères naturellement liés à l'hétérostylie.

Après la description du genre *Craterispermum*, Bentham (1849) l'a rapproché sans hésitation de la tribu des *Vanguerieae* en raison de ses inflorescences souvent compactes, axillaires et disposées par paires au niveau des nœuds et de son ovaire biloculaire contenant des ovules solitaires et pendants. Verdcourt (1958), en établissant formellement l'existence de l'hétérodistylie et en se basant sur la présence de raphides, l'exclut de cette tribu et crée alors la tribu monogénérique

des *Craterispermeae* qu'il place au sein de la sous-famille des *Rubioideae* près des *Urophyllaeae* et des *Psychotrieae*. Robbrecht (1988) propose son retour à une position plus près des *Vanguerieae* et tribus associées. Il argumente ce retour par la présence de fruits contenant seulement un pyrène plus ou moins sphérique avec un endocarpe caractéristique, l'avortement du deuxième ovule au cours de la maturation de l'ovaire (comme dans beaucoup de *Vanguerieae* biloculaires) et l'absence d'enveloppe tégumentaire au niveau de la graine. Il pense donc que les *Craterispermeae* devraient être maintenus comme tribu monogénérique, mais dans la sous-famille des *Antirheoideae* nouvellement créée. Bremer & Manen (2000), dans une étude phylogénétique et une redéfinition de la sous-famille des *Rubioideae* en 16 tribus, y ramènent les *Craterispermeae*. Robbrecht & Manen (2006) confirment ce retour aux *Rubioideae* lors de leur restructuration de la famille en deux : *Craterispermum* ferait, selon eux, désormais partie de la grande sous-famille des *Rubioideae* et serait étroitement lié aux *Schradereae* et aux *Morindeae*. Ces auteurs n'arrivent cependant pas à se prononcer sur son statut tribal monogénérique et envisagent alors l'hypothèse du classement de *Craterispermum* comme une sous-tribu au sein de la tribu des *Morindeae*. Une autre étude phylogénétique (Razafimandimbison *et al.* 2008) indique que *Craterispermum* serait très proche des *Prismatomerideae*. Cependant, du fait de l'absence de traits morphologiques évidents pour soutenir cette relation, ces auteurs maintiennent prudemment le statut tribal de *Craterispermum*.

Sur un plan pratique, le matériel d'herbier de *Craterispermum* est souvent pauvre et ne porte généralement que des inflorescences résiduelles ; les fleurs sont fugaces et les fruits mûrs ne restent pas longtemps sur la plante, probablement mangés par les mammifères ou les oiseaux frugivores (Taedoumg *et al.* 2011). De plus, en raison de la structure compacte des inflorescences, les fleurs et les fruits tombent facilement pendant la collecte, le pressage, le séchage et le montage en herbier. Tout ceci rend difficile la description de nouveaux taxons dans le genre (Taedoumg & Hamon 2013).

### **1.5.1. *Craterispermum* : un potentiel économique non négligeable**

Comme déjà souligné, de nombreuses populations pauvres vivent dans les zones rurales des pays en développement et dépendent directement ou indirectement de l'écosystème et de la biodiversité locale pour leur subsistance au quotidien. Dans ces régions, les éléments de biodiversité (par ailleurs souvent abondants) sont généralement disponibles et pour la plupart librement accessibles. Ces éléments représentent des mesures de dernier recours, par exemple en période de mauvaises récoltes, en tant que pourvoyeurs naturels de services de santé dans les « déserts » médicaux et en tant que source substantielle de revenus (Roe *et al.* 2011 ; Taedoumg *et al.* 2018).

Ainsi, les applications de *Craterispermum* en médecine traditionnelle sont nombreuses. En effet, les notes des collecteurs ainsi que diverses études ethnobotaniques rapportent que les différentes parties végétatives sont utilisées de façon empirique par les populations africaines dans le traitement de la toux, des douleurs gastriques, du paludisme, de la diarrhée, des maladies vénériennes

ou encore des parasites intestinaux. Il serait aussi un cicatrisant avéré et un aphrodisiaque (Jansen *et al.* 2005). Une étude phytochimique sommaire menée en Sierra Leone a d'ailleurs montré une bonne activité antimicrobienne des extraits de feuilles et d'écorces de *Craterispermum laurinum* sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Koroma & Ita 2009). La présence de molécules d'intérêt pharmaceutique est fréquente dans la famille des Rubiaceae : plusieurs composés bioactifs (alcaloïdes, terpenoïdes, tannoïdes) sont signalés dans la famille (Hallé 1970 ; Bouquet & Debray 1974 ; Malaisse *et al.* 1979 ; Kaboré *et al.* 1998 ; Ouédraogo *et al.* 1998 ; Karou *et al.* 2011) dont certains ont des vertus thérapeutiques particulièrement intéressantes, à l'instar de la quinine (*Cinchona* L.) et de la yohimbine (*Pausinystalia* Pierre ex Beille). Certains genres, comme *Oxyanthus* DC. font depuis quelques années l'objet d'études biochimiques prometteuses (Nkeh-Chungag *et al.* 2010).

Le potentiel économique des espèces du genre *Craterispermum* en tant que plantes hyperaccumulatrices d'aluminium est important. Les populations d'Afrique de l'Ouest synthétisent une teinture jaune brunâtre à partir de *Craterispermum laurinum*. Cette teinture, faite à base d'écorces et de feuilles broyées, est utilisée comme mordant en remplacement de l'alun et est vendue dans les marchés pour teinter le coton dans l'industrie textile artisanale (Jansen *et al.* 2005). D'autre part, il a été démontré que les plantes hyperaccumulatrices ont généralement une concentration en métaux dépassant largement celles du sol (Jansen *et al.* 2000a) et peuvent être utilisées pour réduire la pollution des sols. Dans le futur, le *phytomining* (récolte du métal en utilisant des plantes hyperaccumulatrices) pourrait constituer une alternative « verte » aux mines traditionnelles puisque les récoltes atteignent plus de 36 g d'aluminium par kg de matière végétale (Jansen *et al.* 2005).

### 1.5.2. Pourquoi une révision du genre *Craterispermum*?

Cette révision s'intègre, comme d'autres par le passé (De Block 1998 ; Stoffelen 1998 ; Sonké 1999 ; Dessein 2003 ; Ntoré 2004 ; Degreef 2006 ; Neuba 2006 ; Nguembo 2008, etc.), dans un projet plus vaste, initié depuis Robbrecht (1988), pour rendre la famille des Rubiaceae plus compréhensible et ainsi favoriser sa prise en considération efficace dans les divers processus de gestion durable des écosystèmes. Il s'agit essentiellement dans ce travail d'établir la délimitation taxonomique au sein du genre *Craterispermum*, sur la partie continentale de l'Afrique. Pour atteindre cet objectif principal, plusieurs objectifs spécifiques sont traités au travers de diverses approches :

a) Une révision taxonomique est exécutée pour mettre en lumière les caractères morphologiques des différentes espèces. Une clé de détermination et le degré de menace de tous les taxons traités sont fournis. Un accent est mis sur le complexe d'espèces constitué de *Craterispermum cerinanthum*, *C. laurinum* et *C. schweinfurthii*. La révision est limitée à l'Afrique continentale et aux îles du golfe de Guinée, les espèces malgaches et seychelloises n'étant pas incluses.

b) Une étude de la biogéographie est entreprise pour localiser le ou les centres de diversité et d'endémisme du genre *Craterispermum* en Afrique continentale. Il est question de contribuer, par de nouvelles données de distribution, au débat sur la localisation et l'origine des zones de forte biodiversité et d'endémisme en Afrique subsaharienne.



## 2. Méthodologies

### 2.1. Collectes sur le terrain et conditionnement des échantillons

Les échantillons d'herbier rendent compte de la présence d'un taxon dans un lieu donné, à un moment précis. La valeur de ces échantillons dépend étroitement du soin avec lequel ils ont été récoltés et traités. Il est donc impératif pour le collecteur de produire, autant que possible, les meilleurs échantillons accompagnés de notes de terrain adéquates.

L'équipement de base du récolteur en vue d'études taxonomiques est constitué de :

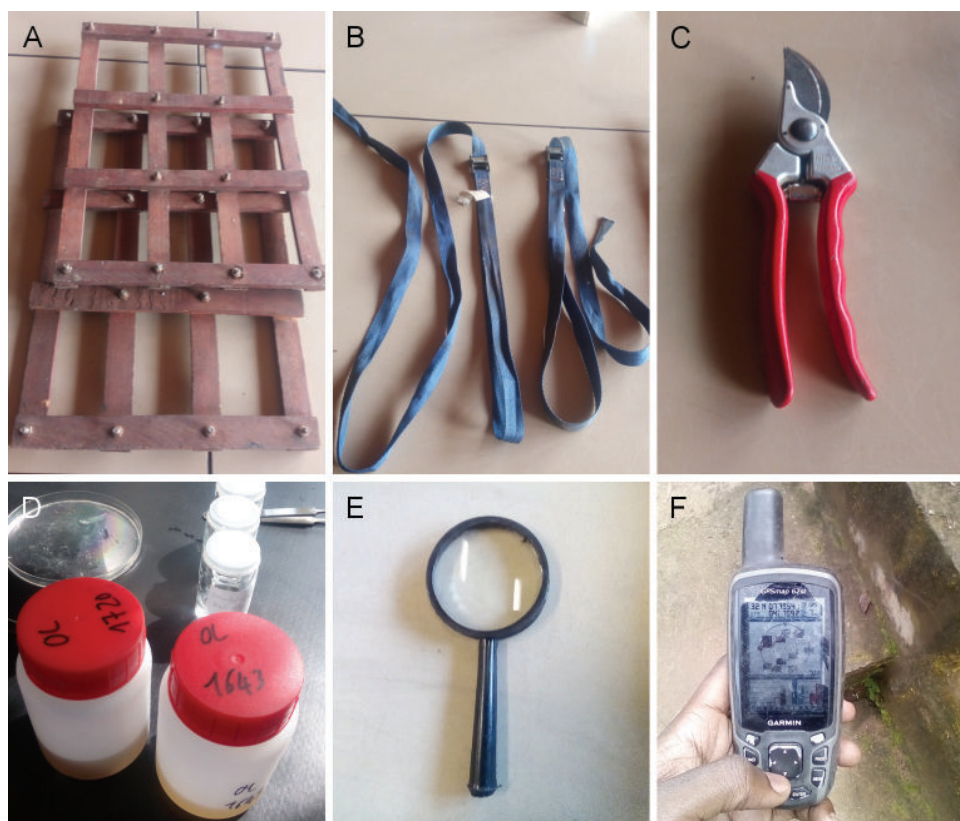
- presses et sangles extensibles (Fig. 3A-B) ;
- papiers presse ;
- carnet (idéalement imperméable) pour y noter la suite numérique des échantillons collectés et les détails, dont certains, fugaces, ne seront plus visibles sur l'échantillon à l'état sec ;
- crayon ou stylo à encre indélébile résistant à l'humidité ;
- marqueur indélébile pour étiqueter les spécimens directement sur les papiers presse ou les pots ;
- étiquettes à ficelle pour numéroter chaque échantillon ;
- loupe de grossissement pour observer *in situ* certains détails invisibles à l'œil nu (Fig. 3E) ;
- tubes de collecte (pots) pour conserver certains organes ou parties d'organe fragiles en alcool ;
- liquide de préservation (alcool à 70 %) ;
- grands sacs en plastique de collecte (sac poubelle 50 l ou 100 l) pour conserver et porter les échantillons collectés avant le pressage ;
- enveloppes/sachets en papier de petite taille pour collecter les fruits/graines ;
- sachets zip pour conserver et sécher le matériel en silicagel destiné aux analyses moléculaires ;
- ficelles pour maintenir en bloc les herbiers, avant leur mise en alcool dans les sacs en plastique ;
- appareil photo pour capturer des images *in situ* et immortaliser certains détails qui disparaîtraient au séchage ;
- sécateur pour récolter et élaguer de manière esthétique et pratique les parts à presser (Fig. 3C) ;
- instrument GPS (Global Positioning System) pour géolocaliser chaque récolte (Fig. 3F) ;
- machette pour s'ouvrir, au besoin, le passage dans la forêt très souvent inextricable en zone tropicale ;
- dessiccateur comme le gel de silice (ou silicagel) pour sécher rapidement le matériel destiné aux analyses moléculaires (feuilles fraîches, cambium...) ;
- grand sac à dos ou sac en bandoulière pour transporter aisément les outils de terrain et la paire de presses.

Le matériel collecté doit être le plus complet possible. Il faut éviter autant que possible de collecter du matériel endommagé, notamment par les insectes. Le ou les spécimens collecté(s) doivent refléter, autant que faire se peut, la gamme de

variation des caractères de la plante. La collecte de matériel stérile (sans fleurs ni fruits) est déconseillée, en raison de la difficulté d'identification qui pourrait en découler.

Les fruits et/ou fleurs supplémentaires sont placés dans des enveloppes ou dans des pots contenant de l'alcool à 70 % (Fig. 3D). Sont notés dans le carnet de terrain, certains caractères susceptibles de disparaître avec le séchage (couleur, odeur etc.) mais aussi des informations liées à la localité, l'habitat (type de végétation, type de substrat, proximité avec d'éventuels points d'eau), l'altitude et la composition phytosociologique de l'environnement direct. Lorsque cela est possible, il est intéressant de glaner des informations se rapportant aux noms vernaculaires et aux utilisations ethnobotaniques locales de la plante collectée.

Des photos de la plante sont prises sous différents angles de vue avec un accent mis sur les parties fertiles et sur des détails à première vue pertinents et fugaces (Fig. 4A).



**Fig. 3.** Exemple de matériel nécessaire à la collecte des échantillons. **A.** Presses pour herbiers. **B.** Sangles extensibles. **C.** Sécateur. **D.** Pots contenant de l'alcool à 70 %. **E.** Loupe de grossissement. **F.** Appareil GPS (Global Positioning System).



Du matériel ligneux (bois) peut aussi être collecté séparément (Fig. 4B). Dans ce cas, il faut prendre soin d'inscrire au marqueur indélébile, sur la section transversale de l'échantillon, un numéro le renvoyant au spécimen d'herbier.



**Fig. 4. A.** Séance de prise de vues de parties fertiles d'un spécimen avant sa collecte. **B.** Section transversale de tige de *Craterispermum schweinfurthii*.

L'échantillon de plante collecté est étalé dans un papier journal et élagué délicatement au sécateur, en gardant à l'esprit qu'il finira fixé sur une planche d'herbier (270 x 240 mm généralement) (Fig. 5A). Sa disposition doit mettre en évidence le maximum de caractères potentiellement discriminants. Pour les feuilles, les faces inférieure et supérieure du limbe doivent être exposées dans le même plan pour une meilleure observation comparative. Dans le cas de taxons à très gros fruits, il est indiqué d'ouvrir longitudinalement ou transversalement le fruit en deux parties égales. Cette coupe permet une observation directe de l'intérieur du fruit mais aussi une facilitation du séchage surtout en cas de fruit charnu.

Les échantillons sont ensuite numérotés soit directement sur le papier journal grâce à un marqueur indélébile, soit à l'aide d'étiquettes à fil accrochées sur les spécimens. La suite numérique est le code généralement utilisé et constitué des initiales du collecteur et d'un chiffre, qui définissent un numéro unique. Chaque numéro est mis en correspondance avec une description succincte de l'échantillon transcrite dans le carnet de terrain. À cette description sont associés le nom de la localité et les coordonnées géographiques de l'endroit où la plante a été collectée. Le matériel collecté doit idéalement être pris en charge immédiatement après la collecte pour éviter sa dégradation (Fig. 5C). Mais ceci pose généralement un problème pratique. En effet, déployer le dispositif de pressage à chaque spécimen collecté est assez contraignant. Une option consiste à regrouper les spécimens collectés dans un sac poubelle (100 l) (Fig. 5B) et de ne les presser que lorsque 3 à 5 échantillons ont été récoltés.

Si possible, jusqu'à 6 parts du même échantillon, appelées « duplicata », sont réalisées. Les séries sont pressées à l'aide de presses et de sangles extensibles (deux jours sous presse au minimum). Les parts collectées seront destinées aux dépôts dans différents herbiers afin d'assurer le meilleur accès possible au

spécimen, lui donnant plus de chance d'être utilisé et identifié par les botanistes à travers le monde.

En l'absence de dispositif de séchage sur le terrain, au bout de 50 à 60 numéros collectés, les échantillons sont sortis des presses, fixés ensemble à l'aide de ficelles et disposés dans des sacs poubelles de 100 l. Ces échantillons sont arrosés d'alcool à 50 %, puis fermés le plus hermétiquement possible afin d'en assurer la conservation (Fig. 5D). Cette imprégnation à l'alcool a l'avantage de conserver les échantillons ayant tendance à moisir ou à pourrir. Au retour du terrain, les échantillons sont directement mis à sécher au four à feu très doux. C'est l'occasion de faire les derniers ajustements dans la position, la forme et la taille des échantillons pressés, car une fois secs, toute tentative de modification endommagerait l'échantillon (Fig. 5E). Il convient cependant de rappeler que l'ajout d'alcool aux spécimens d'herbier détruit leur ADN et les rend inutilisables pour des études moléculaires ultérieures.

Le silicagel (ou gel de silice) a la capacité de déshydrater rapidement la matière végétale (feuilles, cambium) destinée aux analyses moléculaires. Un fragment de chaque échantillon collecté est disposé dans une enveloppe, elle-même placée dans un sachet en plastique hermétique (sachet zip) contenant du silicagel. Sur chaque enveloppe est noté le numéro de collecte unique composé des initiales du récolteur et d'un numéro (Fig. 6A). Ce code correspond à l'échantillon d'herbier du même individu déjà pressé afin de permettre la mise en concordance des spécimens d'herbier et des échantillons en silicagel. Cette disposition permet par ailleurs de moins charger les enveloppes avec des informations déjà marquées dans le carnet de récolteur au moment de la mise en herbier des spécimens.

Pratiquement, les feuilles fraîches et matures constituent les échantillons idéaux. Leur nervure principale est éliminée et les deux côtés du limbe sont découpés en petites tranches. Pour chaque individu, la surface de tissu à récolter doit atteindre au minimum 5 cm<sup>2</sup> (Fig. 6A).

Le matériel est ensuite placé dans une enveloppe en papier qui sera annotée. Plusieurs enveloppes peuvent être disposées dans un même sachet zip préalablement rempli de silicagel. Le sachet en plastique doit être fermé hermétiquement afin de prévenir l'absorption d'humidité ambiante par le silicagel qui entraînerait un mauvais séchage de l'échantillon (Fig. 6B). Une mauvaise déshydratation ou une déshydratation trop lente du matériel végétal peut conduire à une oxydation et à une altération de l'ADN, notamment des bases pyrimidiques, et des sucres (Eglington & Logan 1991). Le taux d'humidité des échantillons doit donc absolument être suivi dans le temps. Chaque soir, en rentrant de la journée de terrain, le silicagel de chaque sachet en plastique (qui aura changé de couleur, signe qu'il aura absorbé l'humidité des échantillons) doit être remplacé. Le silicagel usagé sera remplacé par du silicagel neuf ayant la couleur initiale (Fig. 6B). L'opération sera répétée autant de fois que nécessaire, c'est-à-dire jusqu'à ce que le silicagel dans le sachet ne change plus de couleur, attestant que le matériel végétal est alors parfaitement sec.