



---

UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE  
Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR EN CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES**  
par  
**M. Benjamin METOYER**

---

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA  
CHIMIODIVERSITÉ DES HÉPATIQUES DE  
NOUVELLE-CALÉDONIE**

---

Soutenue publiquement le 21 août 2017 devant le jury composé de :

<b>Prof. Christine GERARDIN</b> Professeur des Universités, Université de Lorraine	<b>Rapporteur</b>
<b>Prof. Vincent SOL</b> Professeur des Universités, Université de Limoges	<b>Rapporteur</b>
<b>Prof. Yoshinori ASAKAWA</b> Professeur des Universités, Tokushima Bunri University (Japon)	<b>Examineur</b>
<b>Prof. Phila BIANCHINI</b> Professeur des Universités, Université de la Polynésie Française	<b>Co-directeur</b>
<b>Dr. Nicolas LEBOUVIER</b> Maitres de Conférences HDR, Université de la Nouvelle-Calédonie	<b>Examineur</b>
<b>Prof. Mohammed NOUR</b> Professeur des Universités, Université de la Nouvelle-Calédonie	<b>Directeur</b>

**Ecole doctorale du Pacifique**

**Unité de recherche : Institut des Sciences Exactes et Appliquées**

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans l'Equipe de Chimie des Substances Naturelles au sein de l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA) sous la direction de Monsieur le Professeur Mohammed Nour de l'Université de Nouvelle-Calédonie et en codirection avec Madame la Professeure Phila Raharivelomanana de l'Université de Polynésie Française de juin 2014 à juillet 2017. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Mohammed Nour de m'avoir accueilli dans son groupe, de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie et de m'avoir donné la possibilité de présenter mes travaux lors du symposium international « ISPSA » ayant eu lieu à Tokoshima (Japon). Je tiens à remercier aussi vivement la Professeure Phila Raharivelomanana pour son suivi au jour le jour concernant l'écriture de communications écrites et le présent manuscrit.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Yoshinori Asakawa pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Chimie des Substances naturelles de l'Université de Tokoshima Bunri (Japon) pendant trois mois, pour son aide logistique précieuse concernant les transports, le logement et toutes les commodités liées à la vie sur place, pour m'avoir fait découvrir le Japon. Je tiens aussi à le remercier pour son soutien scientifique lié aux manipulations et à l'analyse de spectre de résonance magnétique nucléaire. Je remercie aussi Monsieur le Professeur Yoshida pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie Monsieur Louis Thouvenot pour les identifications des plantes que je lui ai envoyées, les discussions très intéressantes que nous avons pu avoir et pour m'avoir permis de l'accompagner lors de ses missions de récoltes ce qui m'a réellement éclairé sur les hépatiques et certains concepts botaniques.

J'aimerais également remercier Madame le Docteur Linda Guentas pour sa formation de grande qualité aux techniques d'essais antimicrobiens en milieu liquide, de la souchothèque jusqu'à l'analyse des résultats, domaine dans lequel j'étais parfaitement novice. Elle m'a permis d'acquérir des connaissances nécessaires dans ce domaine étroitement lié à la phytochimie.

Je remercie Monsieur le Docteur Edouard Hnawia pour son soutien et son aide lors des récoltes ainsi que Monsieur le Docteur Nicolas Lebouvier pour nos discussions très intéressantes sur la biosynthèse des terpénoïdes et son suivi très apprécié lors de la rédaction de communications aussi bien sur le fond que sur la forme.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Charlotte Thieury pour son aide logistique concernant les tests antimicrobiens et sa bonne humeur. Je remercie également Monsieur Cyril Antheaume pour nos discussions intéressantes sur la chimie analytique et son aide pour l'élucidation structurale.

Un grand merci aussi aux stagiaires qui m'ont aidé lors de cette thèse : Juliette Ambrosini, Elodie Davong et Sarah Coulibaly.

## Article et communications produits durant la thèse :

### Publications :

- B. Métoyer, P. Coulerie, N. Lebouvier, E. Hnawia, L. Thouvenot, Y. Asakawa, P. Raharivelomanana and M. Nour. Volatile Constituents of New Caledonian Frullania Species, Natural Product Communications Vol. 11 (0) 2016

Un article est en cours de rédaction : Chemical analysis of 12 species of Bazzanioideae from New Caledonia for chemotype and biomarker determination.

### Posters :

- B. Métoyer, P. Coulerie, N. Lebouvier, E. Hnawia, L. Thouvenot, Y. Asakawa, P. Raharivelomanana and M. Nour. Volatile component of six Frullaniaceae from New Caledonia. international symposium of phenolic substance and aromatic (Tokushima, Japon) 2015.
- Doctoriales de l'Université de Nouvelle-Calédonie, 2015.

### Communications orales :

- Doctoriales de l'Université de Nouvelle-Calédonie, 2017.
- Participation à l'évènement « Ma thèse en 180 secondes », l'Université de Nouvelle-Calédonie, 2016.

## ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
#C	Numéro du carbone
<sup>1</sup> H	Isotope de l'hydrogène avec un neutron
<sup>13</sup> C	Isotope du carbone avec sept neutrons
δC	Déplacement chimique du carbone (en ppm)
δH	Déplacement chimique du proton (en ppm)
AcOEt	Acétate d'éthyle
Ari.	Aristolane
Aro.	Aromadendrane
BG	Bicyclogermacrane
br s	Singulet large
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	Cyclohexane
CIM	Concentration inhibitrice minimale
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutérié
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutérié
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
CL	Concentration létale
CLHP	Chromatographie en phase liquide haute performance
CPG-FID-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de flamme à ionisation et à un spectromètre de masse
d	Doublet
DAD	Détecteur à réseau de diodes
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet de doublet
d-DMSO	Diméthyl sulfoxyde deutérié
DEPT	Augmentation sans déformation par transfert de polarisation (Distortionless enhancement by polarization transfer)
DL <sub>50</sub>	Dose médiane létale (soit 50%)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Eau Mq	Eau ultra pure produit par un système de filtration et osmose inverse de la société Millipore (Milli-Q)
EC <sub>50</sub>	Concentration pour laquelle 50% de l'effet maximal est observé
EI	Impact électronique

ESI	Ionisation par électronébulisation
Et <sub>2</sub> O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
eV	Electron Volt
Exp.	Expérimental
GI <sub>50</sub>	Concentration pour 50% d'inhibition maximal de prolifération cellulaire
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HR	Haute résolution
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice à 50%
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
LB	Bouillon Lysogène
Litt.	Littérature
m/z	Rapport masse sur charge
m	Milli
m	Multiplet
M	Masse moléculaire
MIC	Concentration minimale inhibitive
n	Nano
nM	Nano molaire
NOESY	Spectroscopie NOE et d'échange
PP	pyrophosphate
q	Quadruplet
quin	Quintuplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SM	Spectrométrie de masse/ spectromètre de masse
t	Triplet
t <sub>R</sub>	Temps de rétention (min)
uma	Unité de masse atomique
UV	Ultraviolet
V	Volt
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Visible

# SOMMAIRE

Remerciements .....	2
Abréviations .....	4
Sommaire des Tableaux .....	12
Sommaire des Figures .....	17
Introduction générale.....	21
<b>PARTIE I. Généralités sur les hépatiques .....</b>	<b>23</b>
1 Présentation botanique des hépatiques.....	24
1.1 Place des hépatiques dans le règne végétal .....	24
1.2 Taxonomie des hépatiques (Marchantiophyta).....	25
1.3 Habitat et rôle écologique.....	28
1.4 Structure morphologique des hépatiques.....	28
1.5 Ecophysiologie des hépatiques .....	32
1.6 Mécanismes de protection cellulaire .....	33
2 Phytochimie des hépatiques .....	34
2.1 Terpénoïdes .....	34
2.1.1 Biosynthèse générale.....	34
2.1.2 Monoterpénoïdes .....	35
2.1.3 Sesquiterpénoïdes.....	35
2.1.4 Diterpénoïdes .....	37
2.1.5 Stéroïdes et triterpénoïdes .....	37
2.2 Coumarines et flavonoïdes .....	37
2.3 Bibenzyls et bis(bibenzyl)s.....	39
3 La chimiotaxonomie : de la divergence génomique aux métabolites secondaires .....	41
4 Pharmacognosie .....	42
4.1 Cytotoxicité .....	42
4.2 Activités antimicrobiennes et antifongiques.....	43
4.3 Autres activités .....	44
5 La Nouvelle-Calédonie et les hépatiques.....	46
<b>PARTIE II. Travaux phytochimiques menées sur les hépatiques : Analyse des composés volatils et isolement de molécule .....</b>	<b>49</b>
1 Objectif .....	50

2	Matériel et Méthode .....	51
2.1	Collection du matériel végétal d'étude.....	51
2.2	Techniques extractives .....	55
2.3	Techniques utilisées pour le fractionnement .....	56
2.4	Techniques de chromatographies préparatives.....	57
2.4.1	Chromatographie sur colonne ouverte .....	57
2.4.2	Chromatographie haute performance semi-préparative couplée à un détecteur à barrette de diode (CLHP-DAD semi-prep).....	57
2.4.3	Chromatographie sur couche mince préparative .....	57
2.5	Techniques chromatographique analytiques .....	57
2.5.1	Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	57
2.5.2	Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse (CLHP-DAD-SM).....	58
2.5.3	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et à un détecteur de flamme à ionisation (CPG-FID-MS) .....	58
2.6	Techniques spectroscopiques .....	60
2.6.1	Spectroscopie infrarouge.....	60
2.6.2	Spectrométrie de masse à haute résolution .....	60
2.6.3	Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	60
2.7	Détermination structurale assistée par un logiciel (Logic for Structure determination) : [61])	60
3	Chimiodiversité et chimiotaxonomie.....	62
3.1	Composés volatils issus de la famille des Plagiochilaceae.....	62
3.1.1	Caractéristiques des Plagiochilaceae.....	62
3.1.2	Résultats .....	63
3.1.2.1	Chiastocaulon caledonicum (Steph.) S.D.F. Patzak, M.A.M.Renner, SchäF.-Verw. et Heinrichs .....	63
3.1.2.2	Plagiochila bicornuta Steph. ....	66
3.1.2.2.1	Fractionnement .....	69
3.1.2.2.2	Composé 1 : 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl ( <b>73</b> ) .....	70
3.1.2.2.3	Composé 2 : 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl ( <b>74</b> ) (nouvelle molécule) .....	71
3.1.2.2.4	Composé 3 : 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl ( <b>72</b> ) .....	75

3.1.2.3	Plagiochila tesmanii Sande Lac.....	76
3.1.2.4	Plagiochilion theriotanus (Steph.) Inoue.....	77
3.1.3	Discussion .....	80
3.1.4	Conclusion.....	84
3.2	Composés volatils issus d'espèce de la famille des Lophocoleaceae.....	85
3.2.1	Caractéristiques des Lophocoleaceae.....	85
3.2.2	Résultats .....	86
3.2.2.1	Chiloscyphus latistipus Steph. (endémique).....	86
3.2.2.2	Chiloscyphus confertus Steph. (endémique).....	88
3.2.2.3	Heteroscyphus argutus (Reinw., Blume et Nees) Schiffn. ....	89
3.2.3	Discussion .....	92
3.2.4	Conclusion.....	96
3.3	Composés volatils issus des Bazzanioideae .....	97
3.3.1	Caractéristiques des Bazzanioideae .....	97
3.3.2	Résultats .....	98
3.3.2.1	Acromastigum caledonicum(Steph.) Grolle (endémique).....	98
3.3.2.2	Acromastigum tenax (Steph.) Evans (endémique).....	101
3.3.2.3	Bazzania bernieri (Steph.) Inoue et H.A.Mill.....	101
3.3.2.4	Bazzania deplanchei (Gottsche ex Stephani) Jovet-Ast (endémique) .....	104
3.3.2.5	Bazzania francana (Steph.) N.Kitag.....	105
3.3.2.5.1	Fractionnement .....	109
3.3.2.5.2	Composé 4 : zier-13,14-dien-5-ol ( <b>161</b> ) (nouvelle molécule) .....	110
3.3.2.5.3	Composé 5 : ent-spathuléol ( <b>46</b> ).....	114
3.3.2.6	Bazzania parisii (Steph.) N.Kitag.....	115
3.3.2.7	Bazzania marginata (Steph.) N.Kitag. (endémique) .....	116
3.3.2.7.1	Fractionnement .....	117
3.3.2.7.2	Composé 6 : (-)- $\beta$ -herbertèol ( <b>89</b> ).....	118
3.3.2.8	Bazzania serrifolia Steph.....	119
3.3.2.9	Bazzania subintegra (Steph.) L.Söderstr. et A.Hagborg (endémique) .....	121
3.3.2.10	Bazzania vittata (Gottsche) Trevis.....	121
3.3.2.10.1	Fractionnement .....	123
3.3.2.10.2	Composé 7 : Vittatin ( <b>184</b> ) (nouvelle molécule) .....	124
3.3.2.11	Bazzania sp. AD211 .....	130



3.3.2.12	Bazzania sp. AD212 .....	130
3.3.3	Discussion .....	139
3.3.4	Conclusion.....	148
3.4	Composés volatils issus de la famille des Lejeuneaceae .....	149
3.4.1	Caractéristiques des Lejeuneaceae .....	149
3.4.2	Résultats .....	151
3.4.2.1	Drepanolejeunea pentadactyla (Mont.) Steph.....	151
3.4.2.2	Lejeunea sordida (Nees) Nees .....	152
3.4.2.3	Lopholejeunea subfusca (Nees) Schiffn. ....	153
3.4.2.4	Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana (Gottsche) Gradst. et Terken (endémique).....	154
3.4.2.5	Spruceanthus thozetianus (Gottsche et F. A.Müller) B.Thiers et Gradst. ....	156
3.4.2.6	Thysananthus spathulistipus (Reinw., Blume et Nees) Lindenb. ....	156
3.4.2.7	Thysananthus pancheri (Gottsche ex Steph.) Hürl. (endémique).....	157
3.4.3	Discussion .....	162
3.4.4	Conclusion.....	169
3.5	Composés volatils issus du genre Frullania.....	170
3.5.1	Caractéristiques des espèces du genre Frullania .....	170
3.5.2	Résultats .....	172
3.5.2.1	Frullania bella Steph. (endémique).....	172
3.5.2.2	Frullania cornuta Steph. (endémique).....	173
3.5.2.3	Frullania ericoides (Nees) Mont. ....	173
3.5.2.3.1	Fractionnement .....	175
3.5.2.3.2	Composé 8 : isopinguisanine ( <b>250</b> ).....	176
3.5.2.3.3	Composé 9 : 5,7,4'-triméthoxyflavanone ( <b>249</b> ).....	177
3.5.2.3.4	Composé 10 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone ( <b>253</b> ).....	179
3.5.2.3.5	Composé 11 : 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl ( <b>254</b> ) (Nouvelle molécule) 180	
3.5.2.3.6	Composé 12 : dihydrognétine ( <b>221</b> ) .....	184
3.5.2.4	Frullania falsicornuta S.Hatt (endémique).....	185
3.5.2.5	Frullania mammilosa Steph.....	185
3.5.2.6	Frullania multilacera Steph. (endémique).....	186
3.5.2.7	Frullania scalaris S.Hatt. (endémique) .....	186
3.5.3	Discussion .....	188

3.5.4	Conclusion.....	191
3.6	Composés volatils de <i>Porella viridissima</i> .....	192
3.6.1	Caractéristiques du genre <i>Porella</i> .....	192
3.6.2	Résultats .....	192
3.6.2.1	Fractionnement .....	196
3.6.2.2	Composé 13 : (+)-perrottetianal A ( <b>9</b> ) .....	197
3.6.2.3	Composé 14 : (-)-Ester méthylique de norpinguisone ( <b>218</b> ).....	198
3.6.2.4	Composé 15 : stigmastérol ( <b>11</b> ) .....	199
3.6.2.5	Composé 16 et 17 : 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide (276) et (277).....	200
3.6.2.6	Composé 18 : $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside ( <b>278</b> )..	202
3.6.3	Discussion .....	204
3.6.4	Conclusion.....	206
4	Conclusion générale des travaux phytochimiques .....	207
PARTIE III. Essais antimicrobiens menés sur les hépatiques de Nouvelle-Calédonie.....		210
1	Introduction.....	211
2	Matériel et méthode .....	213
2.1	Matériel végétal d'étude .....	213
2.2	Culture de souches bactériennes.....	214
2.2.1	Présentation des souches bactériennes .....	214
2.3	Les milieux de culture .....	214
2.4	Conditions de culture.....	214
3	Tests antibactériens.....	215
3.1	Préparation des extraits pour les tests.....	215
3.2	Préparation de suspension bactérienne .....	215
3.2.1	Suivi de croissance en microplaque .....	216
3.2.2	Suivi et analyse de la croissance bactérienne.....	217
3.2.3	Analyse des données .....	218
4	Résultats.....	219
5	Discussion.....	223
6	Conclusion des travaux biologiques .....	225
PARTIE IV. Conclusion et perspectives .....		226
PARTIE V. Bibliographie .....		228
ANNEXE 1 : SPECTRES RMN <sup>1</sup> H ET <sup>13</sup> C DES COMPOSES ISOLEES CONNUS.....		238

Composé 1 : méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)- benzoate (73)	239
Composé 3 : méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate (72)	240
Composé 5 : ent-spathulenol (46)	241
Composé 6 : (-)- $\beta$ -herbertenol (89)	242
Composé 8 : isopinguisanine (250)	243
Composé 9 : 5,7,4'-triméthoxyflavanone (249)	244
Composé 10 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (279)	245
Composé 12 : dihydrognétine (221)	246
Composé 13 : (+)-perrottetianal A (9)	247
Composé 14 : (-)-ester méthylique de norpinguisone (218)	248
Composé 15 : stigmastérol (11)	249
Composé 16 : 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide A (280)	250
Composé 18 : $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (281)	253
ANNEXE 2 : COORDONNEES GPS DES PLANTES RECOLTEES	254
ANNEXE 3 : COMPOSES DETECTES PAR CPG-FID-MS NON IDENTIFIES	257

## SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution géographique des échantillons récoltés de l'ordre des Porellales.....	52
Tableau 2 : Distribution géographique des échantillons récoltés du sous-ordre des Lophocoleineae (ordre : Porellales) .....	54
Tableau 3 : Classification taxonomique des espèces étudiées de la famille des Plagiochilaceae .....	63
Tableau 4 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (73) .....	70
Tableau 5 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) et comparaison avec les données de la littérature du 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (73)..	74
Tableau 6 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (72) .....	75
Tableau 7 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Plagiochilaceae (P.b : Plagiochila bicornuta, P.te : Plagiochila tesmanii, P.th : Plagiochilion theriotanus, C.c : Chistocaulon caledonicum).....	78
Tableau 8 : Pourcentages relatifs des composés non sesquiterpéniques détectés dans les espèces de la famille Plagiochilaceae (P.b : Plagiochila bicornuta, P.te : Plagiochila tesmanii, P.th : Plagiochilion theriotanus, C.c : Chistocaulon caledonicum).....	79
Tableau 9 : Composition des espèces de la famille Plagiochilaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation farnesyl et (Z-E)-germacradiényl (pourcentage relatif), ((i) : [21], (ii) : [67]).....	80
Tableau 10 : Composition des espèces de la famille Plagiochilaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation bisabolyl (pourcentage relatif) ((i) : [68]) .....	81
Tableau 11 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Plagiochilaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) .....	83
Tableau 12 : Classification taxonomique des espèces de la famille Lophocoleaceae.....	85
Tableau 13 : Pourcentages relatifs en composés volatils détectés dans les échantillons de Lophocoleaceae .....	91
Tableau 14 : Composition des espèces de la famille Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation bisabolyl (pourcentage relatif) ((i) : [68]) .....	93
Tableau 15 : Composition des espèces de la famille Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl (pourcentage relatif). Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane ((i) : [67], (ii) : [27]) .....	93
Tableau 16 : Composition des espèces de Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation (Z-E) germacradiényl (pourcentage relatif) ((i) : [67]).....	94

Tableau 17 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lophocoleaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) .....	95
Tableau 18 : Classification taxonomique des espèces de la famille des Lepidoziaceae .....	98
Tableau 19 : Attribution des signaux RMN du zier-13,14-dien-5-ol (161) .....	112
Tableau 20 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de l'ent-spathuléol (46) .....	114
Tableau 21 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du (-)-β-herberténol (89) .....	118
Tableau 22 : Attribution des signaux RMN du dimère d'acide lunularique (184) et comparaison avec les données RMN de l'acide lunularique (18) .....	129
Tableau 23 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (1/3) * .....	134
Tableau 24 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (1/2) .....	135
Tableau 25 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (3/3) .....	136
Tableau 26 : Pourcentages relatifs des composés non sesquiterpéniques détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri .....	137
Tableau 27 : Pourcentages relatifs des composés volatils détectés dans les espèces B. marginata (B. m), B. subintegra (B. s), B. vittata (B. v), A. tenax (A. t) et A caledonicum (A. c) .....	138
Tableau 28 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliées aux cations (E-E)-humulyl, (Z-E)-germacradiényl et (Z-E)-humulyl (pourcentage relatif). Afri. : africane, Hum. : humulane, Car. : caryophyllane((i) : [100], (ii) : [67], (iii) : [29]) .....	140
Tableau 29 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques de type pinguisane, monocyclofarnesane, Farnesane et drimane (pourcentage relatif) ((i) : [21],(ii) : [101]) .....	141
Tableau 30 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl. Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane ((i) : [27] ,(ii) : [67],(iii) : [100]) .....	144
Tableau 31 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation Bisaboyl ((i) : [68] ) .....	145
Tableau 32 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lepidoziaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) * : nouveau composé (1/2) .....	146
Tableau 33 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lepidoziaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) * : nouveau composé (2/2) .....	147
Tableau 34 : Classification taxonomique des espèces appartenant à la famille Lejeuneaceae .....	150

Tableau 35 : Pourcentages relatifs de sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Lejeuneaceae (D.p : Drepanolejeunea pentadactyla, L.su : Lopholejeunea subfusca, S.t.h : Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana, S.t : Spruceanthus thozetianus, T.s : Thysananthus spathulistipus, T.p : Thysananthus pancheri et L.so : Lejeunea sordida).....	160
Tableau 36 : Pourcentages relatifs en composés volatils autres que sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Lejeuneaceae (D.p : Drepanolejeunea pentadactyla, L.su : Lopholejeunea subfusca, S.t.h : Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana, S.t : Spruceanthus thozetianus, T.s : Thysananthus spathulistipus, T.p : Thysananthus pancheri et L.so : Lejeunea sordida).....	161
Tableau 37 : Composition des espèces de Lejeuneaceae en structures sesquiterpéniques affiliées aux sesquiterpènes de type monocyclofarnesane, pinguisane et daucane (pourcentage relatif) ((i) : [21]).....	162
Tableau 38 : Composition des espèces de Lejeuneaceae investiguées en structures sesquiterpéniques affiliées au cation Bisaboyl (pourcentage relatif) ((i) : [68]).....	163
Tableau 39 : Composition des espèces de la famille Lejeuneaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-germacradiényl. (pourcentage relatif) Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane, Eud. : eudesmane, Ger. : germacrane .....	164
Tableau 40 : Composition des espèces de la famille des Lejeuneaceae en structures sesquiterpéniques affiliées aux cations (E-E)-humulyl, (E-Z)-germacradiényl et (Z-E)-humulyl (pourcentage relatif) ((i) : [100], (ii) : [67], (iii) : [29]) .....	165
Tableau 41 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lejeuneaceae .....	168
Tableau 42 : Classification taxonomique des espèces de la famille des Frullaniaceae.....	171
Tableau 43 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de l'isopinguisanine (250) .....	176
Tableau 44 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 5,7,4'-triméthoxyflavanone (249).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Tableau 45 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (253).....	179
Tableau 46 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (254) .....	183
Tableau 47 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du dihydrognétine (221)	184
Tableau 48 : Constituants volatils détectés dans les espèces de la famille des Frullaniaceae (constituants majeurs : +++, constituants secondaires : ++, constituants mineurs : +) F. ma1 : COU082, F. ma2 : COU163, F. bella : F. b1 : COU164 et F. b2 : COU090, F. scalaris : F. s, F. falsicornuta F. f, F. multilacera : F. mu, F. cornuta : F.c, F. ericoides : F.e1 : MET017 et F.e1 : MET019 .....	187
Tableau 49 : Composition des espèces de la famille Frullaniaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-germacradiényl. Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane, Eud. : eudesmane. ((i) : [27] ,(ii) : [67],(iii) : [100]) .....	188

Tableau 50 : Composition des espèces de la famille Frullaniaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-humulyl, (Z-E)-humulyl et en structure pinguisane. ((i) : [100], (ii) : [29], (iii) : [21]) .....	189
Tableau 51 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Frullaniaceae nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes).....	190
Tableau 52 : Classification taxonomique de <i>Porella viridissima</i> .....	192
Tableau 53 : Pourcentages relatifs des constituants volatils détectés dans <i>Porella viridissima</i> .....	195
Tableau 54 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du (+)-perrottetianal A (9) .....	197
Tableau 55 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du (-)-ester méthylique de norpinguisone (218) .....	198
Tableau 56 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du stigmastérol (11) .....	199
Tableau 57 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide (277) .....	201
Tableau 58 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide (277) .....	202
Tableau 59 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranoside (278) .....	203
Tableau 60 : Structures sesquiterpéniques détectées chez <i>P. viridissima</i> (pourcentage relatif) ((i) : [68]).....	204
Tableau 61 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour l'espèce <i>Porella viridissima</i> ( nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes).....	205
Tableau 62 : Plantes dont les extraits ont fait l'objet d'essais anti microbiens.....	213
Tableau 63 : références des souches utilisées .....	214
Tableau 64 : Pourcentage d'inhibition des extraits à 50 µg / ml, pourcentage inhibition ± écart type (R <sup>2</sup> de la courbe de croissance) .....	220
Tableau 65 : Valeur de CI <sub>50</sub> en µg /ml des extraits sélectionnés : valeur de CI <sub>50</sub> ± écart type (R <sup>2</sup> pour la sigmoïde ; nombre point sur la sigmoïde) .....	221
Tableau 66 : Molécules majoritaires des extraits étherés ayant montrés de bonnes activités	224
Tableau 67 : Échantillons appartenant à l'ordre des Porellales : famille Porellaceae, Lejeuneaceae et Frullaniaceae.....	255
Tableau 68 : Échantillons appartenant à l'ordre Jungermanniales (2/2) : famille Lophocoleaceae et Plagiochilaceae (* approximatif).....	255
Tableau 69 : Échantillons appartenant à l'ordre Jungermanniales (1/2) : famille Lepidoziaceae (* approximatif).....	256
Tableau 70 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Plagiochilaceae .....	258
Tableau 71 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Lophocoleaceae .....	259

Tableau 72 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (espèces du genre <i>Bazzania</i> : <i>B. Deplanchei</i> , <i>B. marginata</i> , <i>B. subintegra</i> , <i>B.vittata</i> , <i>B. Parisii</i> ainsi que du genre <i>Acromastigum</i> : <i>A. tenax</i> et <i>A. caledonicum</i> ).....	260
Tableau 73 : Sesquiterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (Espèce du genre <i>Bazzania</i> : <i>B. sp. AD212</i> , <i>B. sp. AD211</i> , <i>B. francana</i> , <i>B. serrifolia</i> et <i>B. bernieri</i> ).....	261
Tableau 74 : Diterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (Espèce du genre <i>Bazzania</i> : <i>B. sp. AD212</i> , <i>B. sp. AD211</i> , <i>B. francana</i> , <i>B. serrifolia</i> et <i>B. bernieri</i> ).....	262
Tableau 75 : Diterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lejeuneaceae .....	263
Tableau 76 : Sesquiterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lejeuneaceae	264
Tableau 77 : Composés volatils non identifiés de l'espèce <i>Porella viridissima</i> .....	265



## SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Phylogénie du règne végétal [3] .....	24
Figure 2 : Taxonomie des Marchantiophyta (hors Jungermanniidae).....	25
Figure 3 : Taxonomie des Marchantiophyta, sous-classe des Jungermanniidae.....	27
Figure 4 : Photographie microscopique des cellules de <i>Bazzania serrifolia</i> (a) et <i>Plagiochila bicornuta</i> (b) (agrandissement*1000).....	29
Figure 5 : Photographie de trois espèces d'hépatique : <i>Chiloscyphus latistipus</i> et <i>Porella viridissima</i> (hépatique à lobe), <i>Reboulia hemisphericae</i> (hépatique à thalle). Organes notables ; 1 : Lobe, 2 : amphigastre, 3 : lobule, 4 : rhizoïdes .....	30
Figure 6 : Photographie de trois espèces d'hépatique épiphylls présentes sur la même feuille : <i>Metzgeria ciliata</i> (hépatique à thalle) et deux espèces de la famille des <i>Lejeuneaceae</i> non identifiées (hépatique à feuille). Organes notables ; 1 : lobe, 2 : amphigastre, 3 : lobule.....	31
Figure 7 : Voie de biosynthèse simplifiée des composés terpéniques .....	35
Figure 8 : Cations précurseurs principaux des sesquiterpènes retrouvés dans les hépatiques .	36
Figure 9 : Schéma biosynthétique simplifié pour les coumarines et les flavonoïdes.....	38
Figure 10 : Biosynthèse de la marchantine A .....	40
Figure 11 : Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie .....	46
Figure 12 : Forêt humide .....	46
Figure 13 : Forêt sèche .....	46
Figure 14 : Maquis minier .....	47
Figure 15 : Nombre de genre endémique de bryophytes sur la planète [54] .....	47
Figure 16 : Situation taxonomique des hépatiques de Nouvelle-Calédonie (NC) .....	48
Figure 17 : Zones de collectes.....	51
Figure 18 : Schéma des étapes de fractionnement chromatographiques.....	56
Figure 19 : Détails de <i>Plagiochila bicornuta</i> , en haut à gauche : cellules *1000, en bas à gauche : feuille *100, à droite : face ventrale *40 .....	69
Figure 20 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) .....	71
Figure 21 : 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) : à gauche : corrélations <sup>3</sup> J H→C observées sur le spectre HMBC; au milieu : corrélations <sup>2</sup> J et <sup>4</sup> J H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY.....	73
Figure 22 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) .....	73
Figure 23 : Détails de <i>Chiloscyphus latistipus</i> , à gauche cellules *1000, à droite : face ventrale *40.....	86
Figure 24 : Détails de <i>Chiloscyphus confertus</i> , à gauche : face ventrale *40, à droite cellules *1000.....	88
Figure 25 : Détails d' <i>Acromastigum caledonicum</i> , à gauche face ventral *40, à droite cellules *1000.....	99

Figure 26 : Détails d' <i>Acromastigum tenax</i> , en haut à gauche : feuille *1000, en bas à gauche amphigastre *1000, à droite : face ventrale *100.....	101
Figure 27 : Détails de <i>B. Deplanchei</i> : à gauche face ventrale *40 et cellules *1000 .....	104
Figure 28 : Détails de <i>Bazzania francana</i> , en haut à gauche : face ventrale *40, en bas à gauche : feuille *100, à droite : cellules *1000.....	109
Figure 29 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du zier-13,14-dien-5-ol (161).....	110
Figure 30 : Spectre RMN $^1\text{H}$ du zier-13,14-dien-5-ol (161) .....	111
Figure 31 : zier-13,14-dien-5-ol (161); à gauche, flèches : corrélations $^3\text{J}$ H-C observées sur le spectre HMBC; à droite, flèches : corrélations $^2\text{J}$ et $^4\text{J}$ H-C observées sur le spectre HMBC et en gras corrélations $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ observées sur le spectre COSY .....	111
Figure 32 : zier-13,14-dien-5-ol, corrélations H-H observées sur le spectre NOESY.....	113
Figure 33 : détail de <i>Bazzania marginata</i> , à gauche : face ventrale *40, à droite : feuille *100 .....	116
Figure 34 : Détails de <i>Bazzania marginata</i> .....	117
Figure 35 : Détails de <i>Bazzania subintegra</i> ; à gauche : face ventrale *40, à droite cellules *1000.....	121
Figure 36 : Détails de <i>Bazzania vittata</i> , en haut à gauche : cellules *400, en bas à gauche feuille *100, à droite : face ventrale *40 .....	123
Figure 37 : Spectre RMN $^1\text{H}$ du dimère d'acide lunularique (184).....	124
Figure 38: Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du dimère d'acide lunularique (184).....	125
Figure 39 : Déduction de deux cycles aromatiques sur la base du spectre RMN $^1\text{H}$ et des corrélations $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ visibles sur le spectre COSY .....	126
Figure 40 : Vittatin (184); flèches : corrélations H→C visibles sur le spectre HMBC; liaisons en gras : corrélations $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ visibles sur le spectre COSY .....	127
Figure 41 : Schéma biosynthétique putatif de formation des bis(bibenzyl) incluant la vittatin (184).....	128
Figure 42 : ACP réalisée sur le type de sesquiterpènes contenu dans les Lepidoziaceae analysées.....	131
Figure 43 : ACP réalisée sur les molécules diterpéniques détectées dans les Lepidoziaceae analysées.....	139
Figure 44 : Photographie de <i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarliana</i> : à gauche face ventrale *40, à droite lobe et lobule (entouré en noir)*100 .....	154
Figure 45 : Détails de <i>Thysananthus pancheri</i> , à gauche : face ventrale *40, à droite : cellules *1000.....	158
Figure 46 : Détails de <i>Frullania cornuta</i> , à gauche : cellules*1000, à droite face ventrale *40 .....	173
Figure 47 : Détails de <i>Frullania ericoides</i> , à droite vue macroscopique, en haut à droite : amphigastre *100, en bas à gauche *40 .....	175
Figure 48 : Spectre RMN $^1\text{H}$ du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (254).....	180
Figure 49 : Déduction de deux cycles aromatiques sur la base du spectre RMN $^1\text{H}$ et des corrélations $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ visibles sur le spectre COSY .....	181
Figure 50 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (254).....	181

Figure 51 : 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (254); à gauche, flèches : corrélations $^3J$ H→C observées sur le spectre HMBC; à droite, flèches : corrélations $^2J$ et $^4J$ H→C observées sur le spectre HMBC et en gras corrélations $^3J_{H-H}$ observées sur le spectre COSY .....	182
Figure 52 : Détails de <i>Porella viridissima</i> , en haut à gauche : feuille*100, en bas à gauche : lobule *100, à droite cellules *1000.....	196
Figure 53 : $^{17}O$ -éthoxyphéophorbide (276) et (277).....	200
Figure 54 : Procédure de remplissage d'une microplaque pour les essais en dose unique.....	216
Figure 55 : Procédure de remplissage d'une microplaque pour l'obtention de $CI_{50}$ .....	217
Figure 56 : Courbe de croissance microbienne et courbe de modélisation des phases exponentielles.....	219
Figure 57 : Allures des modélisations de type sigmoïde Dose-réponse pour les extraits les plus actifs, $f(\text{Log } C) = \% \text{ inhibition}$ (M : extrait méthanol, E : extrait éther), extrait ou composé testé / souche de l'essai, .....	222
Figure 58 : Méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)- benzoate; à gauche corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY .....	239
Figure 59 : Spectre RMN $^{13}C$ du méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)-benzoate.....	239
Figure 60 : Spectre RMN $^1H$ du méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)-benzoate.....	239
Figure 61 : Méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate : à gauche, flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY .....	240
Figure 62 : Spectre RMN $^1H$ du méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate .....	240
Figure 63 : Spectre RMN $^{13}C$ du méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate .....	240
Figure 64 : ent-Spathulenol; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC, en bleu corrélation utilisée pour le programme LSD .....	241
Figure 65 : Spectre RMN $^{13}C$ de l'ent-spathulenol .....	241
Figure 66 : Spectre RMN $^1H$ de l'ent-spathulenol .....	241
Figure 67 : Résultats du spectre HMBC du (-)- $\beta$ -herbertenol : à gauche les corrélations $^3J$ H→C, au milieu les corrélations $^2J$ H→C, à droite les corrélations $^4J$ H→C.....	242
Figure 68 : Spectre RMN $^{13}C$ du (-)- $\beta$ -herbertenol .....	242
Figure 69 : Spectre RMN $^1H$ du (-)- $\beta$ -herbertenol .....	242
Figure 70 : Molécule d'isopinguisanine; à droite : corrélations $^3J$ H→C observées sur le spectre HMBC; à gauche : corrélations $^2J$ et $^4J$ H-C observées sur le spectre HMBC et $^3J$ H-H observées sur le spectre COSY .....	243
Figure 71 : Spectre RMN $^{13}C$ de l'isopinguisanine (250).....	243
Figure 72 : Spectre RMN $^1H$ de l'isopinguisanine (250).....	243
Figure 73 : 4',5,7-triméthoxy-flavanone; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC, liaison en gras : corrélations $^3J$ H-H observées sur le spectre COSY .....	244
Figure 74 : Spectre RMN $^{13}C$ du 5,7,4'-triméthoxyflavanone .....	244
Figure 75 : Spectre RMN $^1H$ du 5,7,4'-triméthoxyflavanone .....	244

Figure 76 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC.....	245
Figure 77 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone.....	245
Figure 78 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone.....	245
Figure 79 : Dihydrognétine; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC...	246
Figure 80 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la dihydrognétine.....	246
Figure 81 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de la dihydrognétine.....	246
Figure 82 : (+)-Perrottétianal A; liaisons en gras : corrélations <sup>3</sup> J H-H observées sur le spectre COSY; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC.....	247
Figure 83 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du (+)-Perrottétianal A.....	247
Figure 84 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du (+)-Perrottétianal A.....	247
Figure 85 : Ester méthylique de (-)-norpinguisone ; à gauche, flèches : corrélations H→C <sup>3</sup> J observées sur le spectre HMBC; à droite, en gras : corrélation H-H <sup>3</sup> J observée sur le spectre COSY et flèches corrélations H→C <sup>2</sup> J observées sur le spectre HMBC.....	248
Figure 86 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de l'ester méthylique de (-)-norpinguisone.....	248
Figure 87 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de l'ester méthylique de (-)-norpinguisone.....	248
Figure 88 : stigmastérol.....	249
Figure 89 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du stigmastérol.....	249
Figure 90 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du stigmastérol.....	249
Figure 91 : 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide A; liaisons en gras : corrélations <sup>3</sup> J H-H observées sur le spectre COSY, flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC.....	250
Figure 92 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide A.....	250
Figure 93 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide A (zone 1 à 5 ppm).....	251
Figure 94 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 17 <sup>3</sup> -éthoxyphéophorbide A (zone 6 à 9.5 ppm).....	251
Figure 95 : Multiplicités remarquables d'ordre deux ou supérieures résolues.....	252
Figure 96 : Réseau de spin pour la chaîne latérale partant du carbone C-17.....	252
Figure 97 : α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranoside; à gauche : liaison en gras : corrélations <sup>3</sup> J H-H observées sur le spectre COSY et flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : doubles flèches : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY.....	253
Figure 98 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranoside.....	253
Figure 99 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranoside.....	253

## Introduction générale

La Nouvelle-Calédonie, mondialement reconnue comme un sanctuaire de la nature au niveau marin (lagons classés par l'UNESCO) et terrestre, constitue un site exceptionnel par la richesse de sa flore et ainsi considérée comme un haut-lieu (classé 3<sup>ème</sup> sur les 34 sites dénommés « hot-spot » au niveau mondial) de la biodiversité. La Nouvelle-Calédonie possède une biodiversité floristique riche de 3261 espèces de végétaux « supérieurs » avec un taux d'endémicité de 76% [1], sans inclure les végétaux « inférieurs » (mousse, hépatique et anthocérotes) qui sont également importants car rien que pour les hépatiques, environ 450 espèces y sont recensées à ce jour [2]. Au vu de la richesse de sa biodiversité floristique, la Nouvelle-Calédonie a toujours constitué un site privilégié d'étude des plantes tropicales incluant les recherches menées en phytochimie. Cependant, si l'importance de la chimiodiversité des plantes « supérieures » de la Nouvelle-Calédonie a fait l'objet de nombreuses études scientifiques poussées depuis des décennies, à ce jour, très peu de travaux ont été réalisés sur la phytochimie des plantes « inférieures » de ce territoire. Est-ce due à la méconnaissance de cette catégorie de plantes ?

Les hépatiques, aussi dénommées « Marchantiophyta », font partie des Bryophytes qui, au niveau de l'évolution constituent les premiers végétaux terrestres installés et faisant ainsi le maillon végétal de transition entre les plantes marines (algues) et les ptéridophytes (fougères). La Nouvelle-Calédonie compte parmi les 5 pays les plus riches en biodiversité d'hépatiques (avec la Nouvelle-Zélande, le Japon et le Costa Rica) du monde et sa bryoflore mérite ainsi une attention scientifique notamment au point de vue phytochimique. Les hépatiques sont des plantes de petite taille, et pour certaines, la taxonomie basée uniquement sur l'aspect morphologique peut s'avérer confuse, notamment à cause des variations morphologiques intraspécifiques qui peuvent être dues, entre autre à l'environnement par des microhabitats différents. Les hépatiques sont des plantes très diversifiées, compliquées à identifier et peu étudiées au niveau phytochimique, et pourtant connues pour contenir des métabolites secondaires très particuliers. Ainsi, la connaissance de la chimiodiversité peut constituer un outil utile pour spécifier les taxons par la chimiotaxonomie, et apporter une complémentarité aux études génétiques et morphologiques pour une meilleure caractérisation de la biodiversité de ces hépatiques.

Par ailleurs, au niveau phytochimique, les hépatiques sont connues pour contenir des métabolites secondaires constitués par des molécules très originales au niveau de leurs structures chimiques (notamment des terpénoïdes) et dont certaines ayant des activités biologiques remarquables à potentialité d'application dans les domaines de la pharmaceutique, cosmétique et nutraceutique. En effet, les hépatiques par leur morphologie souvent microscopiques et ayant peu d'usages traditionnels recensés (à la différence de la plupart des plantes médicinales), ont jusque-là, suscité peu d'intérêt et d'études phytochimiques mais l'apport des nouvelles connaissances dans ce domaine pourrait mieux

prendre en considération ces plantes encore mal connues notamment en vue de la valorisation de cette biodiversité. Sachant que dans la nature, les divers organismes présents dans un écosystème jouent un rôle bien défini et interagissent par l'intermédiaire de leurs constituants chimiques, l'idée d'une investigation sur les activités antimicrobiennes des hépatiques nous a semblé intéressante à prospecter.

L'émergence accrue des résistances bactériennes incite à varier les antibiotiques et à trouver de nouveaux principes actifs. L'importance de la recherche de composés à activité antimicrobienne n'est plus à démontrer avec la demande de renouvellement des sources de composés antibiotiques pour lutter contre les résistances aux antibiotiques connues. Les métabolites secondaires provenant de substances naturelles de différents organismes terrestres ou marins ont fait l'objet de prospection de principes actifs notamment dans le domaine de l'activité antimicrobienne. Sachant que peu de bioprospections ont été menées sur les hépatiques de la Nouvelle-Calédonie, nous avons proposé d'évaluer les activités antimicrobiennes d'extraits de quelques espèces de la bryoflore néo-calédonienne afin d'explorer leurs potentialités dans ce domaine. Les hépatiques étant encore peu connues au niveau phytochimique, pourraient constituer de nouvelles sources naturelles de molécules à activité antimicrobienne intéressante, ce qui a motivé d'inclure ce volet d'étude dans le cadre de ce travail.

L'objectif de la thèse est alors double, d'abord de contribuer à une meilleure connaissance de la chimiodiversité des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie et ensuite d'en révéler les propriétés et potentialités de valorisation. L'étude phytochimique constitue le fil rouge par l'analyse des constituants avec diverses analyses chromatographiques (CPG et HPLC) et spectroscopiques des constituants isolés, puis par l'évaluation de leurs propriétés biologiques et entre autres l'activité microbienne.

La présente thèse portant sur la phytochimie des hépatiques constitue un nouvel axe d'étude sur les produits naturels menée au sein de l'UNC, et le travail ainsi réalisé est présenté dans ce manuscrit d'après le plan suivant:

- Une première partie consacrée aux généralités sur les hépatiques, avec une présentation des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie
- Une seconde partie portant sur l'analyse phytochimique des différents échantillons d'étude
- Une troisième partie dédiée à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et constituants d'hépatiques testés
- Une présentation de la conclusion générale et des perspectives

## PARTIE I. GENERALITES SUR LES HEPATIQUES

# 1 Présentation botanique des hépatiques

## 1.1 Place des hépatiques dans le règne végétal

Les hépatiques sont les moins spécialisées de toutes les plantes terrestres en raison de l'absence de graine et de tissus spécialisés. D'après une étude moléculaire [1] les hépatiques seraient les premières plantes terrestres émergentes, il y a environ 475 millions d'années. Les Bryophytes, comprenant les mousses (Bryophyta, 12000 espèces), hépatiques (Marchantiophyta, 6000 espèces) et anthocérotes (Anthocerotophyta, 215 espèces), se tiennent à un niveau d'évolution plus élevé que celui des algues, mais inférieur à celui des plantes vasculaires (Figure 1).

Le niveau d'évolution plus avancé des bryophytes par rapport aux algues pourrait être illustré par exemple par leurs adaptations à la sécheresse avec le développement d'une couche de protection stérile autour des organes sexuels et à la protection de l'embryon végétal au sein de l'organe reproducteur femelle, assurés par **l'archégonium** [2]. La croissance dans les trois dimensions est également une différence majeure entre les bryophytes et les algues (cf. Figure 1).

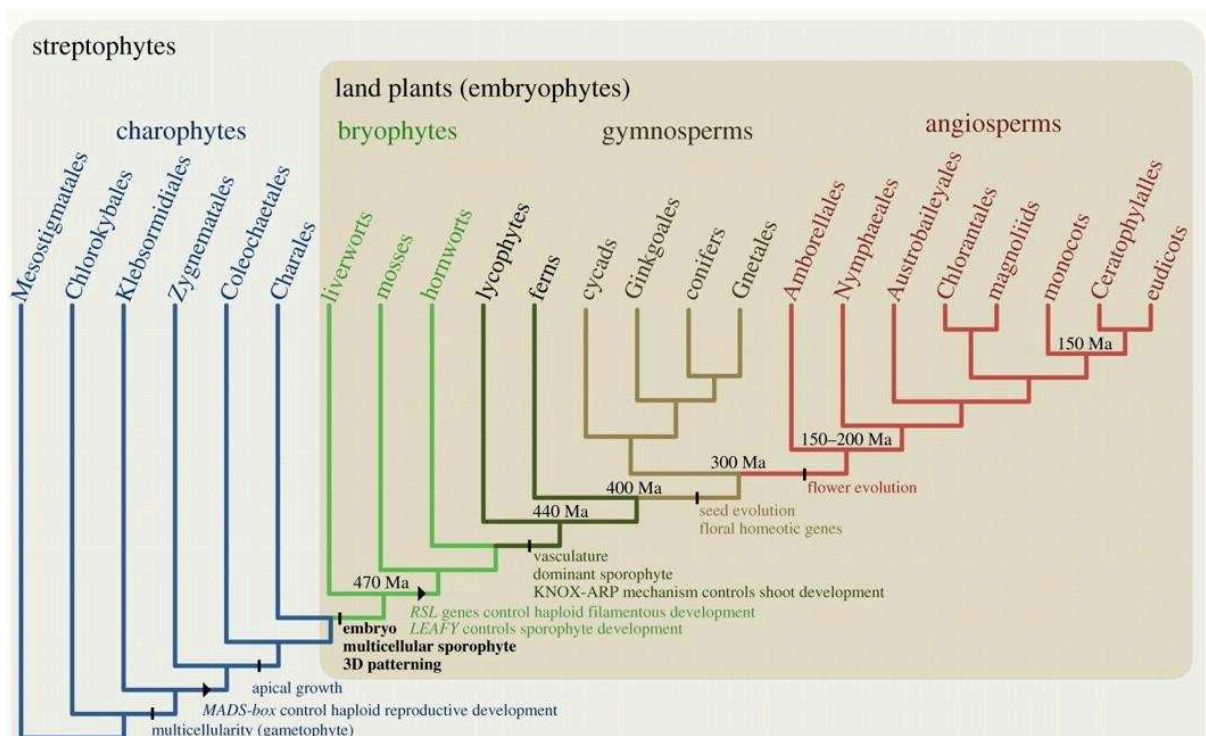


Figure 1 : Phylogénie du règne végétal [3]

Les plantes vasculaires, considérées comme plantes supérieures, sont plus spécialisées que les bryophytes pour assurer leur survie sur la terre. Cette adaptation a induit par exemple la



production de graines. En outre, les sporophytes de plantes supérieures ont des systèmes conducteurs spécialisés pour les nutriments et l'eau comme le **phloème** et le **xylème**, alors que les bryophytes sont dépourvues de ces tissus [2].

Un niveau d'évolution inférieur indique simplement une branche de début de la phylogénie des plantes. Les bryophytes ont survécu aux conditions changeantes sévères et fréquentes. Les deux groupes appliquent différentes stratégies d'adaptation aux conditions environnementales.

## 1.2 Taxonomie des hépatiques (Marchantiophyta)

Les hépatiques sont classées en trois grandes classes : Jungermanniopsida, Marchantiopsida et Haplomitriopsida. Les espèces sont réparties inégalement dans ces trois clades. La classe Haplomitriopsida comprend trois genres pour 15 espèces, c'est la classe la moins importante du point de vue du nombre d'espèce. La classe des Marchantiopsida (hépatique à thalle) est divisée en deux sous-classes : Blasiidae (une seule famille) et Marchantiidae (18 familles) (cf. Figure 2). Notons que parmi les quatre ordres issus des Marchantiidae, seuls les Marchantiales contiennent plus d'une famille et est donc l'ordre le plus important des Marchantiopsida.

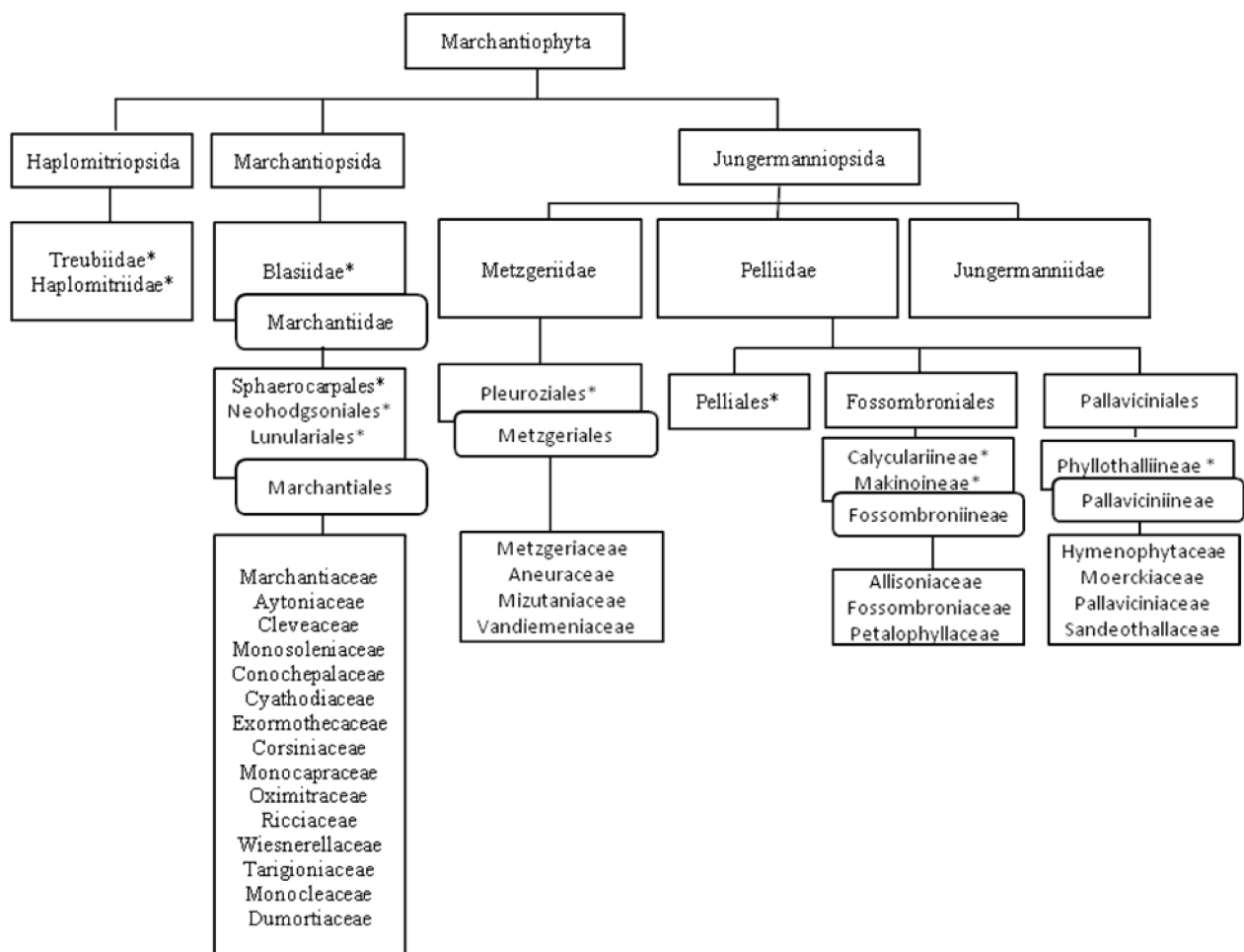


Figure 2 : Taxonomie des Marchantiophyta (hors Jungermanniidae).

\* Clade ne contenant qu'une famille, non détaillé

La classe des Jungermanniopsida est la plus importante sur le plan du nombre d'espèce (environ 7500) et est divisée en trois grandes sous-classes. Ces sous-classes sont : Metzgeriidae et Pelliidae (hépatique à thalle) ainsi que Jungermanniidae (hépatique à lobe) (cf. Figure 3). Notons que pour les hépatiques à thalle simple, la sous-classe des Pelliidae contient le plus de famille alors que les Metzgeriidae ne contiennent que cinq familles.

La sous-classe la plus prolifique au niveau de la diversité des familles est celle des Jungermanniidae, composé de trois ordres : Porellales, Ptilidiales et Jungermaniales. Le nombre d'espèces et genres y est très variable : le genre *Plagiochila* (sous-ordre : Lophocoleineae) est celui contenant le plus d'espèce (environ 1600) alors que la famille Lejeuneaceae (sous-ordre : Jubulineae) contient plus de 80 genres.

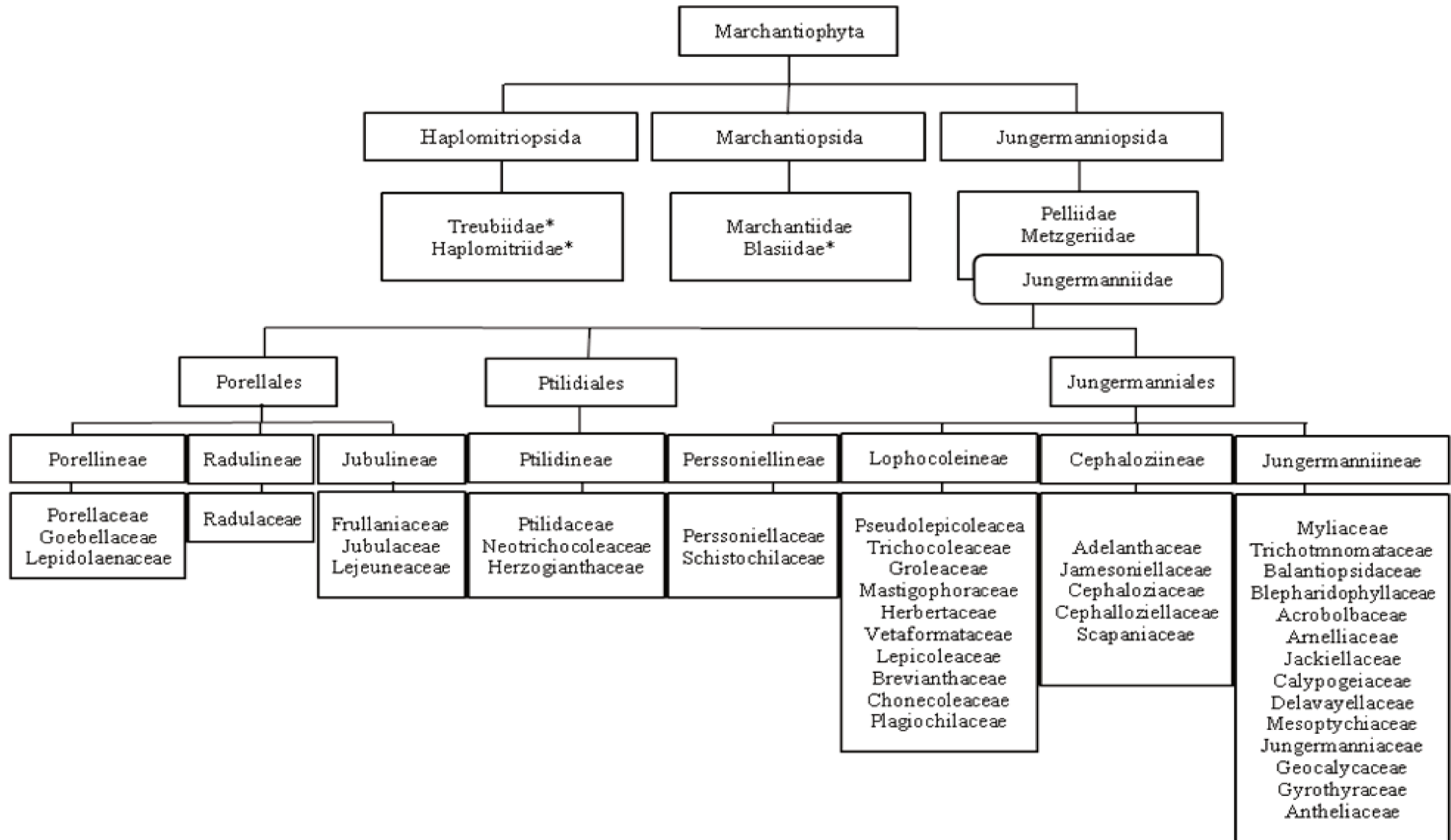


Figure 3 : Taxonomie des Marchantiophyta, sous-classe des Jungermanniidae

## 1.3 Habitat et rôle écologique

Les hépatiques peuvent pousser sur des supports variés : le sol, la roche (saxicole), l'écorce (corticole) et les feuilles (épiphyllé : Figure 6, e)). On distingue deux échelles d'habitats pour les bryophytes : le macro habitat (ex : forêt humide d'altitude) et le micro habitat (ex : écorce d'arbre vivant).

Bien que les populations d'hépatiques soient plus denses dans les milieux humides et sombres, elles sont présentes partout dans le monde, sauf en mer : on en trouve en Antarctique et même dans les zones semi-arides de l'Australie [4].

Les bryophytes sont une composante essentielle de la flore dans les zones humides, les montagnes et les écosystèmes de la toundra [4]. Leur contribution à des niveaux structurels de la diversité serait aussi importante que celle des plantes vasculaires, mais à une plus petite échelle comme par exemple leur rôle de rétention d'eau dans les forêts tropicales d'altitude [5]. Les bryophytes offrent des conditions de micro habitats indispensables à la survie d'une grande diversité d'organismes tels que les eucaryotes unicellulaires, les protozoaires, et de nombreux groupes d'invertébrés [6].

Les bryophytes sont également des plantes jouant le rôle d'indicateurs environnementaux et écologiques importants [7]. Ces groupes de plantes terrestres ont également été utilisés comme indicateurs de changements climatiques passés, pour valider les modèles climatiques, et comme indicateurs potentiels de réchauffement de la planète [8].

## 1.4 Structure morphologique des hépatiques

Les hépatiques sont des plantes de petite taille. Une description succincte est donnée ci-dessous sur le rôle de certains organes/organites.

### ➤ Le gamétophyte

La structure du gamétophyte dominant des hépatiques peut être à **thalles** (Figure 5, e) et f)) et (Figure 6, a) ou à **feuilles** (Figure 5, a) et c)). Un **thalle** est habituellement constitué de plusieurs épaisseurs de cellules. Chez les hépatiques à feuilles, l'épaisseur des lobes est généralement d'une cellule. Les feuilles, contrairement à la mousse, sont disposées le long de la tige en deux ou trois niveaux. Les deux premiers niveaux constituent les feuilles latérales alors que le troisième niveau est généralement plus petit et parfois absent. La feuille de cette troisième rangée est appelée **amphigastre** et est située sur la **face ventrale** de la tige (Figure 5 d) et d) et Figure 6 c) et e)). Un autre type de feuille appelé lobule peut être également présent, celui-ci peut être très visible (Figure 5, b)) ou être très lié aux feuilles latérales et ressembler à un pli de celles-ci (Figure 6, b), c) et d)).

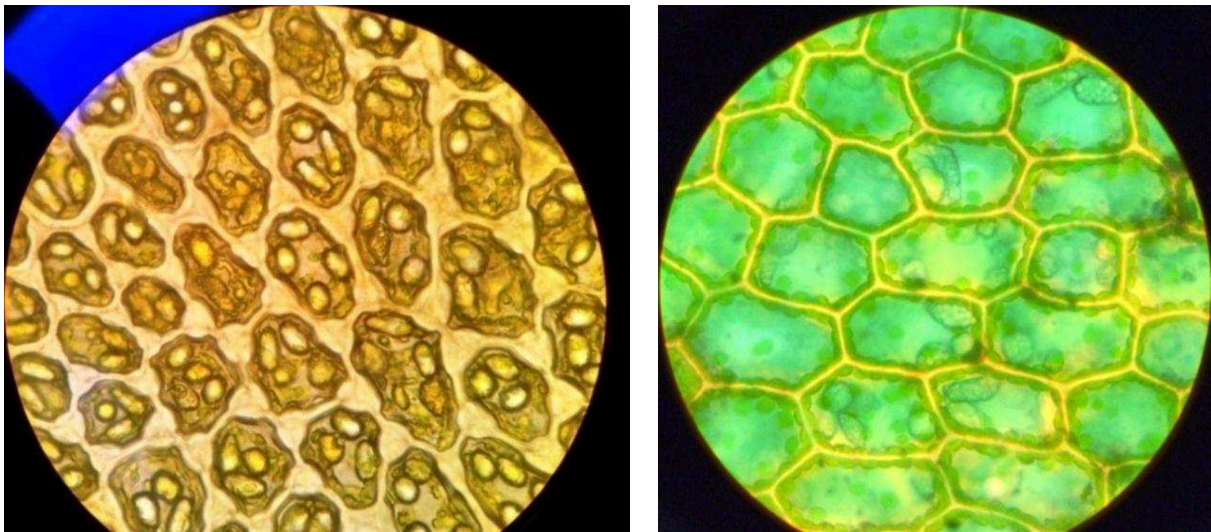
L'ensemble du gamétophyte reçoit l'eau et les nutriments à partir des substrats sur lesquels ils se développent, des gouttelettes de brouillard et de l'eau de pluie. La morphologie des gamétophytes assure une grande surface d'absorption par rapport au poids. L'indisponibilité

des nutriments dans le substrat ne constitue pas un facteur limitant pour les hépatiques, leur habitat peut être pauvre en éléments nutritifs [9].

### ➤ Les cellules

Les cellules d'hépatiques peuvent avoir des agencements particuliers et présenter des **trigones, espacements intercellulaires spécifiques aux hépatiques** (Figure 4 a)). Dans la plupart des hépatiques on peut observer des chloroplastes et des oléocorps. Comme pour les plantes supérieures, la photosynthèse chez les hépatiques a lieu dans les chloroplastes, qui contiennent un mélange de chlorophylles et caroténoïdes [10].

La plus grande particularité des hépatiques est constituée par la présence d'organites uniques (retrouvés chez plus de 90% des hépatiques) appelés **oléocorps** (Figure 4 a) et b)). Ces organites sont le site principal de la cellule où se trouvent les lipides et le site de formation de biosynthèse de l'isoprène, amenant l'hypothèse que les oléocorps sont des sites actifs de la cellule pour la biosynthèse des terpénoïdes. Plusieurs hypothèses sont avancées pour la fonction des oléocorps telles que la protection envers les herbivores, les pathogènes, le froid, les radiations UV et la dessiccation [10]



a) Cellules de *Bazzania serrifolia*,

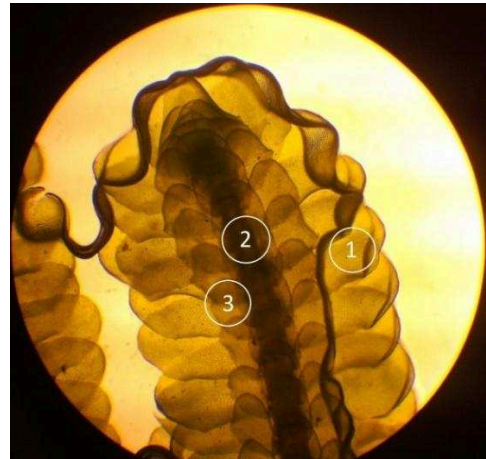
b) Cellules de *Plagiochila bicornuta*

**Figure 4 : Photographie microscopique des cellules de *Bazzania serrifolia* (a) et *Plagiochila bicornuta* (b) (agrandissement\*1000)**





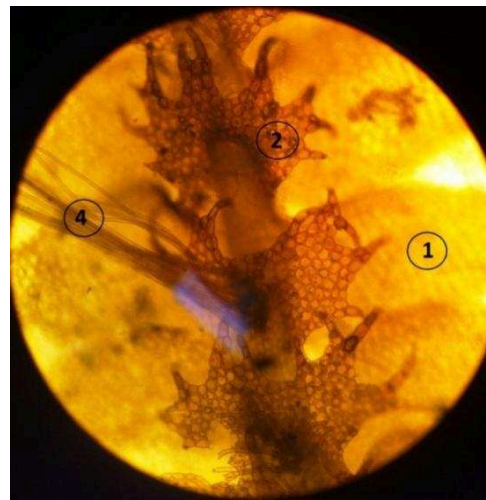
a) *Porella viridissima*, photographie macroscopique, branchement bipenné



b) *Porella viridissima*, microscope optique, agrandissement \*40



c) *Chiloscypus latistipus*, photographie macroscopique



d) *Chiloscypus latistipus*, microscope optique, agrandissement \*100



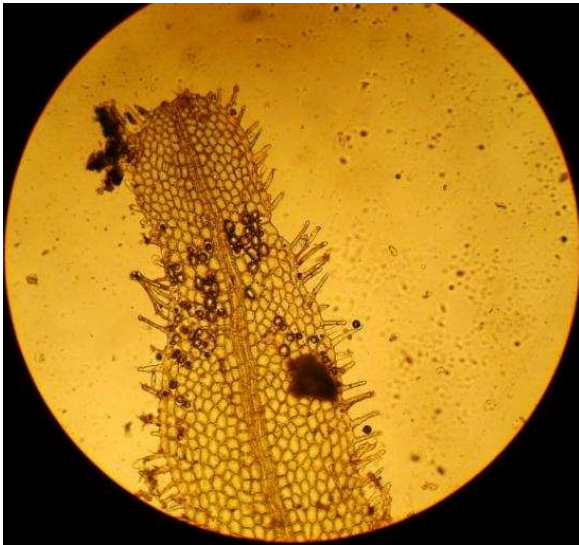
e) *Reboulia hemisphericae*, photographie à hauteur d'homme



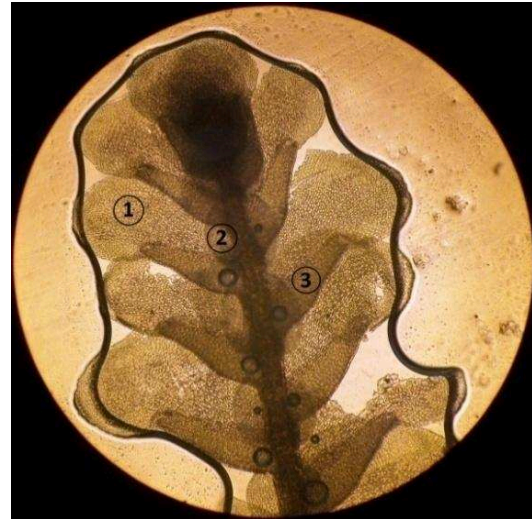
f) *Reboulia hemisphericae*, photographie macroscopique

**Figure 5 : Photographie de trois espèces d'hépatique : *Chiloscypus latistipus* et *Porella viridissima* (hépatique à lobe), *Reboulia hemisphericae* (hépatique à thalle). Organes notables ; 1 : Lobe, 2 : amphigastre, 3 : lobule, 4 : rhizoïdes**

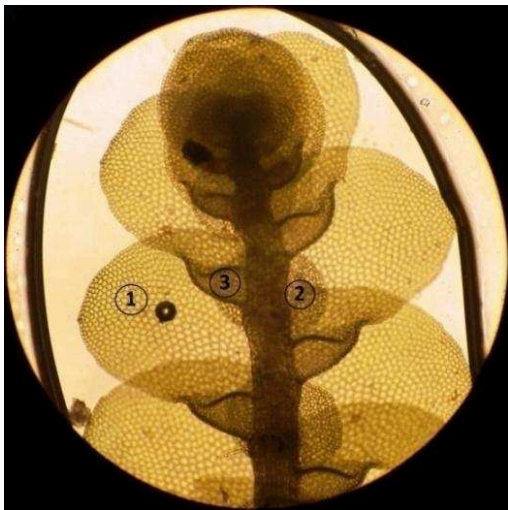




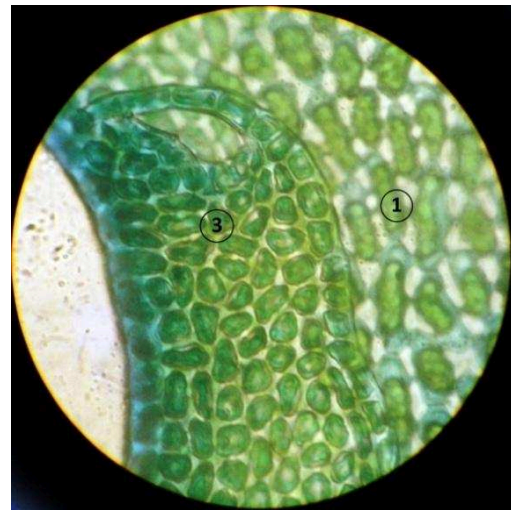
a) *Metzgeria ciliata*, agrandissement \*100



b) *Lejeuneacea épiphylla*, agrandissement \*100



c) *Lejeuneacea épiphylla*, agrandissement \*100



d) Détail *Lejeuneacea* sur la photographie b), agrandissement \*100



e) Substrat des hépatiques a), b) et c)

**Figure 6 : Photographie de trois espèces d'hépatique épiphylls présentes sur la même feuille : *Metzgeria ciliata* (hépatique à thalle) et deux espèces de la famille des *Lejeuneacea* non identifiées (hépatique à feuille). Organes notables ; 1 : lobe, 2 : amphigastre, 3 : lobule**

## 1.5 Ecophysiologie des hépatiques

Du milieu aqueux au milieu terrestre, les plantes ont dû développer des caractéristiques morphologiques et physiologiques pour surmonter les nouvelles contraintes environnementales sur leur croissance et leur développement. Les plantes terrestres ont développé des systèmes leur permettant de fournir de l'eau et des nutriments à toutes les parties de la plante et limiter la dessiccation [2].

L'agencement des feuilles peut influencer sur le mouvement de l'eau de diverses manières. Le transport de l'eau vers le haut est plus rapide lorsque la marge inférieure de la feuille supérieure recouvre le bord supérieur de la feuille inférieure (feuilles **succubes**, Figure 5, d)), tandis que le transport de l'eau vers le bas est plus rapide lorsque le bord supérieur des feuilles inférieures recouvre le bord inférieur des feuilles supérieures (feuilles **incubes**, Figure 5, b)) [11,12].

Contrairement aux plantes vasculaires qui possèdent un tissu de conduction de l'eau, la plupart des hépatiques n'ont pas de telles spécialisations mais certaines ont des structures comparables appelées **brins hydriques centraux**, pouvant être trouvés dans les hépatiques à feuilles appartenant à la sous-classes des Calobryales et quelques hépatiques à thalles de la sous-classes des Metzgeriales [13].

Contrairement aux plantes supérieures où le transport de l'eau dans les feuilles se déroule principalement à travers l'espace apoplastique des parois cellulaires, le transport extérieur de l'eau dans les bryophytes est physiologiquement important (principalement sur la surface du gamétophyte et non en interne) [14].

Du fait que les gamétophytes d'hépatiques sont dépourvus de stomates (orifice de petite taille des végétaux permettant des échanges gazeux avec le milieu extérieur) ils ne peuvent pas éviter activement la perte d'eau et donc l'état métabolique est étroitement régulé par l'humidité ambiante dans l'environnement. Pour certaines hépatiques, le gamétophyte a pris un fonctionnement poikilohydrique (reste en dormance lorsque desséché), ce qui leur permet d'être métaboliquement inactif lorsqu'il est sec et reprendre le métabolisme dans des conditions plus humides [15].

Les hépatiques sont fixées à un substrat par des cellules ou des filaments de cellules allongées simples, appelés **rhizoïdes**. Les rhizoïdes ont seulement une fonction d'ancrage et ne sont pas utilisés pour l'absorption de l'eau et les nutriments du sol comme dans les plantes supérieures. L'absence de racine permet également aux bryophytes de se mettre en place sur des surfaces difficilement accessibles, les hépatiques peuvent avoir des substrats très variés (écorce, feuille, roche et sol).



## 1.6 Mécanismes de protection cellulaire

Les réponses à court terme (acclimations) permettent individuellement aux plantes de réagir rapidement à une évolution rapide des conditions externes, alors que les réponses à long terme (adaptations) sont basées sur des changements physiologiques conférés par la génétique. Les deux réponses sont nécessaires pour la survie et les plantes ont besoin de rétablir rapidement l'équilibre avec l'environnement afin d'optimiser la productivité.

Les réponses d'une plante aux stress sont définies comme les réactions de défense ou d'adaptation à tout aspect de l'environnement conduisant à des changements physiologiques [16,17]. Les structures relativement simples des gamétophytes signifient que la protection contre le stress environnemental doit être réalisée au niveau cellulaire, peut-être à travers la production de composants chimiques notamment les métabolites secondaires et /ou des changements de composition de la paroi cellulaire. Ce qui pourrait expliquer la présence de chimiotypes assez variés au sein de certaines espèces.

Les facteurs de stress environnementaux tels que l'intensité de la lumière et la dessiccation peuvent conduire à une augmentation de la production de radicaux libres et d'autres substances réactives dans les plantes [18,19]. Les composés phénoliques ont la capacité de piéger ces composés destructeurs et donc protéger la plante dans des conditions stressantes. Par exemple, les composés phénoliques tels que les marchantines, qui se trouvent dans plusieurs hépatiques, semblent être des antioxydants efficaces pouvant limiter le stress oxydatif [20] de même que les flavonoïdes, peu diversifiés au sein des hépatiques, mais présents dans plusieurs familles [21].

## 2 Phytochimie des hépatiques

### 2.1 Terpénoïdes

#### 2.1.1 Biosynthèse générale

Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la condensation d'unité isoprène. Le terme terpénoïde désigne les composés terpéniques et leurs dérivés pour lesquels il y a eu des migrations d'atomes (tel que l'hydrogène) ou groupements alkyls, des réarrangements ou des fonctionnalisations. La plupart de ces composés sont polycycliques. Les terpénoïdes peuvent être trouvés dans tous les organismes vivants et constituent le plus large groupe de métabolites secondaires avec environ 60 000 molécules connues [22]. On définit les terpénoïdes par leur nombre d'unité d'isoprène, principalement :

-deux unités d'isoprènes (10 carbones) : monoterpène

-trois unités d'isoprènes (15 carbones) : sesquiterpène

-quatre unités d'isoprènes (20 carbones) : diterpène

-cinq unités d'isoprènes (25 carbones) : sesterpène

-six unités d'isoprènes (30 carbones) : triterpène

On trouve dans les hépatiques des composés mono-, sesqui-, di- et triterpéniques toutefois les hépatiques produisent plus spécifiquement une grande variété de sesquiterpénoïdes et de composés diterpéniques [21,23,24].

Il existe deux voies de biosynthèse permettant la formation d'unité isoprényle à partir de la lyse du glucose : la voie du mévalonate (MVA) et la voie non mévalonate (méthylérythrol phosphate ou MEP/DOXP) [25]. La voie MVA produit de l'isopentyl-PP alors que la voie MEP/DOXP produit de l'isopentyl-PP et de l'isoprényle-PP. L'association de ces unités (building blocks) via des enzymes va aboutir à la biosynthèse des composés mono-, sesqui-, di-, et triterpéniques (Figure 7).

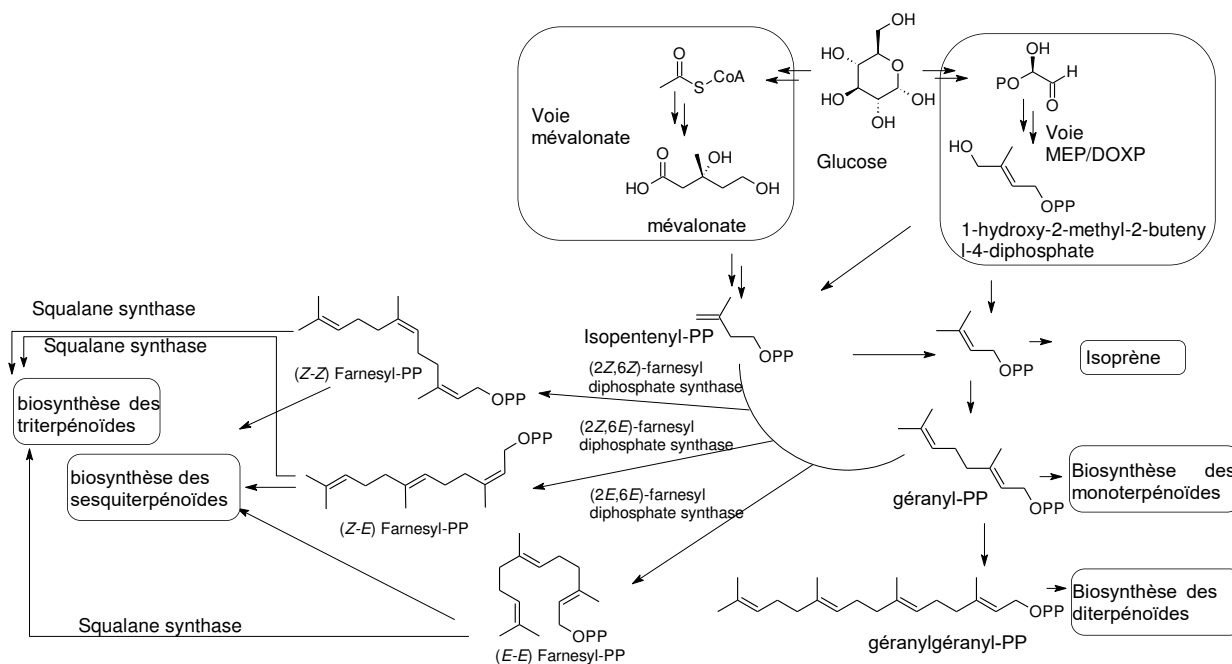
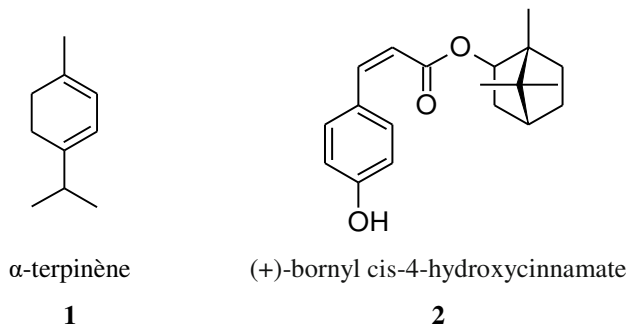


Figure 7 : Voie de biosynthèse simplifiée des composés terpéniques

### 2.1.2 Monoterpénoïdes

Les composés monoterpéniques représentent la troisième classe de terpènes chez les hépatiques pour ce qui est de la diversité, derrière les composés sesquiterpéniques et diterpéniques. Les monoterpénoïdes ont surtout été recensés dans les genres *Plagiochila*, *Radula* et *Asterella*, dans lesquels est détecté l' $\alpha$ -terpinène (**1**). La présence de plusieurs monoterpénoïdes estérifiés tel que le (+)-bornyl cis-4-hydroxycinnamate (**2**) dans *Conocephalum conicum* en fait des biomarqueurs intéressants pour ces espèces [21].



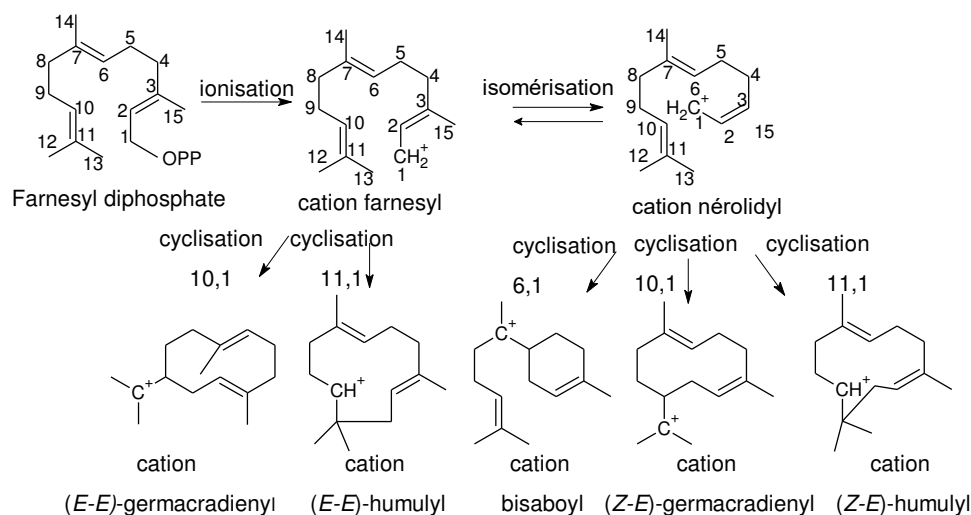
### 2.1.3 Sesquiterpénoïdes

Les composés sesquiterpéniques représentent la classe la plus large de molécules naturelles au sein des terpénoïdes [26]. De nombreux composés sesquiterpéniques ont des propriétés thérapeutiques intéressantes tels qu'antibactérienne, antifongique ou antivirale [27,28].

Les hépatiques produisent des composés sesquiterpéniques en quantité importante et très diversifiés. De nombreux sesquiterpénoïdes sont spécifiques aux hépatiques de même que certains squelettes sesquiterpéniques dont plusieurs sont rares chez les plantes vascularisées

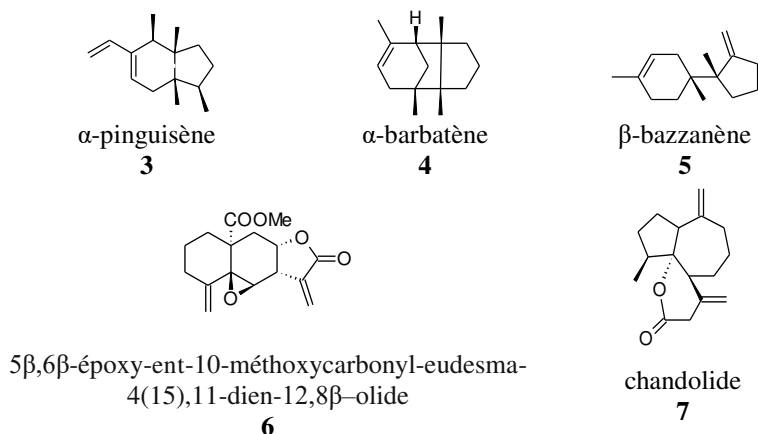
mais couramment détectés chez les hépatiques. Leur plus grande originalité vient du fait que plus de 90% des sesquiterpénoïdes produits par les hépatiques sont les énantiomères de ceux produits par les plantes vascularisées [10].

L'unité farnesyl est le motif de base de tous les sesquiterpènes via des réactions enzymatiques qui transforment son cation en divers précurseurs. Cinq cations cycliques appelés « premiers précurseurs » cationiques sont la source de la majorité des structures sesquiterpéniques rencontrées dans les hépatiques [29]. Les réactions de cyclisations sont détaillées sur la Figure 8 ci-dessous.



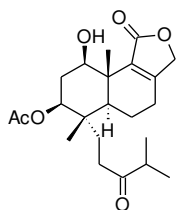
**Figure 8 : Cations précurseurs principaux des sesquiterpènes retrouvés dans les hépatiques**

Certaines structures sesquiterpéniques sont uniquement trouvées chez les hépatiques : c'est le cas des sesquiterpènes de type pinguisane, avec par exemple l' $\alpha$ -pinguisène (**3**), un sesquiterpène assez commun chez les hépatiques. D'autres structures telles que les sesquiterpènes de type barbatane et bazzanane, assez rares dans la nature sont des composés communs dans les hépatiques : l' $\alpha$ -barbatène (**4**) et le  $\beta$ -bazzanène (**5**) sont les plus communs parmi ces structures [21]. Enfin les hépatiques produisent des lactones sesquiterpéniques originales telles que le 10-méthoxycarbonyl-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxy-ent-eudesma-4(15),11-dien-12,8 $\beta$ -olide (**6**) isolée de l'espèce néo-zélandaise *Plagiochilion conjugatus* ou encore le chandolide (**7**) isolé de *Chandonanthus hirtellus* récolté en Polynésie Française [30].

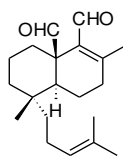


## 2.1.4 Diterpénoïdes

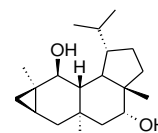
Les composés diterpéniques constituent la seconde plus importante classe de métabolite secondaire rencontrée chez les hépatiques quant à la diversité. Les diterpénoïdes sont une catégorie de molécules très importante car on dénombre plus de 12000 dans le monde du vivant [22]. Tout comme les sesquiterpènes certains squelettes sont uniquement trouvés chez les hépatiques : c'est le cas de la structure sacculatane avec par exemple le pellianolactone A (**8**) isolé de l'hépatique *Pellia endiviifolia* originaire du Japon [21] ou encore le perrottetianal A (**9**) détecté dans plusieurs espèces du genre *Porella* [31].



pellianolactone A  
**8**



perrottetianal A  
**9**

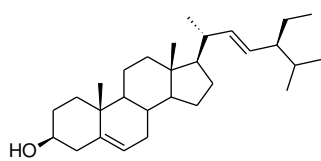


2β,9α-dihydroxyverrucosane  
**10**

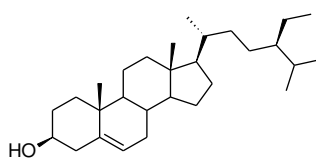
Les diterpènes de type cythane sont très rares dans la nature et sont distribués dans un nombre restreint de taxon chez les hépatiques (principalement *Plagiochila*, *Jamesoniella* et *Fossombronia*) avec par exemple le 2β,9α-dihydroxyverrucosane (**10**) isolé de l'espèce *Fossombronia angulosa* collectée en Grèce [21].

## 2.1.5 Stéroïdes et triterpénoïdes

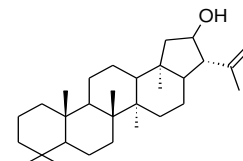
Les stérols détectés dans les hépatiques sont similaires à ceux trouvés dans les plantes supérieures tels que le stigmastérol (**11**) et le sitostérol (**12**) [21]. Le type de triterpénoïde le plus souvent rencontré dans les hépatiques est le type hopane particulièrement présent dans les genres *Reboulia* et *Plagiochasma* [21], avec par exemple la molécule originale 20-hydroxy-22(29)-hopène (**13**) isolée d'une culture *in vitro* de *Fossombronia alaskana* [32].



stigmastérol  
**11**



sitostérol  
**12**



20-hydroxy-22(29)-hopène  
**13**

## 2.2 Coumarines et flavonoïdes

Les coumarines et flavonoïdes sont des métabolites secondaires ayant pour intermédiaire biosynthétique commun l'acide para-coumarique. Leurs voies de biosynthèse divergent à partir de l'addition de trois unités malonyl sur le motif p-coumaroyl qui ouvre la voie de biosynthèse des flavonoïdes [33] (cf. Figure 9).

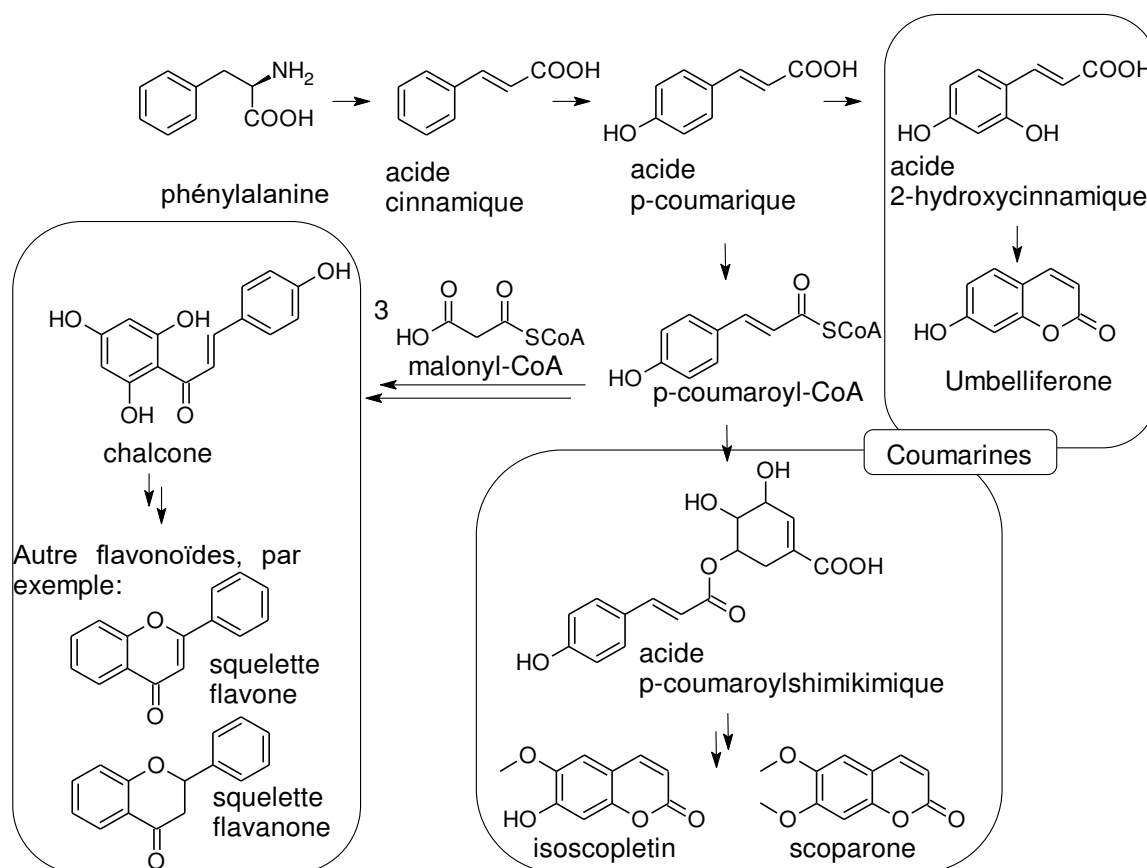
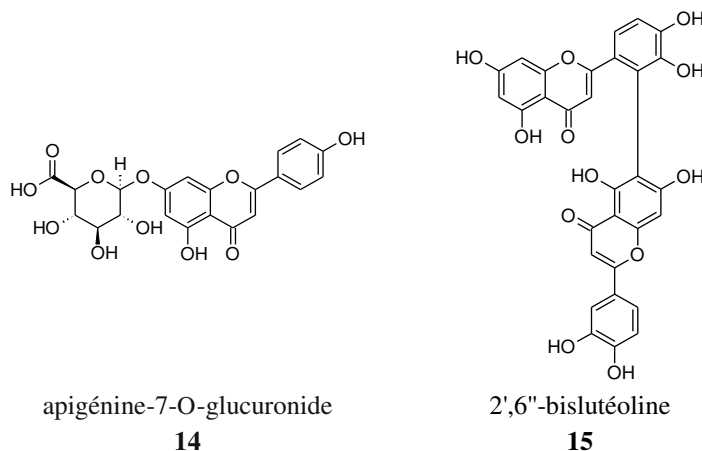
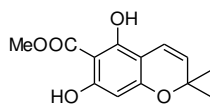


Figure 9 : Schéma biosynthétique simplifié pour les coumarines et les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés minoritaires chez les hépatiques mais présents dans toutes les Jungermanniales, Metzgeriales et les Marchantiales. On trouve surtout des flavones et plus rarement des flavanones. Les dérivés fonctionnalisés les plus communément trouvés dans les Marchantiophyta sont les composés dérivés de la lutéoline et de l'apigénine. L'apigénine-7-O-glucuronide (**14**) a été isolée de *Marchantia palmata* [3] et la 2',6''-bislutéoline (**15**) a été isolée de *Chandonanthus hirtellus* subsp. *giganteus* [34].

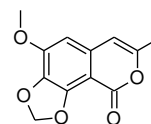


Les composés de type coumarines et chromanes ne sont pas beaucoup distribués dans les hépatiques et sont souvent minoritaires. L'espèce *Pedinophyllum interruptum* [35] collectée en Ecosse contient plusieurs dérivés du chromènes dont le 5,7-dihydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (**16**). L'espèce *Wettsteinia inversa* collectée à Taïwan produit de l'inversine (**17**), une isocoumarine [36].



5,7-dihydroxy-2,2-diméthyl- 1H-chromène-6-carboxylate de méthyl

**16**

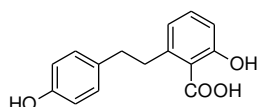


inversine

**17**

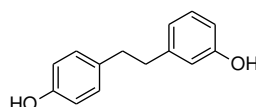
## 2.3 Bibenzyls et bis(bibenzyl)s

Les bibenzyls sont très abondants dans les hépatiques et plusieurs bibenzyls originaux ont été isolés dans les Jungermanniales, Metzgeriales et Marchantiales [21]. L'acide lunularique (**18**) et le lunularine (**19**) sont présents chez les hépatiques ainsi que les algues et les champignons mais à peu d'exception absents chez les mousses et les plantes vascularisées. L'acide lunularique (**18**) possède un rôle d'inhibiteur de croissance ainsi qu'une structure similaire à l'acide abscissique (**20**) présent chez les plantes vascularisées et certaines hépatiques [37].



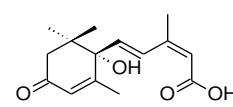
acide lunularique

**18**



lunularine

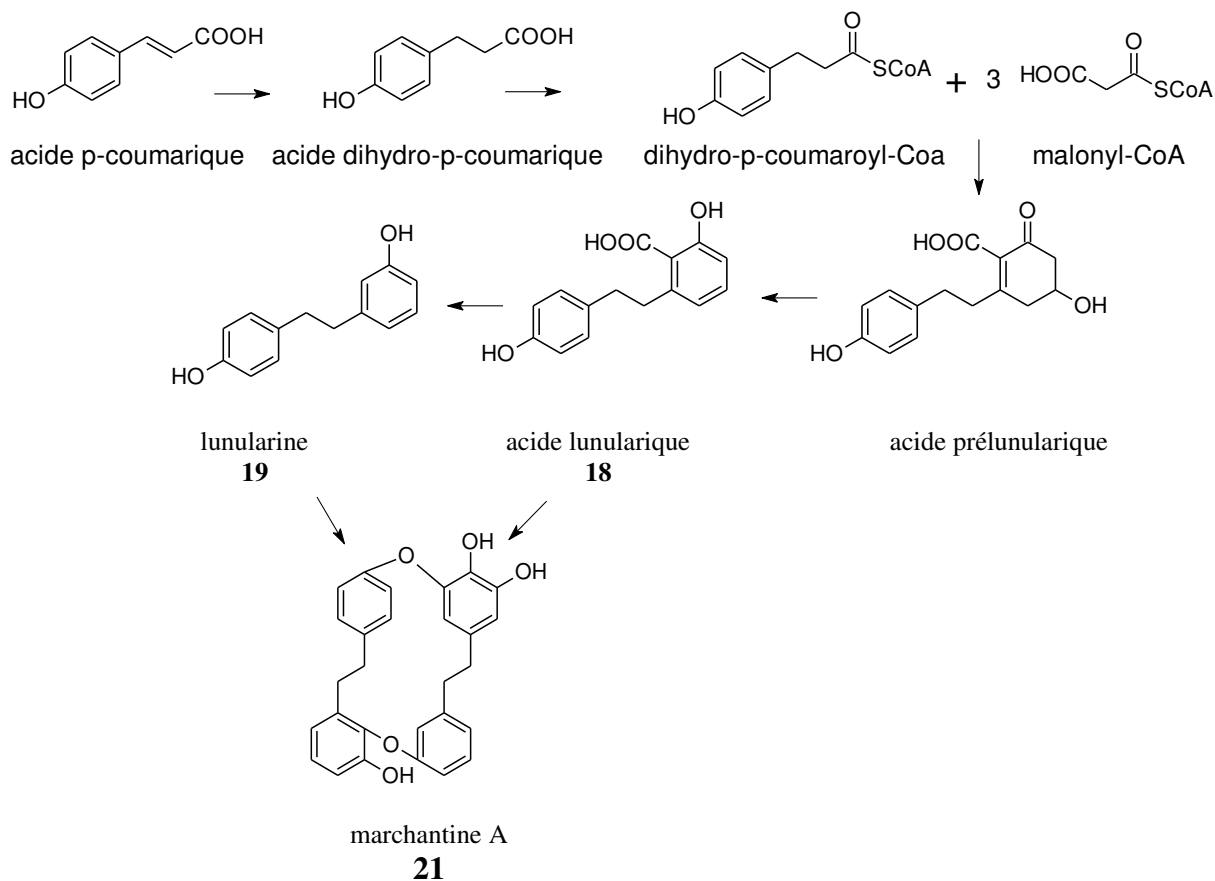
**19**



acide abscissique

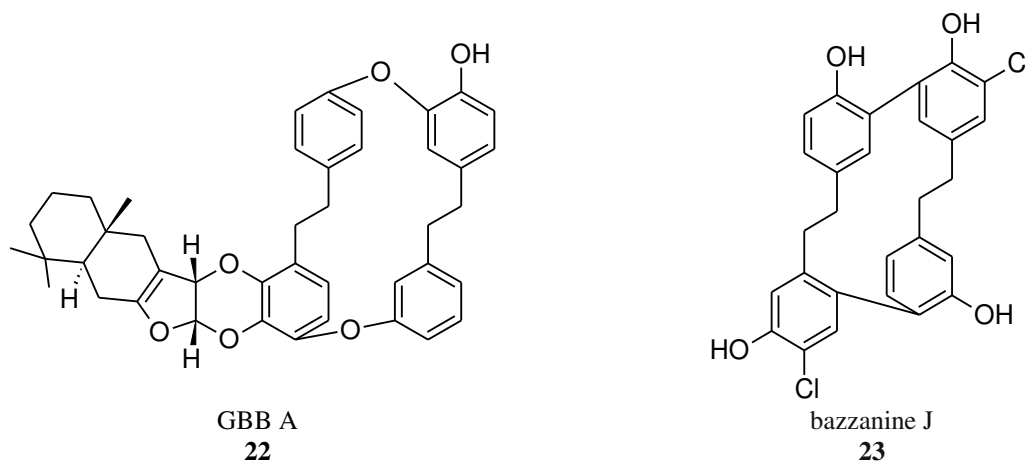
**20**

Les bis(bibenzyl)s sont des molécules assez spécifiques aux hépatiques et sont très diversifiés. Plus de cinquante bis(bibenzyl)s ont été isolés dans les hépatiques appartenant aux ordres Jungermanniales, Marchantiales, Metzgeriales et Monocleales [21,38,39]. L'acide lunularique (**18**) est d'ailleurs le précurseur de l'un des plus grand groupes de bis(bibenzyl) : les marchantines (Figure 10). La voie de biosynthèse de la marchantine A (**21**) se fait via l'acide lunularique (**18**) lui-même biosynthétisé à partir de l'acide p-coumarique [40]. On peut constater d'ailleurs plusieurs similitudes entre la voie de biosynthèse des flavonoïdes et celle de l'acide lunularique (**18**).



**Figure 10 : Biosynthèse de la marchantine A**

Parmi les bis(bibenzyl)s originaux on peut citer le glaucescens bis-bibenzyl (GBB) A (**22**) isolé de *Schistochila glaucescens* [41] et la bazzanine J (**23**) isolée de *Bazzania trilobata* [42] qui est l'un des représentants de la série des bazzanines chlorées, sous-groupe des bis(bibenzyl)s comptant plus de vingt molécules différentes [21].





### 3 La chimiotaxonomie : de la divergence génomique aux métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas indispensables pour l'organisme qui les produit. L'aptitude à biosynthétiser des métabolites secondaires est issue d'une sélection naturelle répondant chimiquement à des besoins spécifiques pour une adaptation ou en réponse à un problème particulier (prédateurs, rayonnements ultra-violet...). Ces « réponses chimiques » sont souvent spécifiques et diffèrent d'une famille de plante à une autre [43].

Ces métabolites secondaires sont synthétisés par des enzymes dépendant directement du génome. La communauté scientifique considère que l'accumulation de nouveaux gènes vient de la duplication puis de mutations dans l'ADN conduisant à la divergence des voies de biosynthèse. Ce qui aurait pour impact les divergences et formation de produits diversifiés [43].

Un nouveau gène peut se distinguer de son ancêtre s'il apporte un changement dans les voies biosynthétiques : en encodant une enzyme catalysant une réaction identique mais avec un substrat différent que son gène père ou en encodant une réaction différente en utilisant le même substrat [43].

Certaines enzymes du métabolisme secondaire s'adaptent sur une diversité de substrats, cependant le taux de conversion n'est pas le même pour chaque type de substrat. Les voies biosynthétiques peuvent être considérées comme un réseau interconnecté de réactions et une « nouvelle » enzyme peut créer un intermédiaire appartenant à une certaine voie de biosynthèse à partir d'un substrat provenant d'une autre voie de biosynthèse [43].

La taxonomie des plantes est traditionnellement basée sur des aspects morphologiques, et les métabolites secondaires étant souvent redondants au sein d'un clade, leur présence et absence peuvent être un indicateur de proximité ancestrale dans une phylogénie donnée. Ainsi la co-occurrence de classes structurales de métabolites secondaires au sein de taxons différents pourrait constituer un indice d'une éventuelle relation monophylétique. Une partie des gènes codant pour la biosynthèse de certaines structures de métabolites secondaires a dû probablement évoluer au cours du temps. De tels gènes peuvent être « désactivés » puis « activés » de nouveau au fil du temps [44].

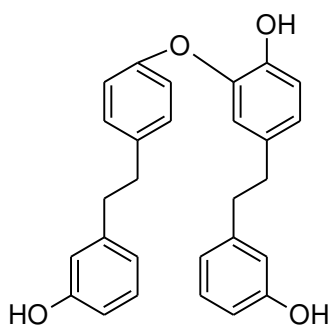
## 4 Pharmacognosie

Les médecines traditionnelles indienne et chinoise font état d'usages thérapeutiques de bryophytes. Par exemple, la médecine chinoise utilise les plantes *Conocephalum conicum* en tant qu'antimicrobien et antifongique ainsi que *Reboulia hemisphaerica* pour les plaies externes [45]. Un récent rapport ethnobotanique indien fait état d'utilisation thérapeutique de plusieurs espèces appartenant au genre *Marchantia* [46,47]. Cependant, globalement, les plantes vascularisées semblent être plus utilisées que les bryophytes en médecine traditionnelle.

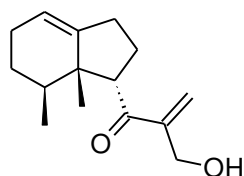
La littérature rapporte de nombreux essais biologiques menés sur des extraits et molécules isolées d'hépatique. Il en résulte que les hépatiques possèdent des activités biologiques très variées [48].

### 4.1 Cytotoxicité

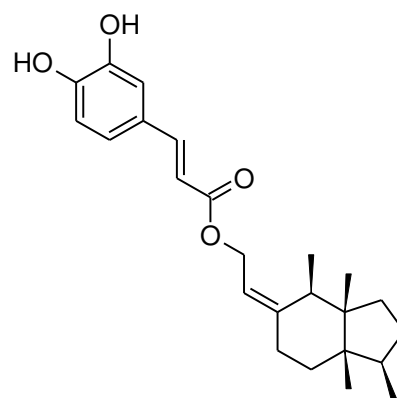
Les bis(bibenzyl)s, molécules très caractéristiques et répandues dans plusieurs familles d'hépatiques, possèdent des activités biologiques très variées dont des effets cytotoxiques envers les cellules KB telle la perrottétine E (**24**) présente dans de nombreuses espèces du genre *Plagiochila* ( $CI_{50} = 12,5 \mu\text{g/ml}$ ) [45].



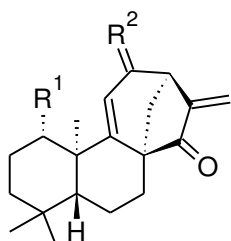
perrottétine E  
**24**



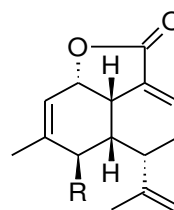
13-hydroxychiloscyphone  
**25**



cafféate de naviculyl  
**26**



kauranes  
 $R^1=OH; R^2=H, H : \mathbf{27}$   
 $R^1=H; R^2=O \mathbf{28}$



$R=H$  : lépidozénolide **29**  
 $R=OOH$  : (-)-5 $\beta$ -hydropéroxy-lépidozénolide **30**

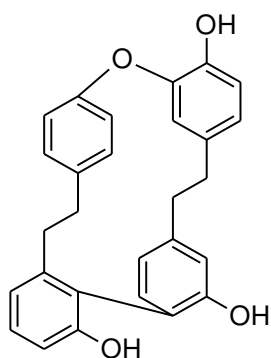
Plusieurs sesquiterpénoïdes issus d'hépatiques possèdent également des activités cytotoxiques avec par exemple le 13-hydroxychiloscyphone (**25**) isolé de *Chiloscyphus rivularis*, actif contre des cellules A-549 de carcinome pulmonaire ( $IC_{50}=2,0 \mu\text{g/ml}$ ) [49]. Le cafféate de naviculyl (**26**), isolé de *Bazzania novae-zelandiae*, montre des effets inhibiteurs de croissance sur les cellules P-388 du virus de la leucémie murine avec une valeur de  $GI_{50}$  située entre 0,8 et 1,1  $\mu\text{g/ml}$  [50].

Des composés diterpéniques isolés d'hépatiques ont montré des propriétés cytotoxiques, c'est le cas de plusieurs composés de type kaurane (**27**) et (**28**) isolés d'espèces appartenant au genre *Jungermannia* avec des inhibitions sur les cellules HL-60 avec des valeurs de  $CI_{50}$ , de 0,28 à 0,59  $\mu\text{M}$  [51].

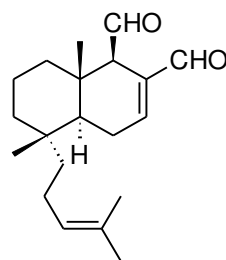
Les lactones sesquiterpéniques sont des molécules couramment distribuées chez les hépatiques et dont certaines d'entre elles (les eudesmanolides, germacranolides et guaianolides) possèdent des activités contre les cellules KB nasopharyngiques et les cellules P-388 de la leucémie lymphocytaire [28]. De même, le lépidozénolide (**29**) montre aussi une cytotoxicité envers la lignée cellulaire P-388 de la leucémie murine ( $CI_{50} = 2,1 \mu\text{g/ml}$ ) [52].

## 4.2 Activités antimicrobiennes et antifongiques

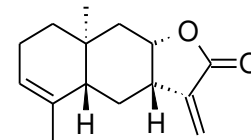
Plusieurs bis(bibenzyl)s de *Marchantia polymorpha* sont connus pour leurs propriétés antifongiques sur *Candida albicans* dont la riccardine D (**31**) [53].



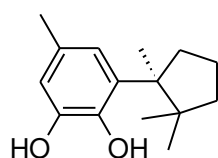
riccardine D  
**31**



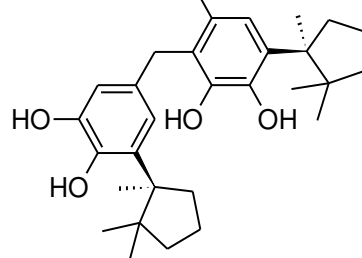
sacculatal  
**32**



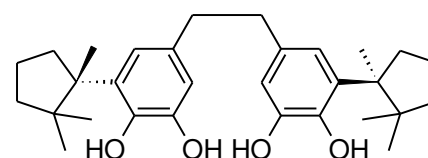
(-)-diplophyllolide  
**33**



(-)-herbertène-1,2-diol  
**34**



(-)-mastigophorène C  
**35**



(-)-mastigophorène D  
**36**

Des activités antimicrobiennes ont aussi été trouvées sur des composés diterpéniques tels que le sacculatal (**32**), isolé de *Pellia endiviifolia* possédant une activité envers *Streptococcus mutans* ( $DL_{50}=8 \mu\text{g/ml}$ ) [54].

Un fractionnement bioguidé de *Mastigophora diclados* a permis d'isoler les composés : (-)-diplophyllolide (**33**), (-)-herbertène-1,2-diol (**34**) et (-)-mastigophorène C (**35**) et D (**36**) qui ont montré des activités antimicrobiennes contre *Bacillus subtilis* (CIM entre 2 et 8  $\mu\text{g/ml}$ )[55].

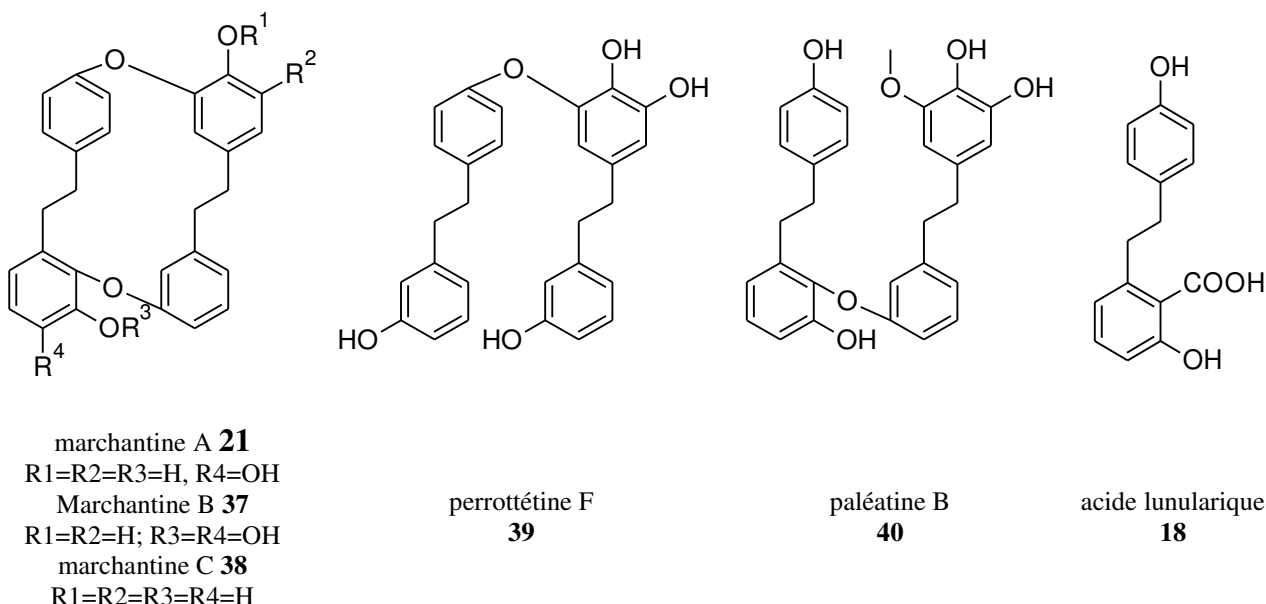
### 4.3 Autres activités

En plus des activités biologiques citées dans les paragraphes précédents, d'autres propriétés biologiques d'intérêt ont été reportées par la littérature dont nous en citons quelques-unes.

Le lépidozénolide (**29**) et le (-)-5 $\beta$ -hydropéroxylépidozénolide (**30**) isolés de *Lepidozia vitrea* et *L. fauriana* montrent des effets antiplaquettaires [52].

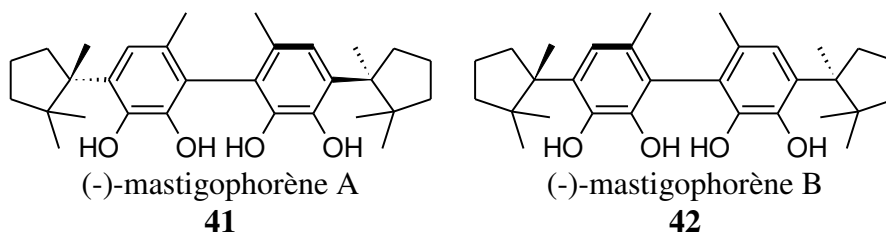
D'autres types d'activité très variés ont été reportés dans la littérature. Ainsi, il a été montré que des composés de type bis(bibenzyl)s tels que les marchantines A (**21**), B (**37**), la perrottétine F (**39**) et le pélatine B (**40**) possèdent une activité inhibitrice du virus VIH-1 ( $CI_{50}= 5,3-23,7 \mu\text{g/ml}$ ) [54].

Des tests enzymatiques sur la marchantine C (**38**) montrent des effets inhibiteurs d'activité sur l' $\alpha$ -glucosidase (52,2% à 1 mM) [56]. L'acide lunularique (**18**), présent dans pratiquement toutes les hépatiques montre une activité anti hyaluronidase ( $CI_{50}=0,13 \text{ nM}$ ) [57].



Certains composés issus d'hépatiques possèdent des activités neurotrophiques notables. C'est le cas des mastigophorènes D (**36**), A (**41**) et B (**42**) isolées de *Mastigophora diclados* qui ont

montré des propriétés neurotrophiques à  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  M, accélérant la germination neuritique et la formation de réseaux cellulaires [48].



## 5 La Nouvelle-Calédonie et les hépatiques

La Nouvelle-Calédonie est un archipel de 18600km<sup>2</sup> situé dans le sud du Pacifique (Figure 11).



Figure 11 : Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie

Une chaîne centrale s'étend sur quasiment toute l'île principale composée majoritairement de forêt humide (cf. Figure 12), formation végétale riche avec plus de 2000 espèces [58].



Figure 12 : Forêt humide

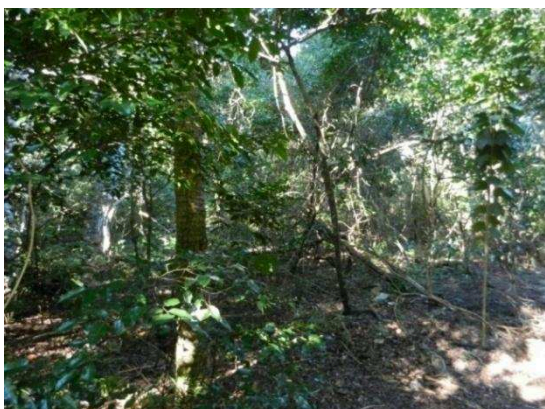


Figure 13 : Forêt sèche

Cette chaîne partage l'île entre la côte Est plus humide et la côte Ouest protégée des vents dominants et donc plus sèche avec des alternances de savane et de forêt sèche (cf. Figure 13).



Sur quasiment toute l'île principale mais surtout dans le sud de la Nouvelle-Calédonie, on trouve un écosystème particulier : le maquis minier (cf. Figure 14) où les plantes se sont développées sur des sols basiques riches en métaux (ultramafiques).



Figure 14 : Maquis minier

Les hépatiques et la bryoflore en générale, même si on en trouve dans tous les milieux, se développent le plus souvent en milieu humide. Leur endémisme est accru dans l'hémisphère sud, certainement grâce au taux d'humidité et à des températures stables [59]. La Figure 15 montre les zones où l'endémisme de la bryoflore est la plus importante, il s'agit de la région du Sud-est asiatique, de l'Océanie et du sud de l'Amérique du Sud.

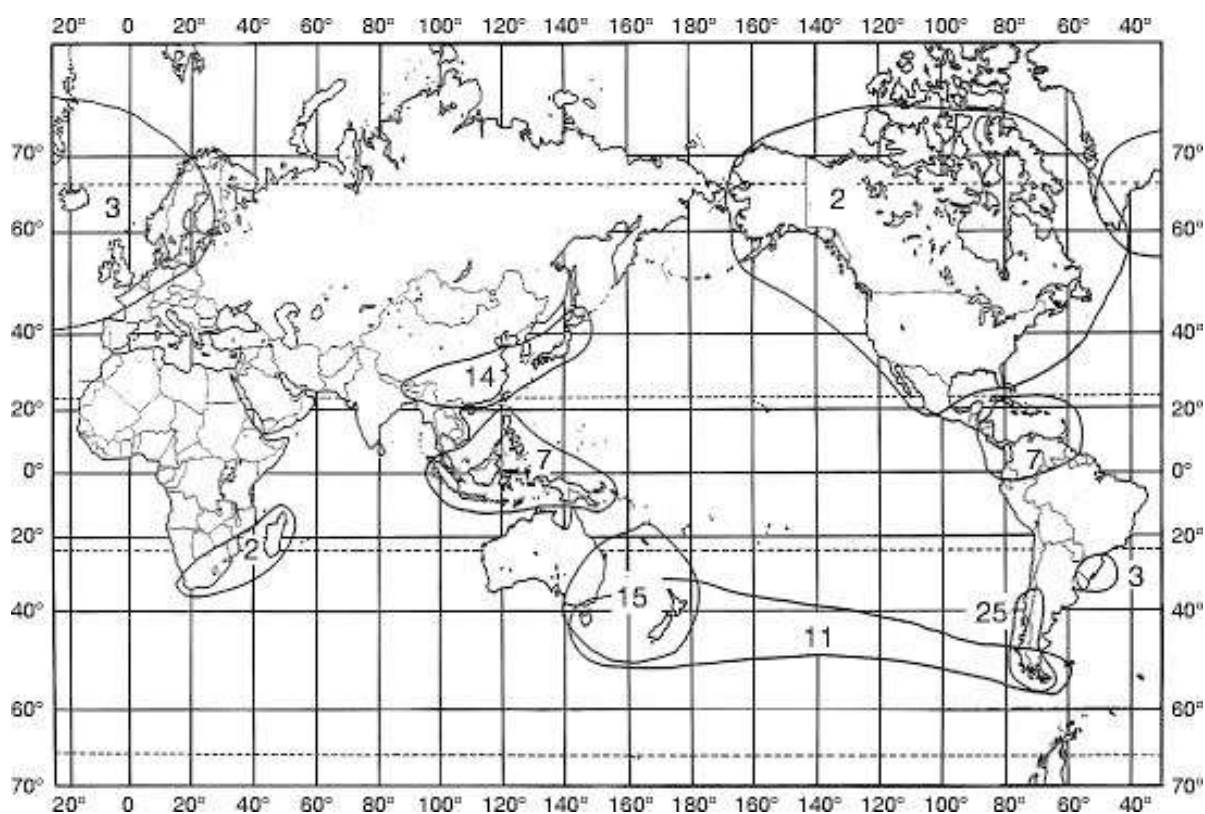
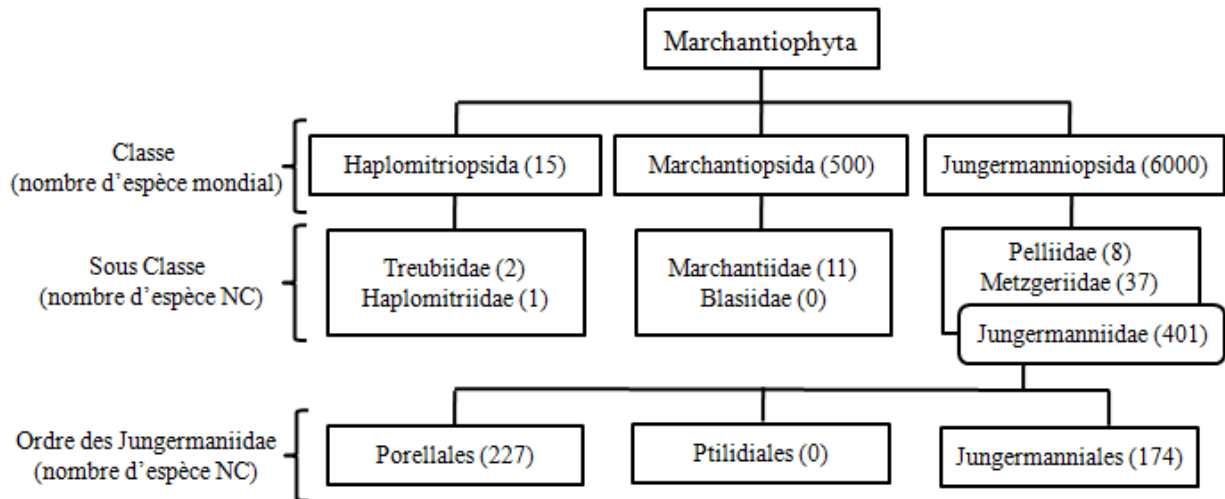


Figure 15 : Nombre de genre endémique de bryophytes sur la planète [54]

La Nouvelle-Calédonie fait partie des zones les plus riches en hépatique avec le Japon, le Costa Rica et la Nouvelle Zélande. En Nouvelle-Calédonie, un récent inventaire fait état de 99 genres et 36 familles [60].

Les Marchantiophyta (hépatiques) sont divisés en trois grandes classes : Jungermanniopsida ( $\approx 6000$  espèces), Marchantiopsida (hépatiques à thalle complexe,  $\approx 500$  espèces) et Haplomitriopsida ( $\approx 15$  espèces).

En Nouvelle-Calédonie, plusieurs familles dominent la flore des hépatiques par leur nombre d'espèces, d'une part dans l'ordre des Porellales, les familles Lejeuneaceae (146 espèces) et Frullaniaceae (52 espèces) ; d'autre part dans l'ordre des Jungermanniales les familles Lepidoziaceae (60 espèces) et Lophocoleaceae (45 espèces) (Figure 16).



**Figure 16 : Situation taxonomique des hépatiques de Nouvelle-Calédonie (NC)**

Le taux d'endémisme est compris entre 13 (endémiques confirmées) et 39% (confirmées et endémiques potentielles), l'amplitude de cette estimation est importante car un doute plane sur l'endémicité de certaines plantes du fait de manque de travaux taxonomiques récents.

Seul un genre d'hépatique est endémique de la Nouvelle-Calédonie : il s'agit du genre *Meinungeria* (Lepidoziaceae) [60].



PARTIE II. TRAVAUX PHYTOCHIMIQUES MENEES  
SUR LES HEPATIQUES : ANALYSE DES COMPOSES  
VOLATILS ET ISOLEMENT DE MOLECULE

# 1 Objectif

L'objectif de cette partie vise à contribuer à la connaissance de la chimiodiversité des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie et de leur importance : établissement de la composition chimique en constituants volatils et non volatils, évaluation des propriétés biologiques des constituants par les données bibliographiques et puis par des tests d'activité antimicrobienne (partie III).

Plusieurs espèces sélectionnées sont extraites à l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O) puis analysées en CPG-FID-SM dans le but d'évaluer la chimiodiversité des hépatiques néo-calédoniennes. Ces résultats permettront de faire des liens chimiotaxonomiques entre les espèces néo-calédonienne et celles antérieurement étudiées.

En parallèle, des extraits ont été fractionnés sur colonne ouverte en alternant chromatographie d'adsorption sur phase normale et chromatographie d'exclusion stérique (CES) et dans les stades finaux par chromatographie liquide haute performance (CLHP) semi préparative en phase inverse et/ou chromatographie sur couche mince (CCM) préparative. Le suivi du fractionnement jusqu'à l'obtention de molécules pures a été contrôlé par CCM, par CLHP-SM et en partie par CPG-SM. Le choix de la technique chromatographique à utiliser concernant le premier fractionnement a été surtout fonction de la solubilité de l'extrait dans les différents solvants présents au laboratoire.

Les molécules isolées ont été caractérisées pour servir de standards analytiques.

## 2 Matériel et Méthode

### 2.1 Collection du matériel végétal d'étude

Les échantillons sont récoltés dans des sacs en papier pour éviter tout transfert de plastifiants et sont classés sous le code METXXX où XXX correspond à un nombre, celui-ci est incrémenté pour chaque nouvel échantillon. Si deux plantes ont été enregistrées ensemble, une lettre est ajoutée au code de l'échantillon pour différencier les espèces. Les coordonnées GPS sont prises pour chaque collecte et le biotope du milieu est renseigné. Les échantillons sont grossièrement débarrassés de leurs "impuretés" (cailloux, terre, autres espèces végétales...), puis mis à sécher à température ambiante. Après séchage, nous procédons à un nettoyage minutieux. Pour chaque échantillon, une partie est mise sous enveloppe et le reste est stocké en chambre froide à 4°C.

68 échantillons d'hépatique, identifiés par Monsieur Louis Thouvenot (spécialiste de la taxonomie des bryophytes), ont été récoltés dans 10 zones (Figure 17) :

- zone 1 : Pindai
- zone 2 : Farino
- zone 3 : Forêt de Dogny
- zone 4 : Mont Humboldt
- zone 5 : Nouméa
- zone 6 : Forêt des Koghis
- zone 7 : Col de Mourange
- zone 8 : Marais kiki et environ
- zone 9 : Port boisé
- zone 10 : Goro



Figure 17 : Zones de collectes

Les échantillons récoltés sont répartis dans six familles. Ces familles appartiennent à la sous-classe des Jungermanniidae (la plus grande des Marchantiophyta en ce qui concerne le nombre d'espèce), distincte des autres pour être uniquement composée d'hépatique à feuille.

On peut diviser taxonomiquement les échantillons en deux groupes : ceux appartenant au sous-ordre des Lophocoleineae (ordre : Jungermanniales) et ceux appartenant à l'ordre des Porellales.

Les échantillons récoltés appartenant à l'ordre des Porellales sont distribués dans deux sous-ordre et trois familles comme montré dans le Tableau 1 avec les familles **Porellaceae** et **Lejeuneaceae**, toutes deux faisant partie du sous-ordre des Porellineae et la famille **Frullaniaceae** (sous-ordre : Jubulineae).

Trois échantillons de *Porella viridissima* (famille : **Porellaceae**) ont été récoltés dans deux zones différentes. Huit échantillons d'hépatique appartenant à la famille des **Lejeuneaceae** ont été récoltés dans quatre zones différentes. Ils sont répartis en six genres et sept espèces. 10 échantillons du genre **Frullania** ont été récoltés (seul genre répertorié pour la famille des Frullaniaceae en Nouvelle-Calédonie). Ces échantillons ont été collectés dans trois zones et sont répartis en sept espèces. Les espèces endémiques sont repérées par un astérisque (cf. Tableau 1).

Ordre	Sous-ordre	Famille	Genre	Espèce	Zone	Echantillon		
Porellales	<u>Porellineae</u>	<b>Porellaceae</b>	Porella	<i>P. viridissima</i>	4	MET035		
					6	MET014		
					6	MET015		
			<b>Lejeuneaceae</b>	Schiffneriolejeunea	<i>S. tumida</i> var <i>haskarliana</i> *	7	MET023	
		Lopholejeunea		<i>L. subfusca</i>	1	MET087		
		Drepanolejeunea		<i>D. pentadactyla</i>	1	MET090		
		Spruceanthus		<i>S. thozetianus</i>	1	MET098		
		Thysananthus		<i>T. spathulistipus</i>	10	MET119		
	10				MET120			
	10				MET121			
		Lejeunea		<i>L. sordida</i>	2	MET131		
		<u>Jubulineae</u>	<b>Frullaniaceae</b>	Frullania	<i>F. bella</i> *	9	COU164	
						8	COU190	
						<i>F. cornuta</i> *	6	COU134
						<i>F. falsicornuta</i> *	6	COU178
						<i>F. mammillosa</i> *	8	COU082
							9	COU163
	<i>F. multilacera</i>					6	COU183	
	<i>F. scalaris</i> *					8	COU187	
	<i>F. ericoides</i>					5	MET017	
		5	MET019					

**Tableau 1 : Distribution géographique des échantillons récoltés de l'ordre des Porellales**

Les échantillons récoltés appartenant au sous-ordre des Lophocoleineae sont distribués dans trois familles : **Lepidoziaceae**, **Lophocoleaceae** et **Plagiochilaceae**.

Comme montré sur le Tableau 2, 38 échantillons d'hépatique appartenant à la famille des **Lepidoziaceae** ont été récoltés. Ces échantillons ont été collectés dans huit zones et représentent 10 espèces identifiées. Huit échantillons pour lesquels l'espèce n'a pas été clairement identifiée sont classés sous l'appellation B. sp (AD212), car ils forment un groupe assez homogène morphologiquement. Un autre échantillon non identifié est classé sous l'appellation B. sp (AD211).

Quatre échantillons d'hépatique appartenant à la famille des **Lophocoleaceae** ont été collectés dans trois zones et représentent trois espèces. Sept échantillons d'hépatique appartenant à la famille des **Plagiochilaceae** ont été récoltés dans trois zones et représentent quatre espèces. Les espèces endémiques sont repérées par un astérisque.

Ordre	Sous-ordre	Famille	Genre	Espèce	Zone	Echantillon		
Jungermanniales	<u>Lophocoleineae</u>	<b>Lophocoleaceae</b>	Chiloscyphus	<i>C. latistipus*</i>	6	MET029		
					3	MET058		
				<i>C. confertus*</i>	10	MET122		
					Heteroscyphus	<i>H. argutus</i>	3	MET061
				<b>Plagiochilaceae</b>	Chiastocaulon	<i>C. caledonicum</i>	10	MET101
						10	MET103	
						10	MET114	
					Plagiochila	<i>P. teysmannii</i>	1	MET091
						<i>P. bicornuta</i>	1	MET088
						1	MET093	
					Plagiochilion	<i>P. theriotanus</i>	3	MET050
				<b>Lepidoziaceae</b>	Acromastigum		10	MET113B
						<i>A. caledonicum*</i>	10	MET107
							10	MET109B
						<i>A. tenax*</i>	10	MET116
					Bazzania	<i>B. bernieri</i>	6	MET028
						6	MET031	
						4	MET038	
						4	MET040	
						3	MET047	
						7	MET063	
						8	MET066	
						8	MET067	
						8	MET069	
						<i>B. deplanchei*</i>	10	MET125
						<i>B. francana</i>	7	MET062
						8	MET065	
						6	MET032	
						10	MET106	
						<i>B. marginata*</i>	3	MET048
						<i>B. parisii</i>	3	MET109A
						<i>B. serrifolia</i>	4	MET041
						3	MET051	
			3	MET052				
			3	MET053				
			1	MET092				
			1	MET099				
			<i>B. sp (AD211)</i>	4	MET039			
			<i>B. sp (AD212)</i>	10	MET110			
				10	MET118			
				10	MET102			
				10	MET124			
				10	MET117			
				7	MET064			
				7	MET068			
				7	MET072			
			<i>B. subintegra*</i>	10	MET100			
			<i>B. vittata</i>	3	MET049			
				3	MET060			

**Tableau 2 : Distribution géographique des échantillons récoltés du sous-ordre des Lophocoleineae (ordre : Porellales)**

## 2.2 Techniques extractives

Le matériel végétal a été nettoyé puis séché quelques jours à l'air libre et température ambiante. Il a été ensuite broyé à l'aide d'un robot ménager. Le broyat fut extrait deux fois dans l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O) (Unilab) par macération (chaque extraction dure une semaine). Si le rendement de l'extrait brut obtenu lors de la seconde macération était supérieur à 30% de la masse de celui obtenu lors de la première macération une troisième extraction fut alors effectuée. Ensuite le marc était extrait de la même manière avec du méthanol (MeOH) (Ajax Finechem, distillé avant usage). Les macérations ont été réalisées sous ultrasonifications ponctuelles.

L'extraction à l'Et<sub>2</sub>O (solvant apolaire) permet d'extraire préférentiellement les molécules apolaires alors que l'extraction au MeOH (solvant polaire et augmentant la perméabilité des cellules) permet d'extraire globalement la majorité des composés secondaires.

## 2.3 Techniques utilisées pour le fractionnement

Le fractionnement d'un extrait pour aboutir à l'isolement des molécules purifiées consiste en une succession d'étapes de purification dont la stratégie est montrée dans la Figure 18. Les fractions obtenues à chaque étape sont analysées par chromatographie sur couche mince (CCM).

Le fractionnement alterne l'utilisation de colonne ouverte de gel de silice et colonne ouverte de gel de Séphadex. Si la masse de la fraction à chromatographier est inférieure à 50 mg des tests sont effectués pour choisir de continuer le fractionnement sur CCM préparative ou sur chromatographie liquide à haute performance (CLHP) semi préparative. Ces techniques de fractionnement sont détaillées dans la partie II.2.4.

Si la masse de la fraction est supérieure au nombre de "spots" (taches) majoritaires sur la CCM multipliée par 10 mg, la purification est poursuivie sinon la fraction est archivée. S'il n'y a qu'un seul "spot" sur la CCM, la pureté de la fraction est évaluée par les techniques de chromatographie analytiques détaillées dans la partie II.2.5.

Les structures des molécules sont déterminées à l'aide de techniques spectrales présentées dans la partie II.2.6.

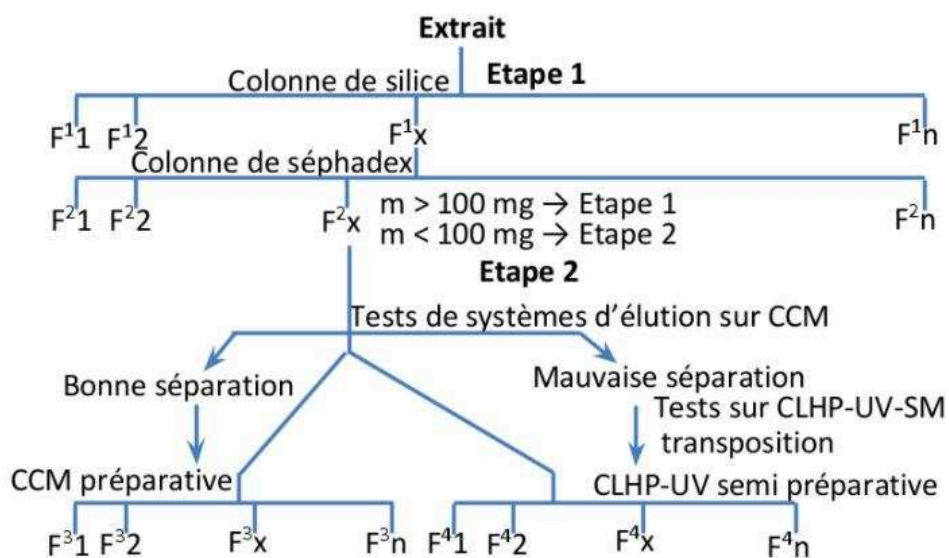


Figure 18 : Schéma des étapes de fractionnement chromatographiques



## 2.4 Techniques de chromatographies préparatives

### 2.4.1 Chromatographie sur colonne ouverte

Les premières étapes de purification consistent en des fractionnements successifs sur colonne ouverte. La taille des particules de silice (Merck, diamètre des particules : 0,2-0,5 cm ou 0,063-0,1 cm; Fischer 0,04-0,063 cm) est choisie en fonction de la taille de la colonne. L'extrait brut à fractionner est solubilisé dans un faible volume de  $C_6H_{12}$  (Ajax Finechem, distillé avant usage), de l'AcOEt (Ajax Finechem, distillé avant usage) est ajouté au besoin pour la solubilisation.

Lorsqu'un volume mort de phase mobile est passé, la phase mobile est récupérée à l'aide de tubes mis sur des supports. Le pourcentage d'AcOEt dans le gradient de la phase éluante est augmenté de 5% tous les trois volumes morts. Le suivi de la séparation et les rassemblements des contenus des tubes sont contrôlés par CCM (Merck).

Le mode opératoire est sensiblement le même pour la chromatographie d'exclusion stérique (Séphadex LH-20). La fraction (obtenue précédemment par fractionnement sur colonne de silice) à séparer est diluée dans un volume minimum de MeOH (Ajax Finechem, distillé avant usage), du DCM (Ajax Finechem, distillé avant usage) est ajouté au besoin pour la solubilisation.

### 2.4.2 Chromatographie haute performance semi-préparative couplée à un détecteur à barrette de diode (CLHP-DAD semi-prep)

Les séparations par CLHP semi préparative sont réalisées sur une chaîne Perkin Elmer, munie d'un passeur (Perkin Elmer flexar LC-autosampler), d'un module de pompe (Perkin Elmer flexar LC pump et solvent manager) et d'un détecteur DAD (perkin Elmer flexar PDA UPLC detector et FX PDA UPLC detector). L'appareil est piloté par le logiciel Chromera. La colonne utilisée est de type C-18 (VP250/10 nucléodur 100-10 C18 Ec.). Les solvants de qualité CLHP sont utilisés ainsi que l'eau Mq : MeCN (sigma Aldrich, chromasolv), MeOH (biochem, chemopharma)

### 2.4.3 Chromatographie sur couche mince préparative

L'extrait/fraction à séparer est déposé sur une plaque de CCM préparative (Merck). L'éluant est déterminé à l'avance via des tests d'éluion sur plaque CCM analytique (partie II.2.5.1).

## 2.5 Techniques chromatographique analytiques

### 2.5.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'extrait / fraction à analyser est déposé sur une plaque de CCM (Merck). En routine, le système d'éluion isocratique :  $C_6H_{12}$  / AcOEt (4: 1 ou 1: 1) est utilisé.

Des éluions avec des mélanges binaires et tertiaires de solvants sont réalisés pour les tests visant des séparations sur CCM préparative. Les solvants utilisés sont le MeOH, le C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, le toluène (sigma Aldrich), l'Et<sub>2</sub>O, le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, le CHCl<sub>3</sub> (unichrom). De très faibles quantités (quelques gouttes) d'acide formique (Ajax Finechem) et d'acide Acétique (sigma Aldrich) peuvent être ajoutées.

Les plaques CCM sont révélées sous UV (longueurs d'onde : 254 et 365 nm) et par pulvérisation d'une solution aqueuse d'acide sulfurique (30%) suivi d'un chauffage.

### 2.5.2 Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse (CLHP-DAD-SM)

L'appareillage de CLHP-DAD-SM utilisé est muni d'un module de pompe (Waters 2695 Séparation module), d'un passeur (Perkin Elmer flexar LC-autosampler), d'un détecteur DAD (Waters 2996 photodiode array detector) et d'un spectromètre de masse type ESI-trappe ionique (Bruker Daltonics HCT plus) dont l'ensemble est piloté par le logiciel Hystar.

L'éluion se fait à travers une colonne de type C-18 (ec 250/4.6 nucleodur 100-5 C18 Ec.). En routine les échantillons sont élués avec un gradient d'eau filtrée (acidifiée avec 0,1% d'acide formique) (A) et du MeCN (B) (sigma Aldrich, chromasolv). Le débit de phase mobile est de 0,8 ml/min avec le gradient suivant : 0 min, 20% B; 3 min, 30% B; 11 min, 35% B; 25 min, 50% B; 37–40 min, 100% B.

L'électronébulisation est réalisée en mode positif avec un débit de diazote (gaz séchant) de 8 l/min à une température de 300°C. La tension du capillaire est fixée à 4000 V. Les données obtenues par le spectromètre de masse sont enregistrées pour des masses comprises entre 50 et 1000 Da.

### 2.5.3 Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et à un détecteur de flamme à ionisation (CPG-FID-MS)

La CPG-FID-MS permet de séparer les composés volatils d'un mélange. Ces composés sont quantifiés de manière relative avec la détection par le détecteur à ionisation de flamme qui fournit une réponse linéaire relative aux nombres de carbone de l'analyte (le facteur de réponse peut varier en fonction des fonctions chimiques des analytes). Le détecteur de masse, , permet de collecter les ions (issus des molécules et fragments) puis d'identifier ces composés par comparaison des spectres expérimentales obtenues avec celles des bases de données de spectre de masse obtenu avec une source impact électronique (V=70eV) . En effet le détecteur de masse utilise une à source impact électronique (70eV) fournissant des spectres de masse avec des détails spécifiques à chaque molécule.

Quelques brins de matériel végétal sec sont sélectionnés de par leur pureté (les brins d'hépatique doivent être sans terre ni morceau de végétaux autre que l'espèce à analyser). Ces

brins sont ensuite broyés avec un peu de sable dans un mortier à l'aide d'un pilon, une faible quantité d'Et<sub>2</sub>O est ajouté, le tout est rebroyé, puis l'extrait est récupéré.

L'extrait étheré résultant de cette manipulation est passé à travers une pipette pasteur remplie de silice et élué avec de l'Et<sub>2</sub>O. Cette étape de préparation de l'échantillon a pour but d'ôter un maximum de composés polaires de l'extrait pour lesquels l'analyse via CPG-FID-SM est inadaptée. La partie de l'extrait ainsi éluée est rediluée au besoin avec de l'Et<sub>2</sub>O, puis est injectée dans le CPG.

Les données sur les composés volatils de la famille des Frullaniaceae (partie II.3.5.2) ont été acquises par le Dr. Paul Coulerie sur un appareil de CPG-SM à l'Université de Pharmacie Tokushima Bunri (Japon). Cet appareil est constitué par une chaîne CPG (Agilent Technologies, 6890N), munie d'un spectromètre de masse (Agilent Technologies). L'échantillon est séparé à travers une colonne capillaire (HP-5MS : 30m x 0,25 mm, 0,26 µm). Les interprétations des spectres de masse sont réalisées à l'aide de la bibliothèque de spectre Mass finder 2.3 et la bibliothèque propre à l'équipe du laboratoire possédant l'appareil CPG-SM. Cet appareil n'étant pas muni d'un FID, l'analyse des analytes n'est pas quantitative.

Toutes les analyses de composés volatils (hormis pour la famille des Frullaniaceae) ont été réalisées sur un appareil CPG (Perkin Elmer gas chromatograph, Clarus® 580), muni d'un spectromètre de masse (Perkin Elmer, Clarus® SQ 8C) et d'un détecteur à ionisation de flamme (Perkin Elmer). Les composés sont séparés à travers une colonne capillaire (elite-5MS : 30m x 0,25 mm, 0,25 µm). Les interprétations des spectres de masse sont réalisés à l'aide des bibliothèques : Mass Finder 2.3 library, NIST library et Wiley library.

#### ➤ Programmation du four

La température de l'injecteur est de 250°C. La température initiale du four est de 50°C avec un palier de 3 minutes puis est augmentée avec un gradient de 5°C par minute jusqu'à atteindre une température de 250°C, puis s'ensuit un palier de 15 minutes. L'analyse dure 58 minutes.

#### ➤ Programmation du spectromètre de masse

Sept minutes après l'injection, le (SM) scanne et collecte les ions ayant un rapport m/z compris entre 50 et 500, la durée d'un scan est d'une seconde et le délai inter scan de 5 ms.

Hormis l'énergie de la source qui est de 70 eV, les autres paramètres inhérents à la source (IE) sont susceptibles de varier en fonction des calibrations.

## 2.6 Techniques spectroscopiques

### 2.6.1 Spectroscopie infrarouge

L'appareil utilisé est un spectromètre Perkin Elmer (FT-IR) spectrometer frontiers utilisant la technique de réflectance totale atténuée (ATR).

Si l'échantillon est solide, celui-ci est broyé avec un mortier et un pilon, placé sur la lentille à échantillon et est compacté à l'aide d'une presse. Si l'échantillon est liquide, celui-ci est dilué au tiers dans l'éther puis une goutte est déposée sur la lentille à échantillon, une fois séchée une autre goutte est déposée et ainsi de suite.

### 2.6.2 Spectrométrie de masse à haute résolution

Les expériences pour acquérir un spectre de masse à haute résolution ont été réalisées sur un appareil Waters (SYNAPT G2 HDMS) muni d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) en mode ESI positif (ESI : 2.8 kV ; tension d'orifice : 20 V ; débit du gaz de nébulisation (azote) : 100 l/h) avec un analyseur à temps de vol. Ces expériences ont été effectuées à Marseille par Madame Valérie Monnier au spectropôle de l'université Aix-Marseille.

### 2.6.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été effectuées avec un appareil Varian (500 MHz) au Japon (Université de Tokushima Bunri) et sur un appareil Bruker (500 MHz) à Marseille par le Dr. Gaëtan Herbette au spectropôle de l'université Aix-Marseille.

Plusieurs types d'expériences RMN complémentaires ont été réalisés :  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, COSY, HMBC et NOESY.

## 2.7 Détermination structurale assistée par un logiciel (Logic for Structure determination) : [61]

Ce logiciel s'appuie sur les informations fournies par le spectre HSQC édité, le spectre COSY, le spectre HMBC et la masse à haute résolution. Les données d'entrée de ce programme sont composées de plusieurs commandes:

-Une commande "MULT", pour laquelle il convient de renseigner tous les atomes n'étant pas des hydrogènes, leurs états d'hybridation et le nombre d'atomes d'hydrogène auxquels ils sont liés. Ces atomes sont numérotés par ordre de déplacement chimique décroissant.

-Une commande "BOND", pour laquelle il convient de renseigner toutes les liaisons carbone-carbone observés via les corrélations  $^3J_{\text{H-H}}$  sur le spectre COSY.

-Une commande "HSQC", pour laquelle il convient de renseigner tous les atomes n'étant pas des hydrogènes liés à un ou plusieurs hydrogènes.

-Une commande "HMBC", pour laquelle il convient de renseigner toutes les corrélations observées sur le spectre HMBC, lesquelles seront considérées comme des corrélations H-C  $^2J$  ou  $^3J$ . Etant donné qu'il peut y avoir des corrélations supérieures à  $^3J$  visibles sur le spectre HMBC, il faut tester plusieurs jeux de données provenant des observations du spectre HMBC.

Le résultat fourni par le programme propose l'ensemble des solutions structurales possibles pour données renseignées obtenus par l'analyse des données spectrales. L'utilisation de cette méthode permet de ne pas passer à côté d'une solution structurale probable.

Plusieurs données importantes ne sont pas renseignées dans ce programme, c'est le cas de la valeur des déplacements chimiques des protons et carbone ainsi que de la multiplicité. Ces données serviront à sélectionner les meilleures solutions parmi celles fournies par le logiciel.

## 3 Chimiodiversité et chimiotaxonomie

### 3.1 Composés volatils issus de la famille des Plagiochilaceae

Comme en attestent les 12 chimiotypes définis pour le genre *Plagiochila*, cette famille contient une importante diversité en composés secondaires. La composition chimique de quatre espèces a été investiguée. Dans cette famille, seul le genre *Plagiochila* a fait l'objet de nombreuses études, nous proposons dans la présente étude la première analyse d'une espèce du genre *Chiastocaulon*.

#### 3.1.1 Caractéristiques des Plagiochilaceae

La famille Plagiochilaceae comprend 11 genres mais l'immense majorité des investigations phytochimiques menées sur cette famille porte sur des espèces du genre *Plagiochila*, d'où moins d'informations présentées sur les autres genres de cette famille.

Comprenant environ 1600 espèces, le genre *Plagiochila* contient le plus d'espèces parmi les Marchantiophyta. La même espèce de ce genre peut parfois présenter des variations morphologiques importantes [62], ce qui montre l'intérêt de la chimiotaxonomie pour cette famille qui en plus possède une diversité chimique très importante [21].

Plus de 90 espèces de *Plagiochila* ont été chimiquement investiguées, montrant que deux grands groupes peuvent être reconnus selon la présence ou l'absence de sesquiterpénoïdes de type 2,3-seco-aromadendrane. Il existe une importante diversité chimique matérialisée par 12 chimiotypes : 2,3-seco-aromadendrane (chimiotype I), 2,3-seco-aromadendrane / diterpénoïdes- (chimiotype II), 2,3-secoaromadendrane / gymnomitrane- (chimiotype III), diterpénoïdes / bis-bibenzyl- (chimiotype IV), diterpénoïdes- (chimiotype V), bibenzyl- (chimiotype VI), bibenzyl / diterpénoïdes- (chimiotype VII), bibenzyl / bis-bibenzyl- (chimiotype VIII), pinguisane- (chimiotype IX), cuparane- (chimiotype X), sesquiterpène lactone- (chimiotype XI), ester méthylique d'acide everninique-9,10-dihydrophénanthrène- (chimiotype XII) [21].

En Nouvelle-Calédonie, 29 espèces appartenant à la famille des Plagiochilaceae ont été répertoriées, ces espèces sont distribuées dans quatre genres : *Acrochila*, *Chiastocaulon*, *Plagiochila* et *Plagiochilion* [60].

Quatre espèces de la famille des Plagiochilaceae ont été étudiées : *Chiastocaulon caledonicum* (échantillons : MET101, MET103 et MET114), *Plagiochila bicornuta* (MET088 et MET093), *Plagiochila tesmanii* (MET091) et *Plagiochilion theriotanus* (MET050). La classification taxonomique de ces espèces est décrite dans le Tableau 3 et les données

relatives à la collecte de ces plantes dans le Tableau 68 (Annexe 2). Les composés détectés non identifiés sont présentés en dans le Tableau 70 (Annexe 3).

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Jungermanniales H.Klinggr</u>
Sous-ordre	Lophocoleineae Schljakov
<b>Famille</b>	<b>Plagiochilaceae Müll.Frib</b>
Genre	Chiastocaulon <b>Carl</b> C. caledonicum (Steph.) S.D.F. Patzak, M.A.M .Renner, SchäF. - Verw. et Heinrichs
Genre	Plagiochila ( <b>Dumort.</b> ) <b>Dumort.</b> P. bicornuta Steph. P. teysmannii Sande Lac.
Genre	Plagiochilion <b>S.Hatt.</b> P. theriotanus (Steph.) Inoue

**Tableau 3 : Classification taxonomique des espèces étudiées de la famille des Plagiochilaceae**

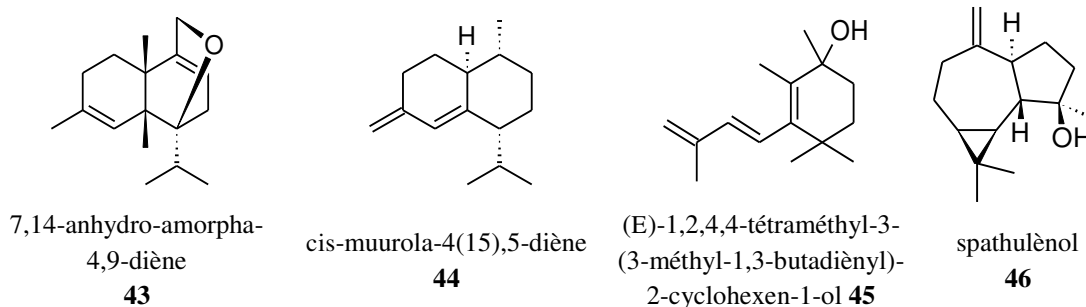
### 3.1.2 Résultats

#### 3.1.2.1 Chiastocaulon caledonicum (Steph.) S.D.F. Patzak, M.A.M.Renner, SchäF. -Verw. et Heinrichs

Trois échantillons de Chiastocaulon caledonicum ont été étudiés (MET101, MET103 et MET114), nous avons observé que MET103 et MET114 ont une composition chimique quasiment identique alors que l'échantillon MET101 présente quelques variations de composition. Les constituants détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 7 et 8.

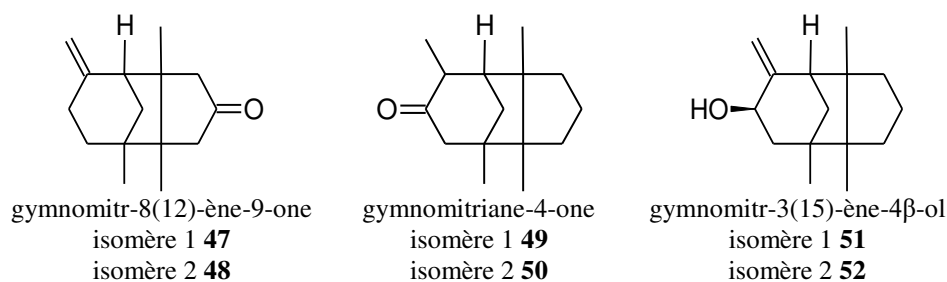
##### ➤ Échantillons MET103 et MET114

Les sesquiterpénoïdes identifiés représentent entre 52,0 et 77,8% des composés volatils avec 13,6 à 22,8% de sesquiterpénoïdes non identifiés. Le **7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène (43) (29,2-54,8%)** est détecté en tant que constituant majoritaire ce qui en fait un bon biomarqueur pour cette espèce, permettant ainsi de proposer un chimiotype amorphe pour le genre Chiastocaulon. Cette molécule a été détectée chez Lepidozia fauriana [21], qui appartient également à la famille Plagiochilaceae. Le cis-muuro-la-4(15),5-diène (**44**) (3,2-4,6%) détecté dans ces échantillons fait également partie des sesquiterpénoïdes affiliés au cation (Z-E)-germacradiényl dans la voie de biosynthèse des sesquiterpènes (cf. Tableau 9).

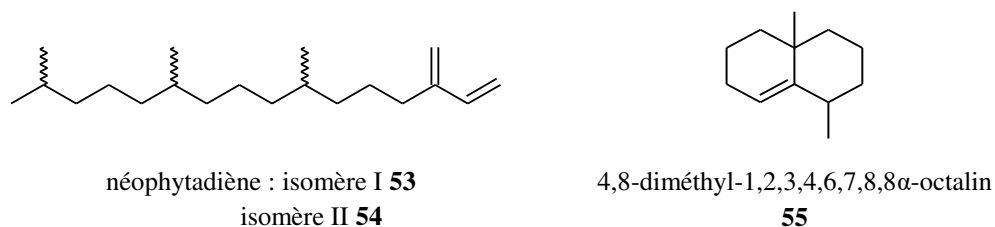


Le (E)-1,2,4,4-tétraméthyl-3-(3-méthyl-1,3-butadiényl)-2-Cyclohexen-1-ol (**45**) (71,8-13,2%), molécule dont le squelette correspond à une structure monocyclonérolidol avec une migration de méthyl, et le spathulénol (**46**) (1,1-4,6%) sont détectés avec des pourcentages relatifs assez importants.

Quant aux composés dérivés du cation bisabolyll, trois composés de type barbatane sont détectés. Le gymnomitr-8(12)-ène-9-one iso 2 (**48**) (1,5-3,4%), le gymnomitriane-4-one iso 1 (0-1,6%) (**49**) et le gymnomitr-3(15)-ène-4β-ol iso 1 (**51**) (0-1%) sont détectés comme constituants mineurs avec des pourcentages relatifs inférieurs à 1%.



Les diterpénoïdes identifiés sont le néophytadiène I (**53**) (1,5-7,4%) et II (**54**) (0,9-3,5%). Le néophytadiène pourrait être un artéfact issu du phytol (partie esterifiée de la chaîne latérale de la chlorophylle-a) lors de l'analyse CPG-SM [63]. Le 4,8-diméthyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octalin (**55**) (0,9-4%) est également détecté, ce composé est connu pour être présent dans les eucaryotes, champignons et plantes supérieures, comme étant un sous produit de la fragmentation du germacradiénol [64].



#### ➤ Échantillon MET101

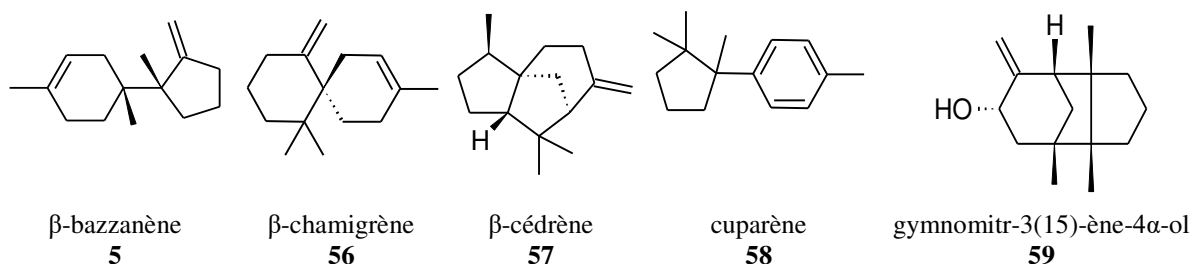
Sur les 18 sesquiterpénoïdes identifiés chez MET101 (représentant 93,5% des composés volatils détectés), seuls trois sont simultanément présents dans les échantillons MET103 et



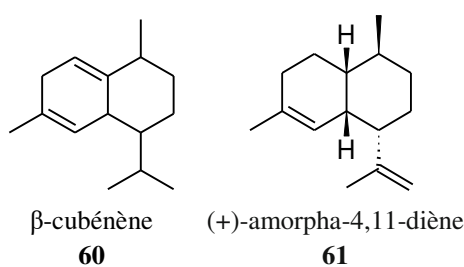
MET114, il s'agit : du (E)-1,2,4,4-tétraméthyl-3-(3-méthyl-1,3-butadiényle)-2-cyclohexen-1-ol (**45**) (5,7%), du **7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène** (**43**) (**58,8%**) et du cis-muuro-la-4(15),5 diène (**44**) (2,3%) dont les deux derniers composés affiliés au cation (Z-E)-germacradiényle. Ceci suppose que même si la composition chimique de cet échantillon diffère de celle de MET114 et MET103, le biomarqueur de cette espèce pourrait être défini comme étant le **7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène** (**43**).

Un autre point très intéressant concerne la détection de trois sesquiterpénoïdes appartenant à la classe des barbatanes : le gymnomitr-8(12)-ène-9-one iso1 (**47**) (0,1%), le gymnomitr-3(15)-ène-4 $\beta$ -ol iso 2 (**52**) (6,7%) et le gymnomitriane-4-one iso2 (**50**) (0,2%). Notons que ces composés ne sont pas détectés dans MET103 et MET114 mais leurs isomères le sont.

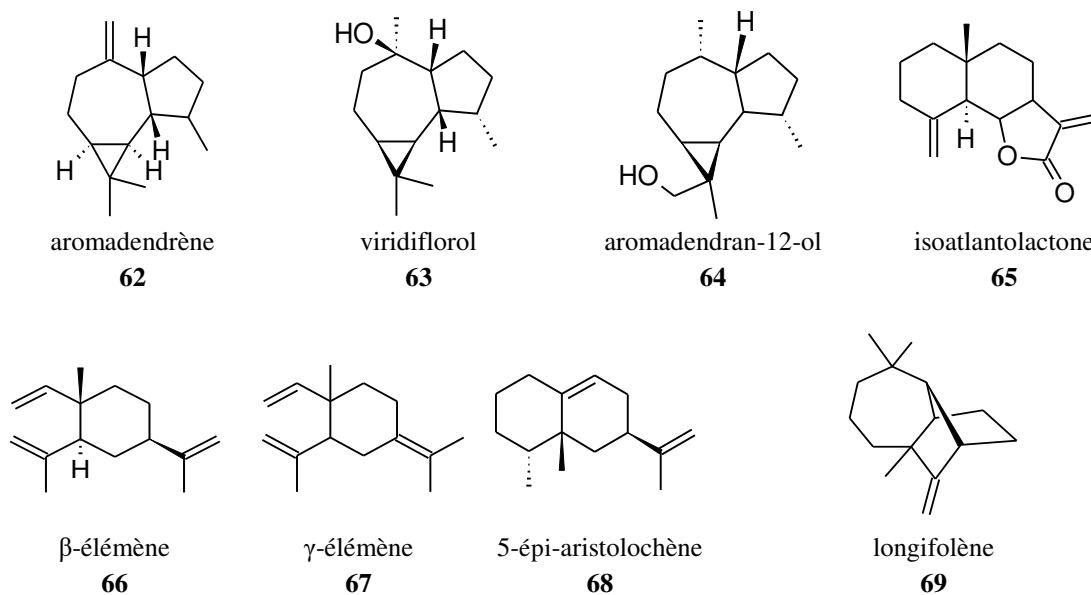
Cinq sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyle sont détectés uniquement dans cet échantillon pour l'espèce *C. caledonicum* : le  **$\beta$ -chamigrène** (**56**) (**12%**), le  $\beta$ -cédrene (**57**) (0,5%), le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (0,3%), le cuparène (**212**) (0,2%) et le gymnomitr-3(15)-ène-4 $\alpha$ -ol (**59**) (0,6%). Ces Sesquiterpénoïdes sont assez proches d'un point de vue biosynthétique car ils sont affiliés au cation cuparényle (cf. Tableau 10).



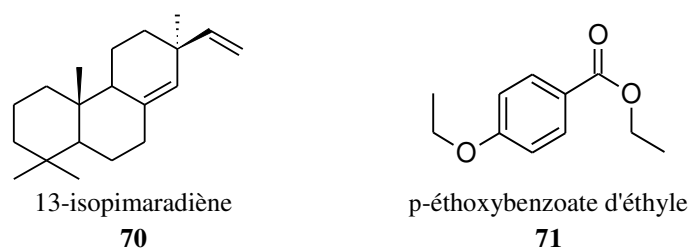
Des sesquiterpénoïdes affiliés au cation (Z-E)-germacradiényle sont détectés dans cet échantillon, ce sont : le  $\beta$ -cubénène (**60**) (1,8%) et l'amorpha-4,11-diène (**61**) (0,5%).



Huit sesquiterpénoïdes affiliés à la voie (E-E)-germacradiényle sont détectés en faible quantité dans cet échantillon mais absents des deux autres échantillons de *C. caledonicum*, ce sont : l'aromadendrene (**62**) (0,3%), le viridiflorol (**63**) (0,2%), l'aromadendran-12-ol (**64**) (0,6%), l'isoatlantolactone (**65**) (0,2%), le  $\beta$ -élémente (**66**) (1,4%), le  $\gamma$ -élémente (**67**) (0,3%), le 5-épi-aristolochène (**68**) (0,3%). Le longifolène (**69**) (0,5%) est aussi détecté.



Les néophytadiènes I (**53**) (1%) et II (**54**) (0,4%) et le 13-isopimaradiène (**70**) (0,2%) sont les seuls diterpénoïdes identifiés dans cet échantillon.



Les composés aromatiques : p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,3%) et 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyle (**73**) (0,1%) sont détectés en très faibles teneurs relatives.

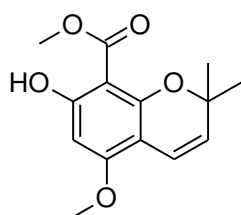
### 3.1.2.2 *Plagiochila bicornuta* Steph.

Deux échantillons de cette espèce ont été étudiés : MET088 et MET093. Leur contenu en composés volatils possèdent beaucoup de point communs essentiels notamment un pourcentage très élevé en dérivés de chromènes (plus de 50% pour les deux échantillons). Le 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyle (**73**) est détecté dans les deux échantillons avec respectivement un pourcentage relatif de 23,3 et 56,6% pour MET093 et MET088, ainsi que des dérivés du tocophérol respectivement à 3,7% et 12%. Les deux échantillons de *P. bicornuta* appartiennent sans ambiguïté à un nouveau chimiotype : le chimiotype chromènes/acide benzoïque prénylé. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont présentés dans le Tableau 7.

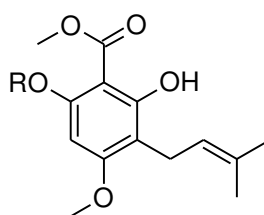
Néanmoins MET093 possède une diversité en dérivés du chromène plus importante alors que MET088 possède un contenu sesquiterpénique plus diversifié.

➤ Echantillon MET093

Le contenu volatil de cet échantillon de *Plagiochila bicornuta* est caractérisé par un fort pourcentage relatif de dérivés chromènes avec : le 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (**72**) (26,2%), le 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**73**) (23,3%) et le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**74**) (4%). Ces trois composés ont été isolés durant cette thèse, leurs identifications structurales sont décrites dans les parties : 3.1.2.2.2, 3.1.2.2.3 et 3.1.2.2.4.

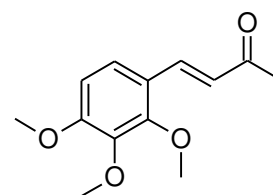


8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl  
**72**



R = H : 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl **73**

R = Me 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl **74**



1-acétyl-2-[2.3.4-triméthoxyphényl]éthylène **75**

Le composé (**74**) a été isolé pour la première fois (nouveau composé naturel) et les composés (**72**) et (**73**) sont communs à l'espèce de la famille des Plagiochilaceae : *Pedinophyllum interruptum* [35] originaire de l'Ecosse. Chez les hépatiques, les chromènes et dérivés d'acide benzoïque prénylés sont rares et surtout détectés dans le genre *Radula* [39].

Des composés aromatiques tels que le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,5%) et le 1-acétyl-2-[2,3,4-triméthoxyphényl]-éthylène (**75**) (1,4%) ont été aussi détectés.

Le pourcentage relatif de sesquiterpénoïdes non identifiés est de 10,4% et celui des sesquiterpénoïdes identifiés est de 10,4%. La majorité des composés sesquiterpéniques détectés sont affiliés au cation bisabolyl avec le cuparène (**212**) (3,9%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (2,8%) et le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (1,2%). Le spathuléol (**46**) (2,5%), composé très classique chez les hépatiques a été aussi détecté.

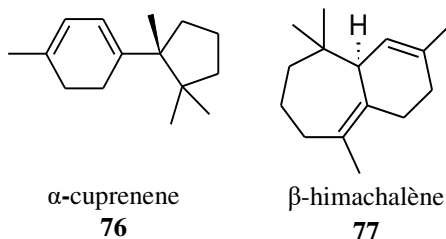
2% de diterpénoïdes ont été identifiés avec le 13-isopimaradiène (**70**) (1,7%) et le néophytadiène II (**54**) (0,2%). La majorité des composés diterpéniques n'a pas pu être identifiés pour l'instant.

➤ Echantillon MET088

La majeure partie du contenu volatil est constituée de composés sesquiterpéniques avec 25% de sesquiterpénoïdes identifiés et 3,8% de sesquiterpénoïdes non identifiés. La majeure partie de ces composés sesquiterpéniques sont affiliés au cation bisabolyl, ce sont : le  $\beta$ -barbatène (**81**) (8,9%), le cuparène (**212**) (5,9%), le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (3,9%), l' $\alpha$ -cuprenène (**76**)

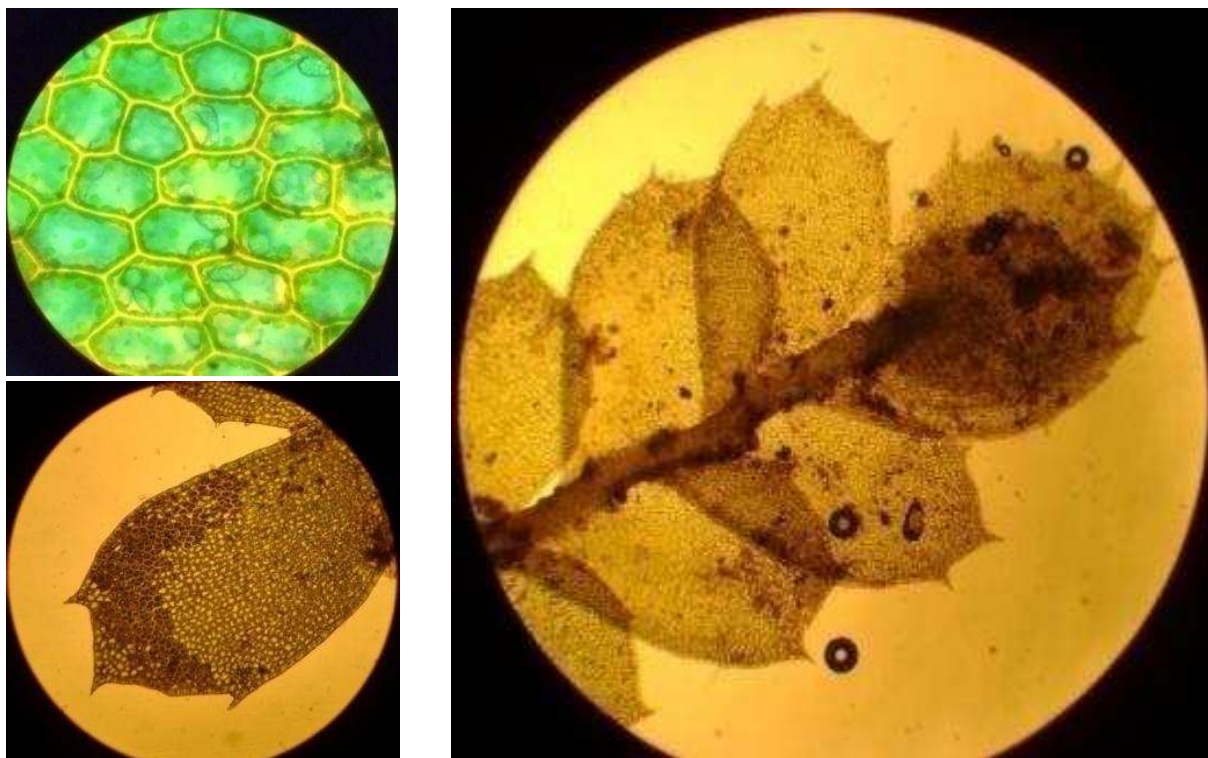
(0,7%), le gymnomitr-3(15)-ène-4 $\beta$ -ol isomère 1 (**52**) (0,6%), le  $\beta$ -cédrène (**57**) (0,5%) et le gymnomitr-3(15)-ène-4 $\alpha$ -ol (**59**) (0,4%).

Deux sesquiterpénoïdes sont affiliés au cation (E-E)-germacradiényl, avec l'aromadendran-12-ol (**64**) (1,3%) et le  $\gamma$ -élémente (**67**) (0,7%). Deux autres composés sesquiterpéniques détectés sont affiliés au cation (Z-E)-humulyl : le  $\beta$ -himachalène (**77**) (1,1%) et le copabornéol (**83**) (0,5%). L'amorpha-4,11-diène (**61**) (0,5%), détecté en faible quantité est le seul sesquiterpénoïde de cette espèce dérivant du cation (Z-E)-germacradiényl.



Les diterpénoïdes identifiés sont le 13-isopimaradiène (**70**) (1,1%) ainsi que le néophytadiène I (**53**) (0,7%) et II (**54**) (0,3%). Le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,6%) est détecté comme composé minoritaire.

### 3.1.2.2.1 Fractionnement



**Figure 19 : Détails de *Plagiochila bicornuta*, en haut à gauche : cellules \*1000, en bas à gauche : feuille \*100, à droite : face ventrale \*40**

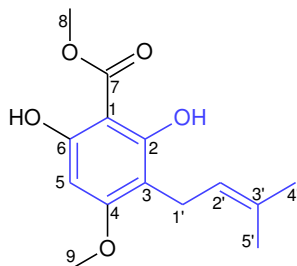
12 g de matériel végétal de *Plagiochila bicornuta* a été extrait et a fourni 300 mg d'extrait à l'éther. Cet extrait est fractionné selon le mode opératoire détaillé dans II.2.3 pour aboutir à l'isolement de trois molécules purifiées.

Les molécules isolées de l'extrait éther sont:

- le 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (**72**) (6 mg)
- le 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**73**) (10 mg).
- le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**74**) (7 mg)

### 3.1.2.2.2 Composé 1 : 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (73)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 4, la parfaite concordance de ces données [35] nous permet de conclure que le composé 1 est identifié au 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (73).



2,6-Dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (73).

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	93,7 (C)	94,1		
2	159,1 (C)	159,1		
3	109,0 (C)	109,4		
4	164,2 (C)	164,6		
5	91,7(CH)	92,0	6,06 (1H, s)	6,06 (1H, s)
6	161,2 (C)	161,3		
7	170,1 (C)	170,3		
8	52,5 ( $\text{CH}_3$ )	52,6	4,02 (3H, s)	4,03 (3H, s)
9	55,8 ( $\text{CH}_3$ )	55,9	3,82 (3H, s)	3,83 (3H, s)
1'	21,7( $\text{CH}_2$ )	21,9	3,25 (2H, d, J = 7,1 Hz)	3,25 (2H, d, J = 6,9 Hz)
2	122,9 (CH)	123,2	5,16 (1H, t, J = 7,1 Hz)	5,16 (1H, t, J = 6,9 Hz)
3'	131,4 (C)	131,4		
4'	25,9 ( $\text{CH}_3$ )	26,0	1,66 (3H, s)	1,67 (3H, s)
5'	17,8 ( $\text{CH}_3$ )	18,0	1,76 (3H, s)	1,76 (3H, s)

Tableau 4 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (73)

### 3.1.2.2.3 Composé 2 : 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyl)-benzoate de méthyl (74) (nouvelle molécule)

Les bandes d'absorptions maximales caractéristiques observées par spectroscopie infrarouge sont : 1629,5 , 1575,3 , 1471,4 , 1437,0 (C=C, aromatique), 1290,4 , 1009,1 (C-O, ester) et 1146,0 (C-O, éther)  $\text{cm}^{-1}$ .

➤ Analyse des spectres RMN proton (Figure 20), carbone (Figure 22) et HSQC édité

L'analyse de ces trois spectres met en évidence cinq signaux de groupes méthyls résonnant sous forme de singulets sur le spectre RMN proton : C-4' ( $\delta_C$  26,0 (CH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  1,65 (s) ppm), C-5' ( $\delta_C$  17,9 (CH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  1,75 (s) ppm) dont trois d'entre eux ont un déplacement typique de méthyl en  $\alpha$  d'un oxygène : C-9 ( $\delta_C$  56,3 (CH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  3,84 (s) ppm), C-10 ( $\delta_C$  55,6 (CH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  3,85 (s) ppm) et C-8 ( $\delta_C$  52,3 (CH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  3,89 (s) ppm).

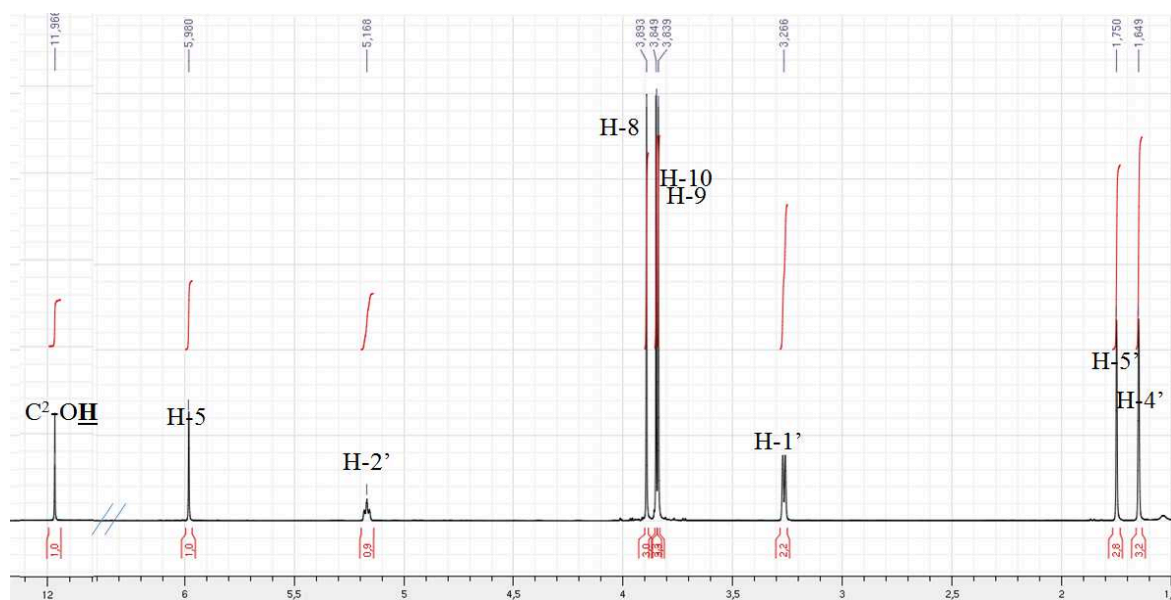


Figure 20 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyl)-benzoate de méthyl (74)

Un seul signal méthylénique est détecté : C-1' ( $\delta_C$  21,8 (CH<sub>2</sub>);  $\delta_H$  3,27 (d ; 7,1) ppm).

Deux signaux attribués à des groupes méthines portés par des carbones hybridés sp<sup>2</sup> sont observés C-2' ( $\delta_C$  122,9 (CH);  $\delta_H$  5,17 (t ; 7,1) ppm) et C-5 ( $\delta_C$  87,4 (CH);  $\delta_H$  5,98 (s) ppm).

Sept carbones quaternaires hybridés sp<sup>2</sup> sont également observés, il s'agit de : C-3' ( $\delta_C$  131,5 (C) ppm), C-3 ( $\delta_C$  110 (C) ppm), C-1 ( $\delta_C$  96,9 (C) ppm), dont trois déblindés pouvant correspondre à des carbones aromatiques portant un oxygène : C-4 ( $\delta_C$  162,7 (C) ppm), C-2 ( $\delta_C$  162,2 (C) ppm) et C-6 ( $\delta_C$  160,9 (C) ppm), et dont un atome de carbone, C-7 ( $\delta_C$  172,0 (C) ppm) ayant les caractéristiques d'un groupe carbonyle.

Enfin, un dernier signal protonique sur le spectre RMN correspondant à un proton très déblindé sous la forme d'un singulet non lié sur un atome de carbone a été détecté : C<sup>2</sup>-OH

( $\delta_{\text{H}}$  11,93 ppm), ce signal est caractéristique d'un groupe phénol formant une liaison hydrogène avec un carbonyle.

➤ Etablissement de la structure du composé 2

L'établissement de la structure commence à partir des groupes méthyles portés par les carbones C-4' et C-5' avec les corrélations H-4'/C-3'/C-2' et H-5'/C3'/C-2' permettant d'élaborer un motif isométhylénique. A ce motif est ajouté l'atome de carbone C-1' car les constantes de couplage et les multiplicités des protons H-1' et H-2' montrent clairement un couplage  $^3J_{\text{H-H}}$ , permettant ainsi d'établir le motif : (C-1')-(C-2')=(C-3')-((C-5')(C-4')).

Les groupements méthyliques déblindés portés par C-9 et C-10 sont interprétés comme étant porteurs des fonctions méthyl-éther liés respectivement aux carbones C-6 et C-4 au vu des corrélations H-9/C-6 et H-10/C-4 relevées sur le spectre HMBC. Par conséquent le carbone C-2 est le seul atome de carbone dont le déplacement chimique est compatible avec la fonction phénol.

Le groupement correspondant aux protons méthyliques déblindés ( $\delta_{\text{H}} = 3,89$  ppm) porté par le carbone C-8, est interprété comme un méthyl ester où le carbonyle de cette fonction est assigné à l'atome de carbone C-7 grâce à la corrélation H-8/C7.

Le nombre d'insaturations et les valeurs des déplacements chimiques des atomes de carbone C-1 à C-6 (respectivement  $\delta_{\text{C}}$  de 96,9 , 162,2 , 110,0 , 162,7 , 87,4 et 160,9 ppm) permettent d'attribuer ces atomes de carbone à un cycle aromatique et de l'associer au motif isométhylénique puis, avec la présence d'un groupe phénol, permet enfin d'aboutir à la structure d'un composé de type chromène ouvert (noyau en bleu sur la Figure 21).

Le motif précédemment formé est lié au cycle aromatique par la liaison (C-1')-(C-3) grâce à la corrélation H-2'/C-3, puis la fonction phénol a pu être localisée sur le cycle en position 2 pour donner la structure d'un noyau chromène ouvert au vu de la corrélation, H-1'/C-2. Ensuite, sachant que le groupe phénol participe à une liaison hydrogène, la fonction ester est fixée en position 1 et le carbone C-1 a pu être attribué grâce à son déplacement chimique et la corrélation C<sup>2</sup>-OH/C-1.

Les corrélations H-9/H-5 et H-10/H-5 relevées sur le spectre NOESY achèvent l'établissement de la structure de la molécule en plaçant les deux fonctions méthoxy, de part et d'autre de la position 5. Le composé 2 est donc ainsi identifié comme étant le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**74**), en cohérence toutes les corrélations observées sur les spectres HMBC et NOESY (Figure 21).



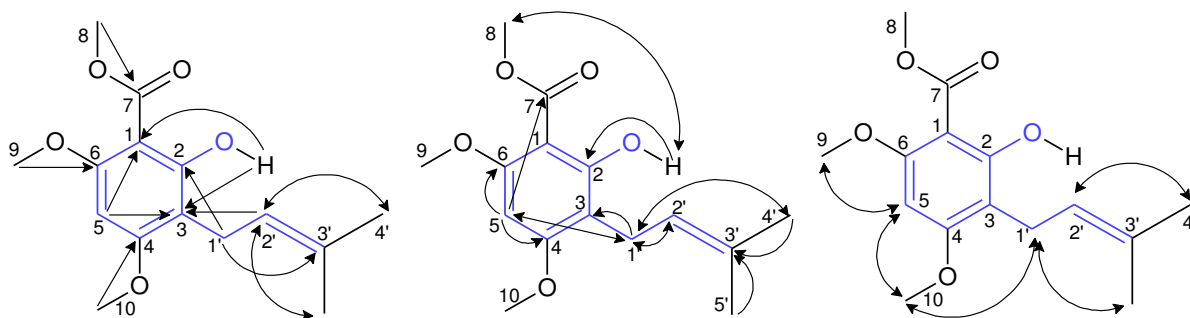


Figure 21 : 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) : à gauche : corrélations  $^3J$  H→C observées sur le spectre HMBC; au milieu : corrélations  $^2J$  et  $^4J$  H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY

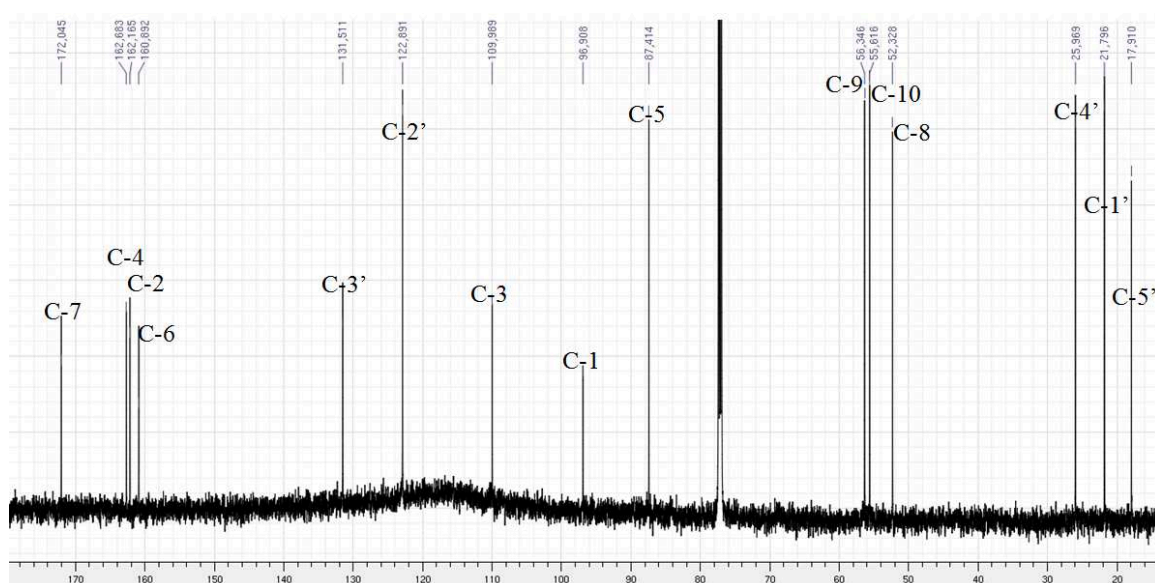
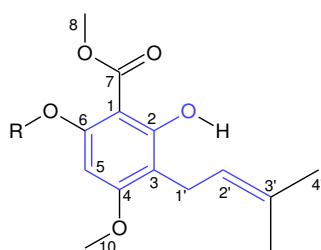


Figure 22 : Spectre RMN  $^{13}C$  du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74)

Nous avons choisi de comparer les valeurs des déplacements chimiques  $^{13}C$  et  $^1H$  du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (74) avec ceux trouvés dans la littérature pour le 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (73) car ces molécules ont des structures très proches mais se différencient seulement par la présence d'une fonction méthoxy. Cette comparaison vient appuyer notre élucidation structurale car les seules différences notables entre les molécules (73) et (74) sont : la présence d'un groupement méthoxy porté par le carbone C-9 pour la molécule (74) et son absence pour la molécule (73) ainsi que la présence caractéristique d'une liaison hydrogène formée par le phénol porté par le carbone C-2 et le carbonyle porté par le carbone C-7. Cette liaison hydrogène n'étant pas directement visible sur la structure de la molécule (73) qui possède des fonctions alcools en  $\alpha$  et  $\beta$  du carbone C-1 (Tableau 5).



2-Hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (**74**) : R=C<sup>9</sup>H<sub>3</sub>

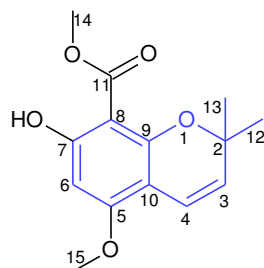
2,6-Dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (**73**) : R=H

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, CDCl <sub>3</sub> )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, CDCl <sub>3</sub> )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	96,9 (C)	94,1		
2	162,2 (C)	159,1		
3	110,0 (C)	109,4		
4	162,7 (C)	164,6		
5	87,4 (CH)	92,0	5,98 (1H, s)	6,06 (1H, s)
6	160,9 (C)	161,3		
7	172,0 (C)	170,3		
8	52,3 (CH <sub>3</sub> )	52,6	3,89 (3H, s)	4,03 (3H, s)
9	56,3 (CH <sub>3</sub> )		3,84 (3H, s)	
10	55,6 (CH <sub>3</sub> )	55,9	3,85 (3H, s)	3,83 (3H, s)
1'	21,8 (CH <sub>2</sub> )	21,9	3,27 (2H, d, J = 7 Hz)	3,25 (2H, d, J = 6,9 Hz)
2'	122,9 (CH)	123,2	5,17 (1H, t, J = 7 Hz)	5,16 (1H, t, J = 6,9 Hz)
3'	131,5 (C)	131,4		
4'	26,0 (CH <sub>3</sub> )	26,0	1,65 (3H, s)	1,67 (3H, s)
5'	17,9 (CH <sub>3</sub> )	18,0	1,75 (3H, s)	1,76 (3H, s)
<b>C<sup>2</sup>-OH</b>			11,93 (1H, s)	

**Tableau 5 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (**74**) et comparaison avec les données de la littérature du 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butènyle)-benzoate de méthyle (**73**)**

### 3.1.2.2.4 Composé 3 : 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (72)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 6, la parfaite concordance de ces données [35] nous permet de conclure que le composé 3 est identifié au 8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (72)



8-Hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (72)

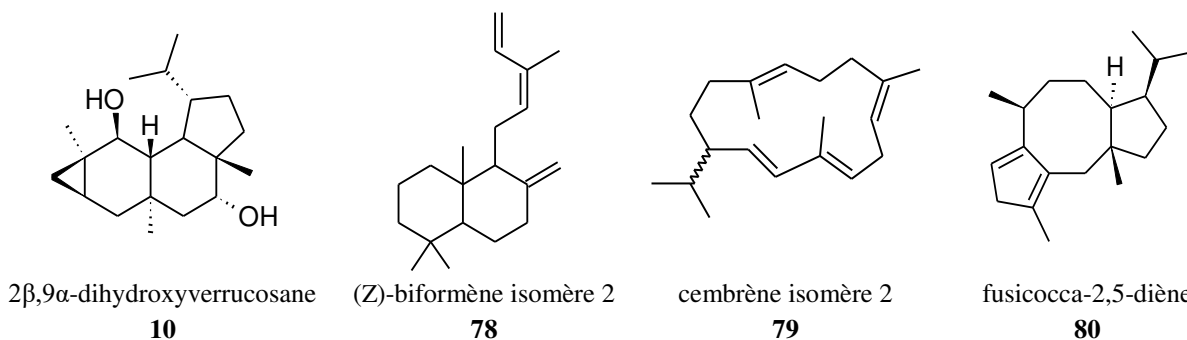
# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	O			
2	77,2 (C)	76,8		
3	125,4 (CH)	125,2	5,41 (1H, d, J = 9,8 Hz)	5,39 (1H, d, J = 9,8 Hz)
4	116,6 (CH)	116,4	6,52 (1H, d, J = 9,8 Hz)	6,46 (1H, d, J = 9,8 Hz)
5	160,3 (C)	160,1		
6	92,2 (CH)	92,0	6,03 (1H, s)	6,00 (1H, s)
7	164,8 (C)	164,6		
8	97,0 (C)	96,9		
9	155,8 (C)	155,6		
10	103,9 (C)	103,7		
11	171,8 (C)	171,6		
12/13	27,7 (2* $\text{CH}_3$ )	27,6	1,41 (2*3H, s)	1,36 (2*3H, s)
14	52,1 ( $\text{CH}_3$ )	51,8	3,88 (3H, s)	3,84 (3H, s)
15	55,8 ( $\text{CH}_3$ )	55,6	3,80 (3H, s)	3,76 (3H, s)
$\text{C}^7\text{-OH}$			11,86 (1H, s)	11,82 (1H, s)

**Tableau 6 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyl (72)**

### 3.1.2.3 *Plagiochila tesmanii* Sande Lac.

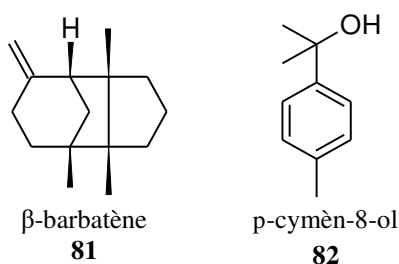
Les composés volatils de cette espèce (échantillon MET091) sont majoritairement des composés diterpéniques avec 57,4% de diterpénoïdes identifiés et 19,5% non identifiés. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 7.

Les diterpénoïdes identifiés sont le **2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -dihydroxyverrucosane (10)** (24%), le **(Z)-biformène isomère 2 (139)** (17,4%), le **cembrène isomère 2 (79)** (13,3%) et le fusicocca-2,5-diène (**80**) (2,7%).



Plusieurs diterpénoïdes de cette plante ont des potentialités thérapeutiques. Le 2 $\beta$ ,9 $\alpha$ -dihydroxyverrucosane est le composé majoritaire de l'écorce de *Picea abies*, qui possède des propriétés antifongiques contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Penicillium funicosum* (CIM= 0,20-0,35 mg/ml) [65]. Le cembrène A possède des propriétés anti-inflammatoires [66], ainsi que des potentialités antipaludiques car cette molécule est active contre *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub> = 2,78  $\mu$ g/ml) [67].

Mise à part les diterpénoïdes, une faible partie du contenu volatil de cette espèce a pu être identifiée. On a détecté : deux sesquiterpénoïdes (l'aromadendran-12-ol (**64**) (4,7%) et le  $\beta$ -barbatène (**81**) (1,3%)), un composé monoterpénique (le p-cymèn-8-ol (**82**) (2,8%)) et le 4,8-diméthyl-1,2,3,4,6,7,8,8 $\alpha$ -octalin (**55**) (4,6%).



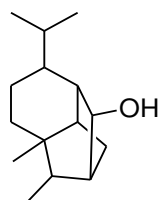
La diversité en composés diterpéniques et leurs pourcentages relatifs indexent cette espèce dans le chimiotype diterpène du genre *Plagiochila* (chimiotype V).

### 3.1.2.4 *Plagiochilion theriotanus* (Steph.) Inoue

L'échantillon étudié (MET050) possède un sesquiterpénoïde dioxygéné inconnu (M=234, 135, 185 (65)) comme composé majoritaire avec un pourcentage relatif de **71,6%**. Parmi toutes les fonctionnalisations possibles des sesquiterpénoïdes dioxygénés, ce composé pourrait être une lactone sesquiterpénique du fait qu'il existe un chimiotype lactone sesquiterpénique (chimiotype XI) pour le genre *Plagiochila*. Les molécules détectées et identifiées de cette espèce sont détaillées dans le Tableau 7.

Le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**74**) (4,2%) a été aussi détecté dans cette espèce. Nous avons détecté trois sesquiterpénoïdes : deux isomères du gymnomitr-8(12)-ène-9-one (**47**) et (**48**) (2,3% et 0,7%) ainsi que le copabornéol (**83**) (1,5%).

Le (Z)-biformène isomère 2 (**139**) (17,3%) est le seul diterpène observé.



copabornéol

**83**

Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	P.b		P.te	P.th	C.c	
			MET093	MET088	MET091	MET050	MET103 MET114	MET101
β-Elémène (66)	1398,8	25,04	-	-	-	-	-	1,4
β-Cubénène (60)	1431,8	25,84	-	-	-	-	-	1,8
Longifolène (69)	1433,1	25,87	-	-	-	-	-	0,5
β-Cédrène (57)	1440,1	26,04	-	0,5	-	-	-	0,5
γ-Elémène (67)	1451,2	26,31	-	0,7	-	-	-	0,3
Aromadendrène (62)	1455	26,4	-	-	-	-	-	0,3
β-Barbatène (81)	1466,5	26,68	2,8	8,9	1,3	-	-	-
Amorpha-4,11-diène (61)	1477,3	26,94	-	0,5	-	-	-	0,5
β-Chamigrène (56)	1497,5	27,43	1,2	3,9	-	-	-	12
5-épi-Aristolochène (68)	1517,4	27,89	-	-	-	-	-	0,3
β-Himachalène (77)	1518,7	27,92	-	1,1	-	-	-	-
Cuparène (172)	1522,2	28	3,9	5,9	-	-	-	0,2
β-Bazzanène (5)	1539,6	28,4	-	-	-	-	-	0,3
Gymnotriane-4-one iso 1 (49)	1545,2	28,53	-	-	-	-	0-1,6	-
cis-Muurolo-4(15),5 diène (44)	1552,6	28,7	-	-	-	-	3,2-4,6	2,3
α-cuprenène (76)	1563,9	28,96	-	0,7	-	-	-	-
Aromadendran-12-ol (64)	1590,9	29,58	-	1,3	4,7	-	-	0,6
Spathuléol (46)	1592,6	29,62	2,5	-	-	-	1,1-4,6	-
Viridiflorol (63)	1601,8	29,83	-	-	-	-	-	0,2
7,14-Anhydro-amorpha-4,9-diène (43)	1636,2	30,59	-	-	-	-	29,2-54,8	58,8
Copabornéol (83)	1653,4	30,97	-	0,5	-	1,5	-	-
Gymnomitr-8(12)-ène-9-one iso 1 (47)	1672,4	31,39	-	-	-	2,3	1,5-3,4	-
Gymnomitriane-4-one iso 2 (50)	1678,3	31,52	-	-	-	-	-	0,2
Gymnomitr-3(15)-ène-4α-ol (59)	1697,7	31,95	-	0,4	-	-	-	0,6
Gymnomitr-3(15)-ène-4β-ol iso 1 (52)	1719,2	32,4	-	0,6	-	-	-	6,7
(E)-1,2,4,4-Tétraméthyl-3-(3-méthyl-1,3-butadiènyl)-2-Cyclohexen-1-ol (45)	1735,6	32,74	-	-	-	-	11,8-13,2	5,7
Gymnomitr-8(12)-ène-9-one iso 2 (48)	1774,5	33,55	-	-	-	0,7	-	0,1
Gymnomitr-3(15)-ène-4β-ol iso 2 (51)	1783,7	33,74	-	-	-	-	0-1	-
Isoatlantolactone (65)	1961,8	37,26	-	-	-	-	-	0,2
Total sesquiterpénoïdes identifiés			10,4	25	6	4,5	52-77,8	93,5
Total sesquiterpénoïdes non identifiés			10,4	3,8	17,2	73,4	13,6-22,8	4,4

**Tableau 7 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Plagiochilaceae (P.b : Plagiochila bicornuta, P.te : Plagiochila tesmanii, P.th : Plagiochilon theriotanus, C.c : Chiasmocaulon caledonicum)**

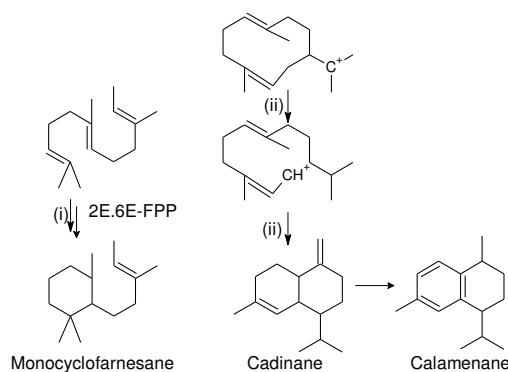
Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	<i>P.b</i>		<i>P.te</i>	<i>P.th</i>	<i>C.c</i>	
			MET093	MET088	MET091	MET050	MET103 MET114	MET101
13-Isopimaradiène ( <b>70</b> )	1969,6	37,41	1,7	1,1	-	-	-	0,2
2β,9α-Dihydroxyverrucosane ( <b>10</b> )	2292,3	43,11	-	-	24,0	-	-	-
Cembrène iso2 ( <b>79</b> )	2117,2	40,12	-	-	13,3	-	-	-
Fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> )	2022,4	38,4	-	-	2,7	-	-	-
Néophytadiène I ( <b>53</b> )	1838,5	34,85	0,2	0,3	-	-	3,7-9,3	0,4
Néophytadiène II ( <b>54</b> )	1831	34,70	-	0,7	-	-	2,2-4,4	1
( <i>Z</i> )-Biformène iso2 ( <b>139</b> )	2027,3	38,49	-	-	17,4	17,3	-	-
Total diterpénoïdes identifiés			1,9	2,1	57,4	17,3	5,9-13,7	1,6
Total diterpénoïdes non identifiés			18,3	-	19,5	-	1,5-8,3	-
4,8-Diméthyl-1,2,3,4,6,7,8,8α-octalin ( <b>55</b> )	1247,1	21,05	-	-	4,6	0,6	1,4-3	-
<i>p</i> -Ethoxybenzoate d'éthyle ( <b>71</b> )	1526,5	28,1	0,5	0,6	-	-	-	0,3
1-Acétyle-2-[2.3.4-triméthoxyphényl]éthylène ( <b>75</b> )	1904,2	36,16	1,4	-	-	-	-	-
Mélange de dérivés tocophérols	2120,1	40,17	3,7	12,0	-	-	-	-
2,6-Dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyle ( <b>73</b> )	2102,3	39,86	23,3	56,6	-	-	-	0,1
2-Hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyle ( <b>74</b> )	1994,2	37,88	4	-	-	4,2	-	-
8-Hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate de méthyle ( <b>72</b> )	1935,6	36,76	26,2	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymène-8-ol ( <b>82</b> )	1193,7	19,59	-	-	2,8	-	-	-
Total non di-, sesquiterpéniques			59,1	69,2	7,4	4,8	1,4-3	0,4

**Tableau 8 : Pourcentages relatifs des composés non sesquiterpéniques détectés dans les espèces de la famille Plagiochilaceae (*P.b* : *Plagiochila bicornuta*, *P.te* : *Plagiochila tesmanii*, *P.th* : *Plagiochilion theriotanus*, *C.c* : *Chiastocaulon caledonicum*)**

### 3.1.3 Discussion

Les deux échantillons de *Plagiochila bicornuta* sont caractérisés par des pourcentages relatifs importants en dérivés chromènes, trois de ces molécules ont été isolées et caractérisées. Deux sont communes à l'espèce *Pedinophyllum interruptum* [35], appartenant également à la famille des Plagiochilaceae et possédant aussi une composition chimique dominée par les molécules du type chromènes. Cela suggère leur appartenance à un chimiotype chromène/acide benzoïque prénylé pour les genres *Pedinophyllum* et *Plagiochila*. Par conséquent il n'est pas exclu que d'autres genres de la famille Plagiochilaceae soient affiliés à ce chimiotype. Bien que le chimiotype chromène/acide benzoïque prénylé ne soit pas répertorié pour les espèces du genre *Plagiochila*, cinq chimiotypes reconnus (chimiotype IV, VI- VIII et XII) pour le genre *Plagiochila* dépendent de la détection de différents composés aromatiques. De la même façon que deux grands groupes peuvent être reconnus selon la présence ou l'absence de sesquiterpénoïdes de type 2,3-seco-aromadendrane, la détection de composés aromatiques pourrait rendre compte d'une classification chimique au sein des espèces de la famille des Plagiochilaceae.

L'espèce *C. caledonicum* se démarque des autres Plagiochilaceae étudiées par la présence de sesquiterpénoïdes de type monocyclofarnesane, habituellement distribués dans la famille des Lejeuneaceae [31], ainsi que de sesquiterpénoïdes de type cadinane et calamène, bien que ce type de structure fait plutôt partie des chimiotypes observés pour le genre *Bazzania* [21] (Tableau 9).



Espèces	Plantes	Monocyclofarnesane	Cation (Z-E)-germacradiényl	
			Cadinane	Calamène
<i>P. bicornuta</i>	MET093	-	-	-
	MET088	-	0,5	-
<i>P. tesmanii</i>	MET091	-	-	-
<i>P. theriotanus</i>	MET050	-	-	-
<i>C. caledonicum</i>	MET103, 114	7,0-12,4	31,4-34,1	-
	MET101	5,7	61,6	1,8

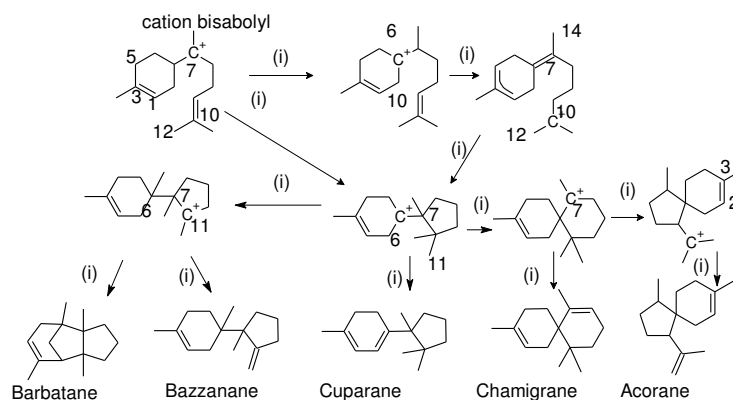
**Tableau 9 : Composition des espèces de la famille Plagiochilaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation farnesyl et (Z-E)-germacradiényl (pourcentage relatif), ((i) : [21] , (ii) : [68])**



Les trois échantillons de *Chiastocaulon caledonicum* n'ont pas été analysés ensemble à cause de variations intraspécifiques notables au point vue chimique. Cependant le 7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène (**43**) est détecté en tant que constituant très majoritaire dans les trois échantillons et pourrait être considéré comme biomarqueur de cette espèce, de même que le type amorphe pourrait alors présenter un chimiotype caractéristique pour le genre *Chiastocaulon*. C'est une donnée très importante à considérer car la présente étude est la première investigation phytochimique du genre *Chiastocaulon*.

Ce chimiotype amorphe attribué au genre *Chiastocaulon* est ainsi proposé de manière logique car les constituants majoritaires des trois échantillons sont affiliés à cette structure. Notons que ce chimiotype ne fait pas partie des chimiotypes répertoriés pour les espèces du genre *Plagiochila* (cf. 3.1.1 Caractéristiques des *Plagiochilaceae*).

Les sesquiterpénoïdes de type barbatane sont présents dans tous les échantillons, cependant le  $\beta$ -barbatène (**84**) est seulement observé pour les trois échantillons de *Plagiochila*, alors que c'est une des molécules les plus communes de ce type de composé sesquiterpénique [21]. Les types de sesquiterpénoïdes : cuparane, chamigrane et acorane (issus du cation bisaboyl) ne sont observés que chez *Plagiochila bicornuta* et *Chiastocaulon caledonicum* (MET101). Les échantillons de *Plagiochilaceae* étudiés ne contiennent pas une part importante de sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisaboyl (Tableau 10). Peut être est-ce une spécificité néo-calédonienne car les sesquiterpénoïdes de type cuparane et barbatane, font partie des chimiotypes décrits pour le genre *Plagiochila* [21].



Espèces	Plantes	Cation bisaboyl				
		Barbatane	Bazzanane	Cuparane	Chamigrane	Acorane
<i>Plagiochila bicornuta</i>	MET093	2,8	-	3,9	1,2	-
	MET088	9,9	-	6,7	3,9	0,5
<i>Plagiochila tesmanii</i>	MET091	1,3	-	-	-	-
<i>Plagiochilon theriotanus</i>	MET050	3,0	-	-	-	-
<i>Chiastocaulon caledonicum</i>	MET103, 114	2,1-3,6	-	-	-	-
	MET101	7,6	0,3	0,2	12,0	0,5

**Tableau 10 : Composition des espèces de la famille *Plagiochilaceae* en composés sesquiterpéniques affiliés au cation bisaboyl (pourcentage relatif) ((i) : [69])**

L'espèce *Plagiochila tesmanii* diffère des autres espèces de Plagiochilaceae étudiées ici car elle produit majoritairement des composés diterpéniques de type cembrane, labdane (le (Z)-biformène isomère 2 (**138**) est observé chez *Plagiochilion theriotanus* avec un fort pourcentage relatif) et verrucosane. Avec un pourcentage relatif de 76,9% de diterpénoïdes détectés *Plagiochila tesmanii* est indexée dans le chimiotype V (type diterpène).

Avec un sesquiterpénoïde non identifié ayant un pourcentage relatif de 71,6%, l'étude de la chimiotaxonomie de *Plagiochilion theriotanus* reste à déterminer, si ce sesquiterpénoïde dioxygéné indéterminé était une lactone sesquiterpénique, cette espèce pourrait être indexée dans le chimiotype XI du genre *Plagiochila*.

Nous vous présentons dans le Tableau 11 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des Plagiochilaceae.

Espèce	Code (MET)	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	%identifiés		Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires			Composés caractérisés par RMN	caractéristiques	
			S.	D.	Sesquiterpénoïdes	Diterpénoïdes	Autres			
P. bicornuta	093	Bisabolyl (7,9%, 3) (E-E) Ger. (2,5%, 1)	10,4	1,9	cuparène ( <b>212</b> ) (3,9%)			mélange de dérivés tocoférols (3,7%) Dérivés du chromène (53,5%)	Les dérivés du chromène : ( <b>72</b> ), ( <b>73</b> ) et ( <b>74</b> ) : nouvelle molécule	dérivés du chromène (répandus dans le genre Radula)
	088	Bisabolyl (21,4%, 8) (E-E) Ger. (2%, 2) (Z-E) Ger. (0,5%, 1) (Z-E) Hum. (1,1%, 1)	25	2,1	β-barbatène ( <b>81</b> ) (8,9%) cuparène ( <b>212</b> ) (5,9%)			un dérivé chromène (56,6%) mélange de dérivés tocoférols (12,0%)		
P. tesmanii	091	(E-E) Ger. (4,7%, 1) Bisabolyl (1,3%, 1)	6	57,4	aromadendran-12-ol ( <b>64</b> ) (4,7%)		2β,9α-dihydroxyverrucosane ( <b>10</b> ) (24%) cembrène iso2 ( <b>79</b> ) (13,3%) (Z)-biformène iso2 ( <b>139</b> ) (17,4%)		chimiotype V du genre Plagiochila: diterpénoïdes	
P. theriotanus	050	(Z-E) Ger. (31,4-34,1%, 2) Autre (7-12,4%, 1) Bisabolyl (4,5%, 3)	4,5	17,3	M=234, 135, 185 (65) (71,6%)	(Z)-biformène iso2 ( <b>139</b> ) (17,3%)	un dérivé chromène (4,2%)		sesquiterpénoïde dioxycénés inconnus	
C. caledonicum	103 114	Bisabolyl (2,1-3,6%, 1-3) (E-E) Ger. (0,6-4,6%, 1) (Z-E) Ger. (31,4-34,1%, 2) Autre (7-12,4%, 1)	52 à 77,8	5,9 à 13,7	7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène ( <b>43</b> ) (29,2-54,8%) (E)-1,2,4,4-tétraméthyl-3-(3-méthyl-1,3-butadiényl)-2-cyclohexen-1-ol ( <b>45</b> ) (11,8-13,2%)	néophytadiènes (5,9-13,7%)			type amorphe (non répertorié comme chimiotype pour la famille des Plagiochilaceae)	
	101	(Z-E) Ger. (63,4%, 4) Bisabolyl (20,6%, 8) Autre (5,7%, 1) (E-E) Ger. (3,3%, 7) (Z-E) Hum. (0,5%, 1)	93,5	1,6	7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène ( <b>43</b> ) (58,8%) β-chamigrène ( <b>56</b> ) (12%)					

**Tableau 11 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Plagiochilaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes)**

### 3.1.4 Conclusion

Ceci constitue le premier travail de phytochimie mené sur ces espèces de la famille des Plagiochilaceae de la Nouvelle-Calédonie. Cette étude nous a permis d'isoler et caractériser trois composés de type chromène issus de *Plagiochila bicornuta*, dont une nouvelle molécule. La caractérisation de ces composés a mis en exergue le chimiotype chromène au sein des Plagiochilaceae. Nous présentons la première étude phytochimique d'une espèce du genre *Chiastocaulon*. Il s'agit de *Chiastocaulon caledonicum*, caractérisée par un fort taux de 7,14-anhydro-amorpha-4,9-diène (**43**). L'espèce *Plagiochila tesmanii* est indexée dans le chimiotype V de par sa richesse et diversité en composés diterpéniques alors que *Plagiochilon theriotanus* contient un sesquiterpénoïde dioxycéné inconnu en tant que composant majoritaire et n'a pas pu être indexé dans un chimiotype répertorié.

Cette analyse de la composition chimique de quatre espèces de la famille Plagiochilaceae rend compte d'une importante chimiodiversité de cette famille présente en Nouvelle-Calédonie.

## 3.2 Composés volatils issus d'espèce de la famille des Lophocoleaceae

Le contenu moléculaire de trois espèces de la famille des Lophocoleaceae a été analysé par CPG-FID-MS. Nous présentons ici la première étude phytochimique de ces espèces dont deux, du genre *Chyloscyphus*, sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie.

### 3.2.1 Caractéristiques des Lophocoleaceae

La famille des Lophocoleaceae comporte 21 genres. Seuls les genres *Chiloscyphus*, *Heteroscyphus* et *Conoscyphus* ont été inventoriés en Nouvelle-Calédonie. L'étude chimiotaxonomique des genres *Chyloscyphus* et *Heteroscyphus* pourrait avoir un impact sur leur taxonomie botanique car peu d'espèces issues de ces deux genres ont fait l'objet d'étude taxonomiques récentes [60].

L'étude phytochimique d'espèces de Lophocoleaceae de Nouvelle-Calédonie est très intéressante car, dans la littérature, peu d'échantillons ont été étudiés et il existe un taux d'endémicité de 70% pour cette famille en Nouvelle-Calédonie [60]. De plus, les espèces de cette famille produisent des composés rares tels que les sesquiterpénoïdes de type oppositane et chyloscéphane [21].

Trois espèces ont été étudiées dont deux endémiques : *Chiloscyphus latistipus* (échantillons : MET058 et MET029) et *Chiloscyphus confertus* (MET122), ainsi qu'une espèce indigène *Heteroscyphus argutus* (MET061) qui est distribuée en Asie, dans le Pacifique et au Brésil. La classification taxonomique de ces espèces est décrite dans le Tableau 12 et les données relatives aux collectes dans le Tableau 68 (partie II.2.2). Les composés détectés non identifiés sont présentés dans le Tableau 71 en Annexe 3.

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniiidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Jungermanniales H.Klinggr</u>
Sous-ordre	Lophocoleineae Schljakov
<b>Famille</b>	<b>Lophocoleaceae Vanden Berghen</b>
Genre	<i>Chyloscyphus</i> <b>Corda</b> C. confertus* Steph. C. latistipus* Steph.
Genre	<i>Heteroscyphus</i> <b>Schiffn.</b> H. argutus (Reinw., Blume et Nees) Schiffn.

**Tableau 12 : Classification taxonomique des espèces de la famille Lophocoleaceae**

## 3.2.2 Résultats

### 3.2.2.1 *Chiloscyphus latistipus* Steph. (endémique)

Deux échantillons (MET029 et MET058) ont été étudiés, leurs contenus en composés volatils sont quasiment identiques. On observe 57,9 à 72,2% de sesquiterpénoïdes identifiés et 5,7 à 6% de sesquiterpénoïdes non identifiés. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 13.

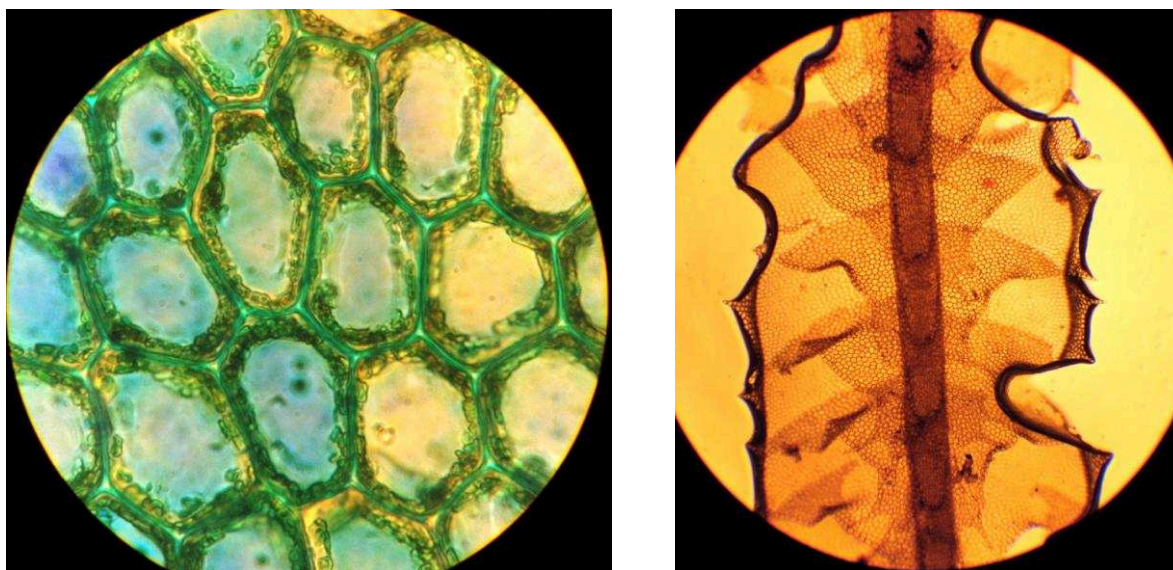


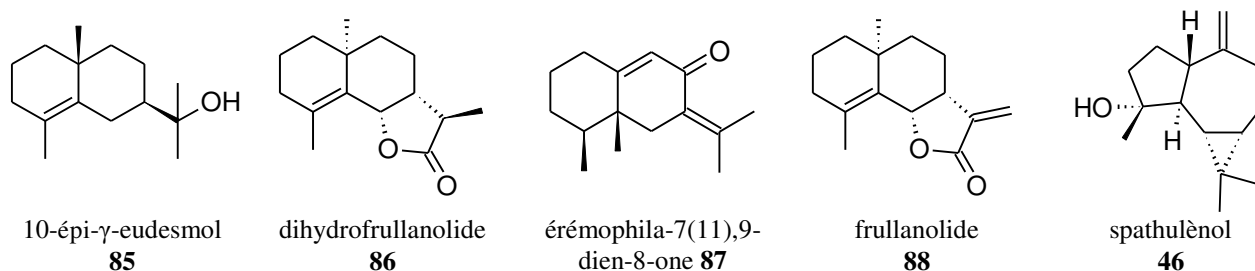
Figure 23 : Détails de *Chiloscyphus latistipus*, à gauche cellules \*1000, à droite : face ventrale \*40

Les composés sesquiterpéniques issus du cation (E-E)-germacradiényl sont très majoritaires car on a détecté le **10-épi- $\gamma$ -eudesmol (85)** en tant que constituant majoritaire (**34,1-46,3%**). Le  $\gamma$ -eudesmol a été trouvé dans l'espèce *Trichocolea pluma* originaire de Tahiti [21], cette espèce faisant aussi partie du sous-ordre Lophocoleineae.

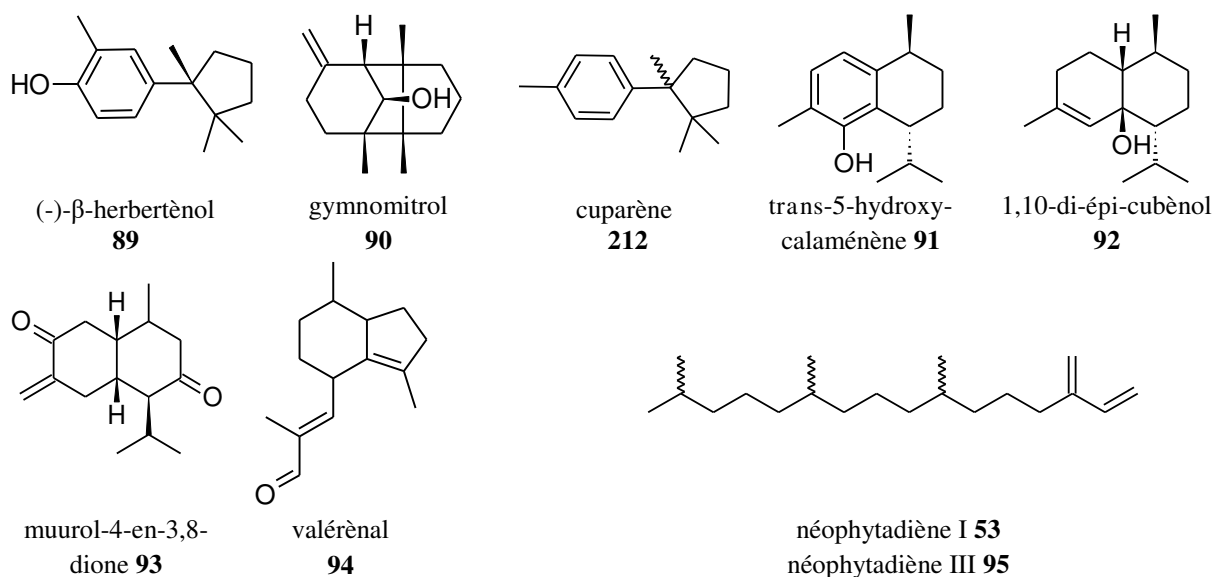
Le 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) a été décrit comme répulsif antitique (*Amblyomma americanum*) avec un fort potentiel économique [70]. Ce point est très intéressant pour la Nouvelle-Calédonie où les troupeaux bovins sont sujets à ce type de parasite, il serait intéressant de tester l'activité de ce composé contre les espèces de tiques néo-calédoniennes.

Quatre autres composés dérivés du cation (E-E)-germacradiényl ont été détectés, avec : le **spathuléol (46)** (**3,6-10,5%**), le dihydrofrullanolide (**86**) (1,4-5,9%), l'érémophila-7(11),9-dien-8-one (**87**) (1,4-2%) et le frullanolide (**88**) (0-2%). La présence de lactones sesquiterpéniques de type eudesmane a déjà été reportée dans les études antérieures portant sur la famille des Lophocoleaceae dans les espèces *Lophocolea heterophylla* et *Chiloscyphus polyanthos* [21], ce qui conforte nos résultats. Bien que le dihydrofrullanolide (**86**) et le frullanolide (**88**) soient plutôt distribués dans le genre *Frullania*, ces composés ont été détectés dans *Lepicolea pruinosa* (Lophocoleineae) [21].

Le 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) est considéré comme le biomarqueur de cette espèce étant donné que des eudesmanolides ont été détectés dans plusieurs espèces de Lophocoleaceae, un chimiotype eudesmane pourrait être caractérisé au sein de la famille des Lophocoleaceae.



Un faible pourcentage relatif de sesquiterpénoïdes ayant pour précurseur le cation bisabolyll (tous étant plus précisément affiliés au cation cuparényl) a été détecté. Ces composés sesquiterpéniques sont : le (-)- $\beta$ -herberténol (**89**) (1,1-6,4%), le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (0-2,7%), le gymnomitrol (**90**) (0,8-1,7%), le cuparène (**212**) (0-1,1%) et le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (0-0,3%). D'autres composés sesquiterpéniques minoritaires ont été détectés : le trans-5-hydroxycalaménène (**91**) (1,3-1,6%), le 1,10-di-épi-cubénol (**92**) (0,3-0,4%) et le muurol-4-en-3,8-dione (**93**) (0-0,5%). Ces trois derniers sont affiliés à la voie biosynthétique du cation (Z-E)-germacradiényl.



Le valérénal (**94**) (1,1-3,6%), possédant des propriétés antispasmodiques et actif contre la dépression du système nerveux central [71] a été détecté. C'est un composé assez rare chez les hépatiques [21].

Les seuls diterpénoïdes observés sont le néophytadiène I (**53**) (2,9-5,9%) et III (**95**) (1,1-2,5%). Plusieurs composés non terpéniques ont été détectés tels que le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,5-0,8%) ainsi que deux alcanes à 30 carbones mais avec des ramifications différentes (17,2-27,2%).



### 3.2.2.2 *Chiloscyphus confertus* Steph. (endémique)

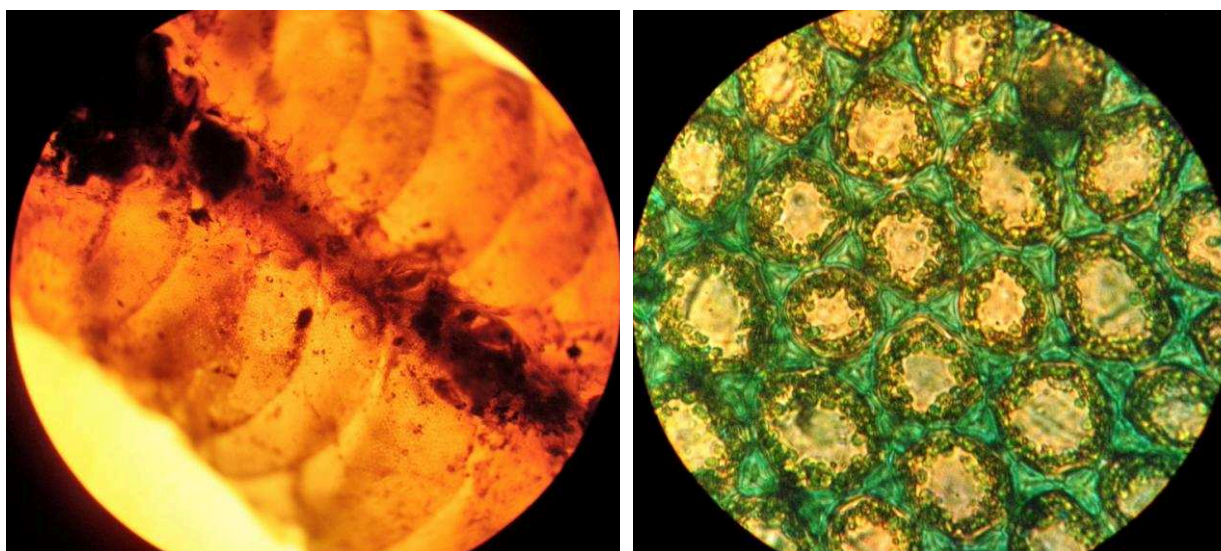


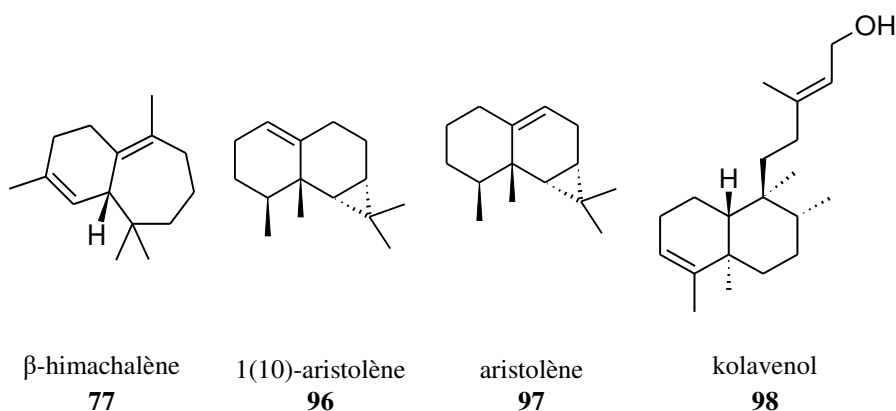
Figure 24 : Détails de *Chiloscyphus confertus*, à gauche : face ventrale \*40, à droite cellules \*1000

Les composés volatils détectés dans cet échantillon (MET122) sont tous des terpénoïdes connus. Les sesquiterpénoïdes sont les plus importants avec un pourcentage relatif de 92,2%.

Le 1(10)-aristolène (**96**) est détecté en tant que constituant majoritaire (66,4%) ce qui le suppose de facto comme étant un biomarqueur de cette espèce et appartenant ainsi à un nouveau chimiotype aristolane. Cette structure sesquiterpénique est peu répandue dans la famille des Lophocoleaceae [39] et les sesquiterpénoïdes de type aristolane ne semblent pas être spécifiques à un clade particulier [21].

Le 1(10)-aristolène (**96**) possède une activité larvicide contre les moustiques *Anopheles stephensi* (vecteur du paludisme), *Aedes aegypti* (vecteur de la dengue, du virus zika et du chikungunya) et *Culex quinquefasciatus* (vecteur du virus du Nil occidental) avec des doses létales respectivement de 12,34 , 13,33 et 14,49  $\mu\text{g/ml}$  [72].

Les autres composés majeurs sont aussi affiliés au cation (E-E)-germacradiényl, ce sont : le 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) (8,9%), l'aristolène (**97**) (4,9%) et le spathuléol (**46**) (2,2%).





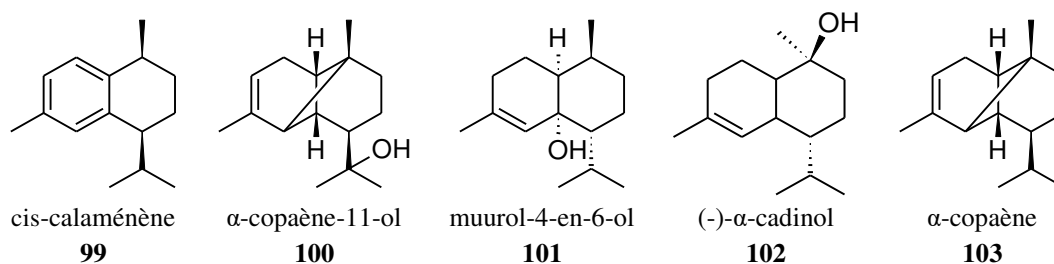
Le  $\beta$ -himachalène (**77**) (5,8%) est le seul sesquiterpénoïde affilié au cation (Z-E)-humulyl détecté dans cette plante, ce composé possède des propriétés insecticides (tests sur des mouches : *Musca domestica*) [73].

Deux sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyl ont été détectés avec des pourcentages modestes : le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (2,3%) et le cuparène (**212**) (1,8%).

Les composés diterpéniques détectés sont le néophytadiène I (**53**) (2,6%) et le kolavenol (**98**) (5,2%). Le kolavenol (**98**) possède une activité antiproliférative modérée sur les cellules cancéreuses ovariennes ( $CI_{50} = 17,9 \pm 3 \mu\text{M}$  contre la lignée cancéreuse A2780) [74]. Il a aussi été montré qu'un isomère du kolavenol possède une activité contre *Trypanosoma brucei* et *T. rhodesiense* ( $CI_{50} = 2,5 \mu\text{g/ml}$ ), parasites connus pour être responsables de la maladie du sommeil [75].

### 3.2.2.3 *Heteroscyphus argutus* (Reinw., Blume et Nees) Schiffn.

Un seul échantillon (MET061) a été étudié. Les composés sesquiterpéniques identifiés et non identifiés représentent respectivement 52,5% et 23,1% du contenu volatil. Les constituants de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 13.



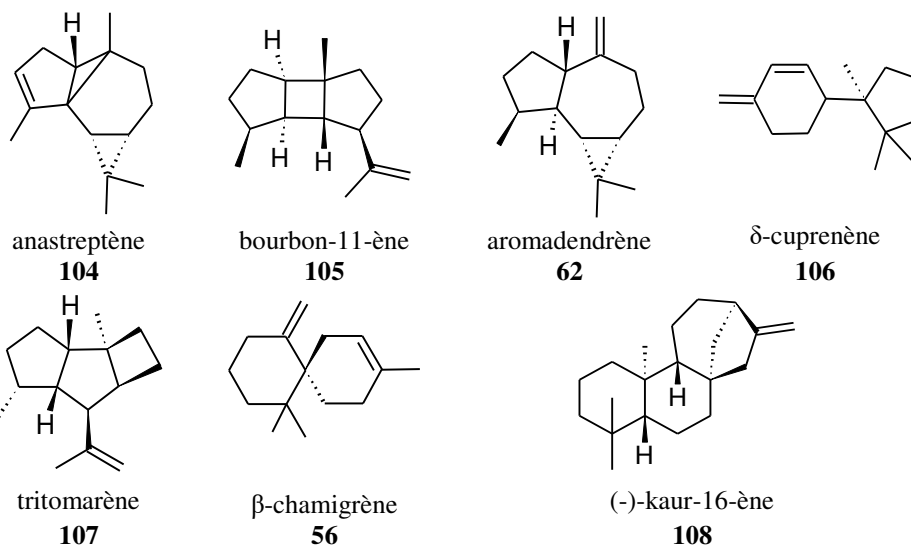
La composition sesquiterpénique de cette espèce est très intéressante car on a décelé sept sesquiterpénoïdes issus du cation (Z-E)-germacradiényl y compris la molécule majoritaire : le trans-5-hydroxycalaménène (**91**) (23,7%), actif contre le champignon pathogène des cultures *Pyricularia oryzae* ( $CI_{50}=1,7 \mu\text{g/ml}$ ) [76].

Le biomarqueur d'*Heteroscyphus argutus* pourrait être le trans-5-hydroxycalaménène (**91**) qui a également été détecté dans les genres *Bazzania*, *Kurzia*, *Calypogeia* et *Frullania* [21]. La présence de ce biomarqueur est cohérente avec la littérature qui répertorie des espèces du genre *Heteroscyphus* riches en sesquiterpénoïde de type calaménane tels qu'*H. coalitus* [21] et *H. planus* [77]. Il existe d'ailleurs un chimiotype calaménane pour le genre *Bazzania* tel que *B. trilobata*, *B. tricrenata* et *B. nitida* (Lepidoziaceae), ce genre est assez proche du genre *Heteroscyphus* au niveau taxonomique, tous deux appartenant au sous-ordre Lophocoleineae [78].

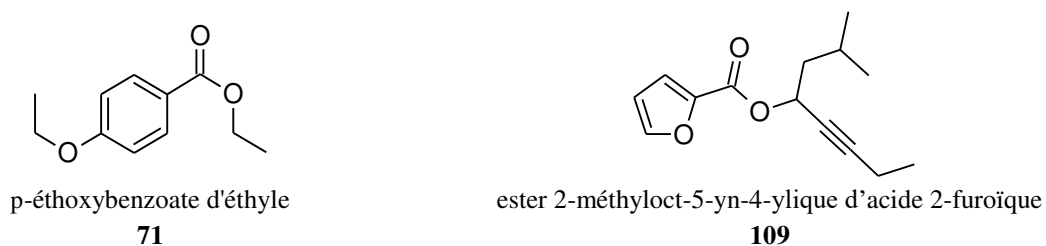
Les autres sesquiterpénoïdes détectés issus de cette voie de biosynthèse sont : le 1,10-di-épicubénol (**92**) (8,4%), le cis-calamenène (**99**) (3,4%), l' $\alpha$ -copaène-11-ol (**100**) (0,9%), le muurol-4-en-6-ol (**101**) (0,4%), le (-)- $\alpha$ -cadinol (**102**) (0,4%) et l' $\alpha$ -copaène (**103**) (0,3%).

Les composés sesquiterpéniques affiliés au précurseur cationique (E-E)-germacradiényl sont le spathuléol (**46**) (6,5%), l'anastreptène (**104**) (1,8%), le bourbon-11-ène (**105**) (0,8%), le 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) (0,5%) et l'aromadendrène (**62**) (0,3%).

Les autres composés minoritaires détectés sont : le cuparène (**212**) (0,6%), le  $\delta$ -cuprenène (**106**) (2,2%), le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (1,9%) (ces trois composés sont affiliés au cation bisaboly) ainsi que le tritomarène (**107**) (0,3%). La part des composés diterpéniques est de 19,6% avec 3,6% de diterpènes identifiés incluant le néophytadiène I (**53**) (0,8%) et III (**95**) (0,3%) et le (-)-kaur-16-ène (**108**) (2,4%).



Le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,6%) et l'ester 2-méthyl-oct-5-yn-4-yle d'acide 2-furoïque (**109**) (3%) sont les composés aromatiques détectés dans cet extrait. Nous avons décelé un alcane à 30 carbones (1,4%) que nous n'avons pas pu identifier.



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	<i>C. latistipus</i>	<i>C. confertus</i>	<i>H. argutus</i>
			MET029,058	MET122	MET061
Anastreptène (104)	1376,7	24,47	-	-	1,8
α-Copaène (103)	1388,4	24,77	-	-	0,3
Tritomarène (107)	1428,1	25,75	-	-	0,3
Aristolène (97)	1432,2	25,85	-	4,9	-
Bourbon-11-ène (105)	1438,8	26,01	-	-	0,8
1(10)-Aristolène (96)	1445,5	26,17	-	<b>66,4</b>	-
Aromadendrène (62)	1455	26,4	-	-	0,3
β-Chamigrène (56)	1497,5	27,43	0-0,3	2,3	1,9
β-Himachalène (77)	1518,7	27,92	-	5,8	-
Cuparène (212)	1522,2	28	0-1,1	1,8	0,6
cis-Calaménène (99)	1532,6	28,24	-	-	3,4
β-Bazzanène (5)	1539,6	28,4	0-2,7	-	-
α-Copaène-11-ol (100)	1555,7	28,77	-	-	0,9
δ-Cuprénène (106)	1564,8	28,98	-	-	2,2
10-épi-γ-Eudesmol (85)	1587,8	29,51	<b>34,1-46,3</b>	8,9	0,5
Spathuléol (46)	1592,6	29,62	3,6-10,5	2,2	6,5
Muurool-4-en-6-ol (101)	1633,5	30,53	-	-	0,4
1,10-di-épi-Cubèol (92)	1642,5	30,73	0,3-0,4	-	8,4
Muurool-4-en-3,8-dione (93)	1646,6	30,82	0.0-0,5	-	-
(-)-α-Cadinol (102)	1657,9	31,07	-	-	0,4
Gymnomitrol (90)	1691	31,8	0,8-1,7	-	-
Valérènal (94)	1750,5	33,05	1,1-3,6	-	-
(-)-β-Herbertèol (89)	1783,7	33,74	1,1-6,4	-	-
Erémophila-7(11),9-dien-8-one (87)	1793,8	33,95	1,4-2	-	-
Dihydrofrullanolide (86)	1807	34,22	1,4-5,9	-	-
trans-5-Hydroxycalaménène (91)	1812	34,32	1,3-1,6	-	<b>23,7</b>
Frullanolide (88)	1938,2	36,81	0-2	-	-
Total sesquiterpénoïdes identifiés			57,8-92,3	72,3	52,4
Total sesquiterpénoïdes non identifiés			0-.05,7	6	23,1
Néophytadiène I (53)	1831	34,7	2,9-5,9	2,6	0,8
Néophytadiène II (54)	1863,5	35,35	1,1-2,5	-	0,3
(-)-Kaur-16-ène (108)	2073,2	39,33	-	-	2,4
Kolavenol (98)	2363,9	44,41	-	5,2	-
Total diterpénoïdes identifiés			7,8-8,4	4	3,5
Total diterpénoïdes non identifiés			-	-	16
Alcane C <sub>30</sub>	2285,7	43	0-27,2	-	1,2
Alcane C <sub>30</sub>	2365,6	44,44	0-17,2	-	-
p-Ethoxybenzoate d'éthyle (110)	1526,5	28,1	0,5-0,8	-	0,6
Ester 2-méthyl-5-yn-4-yl-ique d'acide 2-furoïque (109)	2012,6	38,22	-	-	3,0
Total non terpéniques identifiés			17,7-28	-	4,8

**Tableau 13 : Pourcentages relatifs en composés volatils détectés dans les échantillons de Lophocoleaceae**

### 3.2.3 Discussion

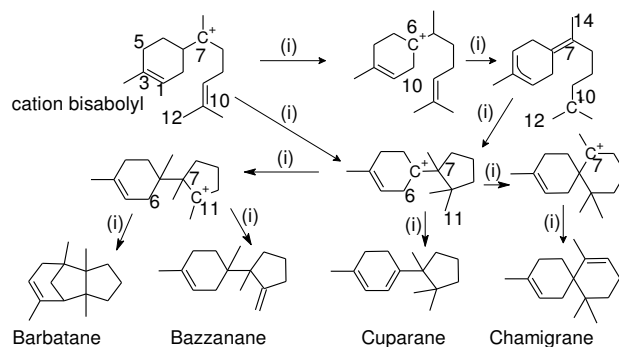
Nous avons détecté des composés aliphatiques parmi les composants principaux des deux échantillons de *Chiloscyphus latistipus*. *Chiloscyphus confertus* produit un alcane linéaire mais comme composé mineur. La littérature fait état d'une présence importante de (E)-dec-2-ène pour *Chiloscyphus pallidus* [21] mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature la présence de composés aliphatiques à longues chaînes pour les genres *Chiloscyphus* et *Hétérosyphus*, ceci pourrait constituer une particularité pour certaines espèces du genre *Chiloscyphus* de Nouvelle-Calédonie.

Les trois espèces étudiées produisent du 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) qui est détecté avec un pourcentage important sauf pour *Heteroscyphus argutus*. Ce composé paraît être un biomarqueur important pour les espèces du genre *Chiloscyphus* de Nouvelle-Calédonie. La littérature fait état de sesquiterpénoïde de type eudesmane oxygéné en tant que molécule majoritaire pour plusieurs *Lophocoleaceae* [21], permettant d'avancer l'hypothèse d'un chimiotype eudesmane au sein de cette famille. Le spathuléol (**46**), commun chez les hépatiques est un composé produit par les quatre échantillons également. Enfin du néophytadiène (isomère I (**53**) et III (**95**)) a été détecté dans tous les échantillons.

Le 1(10)-aristolène (**96**) (66,4%) est un bon biomarqueur pour *Chiloscyphus confertus*. Son importance permet alors de proposer le nouveau chimiotype aristolane au sein des *Lophocoleaceae*. Le 1(10)-aristolène (**96**) est un sesquiterpénoïde rencontré dans plusieurs familles d'hépatique mais cette molécule semble absente des *Lophocoleaceae*. L'étude d'un plus grand nombre d'espèce du genre *Chyloscyphus* de Nouvelle-Calédonie, entre autres, permettrait de vérifier l'occurrence de ce chimiotype.

Les contenus volatils des trois espèces étudiées (*Chiloscyphus latistipus*, *Chiloscyphus confertus* et *Heteroscyphus argutus*) ont beaucoup de différences de composition, ce qui se voit clairement aux niveaux des schémas biosynthétiques sesquiterpéniques.

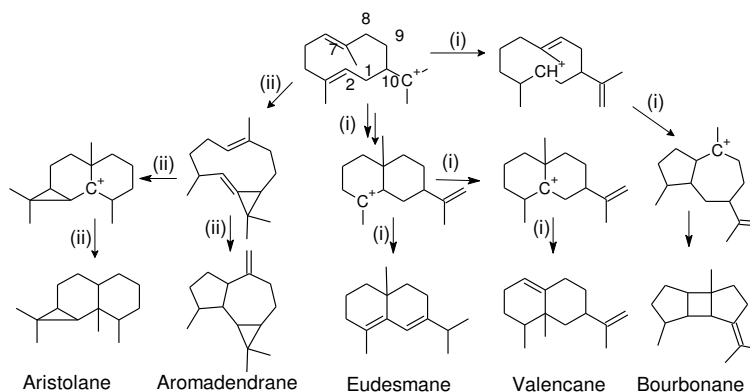
Pour les sesquiterpénoïdes ayant pour précurseurs le cation bisaboyl, de faibles pourcentages ont été détectés et le seul type de sesquiterpène de cette voie commun pour tous les échantillons est le type cuparane (Tableau 14). Les types bazzanane et barbatane, très liés dans la biosynthèse car partageant un intermédiaire commun, n'ont été détectés que pour *C. latistipus*.



Cation bisaboyl					
Espèces	Plantes	Barbatane	Bazzanane	Cuparane	Chamigrane
<i>C. confertus</i>	MET122	-	-	1,8	2,3
<i>C. latistipus</i>	MET058, 029	0,8-1,6	0-2,7	1,1-7,5	0-0,3
<i>H. argutus</i>	MET061	-	-	2,8	1,9

**Tableau 14 : Composition des espèces de la famille Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation bisaboyl (pourcentage relatif) ((i) : [69])**

Pour les sesquiterpénoïdes ayant comme précurseur le cation (E-E)-germacradiényl, les composés de structures aromadendrane et eudesmane sont produits pour tous les échantillons étudiés (Tableau 15). La structure valencane est uniquement produite par *C. latistipus* et la structure aristolane est spécifique à *C. confertus*.

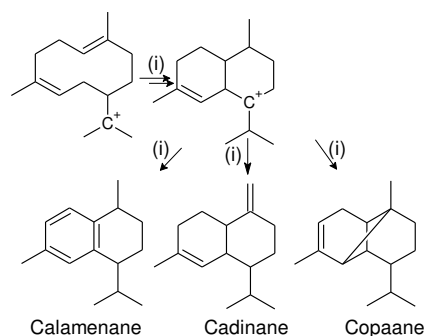


Cation (E-E)-germacradiényl						
Espèces	Plantes	Ari.	Aro.	Eudesmane	Valancane	Bourbonane
<i>C. confertus</i>	MET122	71,6	2,2	8,9	-	-
<i>C. latistipus</i>	MET058, 029	-	3,6-10,5	42,0-47,7	1,4-2,0	-
<i>C. argutus</i>	MET061	-	8,6	0,5	-	0,8

**Tableau 15 : Composition des espèces de la famille Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl (pourcentage relatif). Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane ((i) : [68], (ii) : [27])**

L'analyse de la répartition des structures ayant pour précurseurs le cation (Z-E)-germacradiényl est très intéressante car si aucun constituant produit par cette voie biosynthétique n'a été détecté de *C. confertus* (Tableau 16), sept composés sur les 15 détectés chez *H. argutus* dérivent de cette voie de biosynthèse. Ces sesquiterpénoïdes sont affiliés aux

types copaane, calaménane et cadinane, ces deux derniers étant aussi présentes chez *C. latistipus* mais à des pourcentages moindres.



Espèces	Plantes	Cation (Z-E)-germacradienyl		
		Calaménane	Cadinane	Copaane
<i>C. confertus</i>	122	-	-	-
<i>C. latistipus</i>	058; 029	1,3-1,6	0,4-0,8	-
<i>H. argutus</i>	061	27,1	9,2	1,2

**Tableau 16 : Composition des espèces de Lophocoleaceae en composés sesquiterpéniques affiliées au cation (Z-E) germacradienyl (pourcentage relatif) ((i) : [68])**

Enfin la détection de  $\beta$ -himachalène (**77**) (5,8%) chez *C. confertus* fait de cet échantillon le seul échantillon de la famille des Lophocoleaceae étudié ici, produisant un composé issu du cation (Z-E)-Humulyl.

Nous vous présentons dans le Tableau 17 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des Lophocoleaceae.

Espèces	Code (MET)	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	%identifiés		Composés identifiés notables majoritaires			Caractéristiques
			S.	D.	Sesquiterpénoïdes	Diterpénoïdes	Autres	
Chiloscyphus confertus	122	(E-E) Ger. (82,4%, 4) (Z-E) Hum. (5,8%, 1) Bisabolyl (4,1%, 2)	72,3	4	1(10)-aristolène ( <b>96</b> ) (66,4%) 10-épi- $\gamma$ -eudesmol ( <b>85</b> ) (8,9%)	kolavenol (5,2%)	( <b>98</b> )	sesquiterpénoïdes de type eudesmane et aristolane
Chiloscyphus latistipus	058	(E-E) Ger. (52,7-54,5%, 7-5) Bisabolyl (1,9-12,2%, 2-5) Autre (1,1-3,6%, 0-1) (Z-E) Ger. (2,1-2%, 2-3)	57,8-92,3	7,8-8,4	10-épi- $\gamma$ -eudesmol ( <b>85</b> ) (34,1-46,3%) spathulénoïl ( <b>46</b> ) (3,6-10,5%)		alcanes à 30 carbones (17,2-27,2%)	composés aliphatiques et sesquiterpénoïdes de type eudesmane
Heteroscyphus argutus	061	(Z-E) Ger. (37,5%, 7) (E-E) Ger. (9,9%, 5) Bisabolyl (4,7%, 3) Autre (0,3%, 1)	52,4	3,5	trans-5-hydroxycalaménène ( <b>91</b> ) (23,7%) 1,10-di-épi-cubénoïl ( <b>92</b> ) (8,4%)			sesquiterpénoïdes de type calaménane (Chimiotype II du genre <i>Bazzania</i> )

**Tableau 17 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lophocoleaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes)**

### 3.2.4 Conclusion

La présente étude constitue le premier travail de phytochimie mené sur ces trois espèces (*Chiloscyphus latistipus*, *Chiloscyphus confertus* et *Heteroscyphus argutus*). Les composants volatils majoritaires de ces espèces ont été identifiés.

Ce travail a permis d'attribuer un biomarqueur pour *H. argutus* : le trans-5-hydroxycalaménène (**91**) (23,7%) et pour les deux espèces endémiques du genre *Chiloscyphus*. Il s'agit du 1(10)-aristolène (**96**) pour *C. confertus* et du 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**) pour *C. latistipus*. Ces deux composés détectés avec de forts pourcentages sont très intéressants car ils possèdent des activités biologiques pour lutter contre les insectes.

*Heteroscyphus argutus* possède une diversité importante de structures issues du cation (Z-E)-germacradiényle qui pourrait être indexé dans un chimiotype calaménane, non répertorié pour le genre *Hétérosyphus* mais bien défini pour le genre *Bazzania*, ces deux genres faisant partie du même sous-ordre (Lophocoleineae).



### 3.3 Composés volatils issus des Bazzanioideae

Le contenu moléculaire de 10 espèces de la sous famille Bazzanioideae (Lepidoziaceae), dont cinq endémiques à la Nouvelle-Calédonie, a été analysé par CPG-FID-MS. Nous reportons ici aussi la première étude phytochimique portant sur des espèces du genre *Acromastigum*.

#### 3.3.1 Caractéristiques des Bazzanioideae

Les Bazzanioideae sont une sous famille des Lepidoziaceae comprenant trois genres : *Bazzania*, *Acromastigum* et *Mastigopelma*. Il y a environ 280 espèces d'hépatiques du genre *Bazzania* et une quarantaine d'espèces du genre *Acromastigum* au niveau mondial [78]. Le genre *Mastigopelma* n'a pas été inventorié en Nouvelle-Calédonie. 20 espèces du genre *Bazzania* dont 12 endémiques et 18 espèces du genre *Acromastigum* dont 10 endémiques ont été répertoriées en Nouvelle-Calédonie [60].

La littérature fait état de deux chimiotypes pour le genre *Bazzania* : albicanyl (drimènyl)-cafféate-cuparane (chimiotype I) et calamènane (chimiotype II).

Un total de 38 échantillons représentant 11 espèces différentes dont cinq endémiques (repérées avec un astérisque) et deux groupes d'échantillons non identifiés ont été investigués dans le cadre de cette étude. La classification taxonomique de ces espèces est décrite dans le Tableau 18.

Le genre *Bazzania* a été largement étudié en phytochimie cependant la présente étude est la première réalisée pour les espèces citées ci-dessous et la première investigation chimique menée sur le genre *Acromastigum*.

L'étude des plantes de cette sous-famille a porté sur deux espèces du genre *Acromastigum* : *A. caledonicum*\* (échantillons : MET113B, MET107 et MET109B), *A. tenax*\* (MET116)), ainsi que huit espèces du genre *Bazzania* (*B. parisii* (MET109A), *B. deplanchei*\* (MET125), *B. marginata*\* (MET048), *B. subintegra*\* (MET100), *B. vittata* (MET049 et MET060), *B. francana* (MET032, MET062, MET065 et MET106), *B. serrifolia* (MET041, MET051, MET052, MET053, MET092 et MET099) et *B. bernieri* (MET028, MET031, MET038, MET040, MET047, MET063, MET066, MET067 et MET069)).

Plusieurs échantillons non identifiés classés sous des appellations temporaires par Monsieur Louis Thouvenot : *B. sp.* (AD212) (MET064, MET068, MET072, MET110, MET102, MET117, MET118 et MET124) et *B. sp.* (AD211) (MET039) ont également été étudiés. Les données relatives à la collecte de ces plantes sont dans le Tableau 68 (partie II.2.2). Les composés détectés non identifiés sont présentés dans les Tableaux 72, 73 et 74 en Annexe 3.

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Jungermanniales H.Klinggr</u>
Sous-ordre	Lophocoleineae Schljakov
<b>Famille</b>	<b>Lepidoziaceae Limpr.</b>
Sous famille	Bazzanioideae
Genre	Acromastigum <b>A.Evans</b> A. tenax* (Steph.) Evans A. caledonicum* (Steph.) Grolle
Genre	Bazzania <b>Gray</b> B. parisii (Steph.) N.Kitag. B. deplanchei* (Gottsche) Jovet-Ast, B. marginata* (Steph.) N.Kitag. B. subintegra* (Steph.) L.Söderstr. et A.Hagborg B. vittata (Gottsche) Trevis B. francana (Steph.) N.Kitag. B. serrifolia Steph. B. bernieri (Steph.) Inoue et H.A.Mill. B. sp. (AD211) B. sp. (AD212)

**Tableau 18 : Classification taxonomique des espèces de la famille des Lepidoziaceae**

### 3.3.2 Résultats

#### 3.3.2.1 Acromastigum caledonicum(Steph.) Grolle (endémique)

Trois échantillons d'Acromastigum caledonicum ont été investigués (MET109B, 113B et 107). L'ACP (Analyse en Composantes Principales) réalisée sur leur composition en composés sesquiterpéniques (Figure 43) montre que ces trois échantillons ont un contenu quasiment identique. Entre 74,6 et 87% de sesquiterpénoïdes identifiés et entre 10,8 et 16,4% de sesquiterpénoïdes non identifiés ont été détectés. Les constituants de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 27.

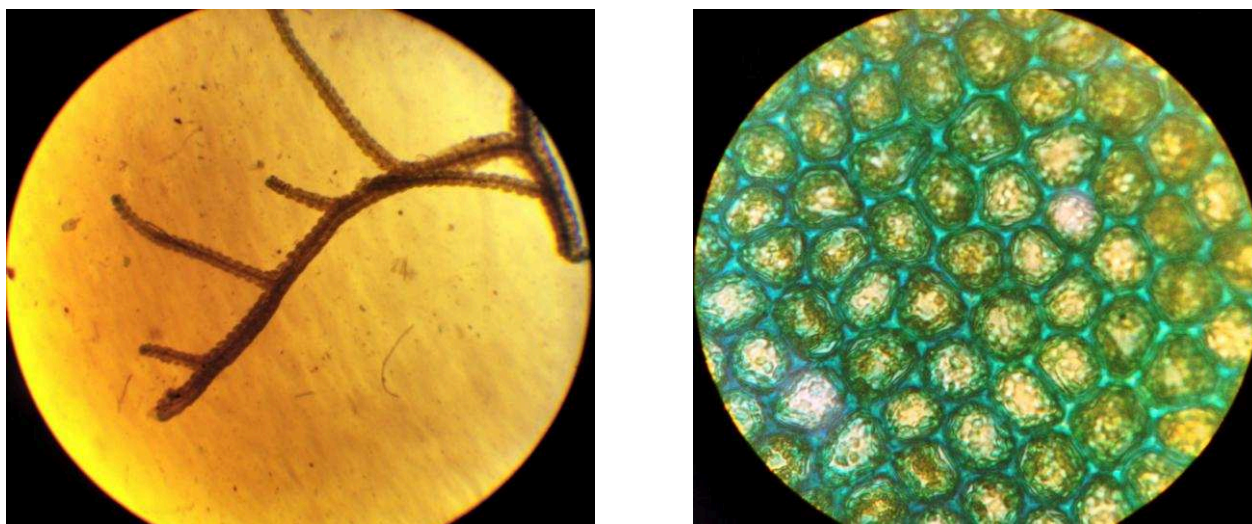
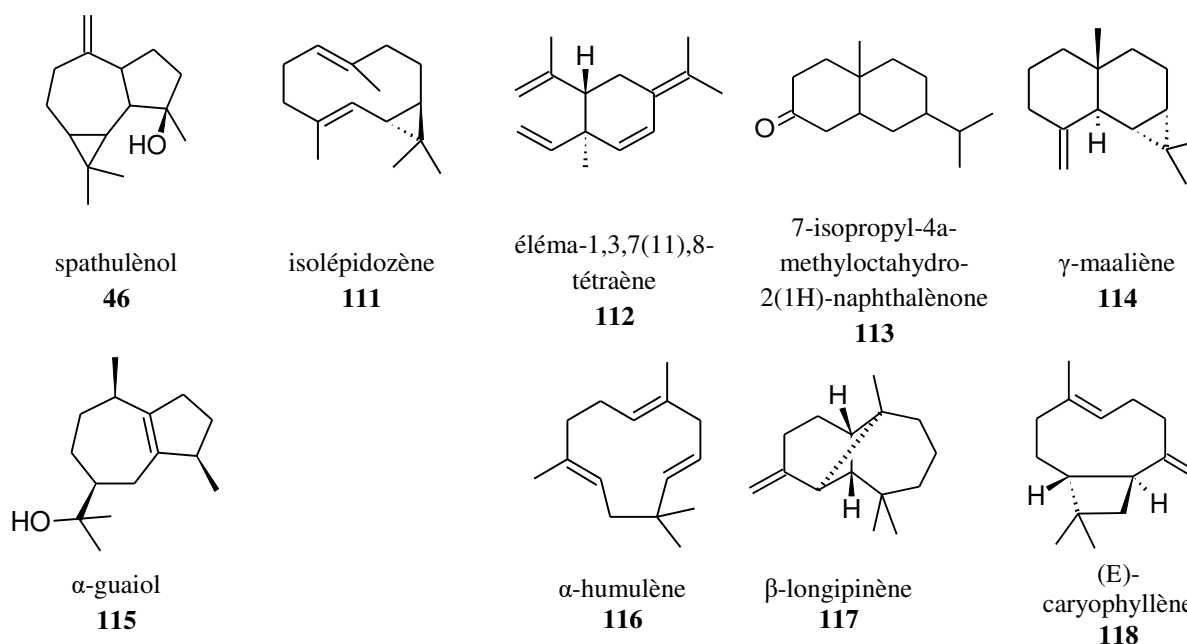


Figure 25 : Détails d'*Acromastigum caledonicum*, à gauche face ventral \*40, à droite cellules \*1000

Ces sesquiterpénoïdes sont pour la majorité affiliés au cation (E-E)-germacradiényl, avec : l'**isolépidozène (111) (41-49%)**, l'**éléma-1,3,7(11),8-tétraène (112) (1,4-5,8%)**, le **spatulénol (46) (0,8-2,3%)** et le **7-isopropyl-4a-methyloctahydro-2(1H)-naphthalène (113) (1,2-2,9%)**. Le  $\gamma$ -maaliène (**114**) (0,3%) est uniquement détecté pour MET107 alors que l' $\alpha$ -guaïol (**115**) (0,4%) est uniquement détecté pour MET109.

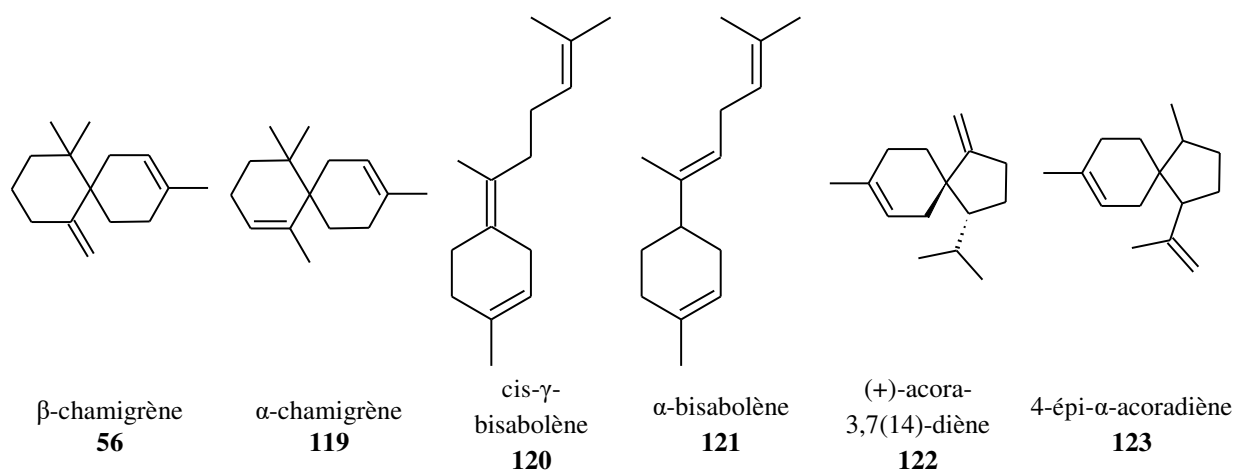


Deux sesquiterpénoïdes affiliés au cation (E-E)-humulyl ont été détectés, il s'agit de l' **$\alpha$ -humulène (116) (8,0-13,4%)** et du (E)-caryophyllène (**118**) (0,6-1,7%). L' $\alpha$ -humulène (**116**) possède des activités intéressantes contre les larves de plusieurs moustiques vecteurs de différentes maladies : *Anopheles subpictus* (vecteur de la malaria), *Aedes albopictus* (vecteur du chikungunya, de la dengue et du virus zika) et *Culex tritaeniorhynchus* (vecteur de

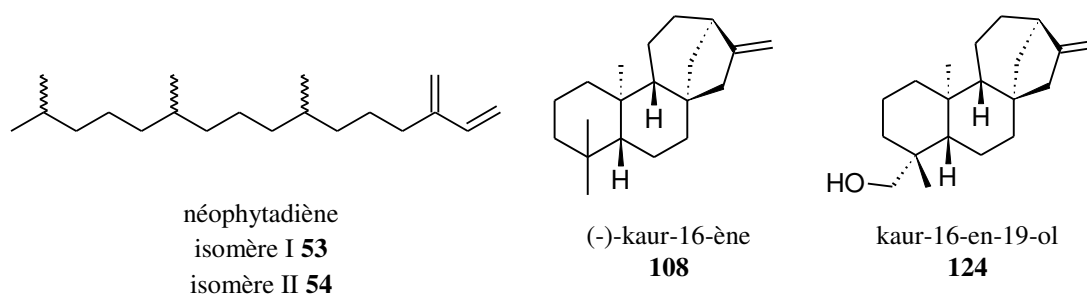
l'encéphalite japonaise) avec respectivement des  $CL_{50}$  de 6,2 ; 6,9 et 7,4  $\mu\text{g/ml}$  [79] ainsi que des activités anticancéreuses avérées envers plusieurs lignées cellulaires [80].

Un seul composé affilié au cation (Z-E)-humulyl a été aussi détecté : le  $\beta$ -longipinène (**117**) (3,4-3,8%).

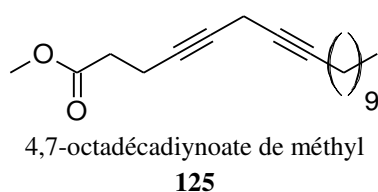
Six constituants représentant trois structures issues du cation bisabolyl communes aux trois échantillons ont été détectés : le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (5,6-7,2%), l' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (1,2-3,9%), le cis- $\gamma$ -bisabolène (**120**) (1,6-2%), l' $\alpha$ -bisabolène (**121**) (0,3-2,5%), le (+)-acora-3,7(14)-diène (**122**) (0,8-1,4%) et le 4-épi- $\alpha$ -acoradiène (**123**) (0,5-0,6%).



Pour les diterpénoïdes, le néophytadiène a été détecté dans les trois échantillons avec le néophytadiène I (**53**) (0,3-1,8%) et II (**54**) (0,9-5,3%), alors que seul MET107 contient le kaur-16-en-19-ol (**124**) (1,5%) et le (-)-kaur-16-ène (**108**) (1,2%).



Le 4,7-octadécadiynoate de méthyl (**125**) (0,7-1,5%) est détecté dans les trois échantillons.



### 3.3.2.2 *Acromastigum tenax* (Steph.) Evans (endémique)

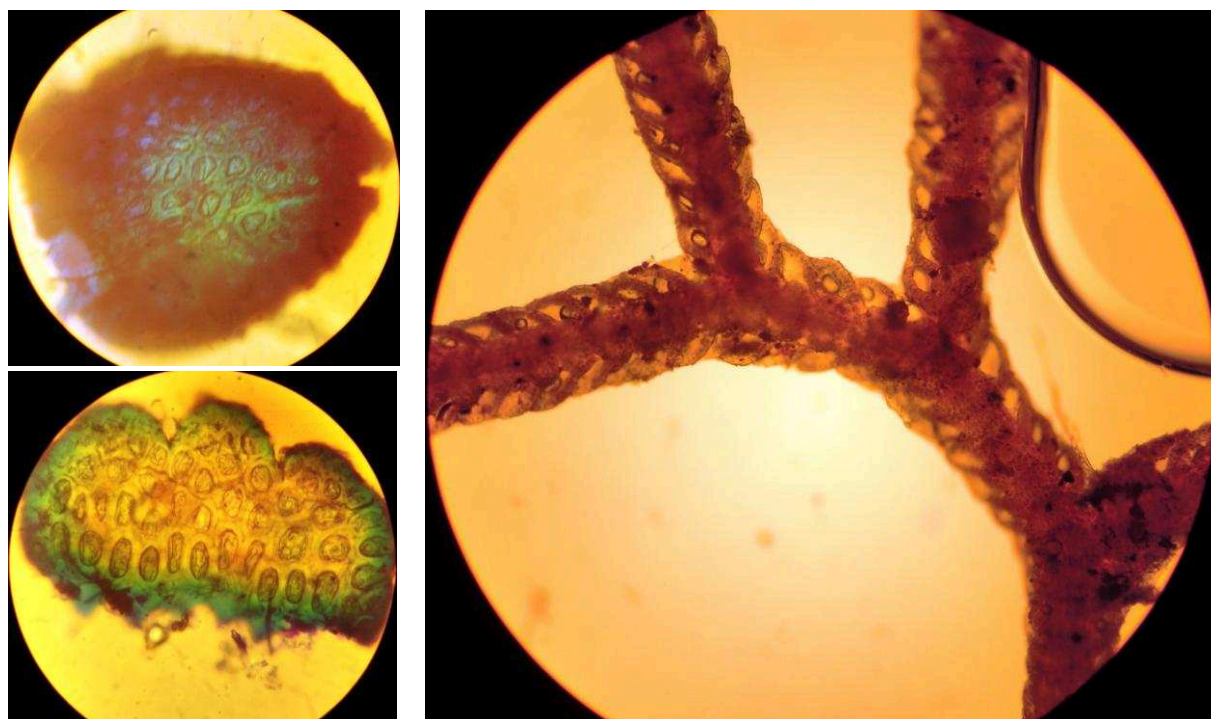


Figure 26 : Détails d'*Acromastigum tenax*, en haut à gauche : feuille \*1000, en bas à gauche amphigastre \*1000, à droite : face ventrale \*100

Les composés volatils détectés dans l'échantillon MET116 sont surtout des sesquiterpénoïdes avec 74,4% de sesquiterpénoïdes identifiés et 4,9% de sesquiterpénoïdes non identifiés (cf. Tableau 27).

Trois sesquiterpénoïdes dérivant du cation (E-E)-germacradiényl représentent plus de 70% des teneurs relatives, ce sont : l'**isolépidozène (111) (51,5%)**, l'**éléma-1,3,7(11),8-tétraène (112) (11,2%)** et le **spathuléol (46) (10,6%)**.

Le spathuléol (**46**) possède une activité contre les staphylocoques *S. Aureus* et *S. epidermidis* (CIM=1,35-1,5 mg/ml) [81] et des effets anti inflammatoires [82]. L' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (1,1%) est aussi détecté.

La part des diterpénoïdes identifiés est de 17%, dont notamment : le kaur-16-en-19-ol (**124**) (7,5%) qui possède des activités modérées (CI<sub>50</sub>= 0,69 mM) contre *Trypanosoma cruzi* (parasite vecteur de la trypanosomiase) [83], le (-)-kaur-16-ène (**108**) (6,7%) et les néophytadiènes I (**53**) (1,8%) et III (**95**) (0,7%).

### 3.3.2.3 *Bazzania bernieri* (Steph.) Inoue et H.A.Mill.

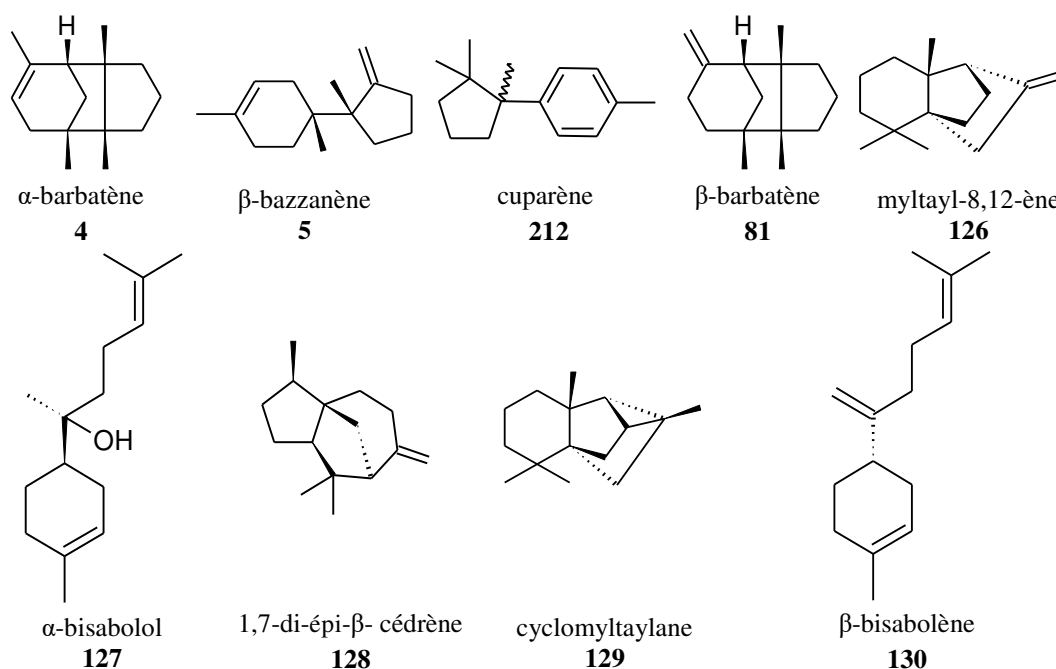
Neuf échantillons de *B. bernieri* ont été analysés, malgré un certain socle commun de sesquiterpénoïdes identifiés, beaucoup de variabilités intra spécifiques ont été observées.

L'échantillon MET038 est différent des autres échantillons de *B. bernieri*, cette différence est mise en évidence par les résultats de l'ACP (Figure 42 et 43). La majorité des constituants a

été identifiée pour cette espèce. Les composants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26. Dans ces tableaux les composés volatils détectés dans MET038 seront différenciés de ceux des autres échantillons : MET028, MET031, MET038, MET040, MET047, MET063, MET066, MET067 et MET069, ces échantillons seront regroupés sous l'appellation groupe 1 (G1).

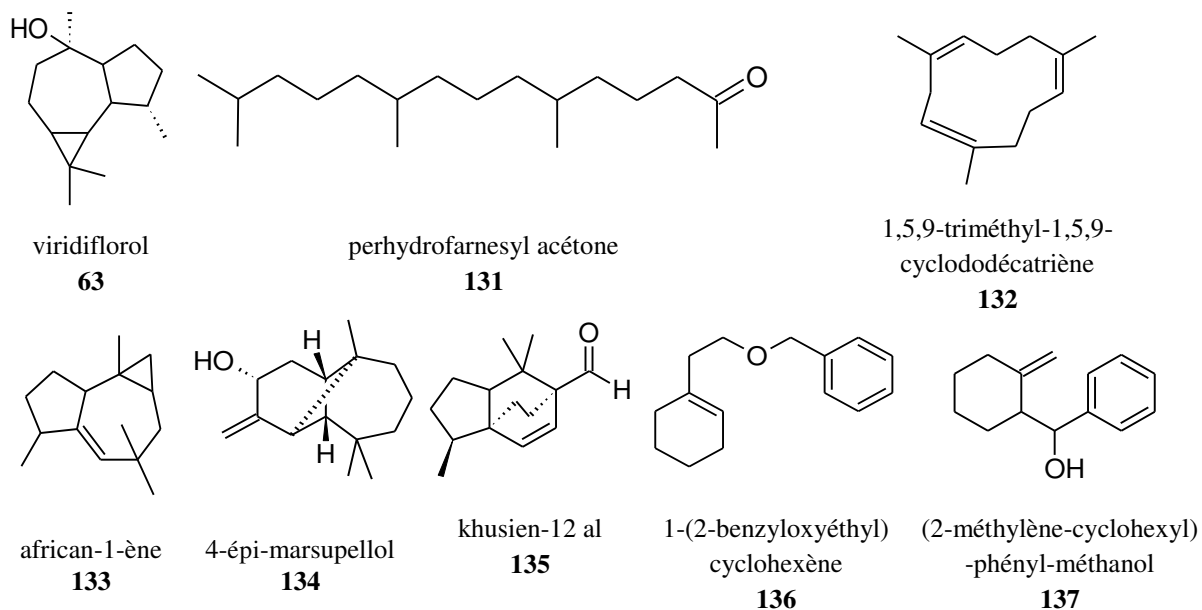
Le spathuléol (**46**) (0,4-2%) est détecté dans tous les échantillons. Les sesquiterpénoïdes communs à tous les échantillons de *B. bernieri* sont pour la majorité affiliés au cation bisabolyl avec la détection dans tous les échantillons des composés suivants : **le  $\delta$ -cuprenène (106) (1,7-26,2%)**, le cuparène (**212**) (1,5-3,3%), le myltayl-8,12-ène (**126**) (0,9-3,5%) et le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (5,6-14,9%).

Trois composés affiliés à cette même voie de biosynthèse (le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (0,9-3,4%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (1,1-4,2%) et l' $\alpha$ -bisabolol (**127**) (0,4-1,1%)) sont présents dans tous les échantillons de *B. bernieri* sauf dans MET038. D'autres constituants sont répartis plus inégalement : c'est le cas du 1,7-di-épi- $\beta$ -cédrène (**128**) (0-1,5%), du 4-épi- $\alpha$ -acoradiène (**123**) (0-0,6%), de l' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (0-1,8%), du cyclomyltaylane (**129**) (0-2,9%), de l' $\alpha$ -bisabolène (**121**) (0-0,7%) et du  $\beta$ -bisabolène (**130**) (0-0,6%).



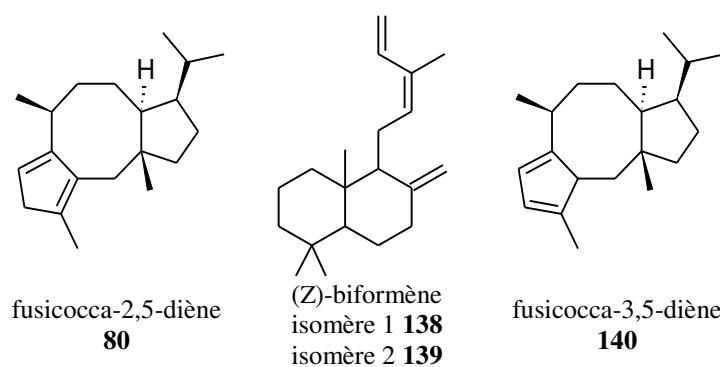
Des sesquiterpénoïdes non affiliés au cation bisabolyl ont été détectés en tant que composés minoritaires et ne sont pas communs à tous les échantillons de *B. bernieri* étudiés, il s'agit du perhydrofarnesyl acétone (**131**) (0-1%), du 1,5,9-triméthyl-1,5,9-cyclododécatriène (**132**) (0-0,4%), de l'éléma-1,3,7(11),8-tétraène (**112**) (0-1%) et du viridiflorol (**63**) (0-0,8%).

Deux sesquiterpénoïdes affiliés au cation (Z-E)-germacradiényl **le (E)-caryophyllène (118) (0-23,8%)** et l'african-1-ène (**133**) (0-1,5%) ont été détectés. Cependant le 4-épi-marsupellol (**134**) (2,8%) et le khusien-12-al (**135**) (1%) ne sont détectés que chez MET038.



Deux diterpénoïdes ont été trouvés communs aux neuf échantillons, ce sont le **fusicocca-2,5-diène (80)** (29,3-62,6%) et le (Z)-biformène isomère 1 (**138**) (0,7-8,6%). D'autres diterpénoïdes ont été détectés avec de faibles pourcentages relatifs : ce sont les néophytadiènes I (**53**) (0-0,9%) et II (**54**) (0-1,1%) et le fusicocca-3,5-diène (**140**) (0-0,7%).

Deux molécules aromatiques, le (2-méthylène-cyclohexyl)-phényl-méthanol (**137**) (0-3,1%) et le 1-(2-benzyloxyéthyl)-cyclohexène (**136**) (0-2,9%) ont été détectées.





### 3.3.2.4 *Bazzania deplanchei* (Gottsche ex Stephani) Jovet-Ast (endémique)

Les composants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

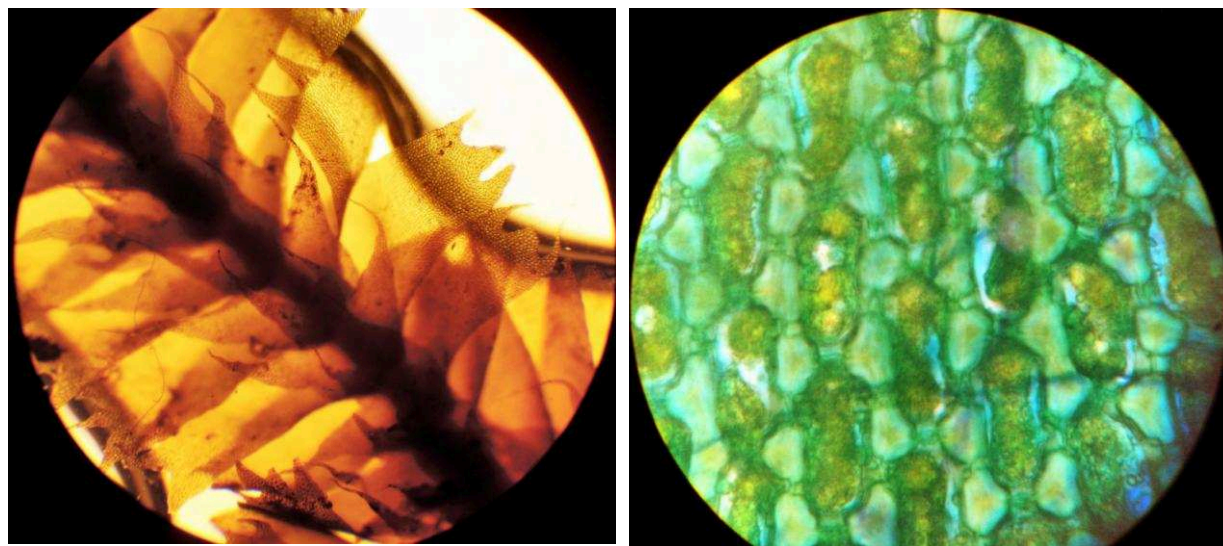
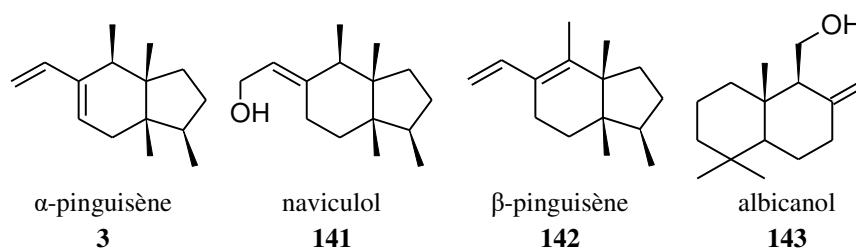


Figure 27 : Détails de *B. Deplanchei* : à gauche face ventrale \*40 et cellules \*1000

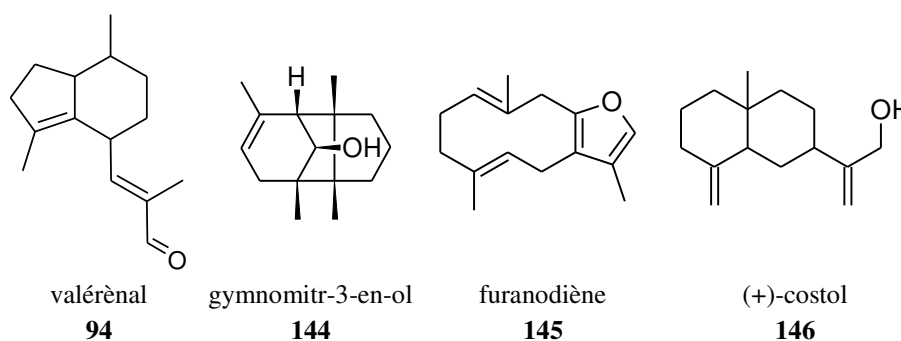
L'échantillon de *B. deplanchei* étudié (MET125) a pour constituant majoritaire un **sesquiterpénoïde non identifié** M=222, 137, 95 (60) (71,4%). L'isolement et la caractérisation de ce constituant est prometteur pour l'obtention d'une molécule potentiellement nouvelle et permettrait d'indexer cette plante endémique dans un chimiotype donné.

La part des composés sesquiterpéniques identifiés est de 19,5%. Ce sont surtout des sesquiterpénoïdes de type pinguisane car l' **$\alpha$ -pinguisène (3)** (14,5%), le **naviculol (141)** (0,7%) et le  **$\beta$ -pinguisène (142)** (0,3%) ont été détectés. L'**albicanol (143)** (1,8%) est également détecté.

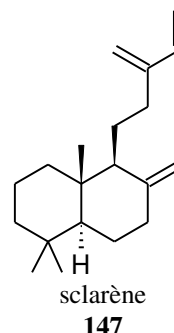


Six sesquiterpénoïdes ont été détectés en tant que composés très minoritaires : le **cis-thujopsène isomère 1 (164)** (0,6%), le **gymnomitr-3-en-ol (144)** (0,3%), le **(E)-caryophyllène (118)** (0,6%), le **valérène (94)** (0,4%), le **furanodiène (145)** (0,2%) et le **(+)-costol (146)** (0,1%).





Le fusicocca-2,5-diène (**80**) (1,2%), le sclarène (**147**) (0,3%) le néophytadiène II (**54**) (0,1%) et le fusicocca-3,5-diène (**140**) (0,1%) sont les diterpénoïdes identifiés dans cette plante.



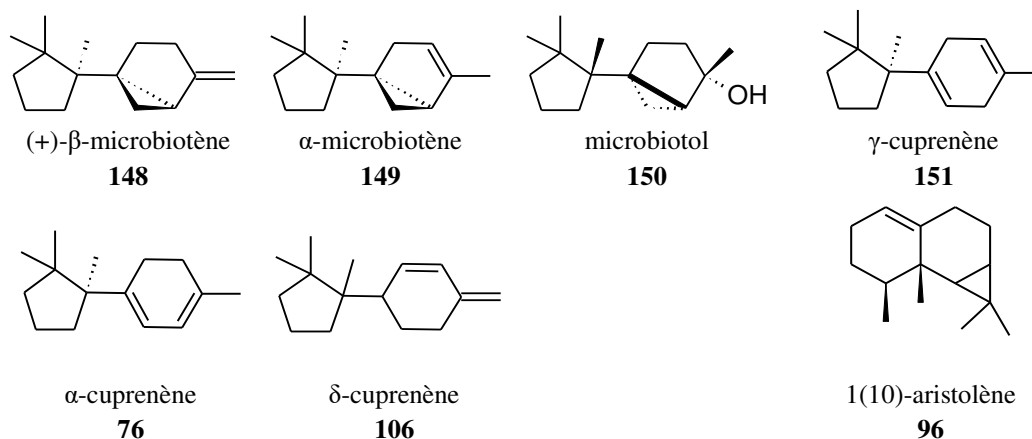
### 3.3.2.5 *Bazzania francana* (Steph.) N.Kitag.

Les constituants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

Quatre échantillons de cette espèce ont été analysés (MET032, 62, 65 et 106). L'analyse des données obtenues par CPG-FID-SM montre clairement la présence de trois chimiotypes très distincts, en effet la localisation des points correspondants aux échantillons MET032 et 106 sur le graphique de l'ACP montre une composition sesquiterpénique particulière pour chacun des échantillons (Figure 42). Les résultats concernant les échantillons MET062 et 65 ne figurent pas sur ce graphique, car ils contiennent une forte proportion (plus de 80%) d'une nouvelle molécule caractérisée pendant cette thèse possédant la structure zierane, ce qui constitue un chimiotype à part.

#### ➤ MET106

Cet échantillon ne comporte que des composés terpéniques dont la grande majorité a pu être identifiée. Les sesquiterpénoïdes identifiés représentent 82,4% des composés volatils détectés. Les sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyl sont majoritaires en ce qui concerne la diversité et le pourcentage relatif avec 11 composés détectés correspondant à six structures différentes. Ces sesquiterpénoïdes sont : le (+)- $\beta$ -microbiotène (**148**) (29%), l' $\alpha$ -microbiotène (**149**) (4,4%), le microbiotol (**150**) (1,1%), le  $\gamma$ -cuprenène (**151**) (2%), l' $\alpha$ -cuprenène (**76**) (1,6%), le  $\delta$ -cuprenène (**106**) (1,2%), le cuparène (**212**) (1,1%), l' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (9,8%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (8,5%), le myltayl-8,12-ène (**126**) (1,8%) et le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (0,6%).



Les composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl sont également bien représentés avec un pourcentage relatif assez important : le  $\gamma$ -maaliène (**114**) (11,9%), le 1(10)-aristolène (**96**) (5%), le viridiflorol (**63**) (1,8%) et le  $\beta$ -élémente (**66**) (0,3%) sont détectés. L' $\alpha$ -pinguisène (**3**) (1,7%) et l'african-1-ène (**133**) (0,9%) ont été aussi identifiés.

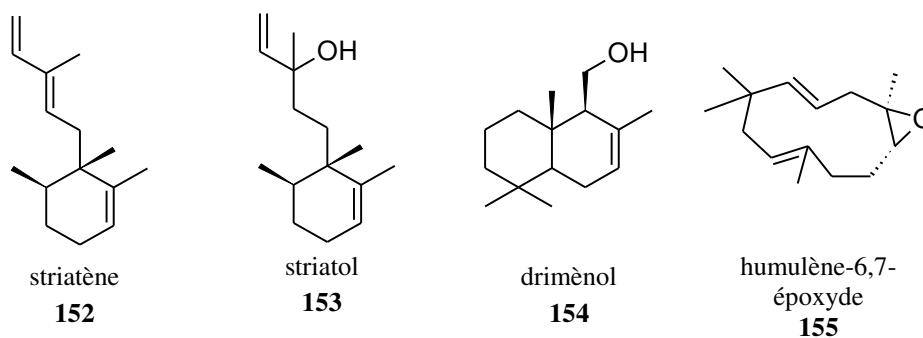
16,4% de diterpénoïdes ont été identifiés, il s'agit de deux isomères du (Z)-biformène : isomère 1 (**138**) (8,9%) et isomère 2 (**139**) (2,1%) ainsi que le fusicocca-2,5-diène (**80**) (3,2%) et le néophytadiène I (**53**) (2,2%).

#### ➤ MET032

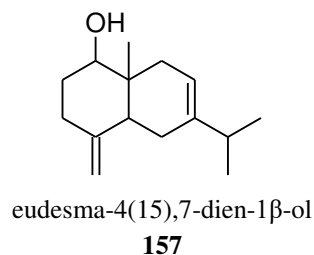
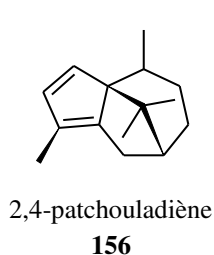
Le contenu volatil de MET032 est constitué majoritairement de composés sesquiterpéniques avec 81% de sesquiterpénoïdes identifiés et 14% non identifiés. Le type monocyclofarnesane domine car le **striatol** (**153**) (57,9%) est détecté avec un fort pourcentage attribuant dès lors un biomarqueur pour ce chimiotype de *B. francana*. Le **naviculol** (**141**) (3,6%) a été également détecté (également détecté chez *Bazzania novae-zelandiae* [40]).

Le **driménol** (**154**) (3,6%), qui possède des propriétés fongicides sur des pathogènes de végétaux (*Cladosporium cucumerinum* (CI<sub>50</sub>= 6,6  $\mu$ g/ml) [76] et *Botrytis cinerea* (CE<sub>50</sub>=80 ppm)) [84] a été également observé.

Trois sesquiterpénoïdes dérivant du cation (E-E)-humulyl ont été détectés, ce sont : le (E)-caryophyllène (**118**) (3,1%), l'humulène époxyde I (**155**) (1%) et l'african-1-ène (**133**) (1,1%).

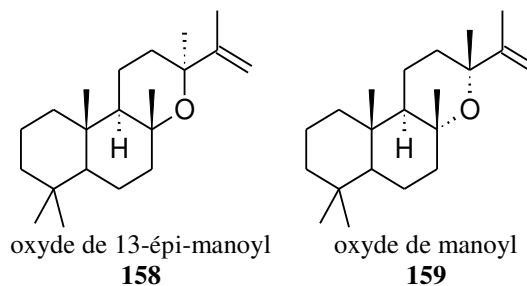


Quatre composés affiliés au cation (E-E)-germacradiényl sont détectés avec des pourcentages modestes : le 2,4-patchouladiène (**156**) (1,5%), l'eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol (**157**) (1,1%), le spathuléol (**46**) (1%) et le viridiflorol (**63**) (0,4%).



Quatre sesquiterpénoïdes de structures différentes affiliés au cation bisabolyl ont été identifiés, ce sont : l' $\alpha$ -cuprenène (**76**) (2,8%), l' $\alpha$ -bisabolène (**121**) (1%), le myltayl-8,12-ène (**126**) (0,8%) et le  $\beta$ -barbatène (**81**) (0,7%). Des traces de khusien-12-al (**135**) (0,6%) sont détectées.

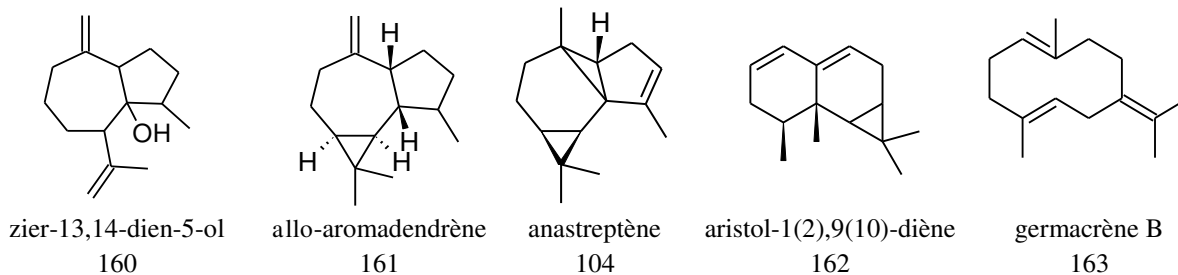
Les diterpénoïdes ne représentent que 3,9% des composés détectés avec 3,2% diterpénoïdes identifiés, ce sont : le fusicocca-2,5-diène (**80**) (1,6%), le néophytadiène I (**53**) (0,4%), le (Z)-biformène isomère 1 (**138**) (0,4%) ainsi que deux isomères : l'oxyde de 13-épi-manoyl (**158**) (0,5%) et l'oxyde de manoyl (**159**) (0,3%).



➤ MET065 et MET062

Ces deux échantillons sont quasiment identiques. Le **zier-13,14-dien-5-ol (160) (86-90,1%)**, l'allo-aromadendrène (**161**) (1-6,8%) (antifongique et antibactérien [85]) et le spathuléol (**46**) (0,9-1,4%) sont détectés dans les deux échantillons.

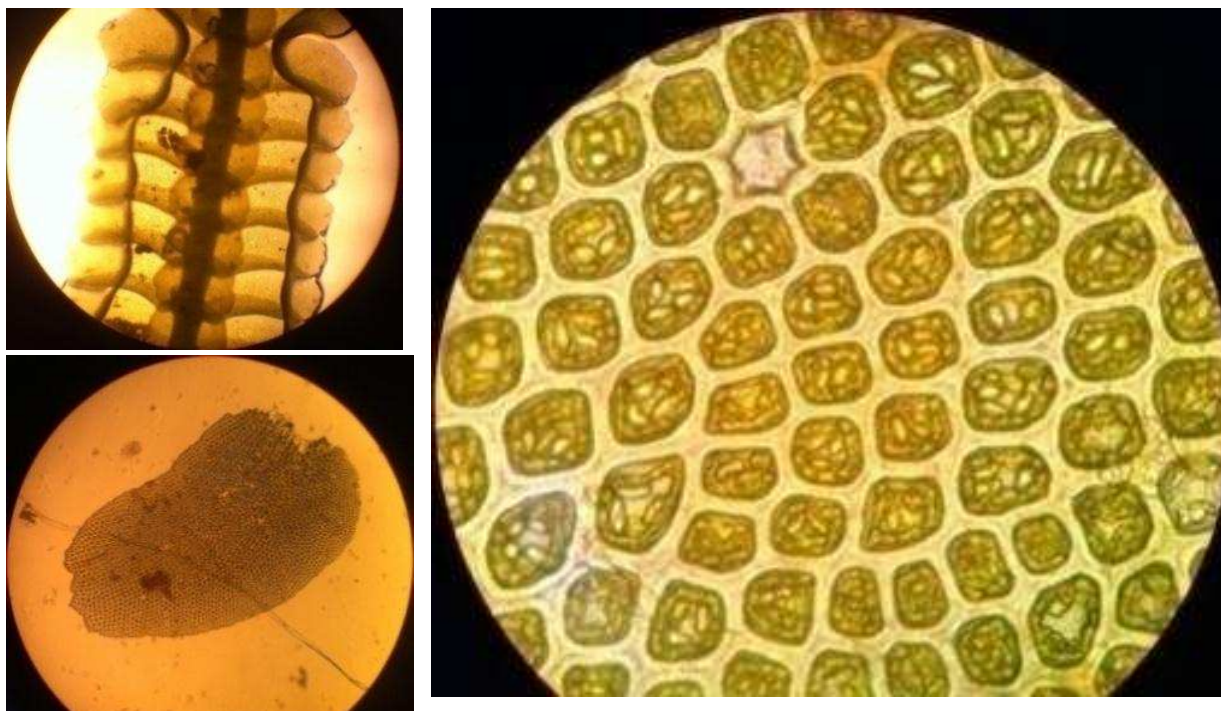
Le **zier-13,14-dien-5-ol (160)** est une nouvelle molécule possédant une structure zierane (rare et affiliée au cation (E-E)-germacradiényl par analogie avec les structures aromadendrène et guaiane), l'élucidation structurale de cette molécule est décrite dans la partie 3.3.2.5.2.



L'échantillon MET062 possède des composés sesquiterpéniques qui ne sont pas détectés chez MET065, ce sont : le  $\beta$ -barbatène (**81**) (1,6%), l' $\alpha$ -guaïol (**115**) (0,8%), l'aristol-1(2),9(10)-diène (**162**) (0,7%) et l'anastreptène (**104**) (0,5%). Deux isomères du (Z)-biformène : isomère 1 (**138**) (0,4%) et isomère 2 (**139**) (0,4%) ont été détectés dans MET062. Le germacrène B (**163**) (1,9%) a été détecté seulement dans MET065.

Les deux échantillons contiennent de l'oxyde de 13-épi-manoyl (**158**) (0,8-1,2%) et du fusicocca-2,5-diène (**80**) (0,6-1%).

### 3.3.2.5.1 Fractionnement



**Figure 28 : Détails de Bazzania francana, en haut à gauche : face ventrale \*40, en bas à gauche : feuille \*100, à droite : cellules \*1000**

20,5 g de matériel végétal a été extrait et a fourni 610 mg d'extrait à l'éther sec de cette espèce et 400 mg d'extrait au MeOH. Cet extrait a été fractionné selon le mode opératoire détaillé dans II.2.3 permettant d'aboutir à l'isolement de deux molécules purifiées.

Les molécules isolées de l'extrait éther puis caractérisées sont :

-le zier-13,14-diène-5-ol (**160**) (200mg)

-le spathuléol (**46**) (10 mg)

Les sesquiterpénoïdes de type zierane sont assez rares dans la nature bien qu'ils ressemblent beaucoup aux squelettes de type guaiane et aromadendrane. Nous présentons ici le **premier isolement** du zier-13,14-diène-5-ol (**160**) qui est ainsi un nouveau composé naturel.

### 3.3.2.5.2 Composé 4 : zier-13,14-dien-5-ol (**160**) (nouvelle molécule)

Le pouvoir rotatoire du composé 4 est de  $-40,4$  ( $c = 9,92$  g/l). La masse de ce composé 4 obtenue par HEIRMS (220,1830) révèle que sa formule brute est  $C_{15}H_{24}O$ , correspondant à une structure avec quatre insaturations. Les bandes d'absorptions maximales caractéristiques observées par spectroscopie infrarouge sont : 3397 (O-H), 2923 , 2854 , 1637 (double liaisons)  $cm^{-1}$ . L'indice de Kovats de ce composé calculé pour une colonne capillaire de type 5-MS (5%-phényl-95% méthylpolysiloxane) est de 1659,3.

➤ Analyse des spectres RMN  $^1H$  (Figure 30),  $^{13}C$  (Figure 29) et HSQC édité

L'analyse de ces trois spectres montre la présence de deux doubles liaisons : C-14 ( $\delta_C$  110,3 ; 4,91 (d;  $J = 4,6$  Hz; 2H) ppm), C-13 ( $\delta_C$  112,5 ( $CH_2$ ),  $\delta_H$  4,83 (d;  $J = 2,2$  Hz) et 4,76 (q;  $J = 1,7$  Hz) ppm), C-11( $\delta_C$  150,2 ppm), C-10 ( $\delta_C$  151,1 ppm). Le nombre d'insaturations étant de quatre, induit à considérer que le composé 4 contiendrait alors deux cycles.

Le spectre RMN proton montre la présence de deux groupes méthyles : un groupe méthyle quaternaire ( $\delta_C$  23,7;  $\delta_H$  1,80 (s) ppm) probablement lié à un carbone hybridés  $sp^2$  étant donné la valeur de son déplacement chimique, ainsi qu'un groupe méthyle C-15 ( $\delta_C$  16,0 ppm;  $\delta_H$  0,89 (3H; d;  $J = 7,2$  Hz) ppm) probablement lié à un carbone  $sp^3$ .

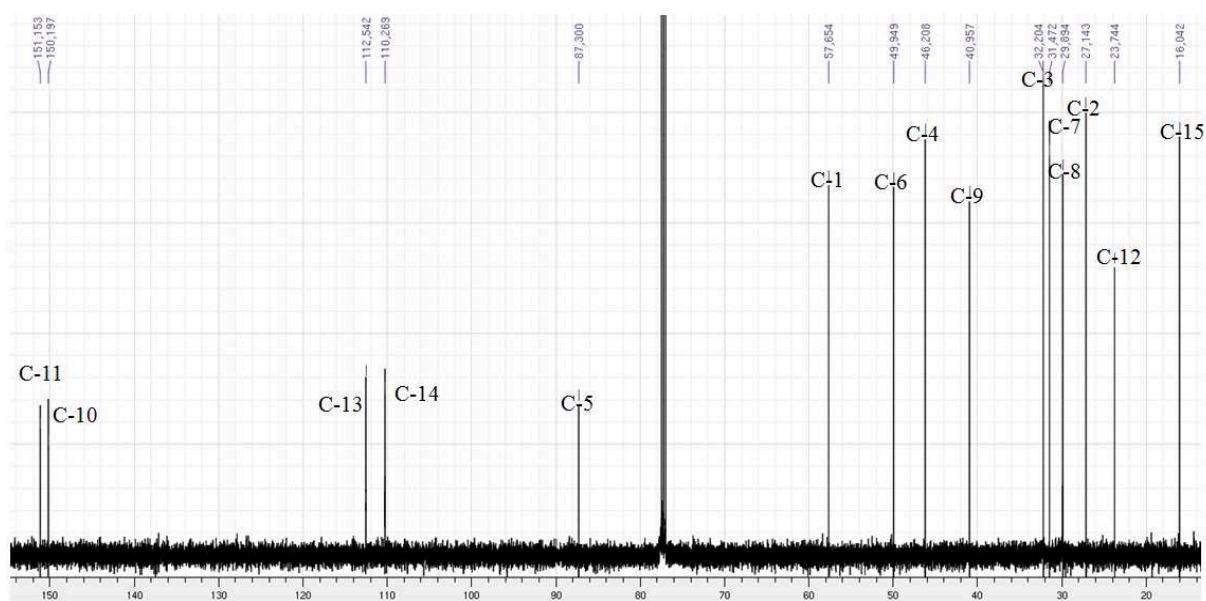


Figure 29 : Spectre RMN  $^{13}C$  du zier-13,14-dien-5-ol (**160**)

La présence de cinq groupes méthyléniques est observée : C-3 ( $\delta_C$  32,2 (m);  $\delta_H$  1,45 (m) et 1,44 (m) ppm) C-2 ( $\delta_C$  27,1;  $\delta_H$  1,92 (m) et 2 (m) ppm), C-7 ( $\delta_C$  31,5 ;  $\delta_H$  1,5 (m) et 2 (m) ppm), C-8 ( $\delta_C$  29,9;  $\delta_H$  1,91 (m) et 1,39 (m) ppm), C-9 ( $\delta_C$  41,0 ppm;  $\delta_H$  2,5 (dtt,  $J = 13,4; 4,9; 0,7$  Hz) et 2,01 (m) ppm) et C-6 ( $\delta_C$  49,9 ,  $\delta_H$  2,28 (dd,  $J = 9,9, 2,0$  Hz) ppm).

Trois groupes méthines sont aussi observés : C-1 ( $\delta_C$  57,6 ;  $\delta_H$  2,54 (t;  $J = 8,7$  Hz) ppm), C-4 ( $\delta_C$  46,2 ;  $\delta_H$  1,88 (m) ppm) et C-6 ( $\delta_C$  49,9 ;  $\delta_H$  2,28 (dd;  $J = 9,9; 2,0$  Hz) ppm). L'analyse de ces spectres montre qu'il n'y a qu'un carbone quaternaire : C-5 ( $\delta_C$  87,3 ppm).

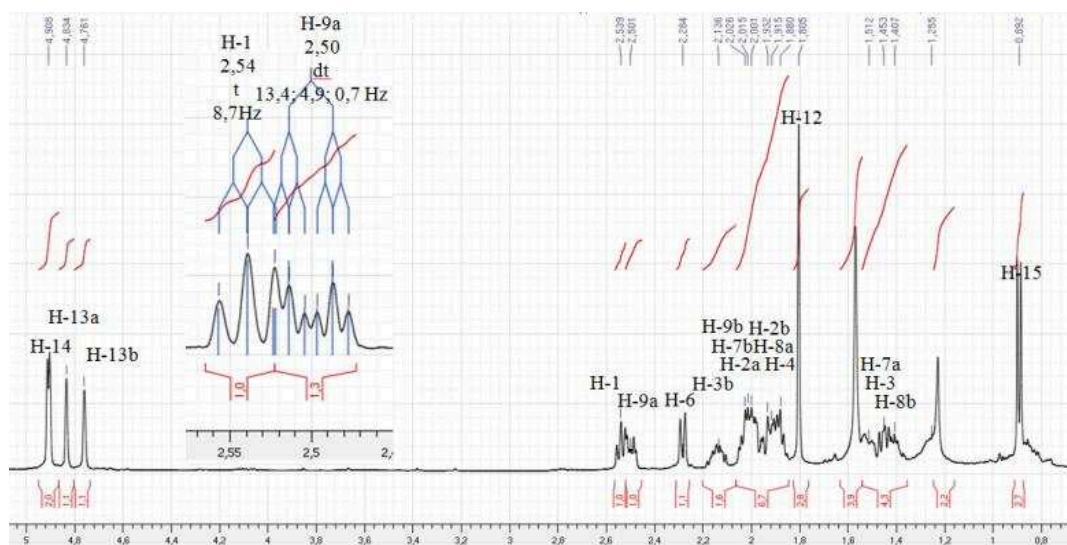


Figure 30 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du zier-13,14-dien-5-ol (160)

➤ Elucidation structurale du composé 4

Les corrélations observées sur le spectre COSY permettent d'établir le réseau (C-6)-(C-7)-(C-8)-(C-9) et de relier les atomes de carbones C-15 et C-4.

La partie vinylique a pu être établie grâce aux corrélations HMBC H-12/C-13/C-11/C-6 et H-13/C-6 d'une part, puis par la liaison des deux carbones hybridés  $\text{sp}^2$  restants, en l'occurrence C-14 et C-10. Le déplacement chimique du carbone C-1 ( $\delta_C$  57,6 ppm) est caractéristique d'un atome de carbone lié à un atome d'oxygène donc supposé porteur d'une fonction alcool.

Etant donné la superposition de plusieurs signaux RMN proton et le nombre important de corrélations d'intensité très variables observées sur le spectre HMBC, le programme LSD a été utilisé pour aider à la détermination structurale. Toutes les informations précédemment énoncées ont été intégrées dans le programme. En plus de ces lignes le programme a été exécuté plusieurs fois avec des différentes données issues du spectre HMBC.

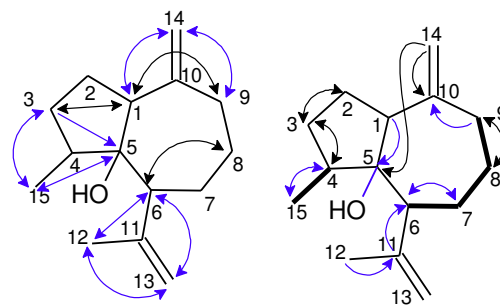
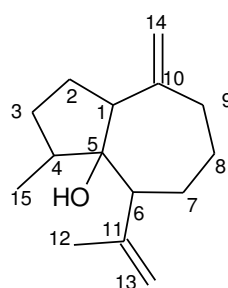


Figure 31 : zier-13,14-dien-5-ol (160); à gauche, flèches : corrélations  $^3\text{J}$  H-C observées sur le spectre HMBC; à droite, flèches : corrélations  $^2\text{J}$  et  $^4\text{J}$  H-C observées sur le spectre HMBC et en gras corrélations  $^3\text{J}_{\text{H-H}}$  observées sur le spectre COSY



La meilleure réponse a été obtenue avec 14 corrélations HMBC différentes et a produit 16 solutions. En éliminant les réponses pour lesquelles les multiplicités les mieux résolues (H-9, H-6 et H-1) ne sont pas respectées, il ne restait plus que trois solutions : deux solutions ne possédant pas une structure sesquiterpénique et possédant un motif cyclobutane et une solution présentant une structure zierane.

Après une comparaison des déplacements chimiques du proton et du carbone expérimentaux avec ceux obtenus par des applications de prédictions de déplacements chimiques pour les trois solutions restantes, la solution du composé à squelette zierane est retenue sans ambiguïté. Cette solution correspond à l'ensemble des corrélations HMBC observées, la Figure 31 montre l'ensemble des corrélations observées dont celles renseignées dans le programme LSD (en bleues).



Zier-13,14-dien-5-ol ( <b>160</b> )			
# C	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	Corrélations HMBC (H $\rightarrow$ C)
<b>1</b>	2,54 (1H, t, J = 8,7 Hz)	57,6	5
<b>2</b>	<b>2a</b> 2 (1H, m)	27,1	4
	<b>2b</b> 1,92 (1H, m)		
<b>3</b>	<b>3a</b> 1,44 (1H, m, J = 2,6 ; 7,4 Hz)	32,2	1, 5
	<b>3b</b> 2,13 (1H, m)		
<b>4</b>	1,88 (1H, m)	46,2	1, 5, 15,2
<b>5</b>	-	87,3	
<b>6</b>	2,28 (1H, dd, J = 9,9 ; 2,0 Hz)	49,9	13, 11, 12, 8, 7
<b>7</b>	<b>7a</b> 1,5 (1H, m)	31,5	
	<b>7b</b> 2 (1H, m)		
<b>8</b>	<b>8a</b> 1,91 (1H, m)	29,9	
	<b>8b</b> 1,39 (1H, m)		
<b>9</b>	<b>9a</b> 2,5 (1H, dtt, J = 13,4 ; 4,9 ; 0,7 Hz)	41,0	8, 7, 1, 14, 10 14,11, 8
	<b>9b</b> 2,01 (1H, m)		
<b>10</b>	-	151,1	
<b>11</b>	-	150,2	
<b>12</b>	1,804 (3H, s)	23,7	6, 13,11
<b>13</b>	<b>13a</b> 4,83 (1H, d, J = 2,2 Hz)	112,5	12, 6
	<b>13b</b> 4,76 (1H, q, J = 1,7 Hz)		
<b>14</b>	4,91 (2H, d, J = 4,6 Hz)	110,3	10, 5, 1, 9
<b>15</b>	0,88 (3H, d, J = 7,2 Hz)	16,0	5, 4, 3

**Tableau 19 : Attribution des signaux RMN du zier-13,14-dien-5-ol (160)**



➤ Etude de la stéréochimie

Le spectre NOESY montre des corrélations H-H 1.3 diaxiale entre les protons : H-8a/H-6, H-6/H-4 et H-1/H-4 (Figure 32). Ces trois corrélations 1.3 diaxiale sont cohérentes avec la suggestion de la stéréochimie du composé 4 comme étant le (1R, 4R, 5R, 6R) zier-13,14-dien-5-ol (**160**). Cependant l'analyse du spectre NOESY n'est pas suffisante, des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'attribuer de façon certaine la stéréochimie de chaque carbone asymétrique et la configuration de ce composé.

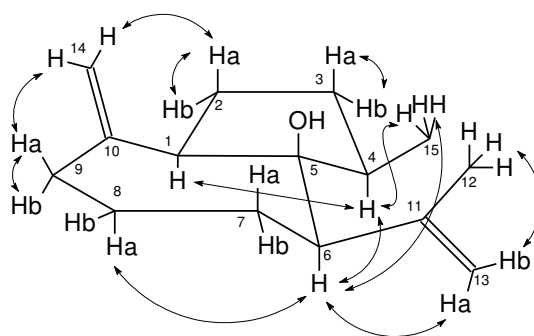
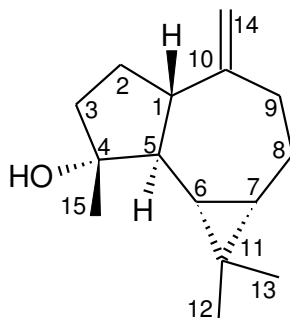


Figure 32 : zier-13,14-dien-5-ol, corrélations H-H observées sur le spectre NOESY

3.3.2.5.3 Composé 5 : ent-spathuléol (**46**)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 20, la parfaite concordance de ces données [86] nous permet de conclure que le composé 5 est identifié au ent-spathuléol (**46**).

ent-Spathuléol (**46**)

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	53,6 (CH)	53,43	2,19 (1H, dt, J = 6,4 ; 10,6 Hz)	2,196
2	26,9 ( $\text{CH}_2$ )	26,72	1,89 (1H, qd; J = 11,7 ; 6,7 Hz) 1,61 (1H, dtd; J = 11,9 ; 2,9 ; 2,3 Hz)	1,909 1,640
3	41,9 ( $\text{CH}_2$ )	41,75	1,75 (1H, dddd; J = 12;2 ; 6,2 ; 1,8 ; 0,7 Hz)	1,771
4	81,2 (C)	80,91	1,55 (1H, qd; J = 6,5 ; 5,9 Hz)	1,540
5	54,5 (CH)	54,29	1,29 (1H, t; J = 11)	1,278
6	30,1 (CH)	29,77	0,45 (1H, dd; J = 11,5 ; 9,5 Hz)	0,463
7	27,7 (CH)	27,46	0,69 (1H, ddd; J = 11,2 ; 9,6 ; 5,9 Hz)	0,707
8	25,0 ( $\text{CH}_2$ )	24,77	1,96 (1H, tdd; J = 6,5 ; 14,2 ; 1,4 Hz) 0,99 (1H, m)	1,960 1,010
9	39,0 ( $\text{CH}_2$ )	38,88	2,02 (1H, t; J = 13 Hz) 2,4 (1H, ddd; J = 13 ; 6,1 ; 1,3 Hz)	2,037 2,41
10	153,6 (C)	153,39		
11	20,4 (C)	20,25		
12	28,8 ( $\text{CH}_3$ )	28,66	1,037 (3H, s)	1,053
13	16,5 ( $\text{CH}_3$ )	16,33	1,03 (3H, s)	1,038
14	106,4 ( $\text{CH}_2$ )	106,27	4,67 (3H, t; J = 1,7 Hz) 4,64 (1H, q; J = 1,4 Hz)	4,662 4,688
15	26,2 ( $\text{CH}_3$ )	26,06	1,27 (3H, s)	1,305

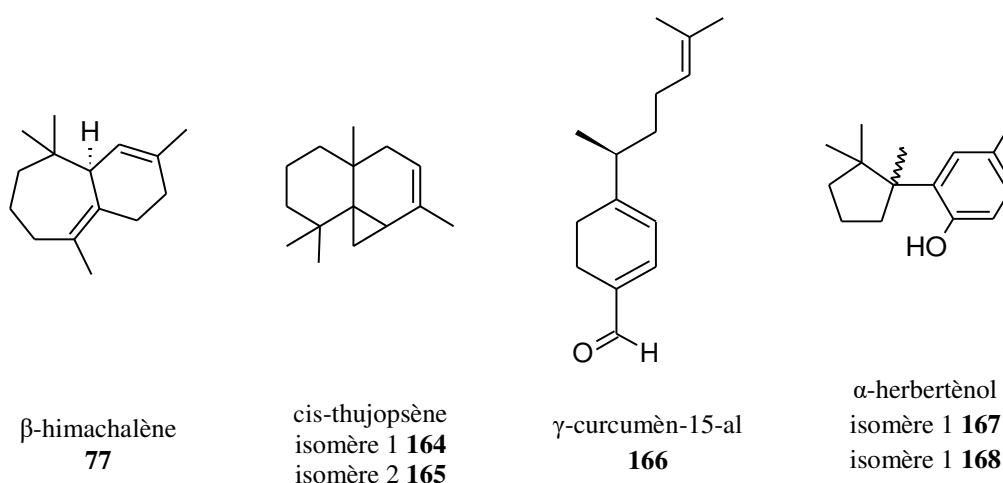
Tableau 20 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de l'ent-spathuléol (**46**)

### 3.3.2.6 *Bazzania parisii* (Steph.) N.Kitag.

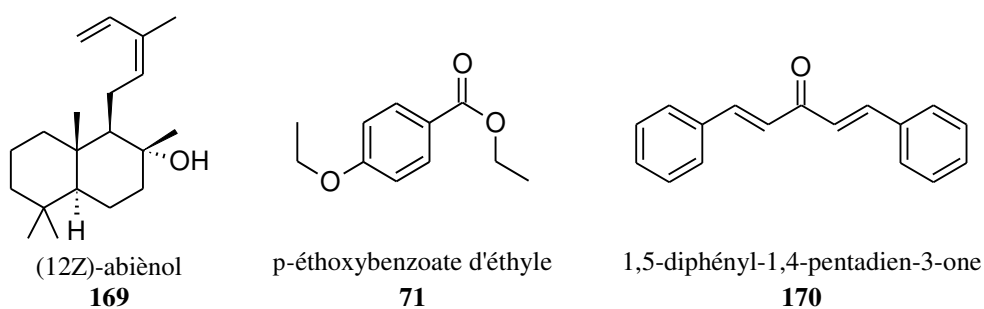
Les sesquiterpénoïdes identifiés dans cet échantillon (MET109) représentent 61% de l'ensemble des composés volatils détectés, les constituants de cette plante sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

Ces composés sesquiterpéniques sont très majoritairement issus du cation bisaboly. En effet le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (21,5%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (17,8%), le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (6,5%), le cis-thujopsène isomère 2 (**165**) (5,7%), l' $\alpha$ -barbatène (**4**) (1,6%), le  $\gamma$ -curcumèn-15-al (**166**) (1,4%), le cuparène (**212**) (1,4%) et l' $\alpha$ -herberténol isomère 2 (**168**) (0,7%) ont été détectés.

Deux autres sesquiterpénoïdes non affiliés à cette voie de biosynthèse, l'allo-aromadendrène (**161**) (3,5%) et le  $\beta$ -himachalène (**77**) (1%) ont été aussi détectés.



19,1% de diterpénoïdes ont été identifiés : le (12Z)-abiénoïl (**169**) (10,7%), l'oxyde de 13-épi-manoyl (**158**) (4,3%) et le fusicocca-2,5-diène (**80**) (4,1%).



Les composés non sesquiterpéniques représentent 2% du contenu volatil, ce sont : le 1,5-diphényl-1,4-pentadien-3-one (**170**) (0,8%), un alcool aliphatique (0,6%) et le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,5%).

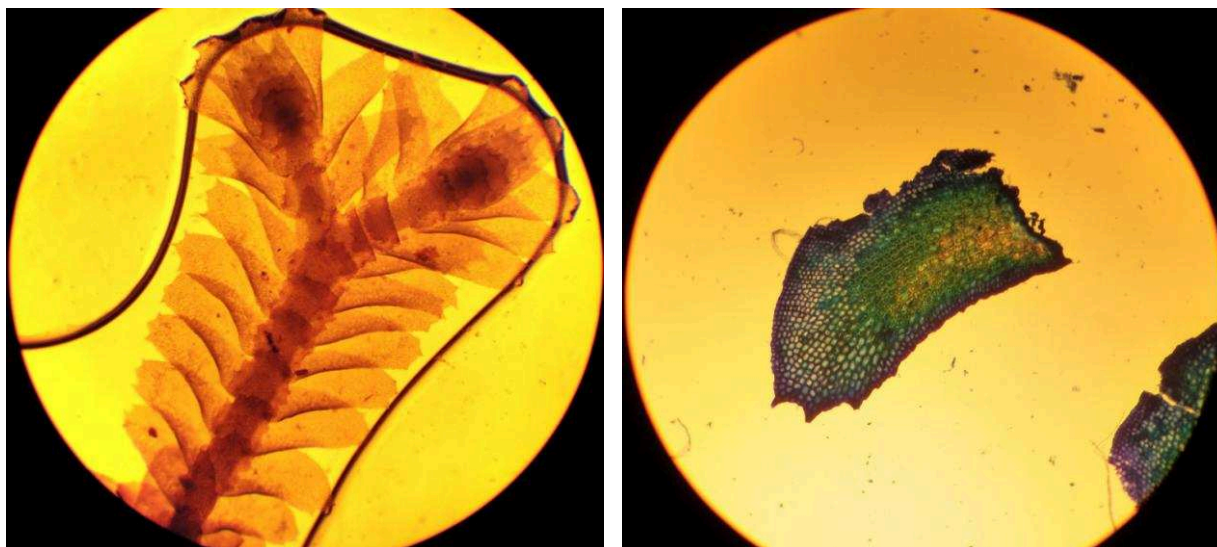
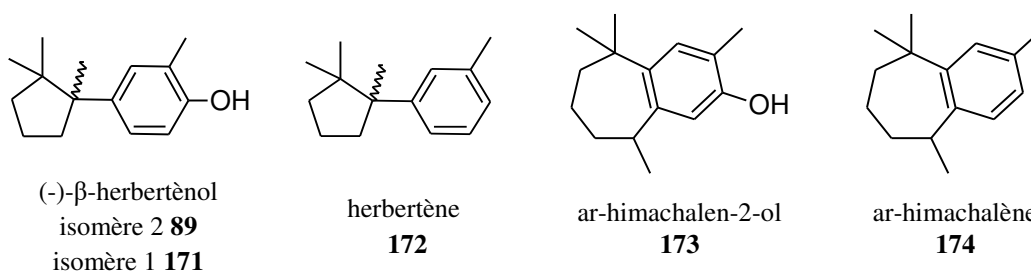
3.3.2.7 *Bazzania marginata* (Steph.) N.Kitag. (endémique)

Figure 33 : détail de *Bazzania marginata*, à gauche : face ventrale \*40, à droite : feuille \*100

Un seul échantillon (MET048) a été étudié. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 27.

Un sesquiterpénoïde majoritaire a été détecté : le (-)- $\beta$ -herberténol (**89**) (95,9%). Ce composé possède une activité modérée contre *Staphylococcus aureus* ainsi que des effets anti inflammatoires (inhibition de production de NO,  $CI_{50} = 12,23 \mu M$ ) [21]. Les autres sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyll détectés sont : l'herbertène (**172**) (1,0%), l' $\alpha$ -herberténol isomère 1 (**167**) (0,3%) et isomère 2 (**168**) (0,5%).

D'autres composés sesquiterpéniques tels que le spathuléol (**46**) (1%), l'ar-himachalen-2-ol (**173**) (0,2%) et l'ar-himachalène (**174**) (0,2%) ont été aussi détectés.



Les diterpénoïdes identifiés représentent seulement 0,6% des composés volatils détectés avec la détection du fusicocca-2,5-diène (**80**) (0,3%) et du néophytadiène I (**53**) (0,3%).

Des composés aliphatiques tels qu'un alcool aliphatique (0,2%) et un alcane non identifié (0,1%) sont également détectés.

### 3.3.2.7.1 Fractionnement

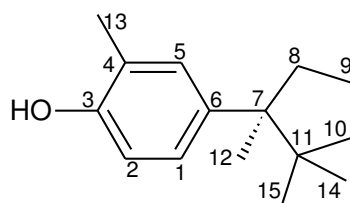


Figure 34 : Détails de *Bazzania marginata*

80 g de matériel végétal a été extrait de *B. marginata* et a fourni 400 mg d'extrait à l'éther et 1,9 g d'extrait au MeOH. L'extrait obtenu par macération dans le MeOH a été fractionné selon le mode opératoire détaillé dans la partie II.2.3 pour aboutir à l'isolement du (-)- $\beta$ -herberténol (**89**) (600mg).

3.3.2.7.2 Composé 6 : (-)- $\beta$ -herbertènol (**89**)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 21, la parfaite concordance de ces données [87] nous permet de conclure que le composé 6 est identifié au (-)- $\beta$ -herbertènol (**89**).

(-)- $\beta$ -Herbertènol (**89**)

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Expérimental	Bibliographie	Expérimental	Bibliographie
1	151,6 (CH)	151,8	6,67 (1H, d, J = 8,3 Hz)	6,72 (1H, d, J = 7,9 Hz)
2	114,1 (CH)	114,3	7,04 (1H, dd, J = 8,4 ; 2,4 Hz)	7,05–7,11 (1H, m)
3	125,8 (C)	125,9		
4	140,0 (C)	140,2		
5	129,9 (CH)	129,9	7,08 (1H, d, J = 2,3 Hz)	7,05–7,11 (1H, m)
6	122,4 (C)	122,6		
7	44,4 (C)	44,5		
8	37,1 ( $\text{CH}_2$ )	37,3	2,44 (1H, dt, J = 12,8 ; 9,1 Hz)	2,39–2,53 (1H, m)
			1,64 (1H, m)	
9	19,9 ( $\text{CH}_2$ )	20,0	1,53 (1H, m)	1,48–1,52 (2H, m)
			1,66 (1H, m)	1,56–1,73 (2H, m)
10*	39,9 ( $\text{CH}_2$ )	40,1	1,75 (2H, m)	1,73–1,84 (2H, m)
11	50,1 (C)	50,3		
12	26,7 ( $\text{CH}_3$ )	26,8	0,55 (3H, s)	0,58 (3H, s)
13	16,3 ( $\text{CH}_3$ )	16,3	2,23 (3H, s)	2,27 (3H, s)
14*	24,7 ( $\text{CH}_3$ )	24,8	1,22 (3H, s)	1,25 (3H, s)
15*	24,5 ( $\text{CH}_3$ )	24,6	1,03 (3H, s)	1,06 (3H, s)

Tableau 21 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du (-)- $\beta$ -herbertènol (**89**)

### 3.3.2.8 *Bazzania serrifolia* Steph.

Six échantillons de cette espèce ont été étudiés (MET041, 51, 52, 53, 92 et 99). Seulement deux molécules sont communes à ces six échantillons : le  **$\delta$ -cuprenène (106) (0,8-21,9%)** et le **fusicocca-2,5-diène (80) (16,1-72,6%)**. Les constituants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

Leurs compositions en composants volatils sont très variables, cependant on observe que les échantillons MET099 et MET092 (groupe 1) ont beaucoup de composés sesquiterpéniques communs. Ainsi ces deux échantillons ont été étudiés ensemble dans un même lot (appelé groupe 1) et les autres (MET041, 51, 52, 53) ont été étudiés à part (appelé groupe 2). La part des sesquiterpénoïdes identifiés permet de différencier les groupes 1 et 2, respectivement 62,6 à 73,9% et 2,2 à 10,3%. Ces différences de compositions peuvent être expliquées par leurs environnement et habitats respectifs, le groupe 1 ayant été récoltés en Province Nord et le groupe 2 en Province Sud (partie II.2.1).

➤ Les sesquiterpénoïdes du groupe 1 (MET092 et 099)

Les échantillons du groupe 1 possèdent neuf sesquiterpénoïdes communs n'étant pas observés dans le groupe 2. Les composés sesquiterpéniques détectés affiliés au cation (E-E)-humulyl sont le **(E)-caryophyllène (118) (29,6-38%)**, ainsi que l'african-1-ène (**133**) (5,2-6,2%) et l'african-2-ène (**177**) (0,2-0,2%).

Ces deux échantillons sont riches en (E)-caryophyllène qui possède des activités biologiques intéressantes telles qu'anesthésique [88], anticancéreuse (non cytotoxique mais augmente l'efficacité du paclitaxel [89]), antibactériennes contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* [90] et est aussi utilisé dans la cosmétique comme agent odorant [91].

Les autres composés spécifiques à ces deux échantillons sont détectés en tant que composés minoritaires et essentiellement affiliés au cation bisabolyl avec : l' $\alpha$ -bisabolol (**127**) (0,7-0,7%), le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (0,6-1,1%), l' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (0,3-0,9%) et le 1,7-di-épi- $\beta$ -cédrène (**128**) (0,2-0,5%). L'isolépidozène (**111**) (0,4-0,8%) et l' $\alpha$ -pinguisène (**3**) (0,3-0,5%) font partie des composés n'ayant pas été détectés dans le groupe 2.

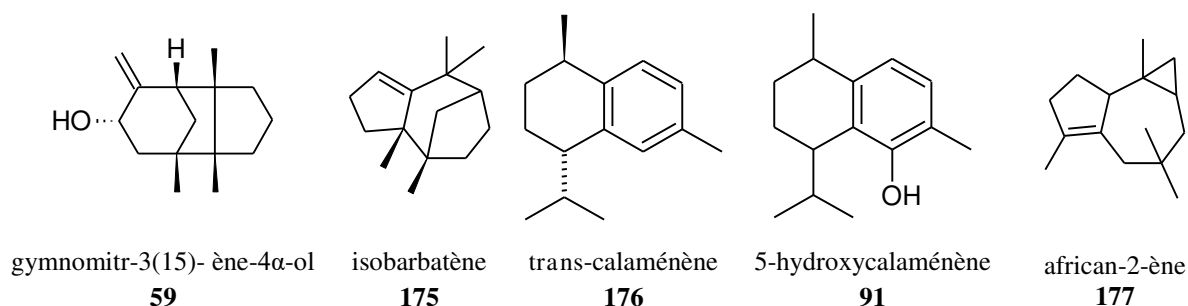
Plusieurs composés sont présents dans les groupes 1 et 2, il s'agit du  $\delta$ -cuprenène (**106**) (8,6-21,9%), du cuparène (**212**) (0,7-1,1%) et du  $\beta$ -bazzanène (**5**) (2,4-3,2%).

Parmi tous les échantillons de *Bazzania serrifolia*, le myltayl-8,12-ène (**126**) (6,3%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (1,5%), le  $\beta$ -himachalène (**77**) (0,7%) et le  $\beta$ -bisabolène (**130**) (0,2%) ont été détectés uniquement chez MET099, alors que l' $\alpha$ -humulène (**116**) (3,5%) a été détecté uniquement chez MET092.

➤ Les sesquiterpénoïdes du groupe 2 (MET041, 51, 52, 53)

Les composés sesquiterpéniques représentent une faible proportion du contenu volatil détecté pour le groupe 2 avec 2,2 à 10,3% de sesquiterpénoïdes identifiés. Ces sesquiterpénoïdes sont,

pour la plupart, affiliés au cation bisabolyl : le gymnomitr-3(15)-ène-4 $\alpha$ -ol (**59**) (0-3,9%), le  $\delta$ -cuprenène (**106**) (0,8-7,4%), l'isobarbatène (**175**) (0-0,6%), le cuparène (**212**) (0-0,8%), le myltayl-8,12-ène (**126**) (0-0,4%) et le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (0-1,3%).

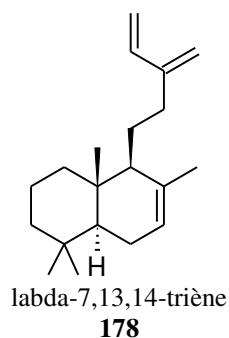


Le 5-hydroxycalaménène (**91**) (0-1,7%), le trans-calaménène (**176**) (0-0,6%), le spathuléol (**46**) (0-3,6%) et le 4-épi-marsupellol (**134**) (0,4-1,6%) ont été aussi détectés.

Contrairement aux échantillons du groupe 1, des composés non sesquiterpéniques ont été détectés dans ce groupe : le (2-méthylène-cyclohexyl)-phényl-méthanol (**137**) (0-1,8%) et le 1-(2-benzyloxyéthyl)-cyclohexène (**136**) (0-1,7%). Ce sont des composés mineurs communs à plusieurs échantillons de *B. serrifolia*.

➤ Diterpénoïdes détectés chez *B. serrifolia* :

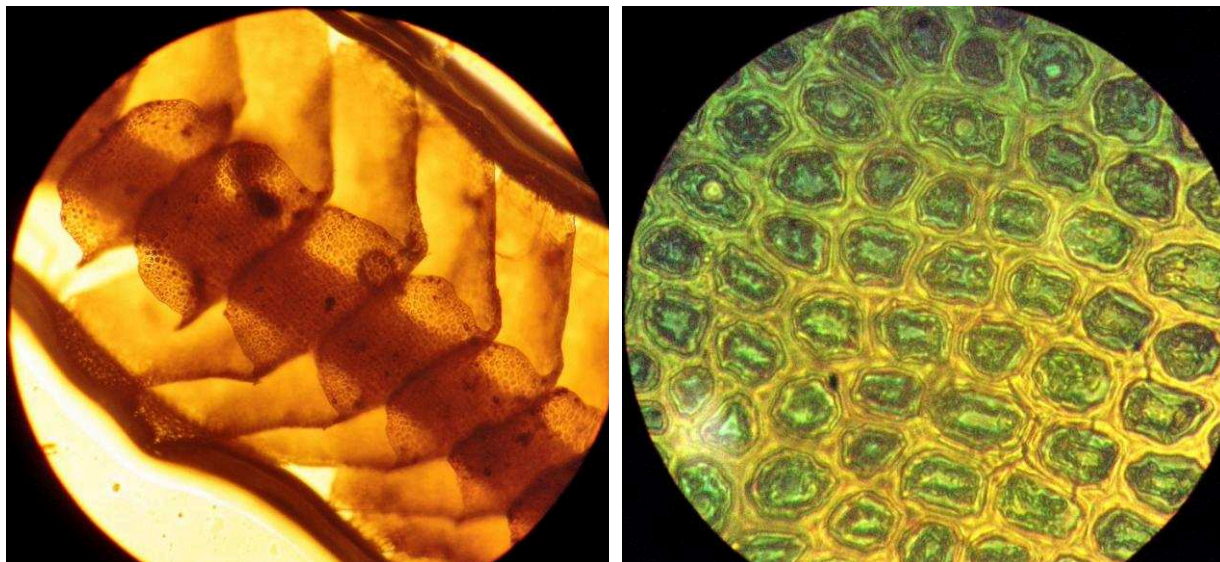
Les diterpénoïdes détectés dans cette espèce sont le fusicocca-2,5-diène (**80**) (16,1-72,6%), le (Z)-biformène isomère 1 (**138**) (0-2,8%), le labda-7,13,14-triène (**178**) (0-1%), le néophytadiène I (**53**) (0-0,4%) et le fusicocca-3,5-diène (**140**) (0-0,2%).





### 3.3.2.9 *Bazzania subintegra* (Steph.) L.Söderstr. et A.Hagborg (endémique)

Les composants de l'échantillon MET100 ont été étudiés. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.



**Figure 35 : Détails de *Bazzania subintegra*; à gauche : face ventrale \*40, à droite cellules \*1000**

28,2% de composés diterpéniques ont été identifiés dans l'extrait, dont majoritairement le **fusicocca-2,5-diène (80) (16,7%)** et l'**oxyde de 13-épi-manoyl (158) (11,5%)**.

Deux diterpénoïdes oxygénés indéterminés, M=288, 95, 107(80) (17,67%) et M $\geq$ 286, 95, 107 (90) (16,1%), font partie des composés majoritaires de cet extrait. Leur caractérisation pourrait mener à la découverte de nouveaux composés. Ces composés ont été également détectés avec des pourcentages relatifs modérés dans plusieurs échantillons classés sous l'appellation *Bazzania* sp. AD212 et *Bazzania serrifolia*.

Les composés sesquiterpéniques représentent 29,3% des composés volatils détectés et sont tous des dérivés d'herberténol, tels que l' **$\alpha$ -herberténol isomère 1 (167) (12,1%)** et isomère 2 (**168**) (9,7%) et ainsi que le (+)- $\beta$ -herberténol (**171**) (7,5%).

### 3.3.2.10 *Bazzania vittata* (Gottsche) Trevis

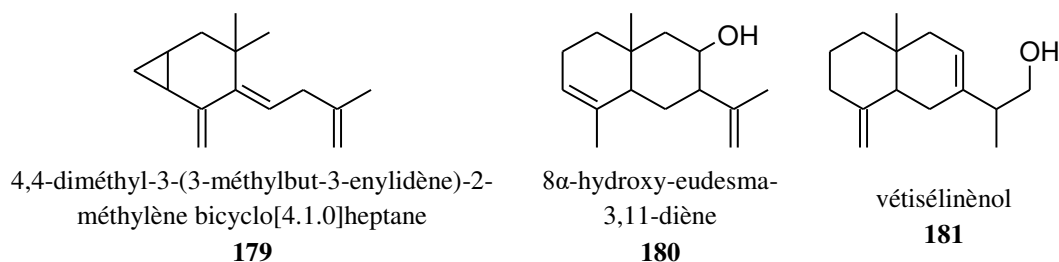
Deux échantillons de cette espèce ont été analysés : MET049 et MET060, ceux-ci ont des contenus en composés volatils quasiment identiques et contiennent tous deux un nouveau bis(bibenzyl) dont l'analyse structurale est détaillée dans la partie 3.3.2.10.2. Cette nouvelle molécule est un composé essentiel de ces espèces car il représente environ 50% en masse des extraits à l'éther et au méthanol de cette espèce tout en ayant une solubilité très faible dans ces deux solvants.

De 47,2 à 48,1% de sesquiterpénoïdes ont été identifiés chez *Bazzania vittata*. Le contenu volatil de cette espèce est détaillé dans le Tableau 27.

Le composé majoritaire est le **4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène)-2-méthylènebicyclo[4.1.0]heptane (179)** (14-16%) bien que sa structure ressemble au type monocyclofarnesane, sa voie biosynthétique n'est pas bien connu.

Au niveau quantitatif les sesquiterpénoïdes affiliés au cation (E-E)-germacradiényl sont dominants dans ces extraits car le **viridiflorol (63)** (10,8-13,5%), l'**α-guaiol (115)** (7,4-10%) et le **8α-hydroxy-eudesma-3,11-diène (180)** (2,9-3,4%) ont été détectés avec des pourcentages relatifs importants. Ces deux sesquiterpénols cités ont des potentialités thérapeutiques intéressantes. Le viridiflorol possède des activités antimicrobiennes modérées contre *Pyricularia oryzae* [76]. L'α-guaiol a montré des activités inhibitrices de croissance modérées sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* et plus forte sur *Salmonella typhi* [92]. L'α-pinguisène (**3**) (10,1-1,8%) a été également détecté dans les deux échantillons.

Leurs compositions en sesquiterpénoïdes ne diffèrent que par le **vétisélinénol (181)** (2,2%) et le **δ-cuprenène (106)** (1,3%) qui ont été détectés uniquement chez MET060 alors que l'allo-aromadendrène (**161**) (2,1%) a été détecté uniquement chez MET049.



20,5 à 34% de diterpénoïdes ont été identifiés dans cette espèce avec le **fusicocca-2,5-diène (80)** (8,9-21%) et le **néophytadiène I (53)** (3,4-13%). Le néophytadiène, constituant commun aux deux échantillons est décrit comme ayant des activités antipyrétique, analgésique et anti inflammatoire [93].

Le néophytadiène II (**54**) (6,8%), le (Z)-biformène isomère 1 (**138**) (2,2%) ainsi que le alcool aliphatique (3,8%) et un alcane non identifié (0,4%) ont été détectés uniquement pour l'échantillon MET060. Le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (6,7-3,5%) a été détecté dans les deux échantillons.

## 3.3.2.10.1 Fractionnement

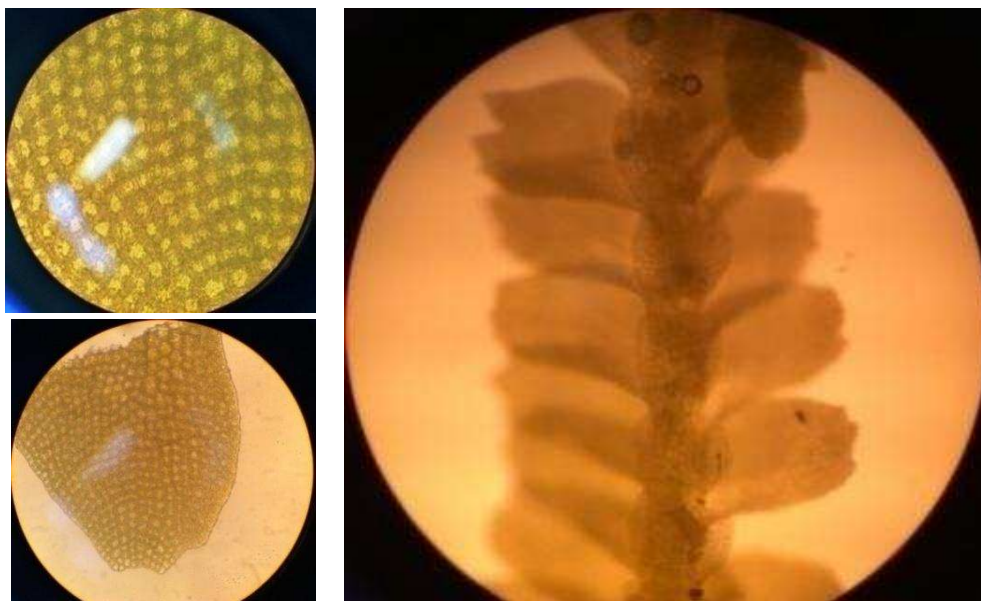


Figure 36 : Détails de *Bazzania vittata*, en haut à gauche : cellules \*400, en bas à gauche feuille \*100, à droite : face ventrale \*40

90 g de matériel végétal (*B. vittata*) a été extrait et a fourni 2,9 g d'extrait à l'éther et 4,1 g d'extrait au MeOH.

L'extrait étheré a été lavé successivement avec du MeOH,  $C_6H_{12}$ , du MeCN puis du DCM pour obtenir 980 mg de dimère d'acide lunularique (**182**).

L'extrait MeOH a été lavé sur Büchner avec du MeOH puis du DCM pour obtenir 1,1 g de vittatin (**183**). Ce composé est inconnu de la littérature.

### 3.3.2.10.2 Composé 7 : Vittatin (183) (nouvelle molécule)

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre blanche floconneuse.

L'analyse en HEIRMS (haute résolution) du composé 7 montre un ion pseudomoléculaire  $[M+H]^+$  avec un rapport  $m/z$  de 527,1700 correspondant à un composé de formule brute  $C_{31}H_{26}O_8$  avec un nombre d'insaturations de 19. Le spectre infrarouge indique la présence de groupe hydroxyles correspondant à une fonction alcool ( $3414\text{ cm}^{-1}$ ) et/ou acide carboxylique, ainsi qu'un groupe carbonyle (C=O) correspondant à un acide carboxylique ( $1753\text{ cm}^{-1}$ ) et d'un cycle aromatique ( $1608\text{--}1445\text{ cm}^{-1}$ ).

➤ Analyse des spectres RMN proton (Figure 37), carbone (Figure 38) et HSQC édité

Au regard de la formule brute du composé 7, de l'intégration des signaux proton sur le spectre  $^1\text{H}$  RMN et du spectre HSQC, nous sommes en présence d'un dimère symétrique où seul un système méthylénique : C-16 ( $\delta_C$  98,9 (CH<sub>2</sub>);  $\delta_H$  5,55 (s) pm) n'est pas commun aux deux monomères, tous les autres signaux devraient être comptés double pour rendre compte de l'aspect dimérique de cette molécule.

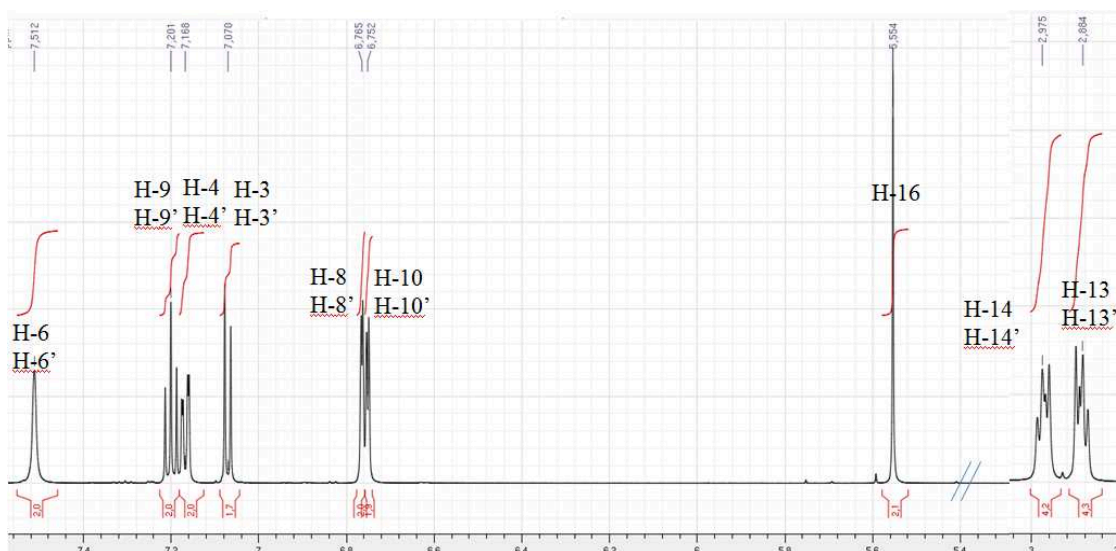


Figure 37 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du dimère d'acide lunularique (183)

Sur le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ , sept signaux correspondant à des carbones quaternaires hybridés  $sp^2$  sont observés : C-1 et C-1' ( $\delta_C$  130,8 ppm), C-5 et C-5' ( $\delta_C$  128,3 ppm), C-7 et C-7' ( $\delta_C$  140,9 ppm), C-12 et C-12' ( $\delta_C$  119,8 ppm), dont deux étant hypothétiquement liés à un oxygène étant donné leurs déplacements chimiques : C-2 et C-2' ( $\delta_C$  152,9 ppm), C-11 et C-11' ( $\delta_C$  156,6 ppm) et un très déblindé caractéristique d'un groupe carbonyle C-15 et C-15' ( $\delta_C$  170,6 ppm).

Sont observés aussi six groupes méthines ayant toutes les caractéristiques de protons aromatiques : C-3 et C-3' ( $\delta_C$  120,6 ;  $\delta_H$  7,07 (d;  $J = 8,2$  Hz) pm), C-4 et C-4' ( $\delta_C$  137,8 ;  $\delta_H$  7,17 (dd;  $J = 8,2; 2$  Hz) pm), C-6 et C-6' ( $\delta_C$  128,7 ;  $\delta_H$  7,51 (d;  $J = 2$  Hz) pm), C-8 et C-8' ( $\delta_C$  120,4 ;  $\delta_H$  6,76 (d;  $J = 7,9$  Hz) pm), C-9 et C-9' ( $\delta_C$  130,9 ;  $\delta_H$  7,2 (t;  $J = 7,9$  Hz) pm) puis C-10 et C-10' ( $\delta_C$  114,0 ;  $\delta_H$  6,75 (d;  $J = 7,9$  Hz) pm).

Un groupe méthylène très déblindé C-16 résonant à  $\delta_C$  98,9 ppm ( $\delta_H$  5,55 ppm) est mis en évidence sur le spectre HSQC, dont la valeur du déplacement chimique l'attribue à un atome de carbone lié à deux liaisons éther. En plus, le spectre HSQC montre la présence de deux groupes méthylènes aliphatiques : C-13 et C-13' ( $\delta_C$  36,6 (CH<sub>2</sub>);  $\delta_H$  2,88 (m) ppm) ainsi que C-14 et C-14' ( $\delta_C$  36,2 (CH<sub>2</sub>);  $\delta_H$  2,97 (m) ppm).

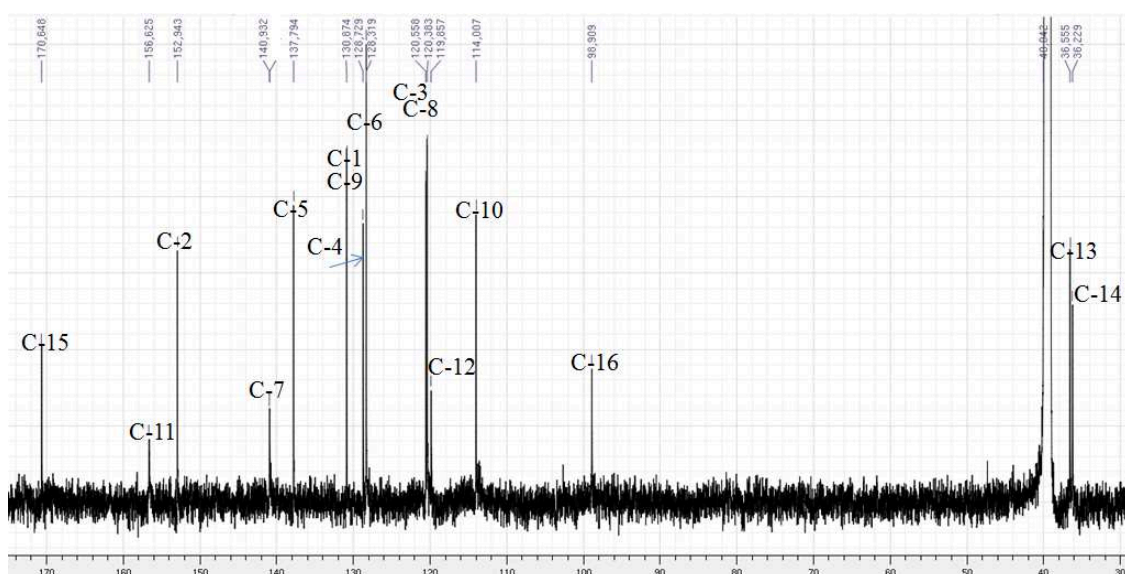


Figure 38: Spectre RMN <sup>13</sup>C du dimère d'acide lunularique (183)

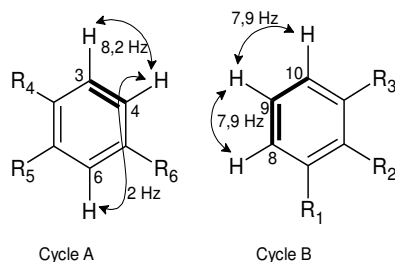
#### ➤ Elucidation structurale du composé 8

Au vu de l'intégration de l'ensemble des signaux (spectres de RMN du <sup>13</sup>C et du <sup>1</sup>H), à part ceux correspondant à l'intégration d'un groupe méthylène (-CH<sub>2</sub>-), tous les signaux correspondent à une intégration double (en intensité) suggérant une structure symétrique. La probabilité de cette hypothèse d'une structure symétrique reliée par un chaînon constituée par ce groupe méthylène a pu être mise en évidence en confrontant les données de spectrométrie de masse à celles de la RMN. En effet, par comparaison avec les données de la littérature, les données de la RMN du composé 8 sont très proches de celles de l'acide lunularique [57] alors que les données de la spectrométrie de masse correspondent à une masse moléculaire plus élevée (plus du double de celle de l'acide lunularique). En absence d'autres signaux en RMN du <sup>13</sup>C et du <sup>1</sup>H (à part ceux du groupe méthylène), l'hypothèse de la duplication d'une unité monomérique constituée par l'acide lunularique pour constituer une structure dimérique reliée a été ainsi mise en évidence.

Pour l'élucidation structurale la molécule est considérée comme un monomère, le dimère étant parfaitement symétrique mais relié par le chaînon (-O-CH<sub>2</sub>-O-) à deux liaisons étheroxydes et ainsi que par une liaison carbonée reliant deux noyaux aromatiques (liaison méta-méta).

L'analyse des signaux attribués aux groupes méthines sont caractéristiques d'un noyau aromatique. En se basant sur les multiplicités, les valeurs des constantes de couplage de ces signaux et les corrélations <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> deux cycles aromatiques (cycle A et cycle B) sont établis (cf. Figure 39).





**Figure 39 : Dédution de deux cycles aromatiques sur la base du spectre RMN  $^1\text{H}$  et des corrélations  $^3\text{J}_{\text{H-H}}$  visibles sur le spectre COSY**

Le spectre COSY montre une corrélation  $^3\text{J}$  entre les protons H-13 et H-14 établissant ainsi la liaison (C-14)-(C-13). Les corrélations clés H-13/C-6/C-4 avec les atomes de carbone du motif (C-14)-(C-13) ont permis de relier ce chaînon aliphatique sur le cycle A. Ensuite les corrélations H-13/C-7 et H-14/C-5 permettent de localiser l'atome de carbone C-7 sur lesquels est fixé le chaînon aliphatique, (formé par les carbones C-14 et C-13) au niveau du cycle B, et constituant ainsi un pont entre les deux cycles aromatiques A et B.

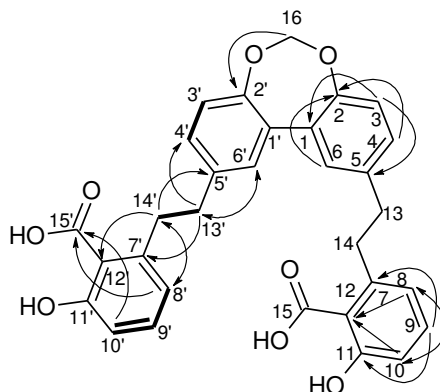
Sont localisés sur le cycle B : le groupe hydroxyle (fonction phénol) fixé sur le carbone C-11 montré par la corrélation H-9/C-11 ; la fonction acide carboxylique (correspondant au carbone C-15 caractérisé par un groupe carboxyle très déblindé résonant à 170,6 ppm) liée au cycle aromatique par le carbone C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  119,8 ppm) d'après les corrélations H-8/C-7/C-15, H-10/C-7/C-15 relevées sur le spectre HMBC.

L'atome de carbone C-2 (résonant à  $\delta_{\text{C}}$  152,9 ppm) montre des tâches de corrélations hétéronucléaires H-4/C-2 et H-6/C-2 observées sur le spectre HMBC. Puis le dernier signal correspondant à un carbone d'état hybridés  $\text{sp}^2$  est attribué au à la position C-1 du cycle A. La connexion du motif (C-16)-O-(C-2) relié ainsi au cycle A, est argumentée par la corrélation H-16/C-2 relevée sur le spectre HMBC ainsi que la valeur du déplacement chimique des protons H-16 ( $\delta_{\text{H}}$  5,5 ppm) fortement déblindés correspondant à celui d'un proton porté par un atome de carbone oxygéné. Cette attribution a permis de déterminer le motif monomérique de la molécule étudiée.

Les deux monomères sont liés par une liaison éther de part et d'autre du carbone C-16 ainsi que par une liaison simple reliant les carbones C-1 et C-1' (correspondant carbone quaternaire hybridé  $\text{sp}^2$  donc ne portant pas de proton mais permettant ainsi d'établir une liaison carbonée entre les deux monomères. Cette élucidation structurale mène ainsi à l'identification de la vittatin dimère d'acide lunularique (**184**) dont la structure ainsi établie est cohérente avec l'ensemble des données spectroscopiques, notamment les corrélations HMBC et COSY (Figure 40).

Il s'agit d'une nouvelle molécule possédant clairement deux motifs d'acide lunularique (**18**), molécule très commune chez les hépatiques. La comparaison des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **8** avec ceux de l'acide lunularique [57] montre des déplacements chimiques similaires sauf pour les systèmes méthines portés par les carbones C-3, C-4 et C-6 qui diffèrent légèrement à cause des fonctionnalisations différentes du cycle aromatique

(Tableau 22). Cette comparaison vient appuyer le résultat de l'élucidation structurale de la vittatin (**183**).



**Figure 40 : Vittatin (183);** flèches : corrélations H→C visibles sur le spectre HMBC; liaisons en gras : corrélations  $^3 J_{H-H}$  visibles sur le spectre COSY

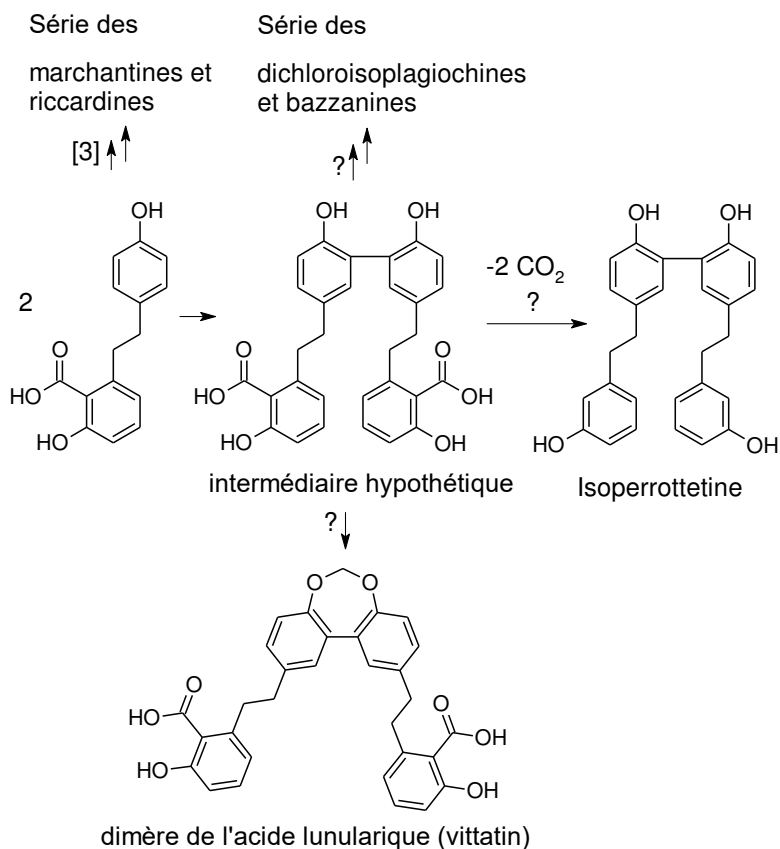
Les bis(bibenzyl)s sont des molécules assez répandues chez les hépatiques (bien que spécifiques de certains taxons). Cependant le composé (**183**) revêt un intérêt particulier d'un point de vue biosynthétique et chimiotaxonomique.

Sa structure symétrique et dimérique où chaque monomère possède les fonctions (phénol et acide carboxylique) de l'acide lunularique (**18**) (précurseur avéré des bis(bibenzyl) de la série des marchantines, cf. Figure 41) amène l'hypothèse que la vittatin (**183**) possède une structure très proche du premier précurseur des bis(bibenzyl) dans la biosynthèse.

Les bis(bibenzyl)s, tel que le composé (**183**), comportant une liaison C-C, de type méta-méta liant deux unités bibenzyls ne sont trouvés que dans les Jungermanniales : dans cinq genres appartenant au sous-ordre des Lophocoleineae et dans un genre (Jamesoniella) appartenant au sous-ordre des Cephaloziineae. Cela suppose l'hypothèse d'une proximité phylétique entre ces deux sous-ordres.

Cette répartition spécifique des bis(bibenzyl)s en fonction des liaisons entre les unités bibenzyls a été obtenue par compilation depuis l'inventaire des bis(bibenzyl)s issus des Marchantiophyta présenté dans le livre "chemical compounds of Bryophytes"[21]).

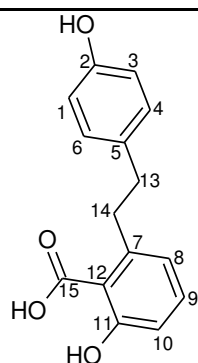
Un schéma de biosynthèse putatif de la « vittatin » (**183**) est proposé dans la Figure 41 où l'on suppose que "l'intermédiaire hypothétique" serait un précurseur des différents types de bis(bibenzyl) pour lesquels les unités bibenzyl sont liés par une liaison C-C de type méta-méta tels que l'isoperrottetine et vittatin (**183**). Ce schéma ne constitue qu'une proposition de voie biosynthétique dont les différentes enzymes et réactions à chaque étape restent à approfondir.



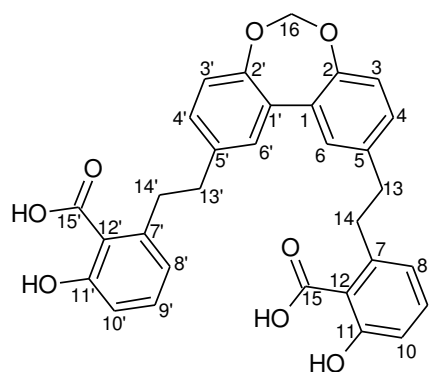
**Figure 41 : Schéma biosynthétique putatif de formation des bis(bibenzyl) incluant la vittatin (183)**

Notons que l'acide lunularique (**18**) présent dans la majorité des hépatiques [21] possède plusieurs propriétés biologiques notamment des effets inhibiteurs de croissance, des propriétés fongicide et des activité antihyaluronidase [94]. L'acide lunularique (**18**) possède aussi une activité prometteuse contre la drépanocytose [95]. Il serait donc intéressant de tester la vittatin (**183**) sur des cible biologique pour lesquelles l'activité de l'acide lunularique (**18**) est établie.





Acide lunularique (18)



Vittatin (183)

# C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		Corrélations* HMBC (H→C)	
	Exp.*	Litt.**	Exp*	Litt.***		
1	1'	6,70 (1H d, J = 8,6 Hz)	130,8	116,5		
2	2'		152,9	156,8		
3	3'	7,07 (1H, d, J = 8,2 Hz)	6,70 (1H, d, J = 8,6 Hz)	120,6	116,5	17, 5, 6
5	5'			137,8	135,0	
4	4'	7,17 (1H, dd, J = 8,2 ; 2 Hz)	7,00 (1H, d, J = 8,6 Hz)	128,7	130,8	2, 2, 13
6	6'	7,51 (1H, d, J = 2 Hz)	7,00 (1H, d, J = 8,6 Hz)	128,3	130,8	2, 4, 13
7	7'			140,9	146,5	
8	8'	6,76 (1H, d, J = 7,9 Hz)	6,78 (1H, d, J = 8,3 Hz)	120,4	123,8	14, 10, 12, 7, 11, 15, 9
9	9'	7,2 (1H, t, J = 7,9 Hz)	7,25 (1H, dd, J = 8,3 ; 8,3 Hz)	130,9	134,8	11, 7, 8, 3
10	10'	6,75 (1H, d, J = 7,9 Hz)	6,68 d (1H, d, J = 8,3 Hz)	114,0	116,6	12, 11, 15
11	11'			156,6	163,2	
12	12'			119,8	115,4	
13	13'	2,88 (2H, m)	2,76 (1H, t, J = 8,5 Hz)	36,6	40,9	5, 14, 7, 6, 4
14	14'	2,97 (2H, m)	3,14 (1H, t, J = 8,5 Hz)	36,2	39,2	7, 13, 5, 12, 8
15	15'			170,6	174,8	
16		5,55 (2H, s)		98,9		2

\*données RMN du dimère d'acide lunularique (183), expériences réalisées dans le d-DMSO

\*\* données RMN de l'acide lunularique (18), expériences réalisées dans le  $\text{CDCl}_3$

\*\* données RMN de l'acide lunularique (18), expériences réalisées dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

**Tableau 22 : Attribution des signaux RMN du dimère d'acide lunularique (183) et comparaison avec les données RMN de l'acide lunularique (18)**

### 3.3.2.11 *Bazzania* sp. AD211

Un échantillon non identifié a été mis sous l'appellation temporaire *Bazzania* sp. AD211 (MET039) en attendant la détermination taxonomique actuellement en cours. Les sesquiterpénoïdes sont majoritaires dans l'extrait analysé avec des pourcentages relatifs de 53,7% et 9,3% pour les composés sesquiterpéniques identifiés et non identifiés respectivement.

Le 4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène)-2-méthylènebicyclo[4.1.0]heptane (**179**) (18,8%) est le constituant majoritaire (proche du squelette monocyclofarnesane). L' $\alpha$ -pinguisène (**3**) (1,8%) a été aussi détecté.

Nous avons détecté cinq molécules dérivant du cation bisabolyl, avec : le  $\beta$ -chamigrène (**56**) (11,1%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (2,5%), le cuparène (**172**) (1,7%)  $\delta$ -cuprenène (**106**) (6,1%) et le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (2,1%). Ces quatre structures sont très liées au niveau biosynthétique car elles peuvent être obtenues par des réactions d'interconversion directes à partir du cation bisabolyl sans besoin d'autres intermédiaires cationiques (Tableau 31).

Deux composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl ont été détectés, il s'agit du viridiflorol (**63**) (5,3%) et de l' $\alpha$ -guaïol (**115**) (4,3%).

L'oxyde de 13-épi-manoyl (**158**) (11,5%) et le fusicocca-2,5-diène (**80**) (22,8%) sont les seuls composés diterpéniques identifiés dans cette plante.

### 3.3.2.12 *Bazzania* sp. AD212

Huit échantillons n'ont pas été identifiés à cause de caractères morphologiques ne correspondant pas exactement à un nom d'espèce et sont pour le moment rassemblés sous l'appellation *Bazzania* sp. AD212 car même s'ils n'ont pas été identifiés, leurs similarités morphologiques a permis à Monsieur Louis Thouvenot (botaniste spécialisé dans les hépatiques de Nouvelle-Calédonie) de faire ce premier regroupement temporaire.

Une analyse des résultats obtenus par CPG-FID-SM nous a permis de les classer en deux groupes d'échantillons : groupe 1 (G1, échantillons : MET064, 68, 72, 102, 117) et groupe 2 (G2, échantillons : MET110, 118, 124). Cette différenciation est en accord avec les analyses en composantes principales portant sur la distribution de squelettes sesquiterpéniques au sein des espèces de Lepidoziaceae étudiées (Figure 42). Les résultats concernant les composés diterpéniques de G2 ne figurent pas dans la Figure 43 à cause d'un trop fort pourcentage de diterpénoïdes indéterminés dans ce groupe. Les constituants détectés et identifiés dans ces groupements d'échantillons sont détaillés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

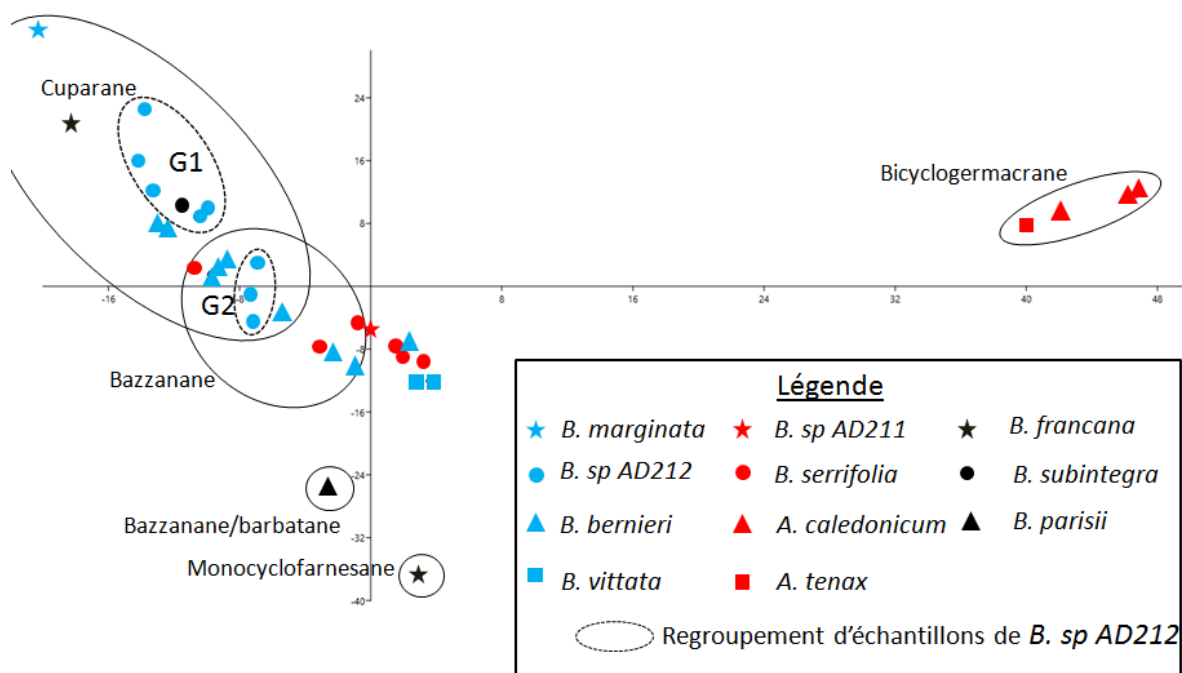


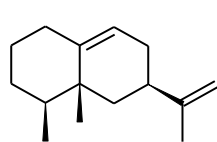
Figure 42 : ACP réalisée sur le type de sesquiterpènes contenu dans les Lepidoziaceae analysées

➤ Contenu volatil du groupe 1

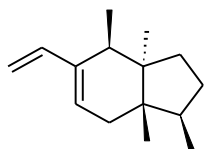
Les composés communs aux cinq échantillons du groupe 1 sont majoritairement des sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisaboyl : le (+)- $\beta$ -microbiotène (**148**) (4,7-36,6%), le  $\delta$ -cuprénène (**212**) (1-2,8%), le  $\beta$ -barbatène (**81**) (2,1-11,8%), l' $\alpha$ -chamigrène (**119**) (0,3-1,5%), le cuparène (**212**) (0,5-8,4%), le  $\gamma$ -cuprénène (**106**) (0,9-2,9%) et l' $\alpha$ -microbiotène (**149**) (1,6-9,1%) ont été détectés avec des pourcentages importants.

Le  $\gamma$ -maaliène (**114**) (2-12,2%) et le spathuléol (**46**) (0,4-9,5%) sont deux sesquiterpénoïdes communs à ces cinq échantillons. Seuls le  $\beta$ -barbatène (**81**), le  $\delta$ -cuprénène (**212**), le spathuléol (**46**) et le cuparène (**212**) ont été détectés dans au moins un échantillon du groupe G2.

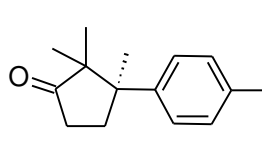
Deux isomères du (Z)-biformène ont été détectés : isomère 1 (**138**) (10,1-22,1%) et isomère 2 (**139**) (1,6-3,2%), ces diterpénoïdes sont absents du groupe G2.



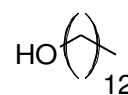
4,5-di-épi-aristolochène  
**185**



1-épi- $\alpha$ -pinguisène  
**186**



$\alpha$ -cuparènenone  
**187**



tridécanol  
**188**

L'allo-aromadendrène (**161**) (0-0,9%), l'isolépidozène (**111**) (0-7%), l' $\alpha$ -guaïol (**115**) (0-1,6%), l'éléma-1,3,7(11),8-tétraène (**112**) (0-1,1%), le 4,5-di-épi-aristolochène (**185**) (0-0,7%), le 1(10)-aristolène (**96**) (0-6,1%) et le viridiflorol (**63**) (0-3%) sont des composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl n'étant pas détectés dans tous les

échantillons du groupe 1. Il en est de même avec la détection du 1,7-di-épi- $\beta$ -cédrene (**128**) (0-0,9%), du  $\beta$ -bazzanène (**5**) (0-1%), de l' $\alpha$ -cuparène (**187**) (0-1,7%), du microbiotol (**150**) (0-2,5%) et du myltayl-8,12-ène (**126**) (0-1,6%), sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyl.

L'african-1-ène (**133**) (0-1,4%), le (E)-caryophyllène (**118**) (0-0,8%), le 4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-enylidène)-2-méthylène bicyclo[4.1.0]heptane (**179**) (0-0,9%), le 1-épi- $\alpha$ -pinguisène (**186**) (0-1,5%) et l' $\alpha$ -pinguisène (**3**) (0-3,2%) sont également détectés dans certains échantillons du groupe 1.

Les autres diterpénoïdes détectés sont le néophytadiène I (**53**) (0-0,9%) et II (**54**) (0-1%) ainsi que le fusicocca-2,5-diène (**80**) (0-4,9%).

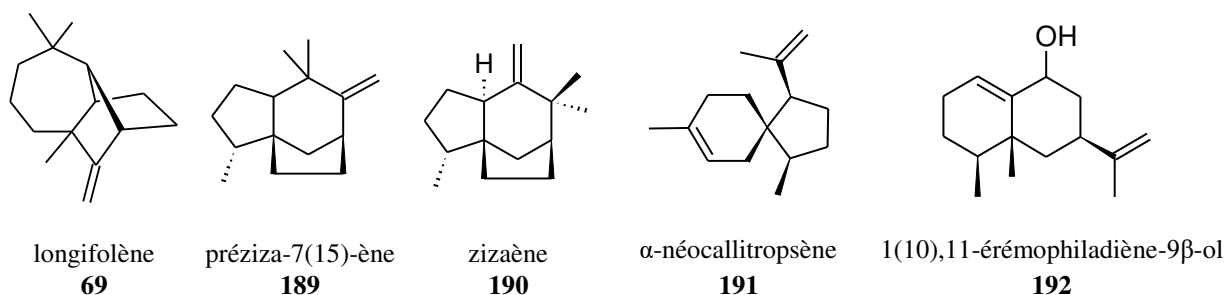
Les composés aliphatiques détectés sont le cis-9-eicosen-1-ol (**195**) (0-1,9%), deux alcools aliphatiques (0-4,6%), le tridécanol (**188**) (0-0,9%) et l'octénal (**197**) (0-1,2%). Le p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0-1,2%) est également détecté.

#### ➤ Contenu volatil du groupe 2

Le groupe 2 possède un taux de composés non identifiés relativement faible : de 0 à 4,7% pour les sesquiterpénoïdes et de 1,4 à 23,3% pour les diterpénoïdes.

Quatre sesquiterpénoïdes dérivant du cation bisabolyl ont été détectés dans tous les échantillons du groupe 2, avec : le  $\beta$ -bazzanène (**5**) (3,3-26,1%), l' $\alpha$ -herbertène isomère 2 (**168**) (6,9-16,4%), l'herbertène (**172**) (0,7-4,4%) et isomère 2 (**212**) (1-1,1%).

Sept composés sesquiterpéniques ont été détectés uniquement chez MET110, ce sont le driménol (**154**) (3,1%), le longifolène (**69**) (0,4%), le 4-épi- $\alpha$ -acoradiène (**123**) (0,5%), (+)-le  $\beta$ -herbertène (**171**) (0,3%) et le (-)- $\beta$ -herbertène (**89**) (0,3%), le préziza-7(15)-ène (**189**) (0,1%) et le zizaène (**190**) (0,1%), ces cinq derniers sont dérivés du cation bisabolyl.



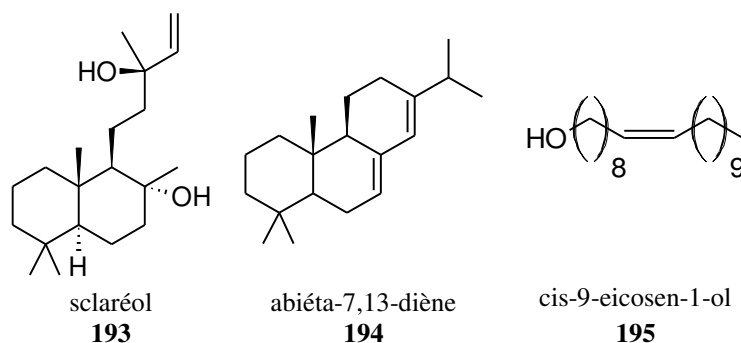
L' $\alpha$ -herbertène iso 2 (1,1%) est uniquement détecté chez MET118 alors que l'anastreptène (**104**) (4,2%) et l' $\alpha$ -néocallitropsène (**191**) (0,9%) ont été détectés uniquement chez MET124.

Le  $\beta$ -barbatène (**81**) (0-9,2%), le cis-thujopsène isomère 2 (**165**) (0-1,1%), le 1(10),11-érémophiladiène-9 $\beta$ -ol (**192**) (0-0,9%), le 4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-enylidène)-2-méthylènebicyclo [4.1.0]heptane (**179**) (0-1,7%), le spathuléol (**46**) (0-3%) et le  $\delta$ -cuprenène (**106**) (0-0,3%) ont été aussi détectés dans les échantillons du groupe 2.

Deux diterpénoïdes ont été détectés dans le groupe 2 mais pas dans le groupe 1, avec le (12Z)-abiénoïl (**169**) (3,4-4,7%) (utilisé en parfumerie [96]) et l'oxyde de 13-épi-manoyl (**158**) (1,9-7,4%).

L'échantillon MET110 se démarque de tous les autres par la présence de sclaréol (**193**) (8,4%). Ce diterpénoïde possède des activités biologiques intéressantes : il augmente l'efficacité du cis-Platine utilisé dans le traitement du cancer du poumon [97], est actif contre les Staphylocoques : *S. Aureus*, *S. epidermis* et *S. hominis* (CIM=0,1 mg/ml) [98]. Par ailleurs un isomère de ce composé, le 13-épi-sclaréol, possède une activité antiproliférative des cellules cancéreuses du sein avec une CI<sub>50</sub> de 11,06 µM sur les lignées cellulaires MCF-7 [99].

Le néophytadiène II (**53**) (0-1,4%) et l'abiéta-7,13-diène (**194**) (0-0,8%) ont été aussi détectés. Du p-éthoxybenzoate d'éthyle (**71**) (0,2%) a été détecté uniquement chez MET110.



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	B. p	B. d	B. sp AD212		B. sp AD211	B. francana			B. serrifolia		B. bernieri	
					G1	G2		MET106	MET065 MET062	MET032	G1	G2	G1	MET038
2,4-Patchouladiène (156)	1371,3	24,33	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-
Anastreptène (104)	1376,7	24,47	-	-	-	0-4,2	-	0-0,5	-	-	-	-	-	-
1-épi-α-Pinguisène (186)	1377,9	24,50	-	-	0-1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
African-1-ène (133)	1380,2	24,56	-	-	0-1,4	-	-	-	0,9	1,1	-	5,2-6,2	0-1,5	-
Cyclomyltaylane (129)	1382,6	24,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-2,9	-
African-2-ène (177)	1396,5	24,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2-0,2	-	-
β-Elémène (66)	1398,8	25,04	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
Aristol-1(2),9(10)-diène (162)	1425,6	25,69	-	-	-	-	-	0-0,7	-	-	-	-	-	-
α-Microbiotène (149)	1432,2	25,85	-	-	1,6-9,1	-	-	-	4,4	-	-	-	-	-
α-Barbatène (4)	1432,6	25,86	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Longifolène (69)	1433,1	25,87	-	-	-	0-0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-Caryophyllène (118)	1434,7	25,91	-	0,6	0-0,8	-	-	-	-	3,1	-	29,6-38	0-23,8	-
γ-Maaliène (114)	1440,5	26,05	-	-	2-12,2	-	-	-	11,9	-	-	-	-	-
Gymnomitr-3-en-ol (144)	1468,2	26,72	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-Thujopsène isomère 1 (164)	1402,1	25,12	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Pinguisène (142)	1444,6	26,15	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1(10)-Aristolène (96)	1445,5	26,17	-	-	0-6,1	-	-	-	5	-	-	-	-	-
α-Chamigrène (119)	1450,4	26,29	-	-	0,3-1,5	-	-	-	9,8	-	-	0,3-0,9	0-1,8	-
cis-Thujopsène isomère 2 (165)	1450,8	26,30	5,7	-	-	0-1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Pinguisène (3)	1458,7	26,49	-	14,5	0-3,2	-	1,8	-	1,7	-	-	0,3-0,5	-	-
β-Barbatène (81)	1466,5	26,68	17,8	-	2,1-11,8	0-9,2	2,5	0-1,6	8,5	0,7	-	0-1,5	1,1-4,2	-
α-Humulène (116)	1469	26,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-3,5	-	-
Myltayl-8,12-ène (126)	1469,8	26,76	-	-	0-1,6	-	-	-	1,8	0,8	0-0,4	0-6,3	0,9-3,5	1,0
Préziza-7(15)-ène (189)	1474,4	26,87	-	-	-	0-0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
allo-Aromadendrène (161)	1474,8	26,88	3,5	-	0-0,9	-	-	1-6,8	-	-	-	-	-	-
Zizaène (190)	1482,6	27,07	-	-	-	0-0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Striatène (152)	1486,8	27,17	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
4-épi-α-Acoradiène (123)	1487,2	27,18	-	-	-	0-0,5	-	-	-	-	-	-	0-0,6	-
α-Néocallitropsène (191)	1487,6	27,19	-	-	-	0-0,9	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau 23 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B. d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (1/3) \***

Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	B. p	B. d	B. sp AD212		B. sp AD211	B. francana			B. serrifolia		B. bernieri	
					G1	G2		MET065 MET062	MET10 6	MET032	G1	G2	G1	MET03 8
(+)-β-Microbiotène (148)	1494,6	27,36	-	-	4,7-36,6	-	-	-	29	-	-	-	-	-
Herbertène(172)	1497,1	27,42	-	-	-	0,7-4,4	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Chamigrène (56)	1497,5	27,43	6,5	-	-	-	11,1	-	-	-	0,6-1,1	0,9-3,4	-	-
Isolépidozène (111)	1500,4	27,50	-	-	0-7,0	-	-	-	-	-	0,4-0,8	-	-	-
4,5-di-épi-Aristolochène (185)	1502,2	27,54	-	-	0-0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobarbatène (175)	1514,8	27,83	-	-	-	-	-	-	-	0-0,6	-	-	-	-
β-Bisabolène (130)	1515,2	27,84	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0-0,6	-	-
α-Cuprénène (76)	1516,5	27,87	-	-	-	-	-	-	1,6	2,8	-	-	-	-
β-Himachalène (77)	1518,7	27,92	1	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-
cuparène (212)	1522,2	28	1,4	-	0,5-8,4	1-1,1	1,7	-	1,1	-	0-0,8	0,7-1,1	1,7-3,3	1,5
1,5,9-Triméthyl-1,5,9-cyclododécatriène (132)	1527,4	28,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-0,4	-
trans-Calaménène (176)	1529,1	28,16	-	-	-	-	-	-	-	-	0-0,6	-	-	-
1,7-Di-épi-β-cédrène (128)	1531,7	28,22	-	-	0-0,9	-	-	-	-	-	-	0,2-0,5	0-1,5	-
Germacrène B (163)	1531,7	28,22	-	-	-	-	-	0-1,9	-	-	-	-	-	-
β-Bazzanène (5)	1539,6	28,4	21,5	-	0-1,0	3,3-26,1	2,1	-	0,6	-	0-1,3	2,4-3,2	5,6-14,9	-
γ-Cuprénène (151)	1547,4	28,58	-	-	0,9-2,9	-	-	-	2	-	-	-	-	-
Khusien-12-al (135)	1548,7	28,61	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	1
Striatol (153)	1561,3	28,90	-	-	-	-	-	-	-	57,9	-	-	-	-
δ-Cuprénène (106)	1564,8	28,98	-	-	1,0-2,8	0,3	6,1	-	1,2	-	0,8-7,4	8,6-21,9	1,8-25,2	1,7
Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol (157)	1575,7	29,23	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-
4,4-Diméthyl-3-(3-méthylbut-3-enylidène)-2-méthylènebicyclo [4.1.0]heptane (179)	1591,7	29,60	-	-	0-0,9	0-1,7	18,8	-	-	-	-	-	-	-
Spathuléol (46)	1592,6	29,62	-	-	0,4-9,5	0-3	-	0,9-1,4	-	1	0-3,6	-	0,4-2	0,5
Furanodiène	1594,3	29,66	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viridiflorol (63)	1601,8	29,83	-	-	0-3,0	-	5,3	-	1,8	0,4	-	-	0-0,3	0,8
α-Guaiol (115)	1610	30,01	-	-	0-1,6	-	4,3	0-0,8	-	-	-	-	-	-
Humulène époxyde I (155)	1614,5	30,11	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
α-Bisabolène (121)	1625,3	30,35	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0-0,7	-

**Tableau 24 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (1/2).**

Attribution	l <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	B. p	B.d	B. sp AD212		B. sp AD211	B. francana			B. serrifolia		B. bernieri	
					G1	G2		MET065 MET062	MET106	MET032	G1	G2	G1	MET038
Microbiotol ( <b>150</b> )	1647,1	30,83	-	-	0-2,5	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-
Zier-13,14-dien-5-ol ( <b>160</b> )	1659,3	31,10	-	-	-	-	-	86-90,1	-	-	-	-	-	-
1(10),11-Erémophiladiène-9β-ol ( <b>192</b> )	1663,8	31,20	-	-	-	0-0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Cuparènone ( <b>187</b> )	1681	31,58	-	-	0-1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Bisabolol ( <b>127</b> )	1692,3	31,83	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7-0,7	0,4-1,1	-	-
Gymnomitr-3(15)-ène-4α-ol ( <b>59</b> )	1697,7	31,95	-	-	-	-	-	-	-	-	0-3,9	-	-	-
(+)-β-Herbertèno ( <b>171</b> )	1711,1	32,23	-	-	-	0-0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-Costol ( <b>146</b> )	1723,1	32,48	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Herbertèno isomère 1 ( <b>167</b> )	1723,1	32,48	-	-	-	0-1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Hydroxycalaménène ( <b>91</b> )	1726,4	32,55	-	-	-	-	-	-	-	-	0-1,7	-	-	-
α-Herbertèno isomère 2 ( <b>168</b> )	1746,2	32,96	0,7	-	-	6,9-16,4	-	-	-	-	-	-	-	-
4-épi-Marsupellol ( <b>134</b> )	1746,6	32,97	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4-1,6	-	-	2,8
Valérènal ( <b>94</b> )	1749,2	33,03	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naviculol ( <b>141</b> )	1751,9	33,08	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-
Eléma-1,3,7(11),8-tétraène ( <b>112</b> )	1754,3	33,13	-	-	0-1,1	-	-	-	-	-	-	-	0-0,8	1
Naviculol ( <b>141</b> )	1754,3	33,13	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Curcumèn-15-al ( <b>166</b> )	1770,7	33,47	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Albicanol ( <b>143</b> )	1775	33,56	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(-)-β-Herbertèno ( <b>89</b> )	1783,7	33,74	-	-	-	0-0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Drimèno ( <b>154</b> )	1788,5	33,84	-	-	-	0-3,1	-	-	-	3,6	-	-	-	-
Perhydrofarnesyl acétone ( <b>131</b> )	1843	34,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-0,4	1
total sesquiterpénoïdes			61	19,5	43,7-77,8	25,4-56,4	53,7	93,9-97,8	82,4	81	2,2-10,3	62,6-73,9	32,3-60	11,4
total sesquiterpénoïdes inconnus			2,5	<b>71,4</b>	0-5,5	0,9-7,2	9,3	0-3,9	1,2	14	3,5-8,9	0,8-0,8	0,3-1,4	13,6

**Tableau 25 : Pourcentages relatifs des sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces B. deplanchei (B.d), B. parisii (B. p), B. sp AD212, B. sp AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri (3/3).**



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	B. p	B. d	B. sp AD212		B. sp AD211	B. francana			B. serrifolia		B. bernieri	
					G1	G2		MET065 MET062	MET106	MET032	G1	G2	G1	MET 038
Abiéta-7,13-diène (194)	1804	34,16	-	-	-	0-0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Néophytadiène I (53)	1831	34,70	-	-	0-0,9	-	-	-	2,2	0,4	0-0,3	0-0,4	0-0,6	0,7
Néophytadiène II (54)	1838,5	34,85	-	0,1	0-1	0-1,4	-	-	-	-	-	-	0,3-0,9	-
Labda-7,13,14-triène (178)	1891	35,90	-	-	-	-	-	-	-	-	0-1	0-0,7	-	-
Sclarène (147)	1947,6	36,99	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-Biformène iso1 (138)	1999	37,97	-	-	10,1-22,1	-	-	0-0,4	8,9	0,4	0-1,7	2,3-2,8	3,5-7,5	0,7
Oxyde de 13-épi-manoyl (158)	2016,9	38,30	4,3	-	-	1,9-7,4	11,5	0,8-1,2	-	0,5	-	-	-	-
Fusicocca-2,5-diène (80)	2022,4	38,40	4,1	1,2	0-4,9	2,3-8,5	22,8	0,6-1	3,2	1,6	50,4-72,6	16,1-22,3	29,3-53,7	62,6
(Z)-Biformène iso2 (139)	2027,3	38,49	-	-	1,6-3,2	-	-	0-0,4	2,1	-	-	-	-	-
Oxyde de manoyl (159)	2037,7	38,68	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
Fusicocca-3,5-diène (140)	2057,9	39,05	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0-0,2	0-0,4	1,1
Sclaréol (193)	2124,7	40,25	-	-	-	0-8,4	-	-	-	-	-	-	-	-
(12Z)-Abièol (169)	2194,3	41,46	10,7	-	-	3,4-4,7	-	-	-	-	-	-	-	-
total diterpénoïdes identifiés			19,1	1,7	17,2-26,8	7,9-22,8	34,3	2,1-2,2	16,4	3,2	50,4-74,7	18,4-26,3	34,6-60,8	65,1
total diterpénoïdes non identifiés			15,5	7,4	1,4-23,3	34,3-44,6	2,7	-	-	0,7	11,1-29,7	6,9-10,4	2,7-7,1	4
Octènal (197)	1393,4	24,90	-	-	0-1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Ethoxybenzoate d'éthyle (71)	1526,5	28,1	0,5	-	0-1,2	0-0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1-(2-Benzoyloxyéthyl) cyclohexène (136)	1606,8	29,94	-	-	-	-	-	-	-	-	0-1,7	-	0-0,8	2,9
1,5-diphényl-1,4-pentadien-3-one (170)	1639,4	30,66	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcane non identifié	1701	32,02	-	-	0-0,2	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-
Alcane non identifié	1747,1	32,98	-	-	0-0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2-méthylène-cyclohexyl)-phényl-méthanol (137)	1765,4	33,36	-	-	-	-	-	-	-	-	0-1,8	-	0-0,7	3,1
tridécanol (188)	1795,2	33,98	-	-	0-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcool aliphatique (	1883,5	35,75	-	-	0-2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-9-Eicosen-1-ol(195)	2062,8	39,14	-	-	0-1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcool aliphatique	2084,2	39,53	0,6	-	0-2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
total non terpénique			2	-	0-5,5	0-0,2	-	-	-	1,1	0,6-3,4	-	0,3-1,5	6

**Tableau 26 : Pourcentages relatifs des composés non sesquiterpéniques détectés dans les espèces *B. deplanchei* (B.d), *B. parisii* (B. p), *B. sp AD212*, *B. sp AD211*, *B. francana*, *B. serrifolia* et *B. bernieri*.**

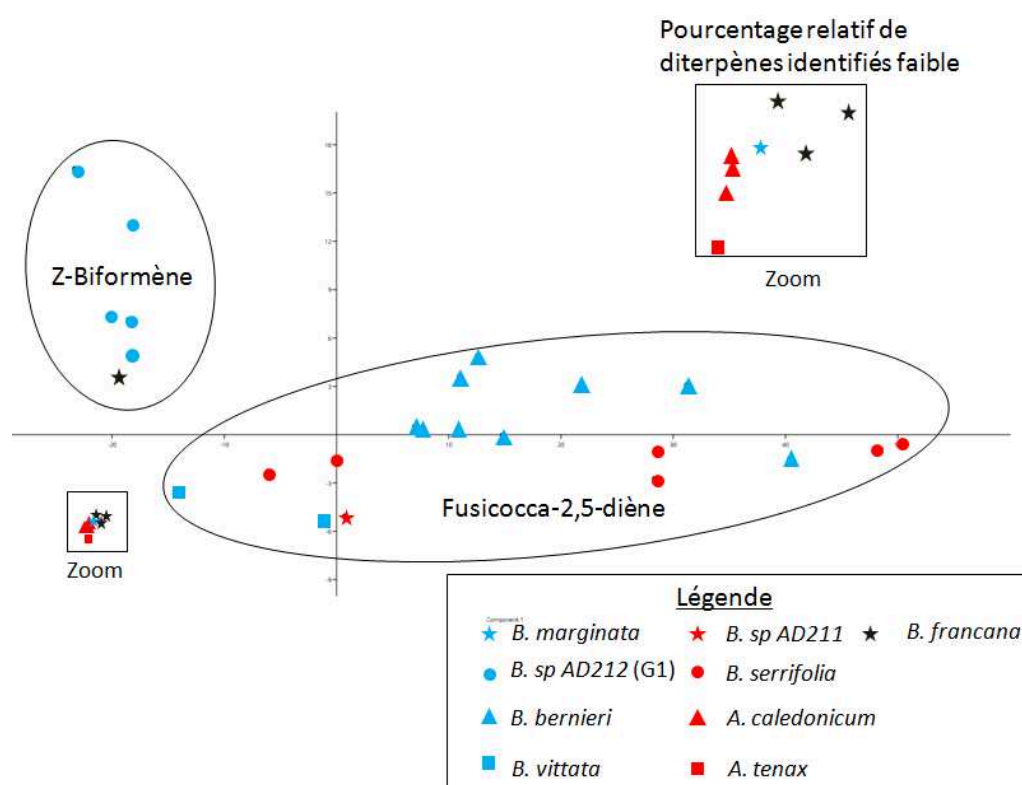
Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	B. m	B. s	B. v	A. t	A. c
(+)-Acora-3,7(14)-diène (122)	1425,6	25,69	-	-	-	-	0,8-1,4
(E)-Caryophyllène (118)	1434,7	25,91	-	-	-	-	0,6-1,7
γ-Maaliène (114)	1440,5	26,05	-	-	-	-	0,3
α-Chamigrène (119)	1450,4	26,29	-	-	-	1,1	1,2-3,9
α-Pinguisène (3)	1458,7	26,49	-	-	1,8-10,1	-	-
α-Humulène (116)	1469	26,74	-	-	-	-	8-13,4
allo-Aromadendrène (161)	1474,8	26,88	-	-	0-2,1	-	-
4-épi-α-Acoradiène (123)	1487,2	27,18	-	-	-	-	0,5-0,6
Herbertène(172)	1497,1	27,42	1	-	-	-	-
β-Chamigrène (56)	1497,5	27,43	-	-	-	-	5,6-7,2
Isolépidozène (111)	1500,4	27,50	-	-	-	51,5	41-49
cis-γ-Bisabolène (120)	1513,9	27,81	-	-	-	-	1,6-2
β-Longipinène (244)	1521,7	27,99	-	-	-	-	3,4-3,8
Ar-himachalène (174)	1546,5	28,56	0,2	-	-	-	-
δ-Cuprénène (106)	1564,8	28,98	-	-	0-1,3	-	-
Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol (157)	1575,7	29,23	-	-	-	-	-
Vétisélinénol (181)	1576,5	29,25	-	-	0-2,2	-	-
8α-Hydroxy-eudesma-3,11-diène (180)	1584,8	29,44	-	-	2,9-3,4	-	-
4,4-Diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène)-2-méthylènebicyclo[4.1.0]heptane (179)	1804	29,60	-	-	14-16	-	-
Spathuléol (46)	1831	29,62	1	-	-	10,6	0,8-2,3
Viridiflorol (63)	1838,5	29,83	-	-	10,8-13,5	-	-
α-Guaiol (115)	1891	30,01	-	-	7,4-10	-	0-0,4
α-Bisabolène (121)	1947,6	30,35	-	-	-	-	0,3-2,5
(+)-β-Herberténol (171)	1999	32,23	0,3	7,5	-	-	-
7-isopropyl-4a-methyloctahydro-2(1H)-naphthalène (113)	2016,9	32,28	-	-	-	-	1,2-2,9
α-Herberténol iso 2 (167)	2022,4	32,48	-	12,1	-	-	-
α-Herberténol isomère 2 (168)	2027,3	32,96	0,5	9,7	-	-	-
Eléma-1,3,7(11),8-tétraène (112)	2037,7	33,13	-	-	-	11,2	1,4-5,8
(-)-β-Herberténol (89)	2057,9	33,74	95,9	-	-	-	-
Ar-himachalène-2-ol (173)	2124,7	34,52	0,2	-	-	-	-
total sesquiterpénoïdes			99,1	29,3	47,2-48,1	74,4	74,6-87
total sesquiterpénoïdes indéterminés			-	-	12-12,6	4,9	10,8-16,4
Néophytadiène I (53)	1831	34,70	0,3	-	3,4-13	0,7	0,3-1,8
Néophytadiène II (54)	1838,5	34,85	-	-	0-6,8	1,8	0,9-5,3
Néophytadiène III (95)	1863,5	35,35	-	-	-	0,3	-
(Z)-Biformène iso1 (138)	1999	37,97	-	-	0-2,2	-	-
Oxyde de 13-épi-manoyl (158)	2016,9	38,30	-	11,5	-	-	-
Fusicocca-2,5-diène (80)	2022,4	38,40	0,3	16,8	8,2-21	-	-
(-)-Kaur-16-ène (108)	2073,2	39,33	-	-	-	6,7	0-1,2
Kaur-16-en-19-ol (124)	2388,5	44,86	-	-	-	7,5	0-1,5
total diterpénoïdes			0,6	28,2	20,5-34	17	1,3-7,1
total diterpénoïdes non identifiés			-	42,5	0-11,1	3,2	0,3-1,2
Alcane non identifié	1490,1	27,25	-	-	0-0,4	-	-
p-Ethoxybenzoate d'éthyle (71)	1526,5	28,1	-	-	3,5-6,7	0,5	-
4,7-Octadécadiynoate de méthyl (125)	1688,2	31,74	-	-	-	-	0,7-1,5
Alcane non identifié	1701	32,02	0,1	-	-	-	-
alcool aliphatique	1994,8	37,89	0,2	-	-	-	-
alcool aliphatique	2084,2	39,53	-	-	0-3,8	-	-
total non sesqui-, diterpénoïdes			0,3	-	6,7-7,7	0,5	0,7-1,5

**Tableau 27 : Pourcentages relatifs des composés volatils détectés dans les espèces *B. marginata* (*B. m*), *B. subintegra* (*B. s*), *B. vittata* (*B. v*), *A. tenax* (*A. t*) et *A. caledonicum* (*A. c*)**

### 3.3.3 Discussion

L'analyse en composantes principales portant sur le contenu diterpénique des espèces étudiées de la sous-famille des Bazzanioideae a été effectuée et les résultats sont illustrés par la Figure 43 ci-dessous. Cette analyse prend en compte chaque diterpénoïde identifié et son pourcentage relatif. Plusieurs échantillons comportant trop de diterpénoïdes non identifiés sont exclus de cette analyse, c'est le cas du groupe de *B. sp.* AD212, *B. subintegra* et *B. parisii*.

Il en résulte une nette discrimination du groupe 1 de *B. sp.* AD212 et avec un échantillon de *B. francana* (MET106) d'une part et d'autre part les espèces *B. bernieri*, *B. serrifolia*, *B. vittata* et *B. sp.* AD211. Cette partition est fondée sur l'abondance de deux diterpénoïdes : le (Z)-biformène et le fusicocca-2,5-diène.

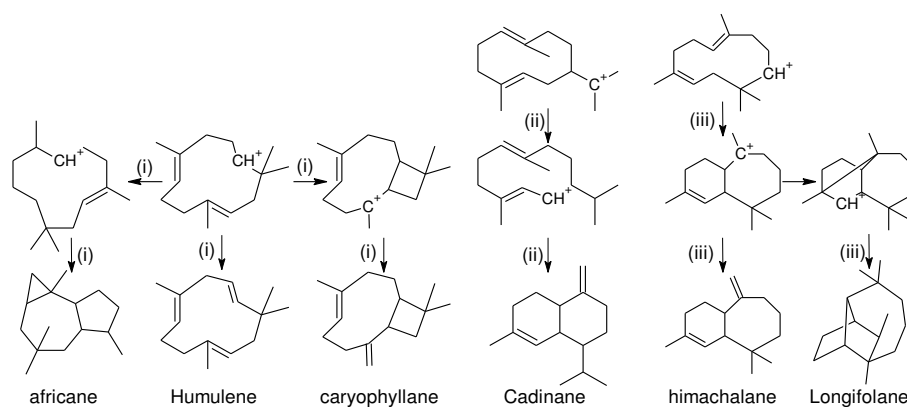


**Figure 43 : ACP réalisée sur les molécules diterpéniques détectées dans les Lepidoziaceae analysées**

La majorité des structures sesquiterpéniques détectées dans la littérature pour le genre *Bazzania* sont de type bazzanane, cuparane, barbatane, aromadendrane, bicyclogermacrane, calaménane, drimane, chamigrane, pinguisane, myltaylane et cyclomyltaylane [100]. Nos résultats sont cohérents avec ces données de la littérature mis à part pour les sesquiterpénoïdes de type bicyclogermacrane, calaménane et drimane qui ne semblent pas répandus dans les espèces de *Bazzania* de Nouvelle-Calédonie. A ce jour, aucune donnée relative à la phytochimie n'a été reportée dans la littérature concernant le genre *Acromastigum*. Ainsi à notre connaissance, les travaux ci-présentés constituent la première étude phytochimique réalisée pour ce genre.

L'isolépidozène (**111**) a été détecté dans quelques échantillons de *B. sp.* (AD212) et deux échantillons de *B. serrifolia* néanmoins l'isolépidozène (**111**) semble être un bon biomarqueur pour le genre *Acromastigum* (40,8-51,2% pour *A. tenax* et *A. caledonicum*). L'analyse ACP (Figure 42) montre clairement que la teneur élevée en composés sesquiterpéniques de type bicyclogermacrane est une caractéristique permettant de bien distinguer le genre *Acromastigum* du genre *Bazzania*, bien que seuls deux espèces du genre *Acromastigum* ont pu être analysées.

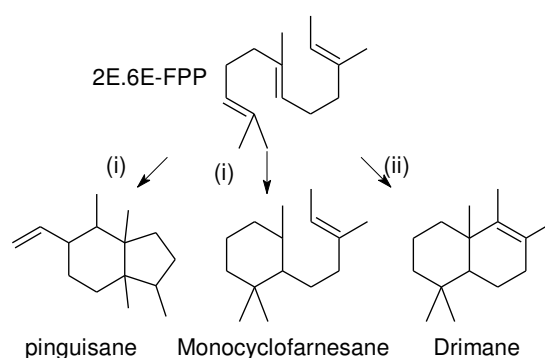
Le type calaménane, considéré comme un chimiotype important pour plusieurs espèces du genre *Bazzania* originaire du Japon [39], est le seul type de sesquiterpène appartenant au cation (Z,E)-germacradiényl détecté dans la présente étude (Tableau 28). Un sesquiterpène de type calaménane a été détecté avec un pourcentage relatif modéré dans un seul échantillon de *B. serrifolia* (sur les six échantillons de *B. serrifolia* qui ont été étudiés). Ce constat montre une différence nette de la chimiodiversité au niveau du genre *Bazzania* de Nouvelle-Calédonie et du Japon.



Espèces	Plantes	Cation (E-E)-humulyl			Cation (Z-E)-germacradiényl	Cation (Z-E)-humulyl	
		Afri.	Hum.	Car.	Calaménane	Longifolane	Himachalane
<i>B. parisii</i>		-	-	-	-	-	1,0
<i>B. sp.</i> AD212	G1	0-1,4	-	0-0,8	-	-	-
	G2	-	-	-	-	0-0,4	-
<i>B. sp.</i> AD211		-	-	-	-	-	-
<i>B. marginata</i>		-	-	-	-	-	0,4
<i>B. deplanchei</i>		-	-	0,6	-	-	-
<i>B. subintegra</i>		-	-	-	-	-	-
<i>B. vittata</i>		-	-	-	-	-	-
<i>B. francana</i>	MET065, 062	-	-	-	-	-	-
	MET106	0,9	-	-	-	-	-
	MET032	1,1	1,0	3,1	-	-	-
<i>B. serrifolia</i>	G2	-	-	-	0-2,3	0,4-1,6	-
	G1	5,4-6,5	0-3,5	<b>29,6-38,0</b>	-	-	0-0,7
<i>B. bernieri</i>	G1	0-1,5	-	0-23,8	-	-	-
	MET038	-	-	-	-	2,8	-
<i>A. tenax</i>		-	-	-	-	-	-
<i>A. caledonicum</i>		-	8,0-10,1	0,6-1,3	-	3,4-3,8	-

**Tableau 28 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliées aux cations (E-E)-humulyl, (Z-E)-germacradiényl et (Z-E)-humulyl (pourcentage relatif). Afri. : africane, Hum. : humulane, Car. : caryophyllane((i) : [101], (ii) : [68], (iii) : [29])**

Ainsi, le chimiotype calaménane semble être rare pour les *Bazzania* néo-calédoniennes. En outre, aucune espèce de *Bazzania* étudiée dans nos travaux n'appartient au deuxième chimiotype décrit pour les espèces de *Bazzania*, à savoir le type albicanyl cafféate-cuparane. Cependant beaucoup d'espèce du genre *Bazzania* investiguées semblent proches du chimiotype II de par le pourcentage important de sesquiterpénoïdes de type cuparane (Tableau 31). C'est le cas de *B. sp. AD212* (12,3-40,6%), *B. sp. AD211* (7,8%), *B. subintegra* (29,3%), *B. marginata* (97,7%), *B. francana* (MET106 : 40,4%), *B. serrifolia* (G1, 9,3-23) et *B. bernieri* (3,5-28,6%). Cela laisse supposer qu'un chimiotype II "nuancé" ne prenant en compte que le type cuparane serait une plus appropriée pour caractériser les *Bazzania* de Nouvelle-Calédonie.



Espèces	Plantes	Cation farnesyl			
		Pinguisane	Monocyclofarnesane	Drimane	Farnesane
<i>B. parisii</i>		-	-	-	-
<i>B. sp. AD212</i>	G1	0-4,7	0-0,9	-	-
	G2	-	0-1,7	0-3,1	-
<i>B. sp. AD211</i>		1,8	18,8	-	-
<i>B. marginata</i>		-	-	-	-
<i>B. deplanchei</i>		15,8	-	1,8	-
<i>B. subintegra</i>		-	-	-	-
<i>B. vittata</i>		1,8-10,1	13,9-16,0	-	-
<i>B. francana</i>	MET065, 062	-	-	-	-
	MET106	1,7	-	-	-
	MET032	3,6	58,8	3,6	-
<i>B. serrifolia</i>	G2	-	-	-	-
	G1	0,3-0,4	-	-	-
<i>B. bernieri</i>	G1	-	-	-	0-0,4
	MET038	-	-	-	1,0
<i>A. tenax</i>		-	-	-	-
<i>A. caledonicum</i>		-	-	-	-

**Tableau 29 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques de type pinguisane, monocyclofarnesane, Farnesane et drimane (pourcentage relatif) ((i) : [21],(ii) : [102])**

Les espèces de *Bazzania* : *B. sp. (AD211)*, *B. vittata* et un échantillon de *B. francana* (MET032) sont caractérisées par un pourcentage élevé en sesquiterpénoïdes de type monocyclofarnesane (Tableau 29).

Le Tableau 30 montre la répartition des structures issues du cation (E-E) germacradiényl, on peut constater que le squelette aromadendrane est présent dans quasiment tous les échantillons. Cette structure n'a pas été détectée chez *B. subintegra* et le groupe 1 de *B. serrifolia*, ces échantillons ne contiennent pas ou contiennent très peu de composés dérivant du cation (E-E) germacradiényl.

Dans cette voie de biosynthèse sesquiterpénique mettant en jeu le cation (E-E) germacradiényl, le genre *Acromastigum* se démarque par un fort pourcentage de sesquiterpénoïdes de type bicyclogermacrane ainsi que deux échantillons de *B. francana* (MET062 et MET065) qui se distinguent par la présence d'un composé sesquiterpénique de type zierane.

Bien que les espèces d'*Acromastigum* sont caractérisées par des sesquiterpénoïdes de type bicyclogermacrane et une faible quantité de diterpénoïdes. Les diterpénoïdes de type kaurane pourraient être considérés comme des biomarqueurs permettant de différencier *A. tenax* et *A. caledonicum*.

Pour les sesquiterpénoïdes appartenant à la voie du cation bisaboyl, dans la plupart des cas, lorsque des composés de type barbatane et bazzanane ont été détectés, le type cuparane a également été détecté. Le même constat a été observé pour le type cédrane et acorane. Cela pourrait s'expliquer par la proximité de ces structures d'un point de vue biosynthétique (Tableau 31). La même observation a été faite concernant la présence de sesquiterpénoïdes de type maaliane, aristolane et aromadendrane (Tableau 30).

On peut émettre l'hypothèse d'une proximité phylogénique entre *B. parisii* (pour laquelle les pourcentages relatifs de sesquiterpénoïdes de type barbatane et bazzanane sont de 19,4 et 21,4% respectivement) et sept espèces de *Bazzania* collectés au Japon (*B. bidentula*, *B. japonica*, *B. pompeana*, *B. tricrenata*, *B. tridens*, *B. trilobata* et *B. yoshinagana*) pour lesquelles les biomarqueurs sont des sesquiterpénoïdes de type barbatane et bazzanane [39].

La littérature a montré que le précurseur du type sesquiterpénique thujopsane peut être un cation cuparényl et / ou chamigranyl [69]. Cependant, dans *A. caledonicum*, un pourcentage relatif considérable de sesquiterpénoïde de type chamigrane et thujopsane a été détecté, mais aucun sesquiterpène de type cuparane, ce qui laisse suggérer que les composés sesquiterpéniques de type thujopsane pourraient être produits via le cation chamigranyl plutôt qu'avec le cation cuparényl pour les espèces d'*Acromastigum*.

Nous avons remarqué que deux échantillons de *B. serrifolia* (MET099 et MET092) partagent beaucoup de caractéristiques communes avec *B. bernieri* telles que la quantité élevée de sesquiterpénoïdes de type caryophyllane et la présence des types chamigrane, cédrane et bisabolane (ces quatre structures sont absentes des autres échantillons de *B. serrifolia*).

A contrario, un échantillon de *B. bernieri* (MET038) partage beaucoup de caractéristiques avec les autres échantillons de *B. serrifolia*, comme l'absence de sesquiterpènes des types caryophyllane, chamigrane, cédrane et bisabolane (ces quatre structures sont présentes dans

les autres échantillons de *B. bernieri*). Ces données pourraient indiquer une proximité très importante entre les espèces *B. bernieri* et *B. serrifolia*.

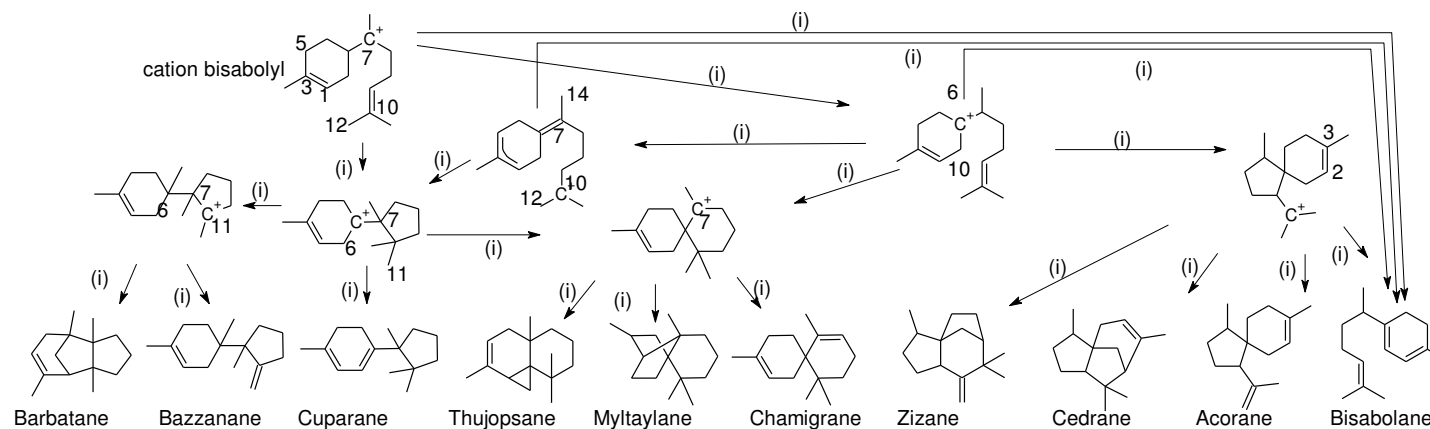
La présence importante de diterpénoïdes de type fusicoccane semble être spécifique aux *Bazzania* de Nouvelle-Calédonie puisque les composés de cette structure sont rares chez les *Bazzania* d'autres origines géographiques. Les espèces du genre *Bazzania* de Nouvelle-Calédonie sont caractérisées principalement par un pourcentage relatif considérable de composés diterpéniques de type fusicoccane et sesquiterpéniques de type cuparane.

Nous vous présentons dans les Tableaux 32 et 33 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des Lepidoziaceae.

Espèce	Cation (E-E)-germacradienyl											
	Plantes		Maaliane	Ari.	Aro.	Zierane	Elémane	Germacrane	BG	Eudesmane	Valancane	Guaiane
<i>B. parisii</i>		-	-	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. sp. AD212</i>	G1	2,0-12,2	-	0,4-10,7	-	0-1,1	-	0-7	-	0,7-6,1	0-1,6	-
	G2	-	-	0,8-4,2	-	-	-	-	-	0-0,9	-	-
<i>B. sp. AD211</i>		-	-	5,3	-	-	-	-	-	-	4,3	-
<i>B. marginata</i>		-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. deplanchei</i>		-	-	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-
<i>B. subintegra</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. vittata</i>		-	-	12,9-13,4	-	-	-	-	2,9-5,5	-	7,4-10,0	-
<i>B. francana</i>	MET065,62	-	-	1,9-8,7	<b>56,0-90,1</b>	-	0-1,9	-	-	-	0-0,8	-
	MET106	11,9	-	1,8	-	0,3	-	-	-	5,0	-	-
	MET032	-	-	1,4	-	-	-	-	1,0	0,6	-	1,5
<i>B. serrifolia</i>	G2	-	-	0-3,6	-	-	-	-	-	-	-	-
	G1	-	-	-	-	-	-	0,4-0,8	-	-	-	-
<i>B. bernieri</i>	G1	-	-	0,4-2,3	-	0-0,8	-	-	-	-	-	-
	MET038	-	-	1,3	-	1,0	-	-	-	1,0	-	-
<i>A. tenax</i>		-	-	10,6	-	11,2	-	51,5	-	-	-	-
<i>A. caledonicum</i>		0-0,3	-	1,0-2,3	-	1,4-5,8	-	<b>41,0-44,9</b>	-	-	-	-

**Tableau 30 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradienyl. Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane ((i) : [27], (ii) : [68], (iii) : [101])**





Espèces	cation Bisaboyl										
	Plantes	Barbatane	Bazzanane	Cuparane	Thujopsane	Myltaylane	Chamigrane	Zizane	Cédrane	Acorane	Bisabolane
<i>B. parisii</i>		19,4	21,4	2	5,7	-	6,4	-	-	-	1,4
<i>B. sp. AD212</i>	G1	2,1-11,8	0-1,0	24,1-40,6	-	0-1,6	0,3-1,5	-	-	0-0,9	-
	G2	0-9,2	3,3-26,1	12,3-19,1	0-1,1	-	-	0-0,2	-	0-0,9	-
<i>B. sp. AD211</i>		2,5	2,1	7,8	-	-	11,1	-	-	-	-
<i>B. marginata</i>		-	-	97,7	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. deplanchei</i>		0,3	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
<i>B. subintegra</i>		-	-	29,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. vittata</i>		-	-	0-1,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. francana</i>	MET065, 62	0-1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MET106	8,5	0,6	40,4	-	1,8	9,8	-	-	-	-
	MET032	0,7	-	2,9	-	0,8	-	-	-	-	1,0
<i>B. serrifolia</i>	G2	0-4,5	0-1,3	0,8-8,2	-	0-0,4	-	-	-	-	-
	G1	0-1,5	2,4-3,2	9,3-23	-	0-6,3	0,9-2,0	-	0,2-0,5	-	0,7-0,9
<i>B. bernieri</i>	G1	1,1-4,2	5,6-14,9	3,5-28,6	-	0,9-6,3	0,9-5,0	-	0,0-1,5	0-0,6	0,6-2,0
	MET038	-	-	3,2	-	1,0	-	-	-	-	-
<i>A. tenax</i>		-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-
<i>A. caledonicum</i>		-	-	-	-	-	6,8-10,2	-	-	1,3-2,0	2,4-4,0

Tableau 31 : Composition des espèces de Bazzanioideae en composés sesquiterpéniques affiliés au cation Bisaboyl (i) : [69]

Espèce	Code	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	% identifiés		Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires		Composés caractérisés par RMN	caractéristiques
			S.	D.	S.	D.		
A. tenax	116	(E-E) Ger. (73,3%, 3) Bisabolyl (1,1%, 1)	74,4	17	isolépidozène ( <b>111</b> ) (51,5%) éléma-1,3,7(11),8-tétraène ( <b>112</b> ) (11,2%) spathuléol ( <b>46</b> ) (10,6%)			
A. caledonicum	109B	(E-E) Ger. (50,2-53,3%,4-5) Bisabolyl (12,2-15,1%,6-6) (E-E) Hum. (8,6-15,2%,2-2) (Z-E) Hum. (3,4-3,8%,1-1)	74,6-87	1,3-7,1	isolépidozène ( <b>111</b> ) (41-49%), $\alpha$ -humulène ( <b>116</b> ) (8-13,4%) $\beta$ -chamigrène ( <b>56</b> ) (5,6-7,2%)		Diterpénoïdes de type kaurane (2,7%)	Sesquiterpénoïdes de type <b>lépidozane</b>
B. parisii	109A	Bisabolyl (56,5%, 8) (E-E) Ger. (3,5%, 1) (Z-E) Hum. (1%, 1)	61	19,1	$\beta$ -bazzanène ( <b>5</b> ) (21,5%), $\beta$ -barbatène ( <b>81</b> ) (17,8%)		(12Z)-abiénoïl ( <b>169</b> ) (10,7%)	Sesquiterpénoïdes de type <b>bazzanane</b> et <b>barbatane</b>
B. sp. AD212 G2	G2	Bisabolyl (22,4-49,6%,5-12) (E-E) Ger. (1,1-5,1%,1-2) Autre (0-3,1%,0-1) (Z-E) Hum. (0-0,4%,0-1)	25,4-56,4	7,9-22,8	$\beta$ -bazzanène ( <b>5</b> ) (3,3-26,1%) $\alpha$ -herberténol isomère 2 ( <b>168</b> ) (6,9-16,4%)		oxyde de 13-épi-manoyl ( <b>158</b> ) 1,9-7,4%) fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (2,3-8,5%)	Sesquiterpénoïdes de type <b>bazzanane</b> et <b>herbertane</b>
B. marginata	048	Bisabolyl (97,7%, 4) (E-E) Ger. (1%, 1) (Z-E) Hum. (0,4%, 2)	99,1	0,6	(-)- $\beta$ -herberténol ( <b>171</b> ) (95,9%)		(-)- $\beta$ -herberténol ( <b>171</b> )	Sesquiterpénoïdes de type <b>herbertane</b>
B. subintegra	100	Bisabolyl (29,3%, 3)	29,3	28,2	$\alpha$ -herberténol isomère 1 ( <b>167</b> ) (12,1%) $\alpha$ -herberténol isomère 2 ( <b>168</b> ) (9,7%)		M=288, 95, 107(80) (17,67%) M $\geq$ 286, 95, 107 (90) (16,1%)	diterpénoïdes indéterminés et sesquiterpénoïdes de type <b>herbertane</b>
B. sp. AD212 G1	G1	Bisabolyl (29,7-55,4%, 7-12) (E-E) Ger. (14-26%, 4-8) Autre (0-5,5%,0 -3)	43,7-77,8	17,2-26,8	(+) $\beta$ -microbiotène ( <b>148</b> ) (4,7-36,6%) $\beta$ -barbatène ( <b>81</b> ) (2,1-11,8%) $\gamma$ -maaliène ( <b>114</b> ) (2-12,2%)		sclaréol ( <b>193</b> ) (8,4%) (Z)-biformène isol ( <b>138</b> ) (10,1-22,1%)	diterpénoïde de type <b>labdane</b> / sesquiterpène de type <b>microbiotane</b>
	106	Bisabolyl (61%, 11) (E-E) Ger. (18,9%, 4) Autre (1,7%, 1) (E-E) Hum. (0,9%, 1)	82,4	16,4	(+) $\beta$ -microbiotène ( <b>148</b> ) (29%) $\alpha$ -chamigrène ( <b>119</b> ) (9,8%) $\gamma$ -maaliène ( <b>114</b> ) (11,9%)		biformènes : 11%	
B. francana	032	Autre (66%, 4) Bisabolyl (5,2%, 4) (E-E) Hum. (5,2%, 3) (E-E) Ger. (4,6%, 5)	81	3,2	striatol ( <b>153</b> ) (57,9%)			Sesquiterpénoïdes de type <b>striatane</b>
	065	(E-E) Ger. (93,9-96,1%, 4-6) Bisabolyl (0-1,6%, 0-1)	93,9-97,8	2,1-2,2	zier-13,14-dien-5-ol* ( <b>160</b> ) (86-90,1%),		zier-13,14-dien-5-ol* ( <b>160</b> ) spathuléol ( <b>46</b> )	Sesquiterpénoïdes de type <b>zierane</b>

**Tableau 32 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lepidoziaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) \* : nouveau composé (1/2)**

Espèces	Code (MET)	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	%identifiés		Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires		Composés caractérisés par RMN	Caractéristiques
			S.	D.	Sesquiterpénoïdes			
B. sp AD211	039	Bisabolyl (23,5%, 5) Autre (20,7%, 2) (E-E) Ger. (9,5%, 2)	53,7	34,3	4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène)- 2-méthylènebicyclo[4,1,0]heptane ( <b>179</b> ) (18,8%) le $\beta$ -chamigrène ( <b>56</b> ) (11,1%)	oxyde de 13-épi-manoyl ( <b>158</b> ) (11,5%) fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (22,8%)		fusicocca-2,5-diène
B. vittata	060	(E-E) Ger. (23,1-29%,4-4) Autre (17,8-24,1%,2-2) Bisabolyl (0-1,3%,0-1)	47,2-48,1	20,5-34	4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène)- 2-méthylènebicyclo[4,1,0]heptane ( <b>179</b> ) (14-16%) $\alpha$ -guaïol ( <b>115</b> ) (7,4-10%) viridiflorol ( <b>63</b> ) (10,8-13,5%),	fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (8,9-21%)	bis(bibenzyl) : vittatin* ( <b>183</b> )	sesquiterpénoïdes de type monocyclofarnesane
B. serrifolia	G2	Bisabolyl (0,8-9,5%,1-4) (E-E) Ger. (0-3,6%,0-1) (Z-E) Ger. (0-2,3%,0-2) (Z-E) Hum. (0,4-1,6%,1-1)	2,2-10,3	50,4-74,7	$\delta$ -cuprénène ( <b>151</b> ) (8,6-21,9%)	fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (16,1-22%)		
	G1	(E-E) Hum. (35-47,9%,3-4) Bisabolyl (13,5-37,4%,7-10) (E-E) Ger. (0,4-0,8%,1-1) Autre (0,3-0,5%,1-1) (Z-E) Hum. (0-0,7%,0-1)	62,6-73,9	18,4-26,3	(E)-caryophyllène ( <b>118</b> ) (29,6-38%), african-1-ène ( <b>133</b> ) (5,2-6,2%)	fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (50,4-72,6%)		fusicocca-2,5-diène
B. bernieri	063	Bisabolyl (22,8-51,2%,8-13) (E-E) Hum. (0-25,3%,0-2) (E-E) Ger. (0,4-2,3%,1-2) Autre (0-0,4%,0-1) (Z-E) Ger. (0-0,4%,0-1)	32,3-60	34,6-60,8	$\beta$ -bazzanène ( <b>5</b> ) (5,6-14,9%) $\delta$ -cuprénène ( <b>151</b> ) (1,8-25,2%)	fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (29,3-53,7%)		
	038	Bisabolyl (4,2%, 3) (E-E) Ger. (3,3%, 4) (Z-E) Hum. (2,8%, 1) Autre (1%, 1)	11,4	65,1		fusicocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (62,6%)		

**Tableau 33 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lepidoziaceae (nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes) \* : nouveau composé (2/2)**

### 3.3.4 Conclusion

La présente étude constitue le premier travail phytochimique pour ces espèces de la famille Lepidoziaceae et la première étude phytochimique pour des espèces du genre *Acromastigum*. Les deux espèces de ce genre sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie et un chimiotype bicyclogermacrane leur est attribué. L'isolépidozène (**111**) est proposé comme biomarqueur pour le genre *Acromastigum*.

Deux nouveaux composés ont été isolés. Il s'agit du zier-13,14-dien-5-ol (**160**) isolé de *Bazzania francana* et du dimère d'acide lunularique (**196**) que nous avons appelé « vittatin » isolé de *Bazzania vittata*. Cette molécule semble être un intermédiaire de biosynthèse pouvant conduire à d'autres bis(bibenzyl)s de type bazzanines car elle possède toutes les fonctions chimiques de l'acide lunularique constituant un élément important du schéma biosynthétique de cette famille de composés.

L'analyse des composés de ces espèces a montré plusieurs originalités, parmi elles, la détection de taux importants de fusicocca-2,5-diène (**80**) dans cinq espèces ainsi qu'un pourcentage relatif élevé de sesquiterpénoïdes de type cuparane dans ces cinq espèces.

Trois chimiotypes très distincts de *B. francana* ont été mis à jour, avec les types zierane, monocyclofarnesane et microbiotane (affilié au cuparane). La diversité en chimiotypes de l'espèce *B. francana* mettant en lumière une telle chimiovariabilité amène à poser la question d'un complexe d'espèces cryptiques ou d'une influence inhabituelle de l'habitat sur la biosynthèse de métabolites secondaires concernant les échantillons de *B. francana*.

## 3.4 Composés volatils issus de la famille des Lejeuneaceae

Le contenu moléculaire de sept espèces de la famille des Lejeuneaceae, dont deux endémiques à la Nouvelle-Calédonie, a été analysé par CPG-FID-MS. Certaines espèces avaient fait l'objet d'études antérieures rendant possible des comparaisons intraspécifiques avec des échantillons extérieurs à la Nouvelle Calédonie.

### 3.4.1 Caractéristiques des Lejeuneaceae

La famille des Lejeuneaceae est la plus importante dans la classification des Marchantiophyta et englobe 20 à 25% des hépatiques. Elle comprend environ 80 genres et plus de 1600 espèces, pour la plupart des épiphytes même si il y a tout de même une part significative d'espèces épiphylls. Ces plantes évoluent le plus souvent en milieu tropical.

Du fait que les espèces de cette famille ont souvent une morphologie d'aspect microscopique, notamment au niveau des lobules, leurs classifications s'avèrent compliquées et la chimiotaxonomie peut constituer alors un atout important. La plupart des taxons produisent de nombreux composés sesquiterpéniques et diterpéniques, rarement des monoterpènes et des composés aromatiques [103].

Dans cette grande famille, la subdivision en sous-familles a une importance majeure. La famille des Lejeuneaceae est divisée en deux sous familles : Ptychanthoideae et Lejeuneoideae, elles-mêmes subdivisées en sous-groupes [104].

En Nouvelle-Calédonie, 146 espèces appartenant à la famille des Lejeuneaceae ont été inventoriées, ces espèces sont réparties dans 29 genres [60].

Sept espèces, réparties en six genres ont été étudiées dans la présente étude. Le Tableau 34 détaille la taxonomie des espèces de Lejeuneacea collectées : de la famille à la sous tribu, les espèces endémiques sont signalées par un astérisque.

Les données relatives à la collecte de ces plantes sont dans le Tableau 68 (partie II.2.2) et les composés détectés non identifiés sont présentés dans les Tableaux 75 et 76 en Annexe 3.

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Porellales Schljakov</u>
Sous-ordre	Porellineae R.M.Schust.
<b>Famille</b>	<b>Lejeuneaceae Cavers</b>
Sous famille	Lejeuneoideae
tribu	Brachiolejeuneae
Sous tribu	Drepanolejeuneinae
Genre	Drepanolejeunea ( <b>Spruce</b> ) <b>Steph.</b> D. pentadactyla (Mont.) Steph.
tribu	Lejeuneae Dumort
Sous tribu	Lejeuneinae Gradst
Genre	Lejeunea <b>Lib.</b> L. sordida (Nees) Nees
Sous famille	Ptychanthoideae
Genre	Schiffneriolejeunea <b>Verd.</b> S. tumida var haskarliana* (Gottsche) Gradst. et Terken
Genre	Lopholejeunea ( <b>Spruce</b> ) <b>Steph.</b> L. subfusca (Nees) Schiffn.
Genre	Spruceanthus <b>Verd.</b> S. thozetianus (Gottsche et F. A.Müller) B.Thiers et Gradst.
Genre	Thysananthus <b>Lindenb.</b> T. spathulistipus (Reinw., Blume et Nees) Lindenb. T. pancheri* (Gottsche ex Steph.) Hürl

**Tableau 34 : Classification taxonomique des espèces appartenant à la famille Lejeuneaceae**

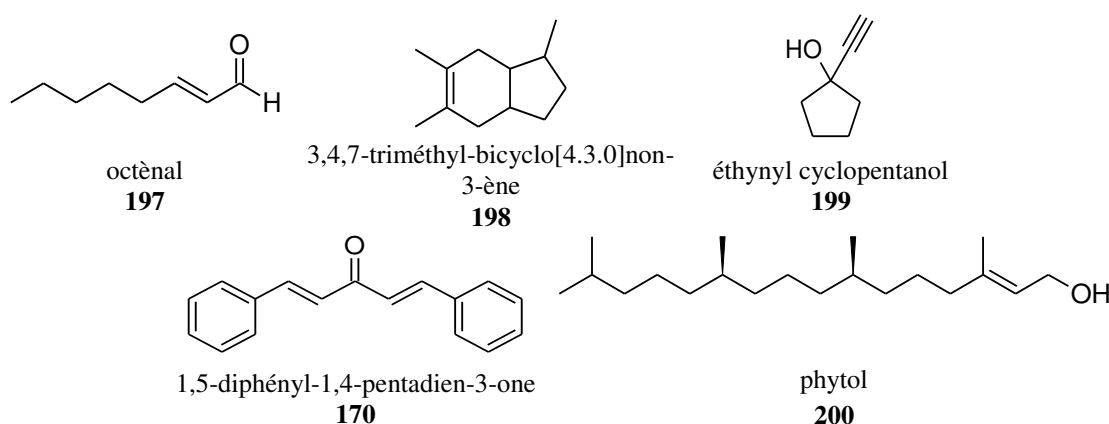
Les espèces analysées sont : Drepanolejeunea pentadactyla (échantillon MET090), Lopholejeunea subfusca (MET087), Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana\* (MET 023), Spruceanthus thozetianus (MET 098), Thysananthus spathulistipus (MET 119), Thysananthus pancheri\* (MET 120 MET 121) et Lejeunea sordida (MET 131). Les données relatives à la collecte de ces plantes sont compilées dans le Tableau 67 (partie II.2.2).

## 3.4.2 Résultats

### 3.4.2.1 *Drepanolejeunea pentadactyla* (Mont.) Steph.

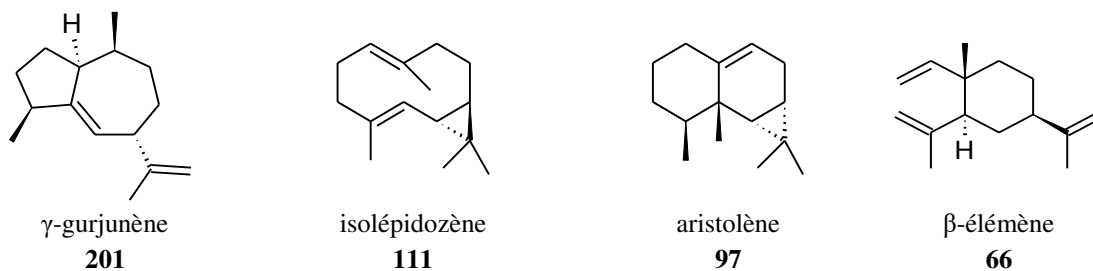
L'échantillon analysé est MET090, les constituants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36.

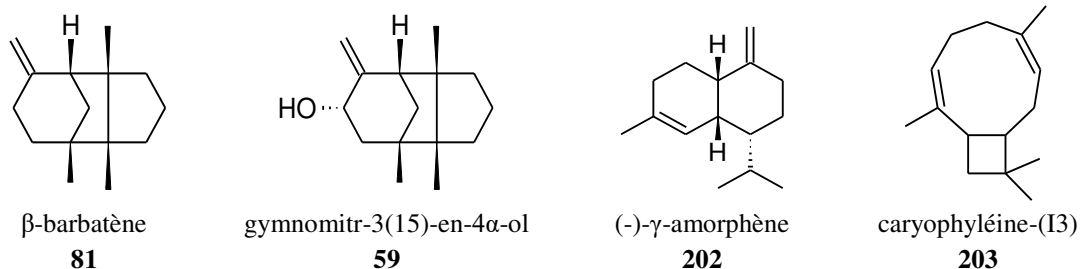
La majeure partie du contenu volatil de cette espèce est constituée de composés non terpéniques (59,9%) avec l'**octènal (197) (28,6%)**, le **3,4,7-triméthyl-bicyclo[4.3.0]non-3-ène (198) (15%)**, alcool aliphatique (**10,8%**), un alcane non identifié à 30 carbones (3,5%), le 1,5-diphényl-1,4-pentadien-3-one (**170**) (3,1%) et l'éthynylcyclopentanol (**199**) (2,4%). Le phytol (**200**) (0,4%) est le seul composé diterpénique identifié dans l'extrait.



Les sesquiterpénoïdes dérivant du cation (E-E)-germacradiényl détectés sont : le  **$\gamma$ -gurjunène (201) (10,3%)** (ayant des propriétés insecticides contre *Tribolium castaneum* et *Myzus persicae* deux insectes ravageurs des végétaux [105]), l'isolépidozène (**111**) (3,7 %), l'aristolène (**97**) (2,2%) et le  $\beta$ -élémente (**66**) (1,9%).

Deux sesquiterpénoïdes affiliés au cation bisabolyyl ont été détectés avec : le  **$\beta$ -barbatène (81) (10,4%)** et le gymnomitr-3(15)-en-4 $\alpha$ -ol (59) (1,2%), tous deux possédant une structure de type barbatane. Le  $\gamma$ -amorphène (202) (3,9%) et le caryophyléine-(I3) (203) (2,7%) ont été détectés avec des pourcentages notables.

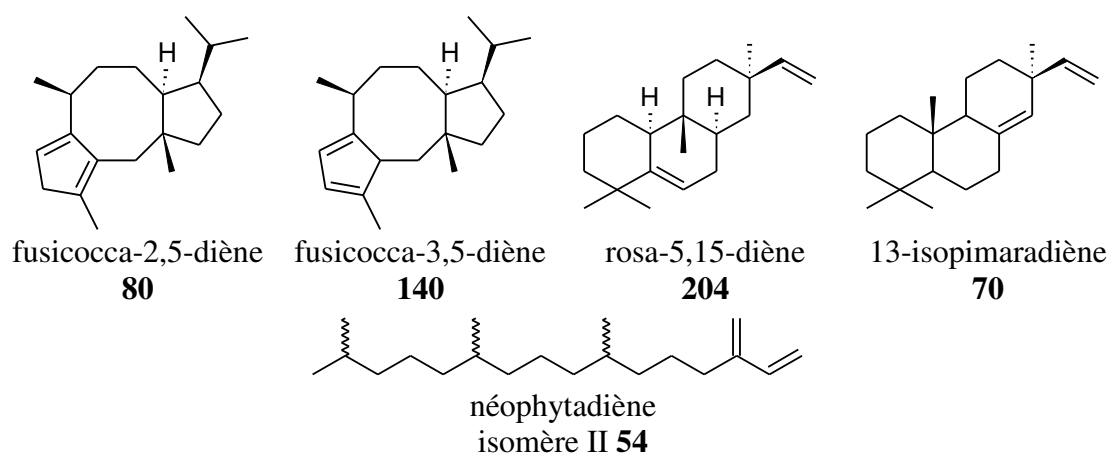




### 3.4.2.2 *Lejeunea sordida* (Nees) Nees

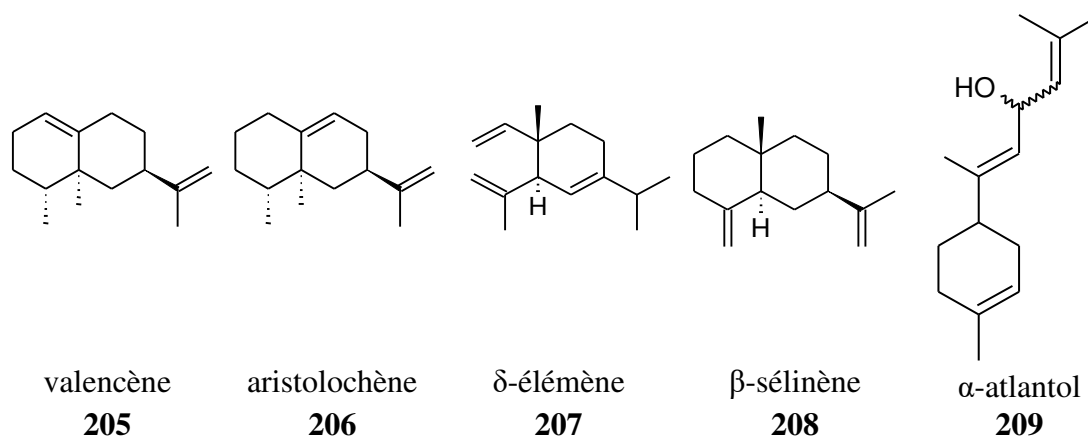
Les constituants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36. L'analyse en composés volatils de cet échantillon (MET131) de *Lejeunea sordida* montre une forte proportion de **diterpènes non identifiés (88,9%)**. Ce contenu diterpénique non identifié est majoritairement composé de deux diterpénoïdes oxygénés, ce sont : **M $\geq$ 304, 91, 105 (90) (60,8%)** et **M=288, 91, 105 (80) (23,4%)**. *Lejeunea sordida* est une bonne "plante cible" pour mener des travaux d'isolement et de caractérisation de diterpénoïdes oxygénés potentiellement originaux.

Les diterpénoïdes identifiés entant que constituants mineurs sont le : rosa-5,15-diène (**204**) (3,1%), le fusicocca-2,5-diène (**80**) (0,4%), le 13-isopimaradiène (**70**) (0,3%), le fusicocca-3,5-diène (**140**) (0,3%) et le néophytadiène II (**54**) (0,2%).



Les sesquiterpénoïdes identifiés représentent 6% du contenu volatil de l'extrait. Ce sont majoritairement des composés affiliés au cation (E-E)-germacradiényl très proches d'un point de vue biosynthétique (Tableau 39). Il s'agit du valencène (**205**) (1,9%), de l'aristolochène (**206**) (0,6%), du  $\delta$ -élémente (**207**) (0,5%), du  $\beta$ -sélinène (**208**) (0,4%) et du  $\beta$ -élémente (**66**) (0,2%). L' $\alpha$ -atlantol (**209**) (2,5%) (dérivant du cation bisaboly) a été aussi détecté.



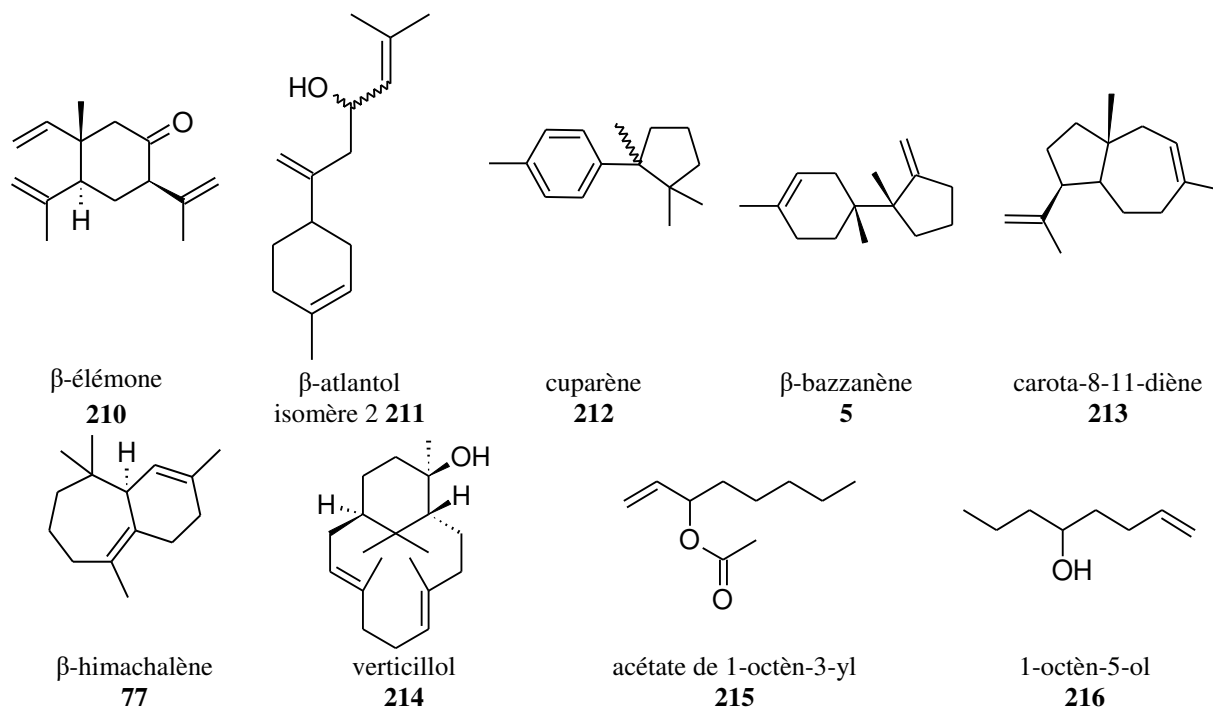


### 3.4.2.3 *Lopholejeunea subfusca* (Nees) Schiffn.

La part des sesquiterpènes identifiés dans le contenu volatil de cet échantillon (MET087) est de 26,3%. La composition chimique de cette espèce est détaillée dans les Tableaux 35 et 36.

Six composés affiliés au cation (E-E)-germacradiényl ont été détectés, ce sont : l'**isolépidozène (111) (11,4%)**, le **γ-gurjunène (201) (2,5%)**, le **γ-amorphène (202) (1,1%)**, l'**aristolène (97) (0,8%)**, le **β-élémente (66) (0,6%)** et le **β-élémonone (210) (0,6%)**.

Quatre composés dérivant du cation bisabolyyl sont aussi détectés, ce sont : le **β-barbatène (81) (2,5%)**, le **β-atlantol isomère 2 (211) (1,3%)**, le **cuparène (212) (0,7%)** et le **β-bazzanène (5) (0,6%)**. Le **carota-8-11-diène (213) (2,5%)**, appartenant au type daucane, a été aussi détecté.



Le caryophylléine-(I3) (**203**) (0,6%) et le  $\beta$ -himachalène (**77**) (0,9%) ont été détectés avec des pourcentages relatifs modérés, ils sont respectivement affiliés aux cations (E-E)-humulyl et (Z-E)-humulyl.

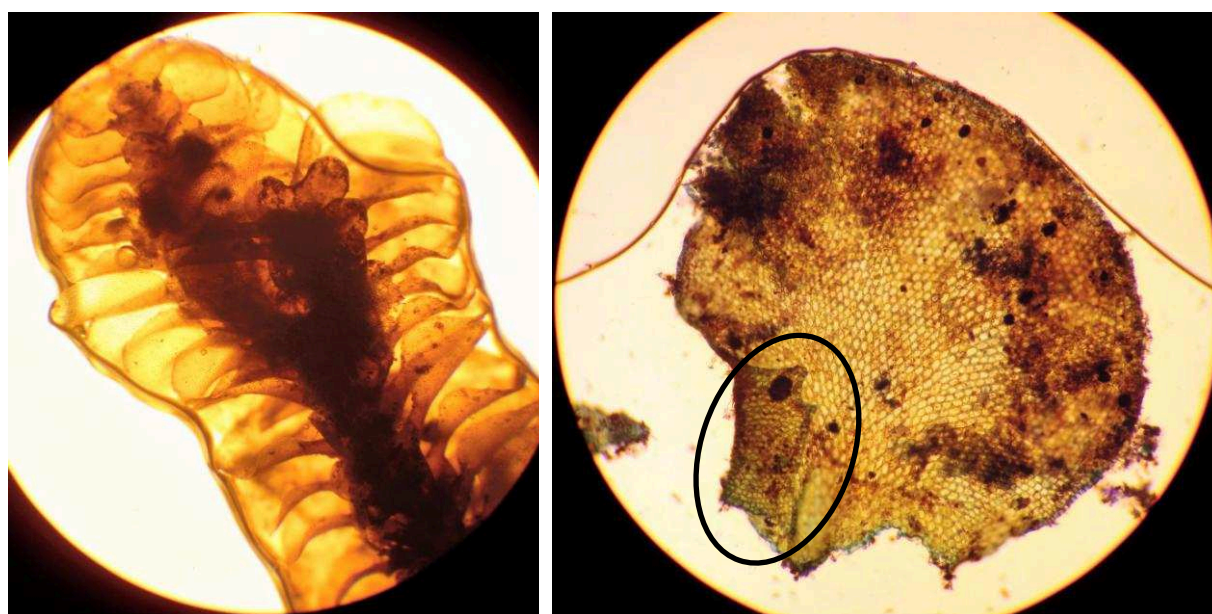
Les composés diterpéniques constituent la classe de molécules la plus abondante détectée dans cette espèce avec 13% de diterpénoïdes identifiés : le **verticillol (214) (10,3%)**, le néophytadiène II (**54**) (1,2%), le phytol (**200**) (0,8%) et le fusicocca-2,5-diène (**80**) (0,7%).

La majorité des molécules diterpéniques n'a pas pu être identifiée pour l'instant. Un diterpénoïde oxygéné (**M $\geq$ 306, 136, 121 (95), (32,8%)**) a été détecté, sa caractérisation mènerait potentiellement à la découverte d'une nouvelle molécule.

Des composés non terpéniques tels que le 3,4,7-triméthyl-bicyclo[4.3.0]non-3-ène (**198**) (8,6%), l'acétate de 1-octèn-3-yl (**215**) (2,3%), l'octénal (**197**) (1,6%) et le 1-octèn-5-ol (**216**) (0,8%) ont été aussi détectés.

#### 3.4.2.4 Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana (Gottsche) Gradst. et Terken (endémique)

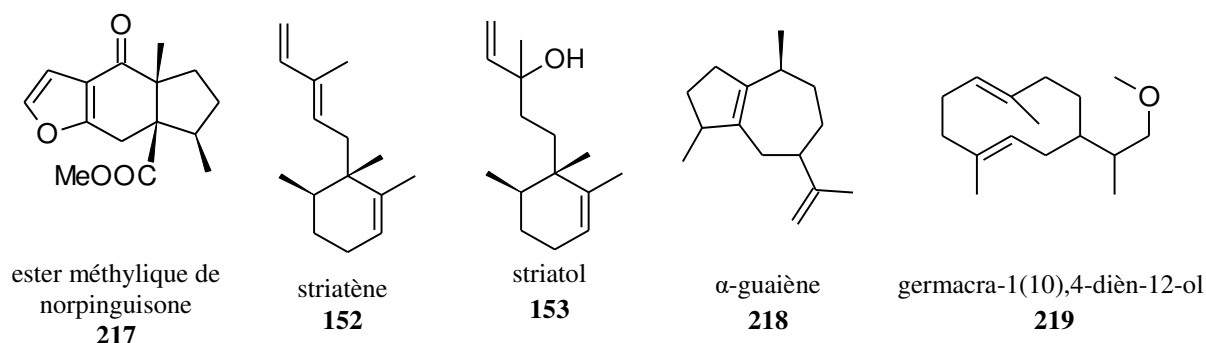
Le contenu moléculaire en constituants volatils de l'échantillon MET023 est composé de 76,9% de sesquiterpénoïdes représentant 13 composés identifiés. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36.



**Figure 44 : Photographie de Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana : à gauche face ventrale \*40, à droite lobe et lobule (entouré en noir)\*100**

L'ester méthylique de norpinguisone (**217**) (**63,3%**) est la molécule majoritaire de cet extrait et est attribué de facto comme étant un biomarqueur de cette espèce, avec l'hypothèse d'un chimiotype pinguisane pour Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana. Notons que cette molécule possède une activité insecticide contre les larves de Spodoptera frugiperda

(ravageur des cultures) [106]. L'extrait de cette plante endémique pourrait alors être testé contre les espèces de papillons piqueurs propres à la Nouvelle-Calédonie.

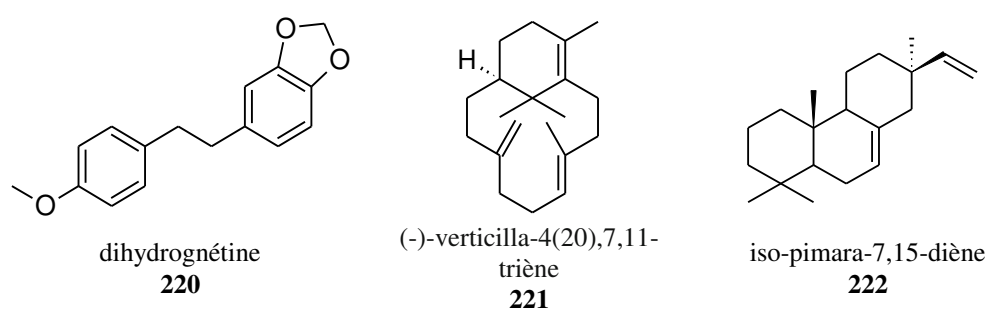


Six sesquiterpénoïdes de cette espèce sont affiliés au cation (E-E)-germacradiényl, ce sont : le γ-gurjunène (**201**) (1,4%), l'isolépidozène (**111**) (1,1%), l'aristolène (**97**) (1,0%), le β-élémente (**66**) (0,6%), le germacra-1(10),4-diène-12-ol (**219**) (0,6%) et l'α-guaiène (**218**) (0,3%).

Quant aux sesquiterpénoïdes dérivés du cation bisabolyl, trois composés ont été détectés : le β-atlantol isomère 2 (**211**) (0,9%), le β-barbatène (**81**) (3,1%), et le gymnomitr-3(15)-en-4α-ol (**59**) (0,8%). Ces deux derniers possèdent une structure barbatane.

Le striatène (**152**) (1,8%), le γ-amorphène (**202**) (1,3%) et le caryophyllène-(13) (**203**) (0,8%) ont été aussi détectés.

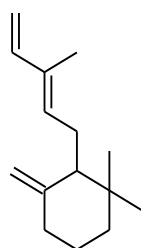
Les composés non terpéniques représentent une proportion de 11,1% de l'ensemble des molécules détectées avec le 3,4,7-triméthyl-bicyclo[4.3.0]non-3-ène (**198**) (5,8%), l'octénal (**197**) (3%), le dihydrognétine (**220**) (2,7%), le 1-octène-5-ol (**216**) (1,2%), l'acétate de 1-octène-3-yl (**215**) (1,1%), le 1,5-diphényl-1,4-pentadiène-3-one (**170**) (0,4%) et un alcane non identifié (0,4%)



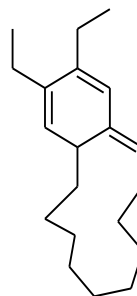
Les diterpénoïdes identifiés sont le 2,3-diéthyl-4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-décahydrobenzocyclododécène (**224**) (3,4%), le fusicocca-2,5-diène (**80**) (1,9%), le phytol (**200**) (0,8%), le (-)-verticilla-4(20),7,11-triène (**221**) (0,7%), l'iso-pimara-7,15-diène (**222**) (0,7%) et le néophytadiène II (**54**) (0,6%).

### 3.4.2.5 *Spruceanthus thozetianus* (Gottsche et F. A.Müller) B.Thiers et Gradst.

Les constituants de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36. Les sesquiterpénoïdes de cet échantillon (MET098) représentent 51,8% des composés détectés. Le **cyclofarnesa-5(14),8,10-triène (223) (32,7%)** a été détecté en tant que composé majoritaire. Les autres sesquiterpénoïdes détectés sont : le **caryophylléine-(I3) (203) (13,1%)**, le cuparène (**212**) (2,6%), le germacra-1(10),4-diène-12-ol (**219**) (2%) et l'isolépidozène (**111**) (1,5%).



cyclofarnesa-5(14),8,10-triène  
**223**



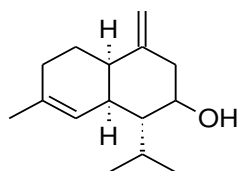
2,3-diéthyl-4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13-  
décahydro-benzocyclododécène  
**224**

Les composés diterpéniques identifiés sont le phytol (**200**) (6%) et le néophytadiène II (**54**) (5,8%). Un diterpénoïde avec un fort pourcentage relatif :  $M \geq 270$ , 145, 91 (70) (17,9%), n'a pas pu être identifié.

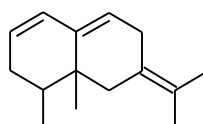
### 3.4.2.6 *Thysananthus spathulistipus* (Reinw., Blume et Nees) Lindenb.

Les constituants détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36. L'échantillon (MET119) possède un terpénoïde oxygéné majoritaire non identifié :  $M \geq 257$ , **95, 81 (95) (61,9%)**. Ce composé pourrait être un biomarqueur de cette espèce et potentiellement s'avérer être une nouvelle molécule.

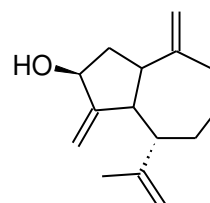
Le  $\beta$ -atlantol isomère 2 (**211**) (2,2%), le 4,10(14)-muuroladiène-8 $\beta$ -ol (**225**) (1,3%), l'isolépidozène (**111**) (0,9%), le (+)-saccogynol (**227**) (0,9%) et le  $\beta$ -vatirénène (**226**) (0,6%) ont été identifiés dans l'extrait, ces sesquiterpénoïdes sont assez éloignés les uns des autres d'un point de vue biosynthétique.



4,10(14)-muuroladiène-8 $\beta$ -ol  
**225**



$\beta$ -vatirénène  
**226**

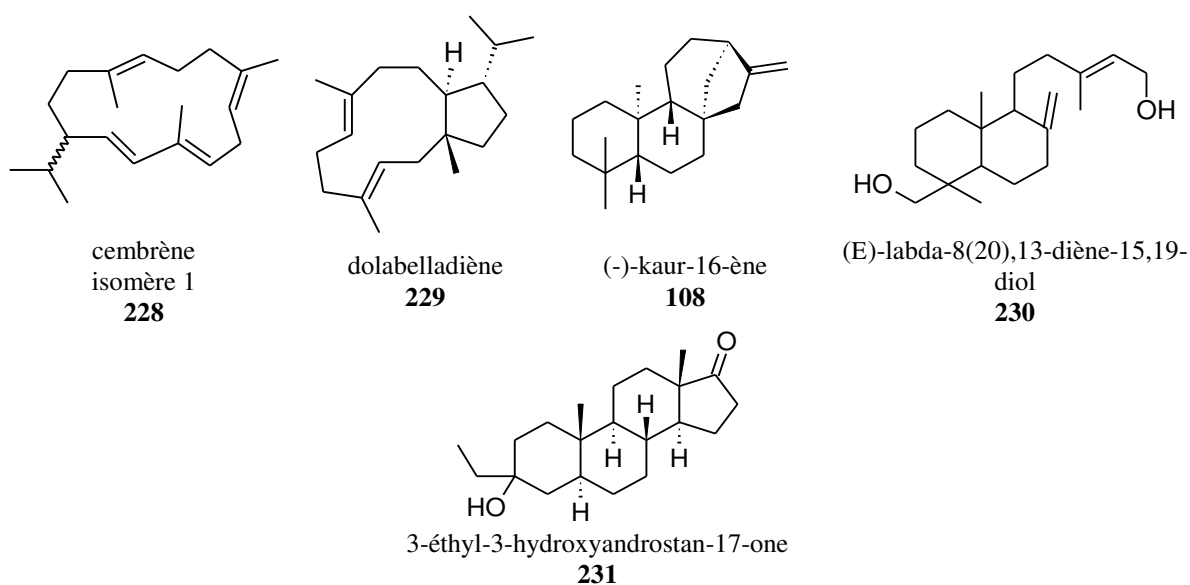


(+)-saccogynol  
**227**

25,2% des composés diterpéniques ont été identifiés, ce sont : le cembrène isomère 1 (**228**) (7,7%), le dolabelladiène (**229**) (7,3%), le phytol (**200**) (6%), le rosa-5,15-diène (**204**) (4%), le

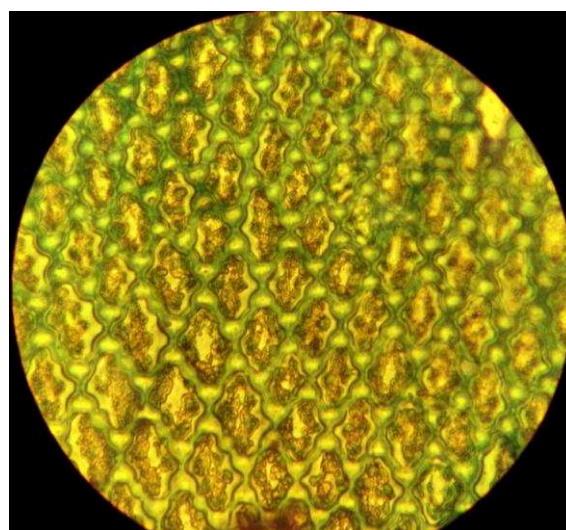
(E)-labda-8(20),13-diène-15,19-diol (**230**) (3,5%) (molécule inhibitrice de l'  $\alpha$ -glucosidase,  $CI_{50}=8,9 \mu\text{g/ml}$  [107], le 13-isopimaradiène (**70**) (1,1%) et le (-)-kaur-16-ène (**108**) (1%). Ces sept diterpénoïdes sont affiliés à des types de structures différentes. Malgré un pourcentage relatif moyen en diterpénoïdes, *Thysananthus spathulistipus* possède une diversité structurale remarquable en composés diterpéniques.

Le composé stéroïdique 1,3-éthyl-3-hydroxyandrostan-17-one (**231**) (0,6%) possédant un noyau stérane, a été détecté.



### 3.4.2.7 *Thysananthus pancheri* (Gottsche ex Steph.) Hürl. (endémique)

Deux échantillons de cette espèce ont été étudiés (MET120 et MET121), leurs contenus en composés volatils étant assez différents, ils ont été analysés séparément. Néanmoins pour plus de clarté au niveau de leurs compositions, les composés communs identifiés dans ces deux échantillons ont été marqués d'un astérisque. Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans les Tableaux 35 et 36.





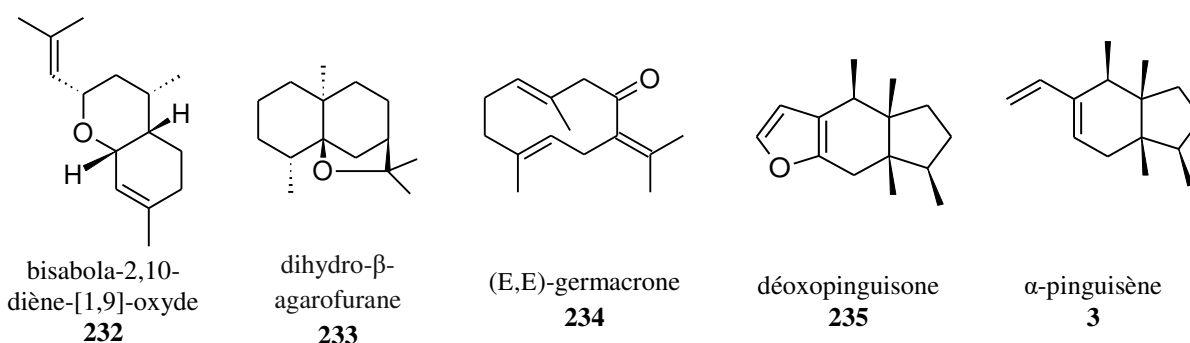
**Figure 45 : Détails de *Thysananthus pancheri*, à gauche : face ventrale \*40, à droite : cellules \*1000**

➤ Échantillon MET121

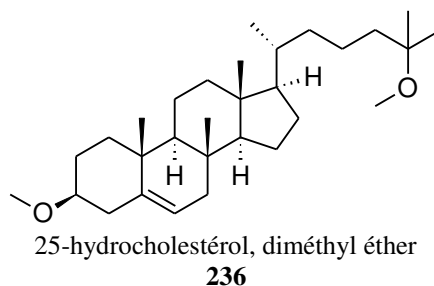
Les composés sesquiterpéniques représentent la plus importante proportion des constituants détectés.

Les structures sesquiterpéniques identifiées sont assez variées. Deux sesquiterpénoïdes oxygénés de type bisabolane ont été détectés, ce sont : le  $\beta$ -atlantol isomère 2\* (**211**) (7,1%) et le bisabola-2,10-diène-[1,9]-oxyde (**232**) (1,2%). Nous avons aussi détecté trois composés dérivant du cation (E-E) germacradiényl avec le (+)-saccogynol (**227**) (3%), le dihydroagarofuran\* (**233**) (2,4%), le (E,E)-germacrone\* (**234**) (1,3%).

Le striatol\* (**153**) (1,9%), le déoxopinguisonne (**235**) (1,6%), et l' $\alpha$ -pinguisène\* (**3**) (0,4%) sont trois sesquiterpénoïdes proches au niveau biosynthétique et assez spécifiques de la famille des Lejeuneaceae. Le caryophyléine-(I3) (**203**) (0,5%) et le 4,10(14)-muuroladièn-8 $\beta$ -ol (**225**) (2,6%) ont été aussi détectés. La majorité des sesquiterpénoïdes n'a pas pu être identifiée pour l'instant.



Les diterpénoïdes représentent aussi une part importante du contenu volatil avec 45,5% de composés diterpéniques, seuls le fusicocca-2,5-diène (**80**) (1,3%) et le phytol (**200**) (0,7%) ont été identifiés. D'autres composés tels que le 25-hydrocholestérol diméthyl éther (**236**) (1,6%) et le 1,5-diphényl-1,4-pentadien-3-one (**170**) (1,4%) ont été détectés.

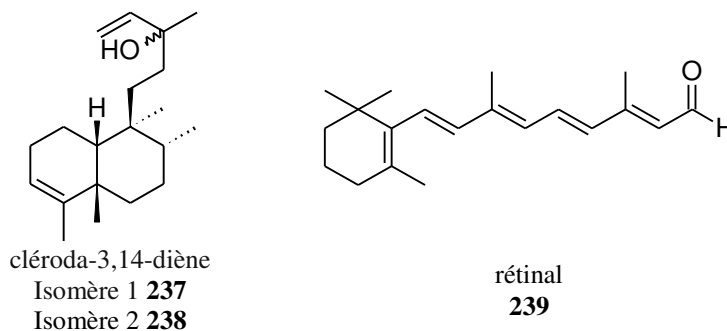


➤ Échantillon MET120

Le contenu moléculaire de cet échantillon est dominé par la présence d'un diterpénoïde non identifié,  $M \geq 272$ , **149**, **177** (**95**) (**52,1%**). L'identification de ce composé permettrait

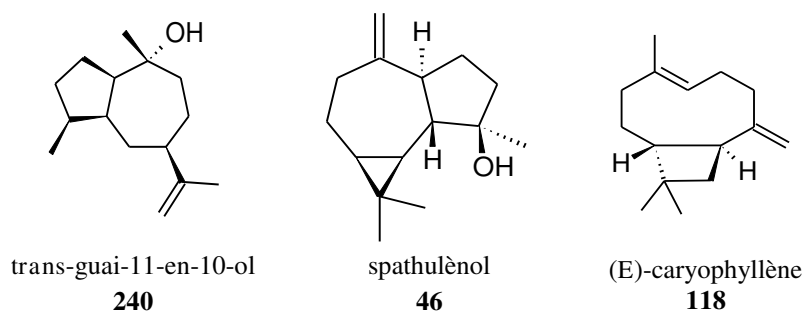
d'attribuer un biomarqueur pour ce chimiotype particulier (ce composé n'étant pas détecté dans MET121) de cette espèce endémique.

Les composés diterpéniques identifiés sont : le cis-3,14-clérodadien-13-ol (**237**) (3,4%), le (-)-cléroda-3,14-dien-13-ol (**238**) (2,6%) et le rétinol (**239**) (0,8%).



Sept composés sesquiterpéniques affiliés au cation (E-E)-germacradiényl ont été détectés, ce sont : l'isolépidozène (**111**) (11,1%), le dihydroagarofuran\* (**233**) (5,7%), le trans-guai-11-en-10-ol (**240**) (1,5%), le (E,E)-germacrone\* (**234**) (0,3%), le  $\beta$ -élémente (**66**) (0,3%) et le spathulénol (**46**) (0,3%).

L' $\alpha$ -pinguisène\* (**3**) (2,4%) et le striatol\* (**153**) (0,7%), composés proches au niveau de la biosynthèse, ont été aussi détectés. D'autres sesquiterpénoïdes sans liens biosynthétiques évidents ont été aussi détectés, ce sont : le carota-8-11-diène (**213**) (3%), le  $\beta$ -atlantol isomère 2\* (**211**) (2,7%) et le (E)-caryophyllène (**118**) (2,6%).



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	D.p	L.su	S.t.h	S.t	T.s	T.p	L. so	
			90	87	23	98	119	121	120	131
δ-Elémène (207)	1344,6	23,64	-	-	-	-	-	-	0,5	
β-Elémène (66)	1398,8	25,04	1,9	0,6	0,6	-	-	0,3	0,2	
γ-Amorphène (202)	1429,8	25,79	3,9	1,1	1,3	-	-	-	-	
Aristolène (97)	1432,2	25,85	2,2	0,8	1,0	-	-	-	-	
(E)-Caryophyllène (118)	1434,7	25,91	-	-	-	-	-	2,6	-	
α-Guaiène (218)	1455	26,4	-	-	0,3	-	-	-	-	
Cyclofarnesa-5(14),8,10-triène (223)	1457,9	26,47	-	-	-	32,7	-	-	-	
α-Pinguisène (3)	1458,7	26,49	-	-	-	-	0,4	2,4	-	
β-Barbatène (81)	1466,5	26,68	10,4	2,5	3,1	-	-	-	-	
Dihydroagarofurane (233)	1481	27,03	-	-	-	-	-	2,4	5,7	
Aristolochène (206)	1484,3	27,11	-	-	-	-	-	-	0,6	
Striatène (152)	1486,8	27,17	-	-	1,8	-	-	-	-	
Carota-8-11-diène (213)	1495	27,37	-	2,5	-	-	-	3,0	-	
Isolépidozène (111)	1500,4	27,50	3,7	11,4	1,1	1,5	0,9	-	11,1	
Valencène (205)	1500,9	27,51	-	-	-	-	-	-	1,9	
Caryophylléine-(13) (116)	1503,9	27,58	2,7	0,6	0,8	13,1	-	0,5	-	
β-Sélinène (208)	1503,9	27,58	-	-	-	-	-	-	0,4	
γ-Gurjunène (201)	1507,8	27,67	10,3	2,5	1,4	-	-	-	-	
β-Himachalène (77)	1804	27,92	-	0,9	-	-	-	-	-	
Cuparène (212)	1831	28	-	0,7	-	2,6	-	-	-	
β-Bazzanène (5)	1838,5	28,4	-	0,6	-	-	-	-	-	
Striatol (153)	1891	28,90	-	-	-	-	-	1,9	0,7	
β-Vatirénène (226)	1947,6	29,41	-	-	-	-	0,6	-	-	
Déoxopinguisonne (235)	1999	29,59	-	-	-	-	-	1,6	-	
Spathuléol (46)	2016,9	29,62	-	-	-	-	-	-	0,3	
(E,E)-Germacrone (234)	2022,4	30,05	-	-	-	-	-	1,3	0,3	
trans-Guai-11-en-10-ol (240)	2027,3	30,41	-	-	-	-	-	-	1,5	
Gymnomitr-3(15)-en-4α-ol (59)	2037,7	31,95	1,2	-	0,8	-	-	-	-	
4,10(14)-Muurooladièn-8β-ol (225)	2057,9	31,94	-	-	-	-	1,3	2,6	-	
β-Atlantol iso2 (211)	2124,7	33,05	-	1,3	0,9	-	2,2	7,1	2,7	
α-Atlantol (209)	2124,7	33,09	-	-	-	-	-	-	2,5	
Ester méthylique de norpinguisone (217)	2124,7	34,44	-	-	63,3	-	-	-	-	
Saccogynol (227)	2124,7	35,44	-	-	-	-	0,9	3,0	-	
Bisabola-2,10-diène-[1,9]-oxyde (232)	2124,7	36,43	-	-	-	-	-	1,2	-	
β-Elémone (210)	2124,7	36,83	-	0,6	-	-	-	-	-	
germacra-1(10),4-dièn-12-ol (219)	2124,7	37,54	-	-	0,6	2,0	-	-	-	
Total sesquiterpénoïdes identifiés			36,3	26,1	77,0	51,9	5,9	22,0	30,6	6,1
Total sesquiterpénoïdes non identifiés			0,0	9,2	0,5	-	67,3	29,5	5,5	0,8

**Tableau 35 : Pourcentages relatifs de sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Lejeuneaceae (D.p : Drepanolejeunea pentadactyla, L.su : Lopholejeunea subfusca, S.t.h : Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana, S.t : Spruceanthus thozetianus, T.s : Thysananthus spathulistipus, T.p : Thysananthus pancheri et L.so : Lejeunea sordida)**



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	D.p	L.su	S.t.h	S.t	T.s	T.p		L. so
			90	87	23	98	119	121	120	131
2,3-Diéthyl- 4a,5,6,7,8,9,10,11,12,13- décahydro- benzocyclododécène (224)	1731,3	32,65	-	-	3,4	-	-	-	-	-
Néophytadiène II (53)	1838,5	34,85	-	1,2	0,6	5,8	-	-	-	0,2
Rosa-5,15-diène (204)	1951,8	37,07	-	-	-	-	4,0	-	-	3,1
13-Isopimaradiène (70)	1969,6	37,41	-	-	-	-	1,1	-	-	0,3
Iso-pimara-7,15-diène (222)	1991,1	37,82	-	-	0,7	-	-	-	-	-
Fusicocca-2,5-diène (80)	2022,4	38,4	-	0,7	1,9	-	-	1,3	-	0,4
Dolabelladiène (229)	2027,9	38,5	-	-	-	-	7,3	-	-	-
(-)-verticilla-4(20),7,11-triène (221)	2035	38,63	-	-	0,7	-	-	-	-	-
Cembrène iso1 (228)	2040,4	38,73	-	-	-	-	7,7	-	-	-
Fusicocca-3,5-diène (140)	2057,9	39,05	-	-	-	-	-	-	-	0,3
(-)-Kaur-16-ène (108)	2073,2	39,33	-	-	-	-	1,0	-	-	-
cis-3,14-Clérodadien-13-ol (237)	2092,9	39,69	-	-	-	-	-	-	3,4	-
(-)-Cléroda-3,14-dien-13-ol (238)	2127,6	40,3	-	-	-	-	-	-	2,6	-
Phytol (200)	2109,2	39,98	0,4	0,8	0,8	6	0	0,7	0	0
Verticillo (214)	2152,3	40,73	-	10,3	-	-	-	-	-	-
(E)-Labda-8(20),13-diène- 15,19-diol (230)	2154	40,76	-	-	-	-	3,5	-	-	-
Rétinal (239)	2203,6	41,62	-	-	-	-	-	-	0,8	-
androxyandrostan-17-one(231)	2336,1	43,9	-	-	-	-	0,6	-	-	-
Total diterpénoïdes identifiés			0,4	13,0	8,1	11,8	25,2	2,0	6,8	4,3
Total diterpénoïdes non identifiés			3,4	38,2	-	36,3	1,3	43,5	57,1	88,9
1-Octèn-5-ol (216)	983,7	13,36	-	0,8	1,2	-	-	-	-	-
Octénal (197)	1046,7	15,29	28,6	1,6	3	-	-	-	-	-
Acétate de 1-octèn-3-yl (215)	1107,3	17,12	-	2,3	1,1	-	-	-	-	-
3,4,7-triméthyl- bicyclo[4.3.0]non-3-ène (198)	1246	21,02	15	8,6	5,8	-	-	-	-	-
1,5-diphényl-1,4-pentadien-3- one (170)	1639,4	30,66	3,1	-	0,4	-	-	1,4	-	-
Ethynylcyclopentanol (199)	1951,1	37,99	2,4	-	-	-	-	-	-	-
25-Hydrocholestérol, diméthyl éther (236)	2014,8	38,26	-	-	-	-	0,3	1,6	-	-
Dihydrognétine (220)	2169,5	41,03	-	-	2,7	-	-	-	-	-
Alcool aliphatique		43,16	10,8	-	-	-	-	-	-	-
Alcane non identifié		47,27	-	-	0,4	-	-	-	-	-
Total non sesquiterpénoïdes			59,9	13,3	14,6	-	0,3	3,0	-	-

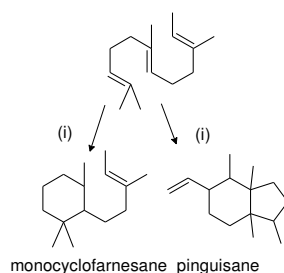
**Tableau 36 : Pourcentages relatifs en composés volatils autres que sesquiterpénoïdes détectés dans les espèces de la famille Lejeuneaceae (D.p : Drepanolejeunea pentadactyla, L.su : Lopholejeunea subfusca, S.t.h : Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana, S.t : Spruceanthus thozetianus, T.s : Thysananthus spathulistipus, T.p : Thysananthus pancheri et L.so : Lejeunea sordida)**

### 3.4.3 Discussion

Parmi les espèces de Lejeuneaceae étudiées au cours de cette thèse deux d'entre elles possèdent un constituant très majoritaire identifié leur attribuant un potentiel biomarqueur et l'hypothèse d'un chimiotype. Il s'agit de *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* (biomarqueur potentiel : ester méthylique de norpinguisone (**217**), chimiotype hypothétique : sesquiterpénoïde de type pinguisane) et *Spruceanthus thozetianus* (biomarqueur potentiel : cyclofarnesa-5(14),8,10-triène (**223**), chimiotype hypothétique : sesquiterpénoïde de type monocyclofarnesane).

Notons que la description des composés volatils de *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* avait été antérieurement publiée [108], mettant en avant la présence d'un fort pourcentage d'un composé indéterminé ( $[M^+] = 262, 108, 203 (49)$ ). Le rapport  $m/z$  de ce composé est similaire à l'ester méthylique de norpinguisone (**217**) isolé durant cette thèse, signifiant que l'échantillon antérieurement étudié et celui de la présente étude pourraient être le même composé majoritaire.

L'ester méthylique de norpinguisone (**217**) est un composé très commun du genre *Porella* [21]. Sa présence conforte les hypothèses de proximité phylétique entre le genre *Porella* et la famille des Lejeuneaceae [40]. Leurs ressemblances au niveau chimique seraient plus évidentes avec la sous famille des Ptychanthoideae car cette molécule a aussi été détectée chez *Bryopteris filicina* [109] (seule citation d'une espèce de Lejeuneaceae possédant cette molécule [21]). *Bryopteris filicina* et *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* ont également en commun la production de sesquiterpénoïdes de type germacrane, lépidozane et humulane ainsi que les diterpénoïdes de type fusicoccane. Il se pourrait donc que les genres *Schiffneriolejeunea* et *Bryopteris* aient un ancêtre commun assez proche au niveau phylétique.



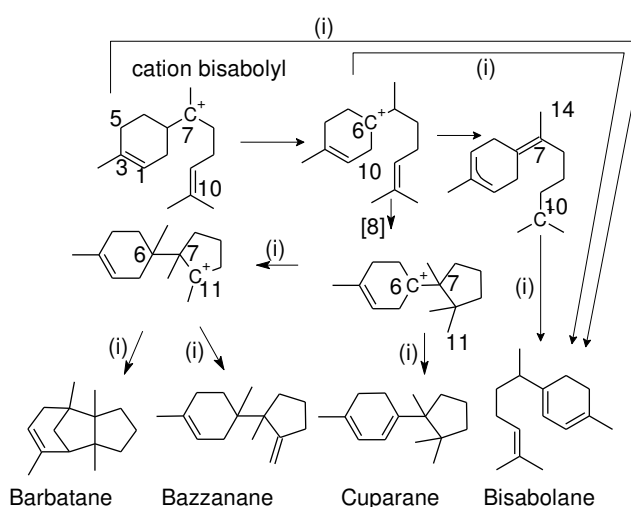
Espèces	Code (MET)	Cation farnesyl		
		Monocyclofarnesane	Pinguisane	Daucane
<i>Drepanolejeunea pentadactyla</i>	090	-	-	-
<i>lopholejeunea subfusca</i>	087	-	-	2,5
<i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarliana</i>	023	1,8	63,3	-
<i>Spruceanthus thozetianus</i>	098	32,7	-	-
<i>Thysananthus spathulistipus</i>	119	-	-	-
<i>Thysananthus pancheri</i>	121	1,9	2,0	-
	120	0,7	2,4	3,0
<i>Lejeunea sordida</i>	131	-	-	-

**Tableau 37 : Composition des espèces de Lejeuneaceae en structures sesquiterpéniques affiliées aux sesquiterpènes de type monocyclofarnesane, pinguisane et daucane (pourcentage relatif) (i) : [21])**

Le Tableau 37 montre la détection en grande quantité de sesquiterpénoïdes de type monocyclofarnesane chez *Spruceanthus thozetianus* et leur présence avec un moindre pourcentage chez *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* et les deux échantillons de *Thysananthus pancheri* (en co-occurrence avec des molécule de type pinguisane) ce qui constitue une particularité déjà décrite pour les *Lejeuneaceae* du clade des *Ptychanthoideae* [21].

Les analyses phytochimiques réalisées ne sont pas suffisantes pour une étude chimiotaxonomique avec les résultats obtenus sur les quatre échantillons étudiés pour lesquels une molécule majoritaire non identifiée a été détectée. Il s'agit des cas de *Thysananthus spathulistipus*  $M \geq 257$ , 95, 81 (95) (**61,9%**), *Lopholejeunea subfusca* :  $M \geq 306$ , 136, 121 (95) (**32,8%**), *Thysananthus pancheri* : (MET120)  $M \geq 232$ , 149, 177 (95) (**52,1%**) et *Lejeunea sordida*  $M \geq 304$ , 91, 105 (90) (**60,8%**). Ces composés non déterminés présentent autant de potentielles nouvelles molécules et de biomarqueurs à découvrir.

Parmi les types de composés sesquiterpéniques ayant pour précurseur le cation bisaboyl, présentés dans le Tableau 38, les espèces *Spruceanthus thozetianus*, *Thysananthus spathulistipus*, *Thysananthus pancheri* et *Lejeunea sordida* produisent uniquement des composés de type bisabolane (structure peu spécifique de cette famille).



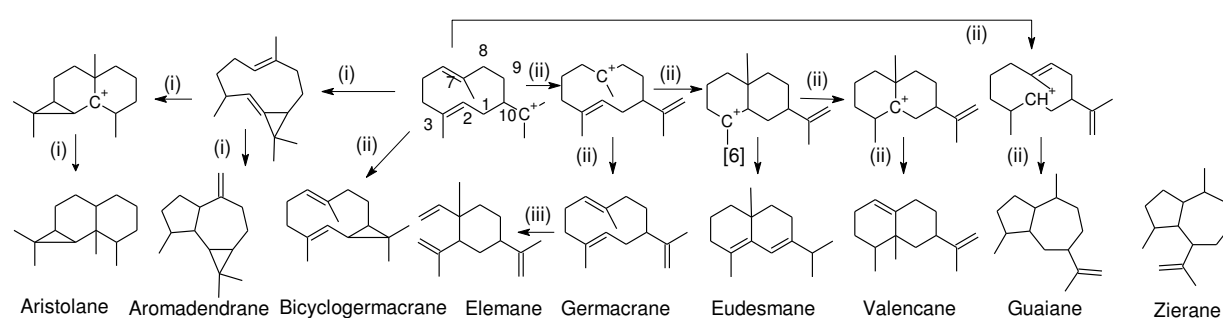
Espèces	Code (MET)	Cation bisaboyl			
		Barbatane	Bazzanane	Cuparane	Bisabolane
<i>Drepanolejeunea pentadactyla</i>	090	11,5	-	-	-
<i>Lopholejeunea subfusca</i>	087	2,5	0,6	0,7	1,3
<i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarliana</i>	023	3,9	-	-	0,9
<i>Spruceanthus thozetianus</i>	098	-	-	2,6	-
<i>Thysananthus spathulistipus</i>	119	-	-	-	2,2
<i>Thysananthus pancheri</i>	121	-	-	-	8,3
	120	-	-	-	2,7
<i>Lejeunea sordida</i>	131	-	-	-	2,5

**Tableau 38 : Composition des espèces de *Lejeuneaceae* investiguées en structures sesquiterpéniques affiliées au cation Bisaboyl (pourcentage relatif) ((i) : [69])**

*Lopholejeunea subfusca* est l'espèce de la famille des Lejeuneaceae, de la présente étude, exploitant le plus cette voie de biosynthèse des composés issus du bisabolyl via la production de sesquiterpénoïdes de type barbatane, bazzanane, bisabolane et cuparane avec des pourcentages relatifs modestes.

Cette voie de biosynthèse est peu utilisée de manière générale par les Lejeuneaceae même si plusieurs espèces du genre *Lejeunea* [21] produisent des sesquiterpénoïdes de type cuparane et barbatane, ce qui est rare chez les Lejeuneaceae. Par ailleurs, dans la littérature, il a été suggéré que le type cuparane pouvait être un marqueur de la sous-famille des Lejeuneoideae [39]. Cependant les plantes dans lesquelles nous avons détecté des sesquiterpénoïdes de type cuparane (avec de faibles pourcentages relatifs) n'appartiennent pas à cette sous famille des Lejeuneoideae.

Les structures sesquiterpéniques provenant du cation (E-E)-germacradiényl sont plus abondantes et plus diversifiées. Les composés de structure bicyclogermacrane ont été détectés dans quasiment tous les échantillons à part *Lejeunea sordida* et un échantillon de *Thysananthus pancheri* (MET121).



Espèces	Code (MET)	Cation (E-E)-germacradiényl								
		Ari.	Aro.	Elémance	BG	Ger	Eud.	Valancane	Guaiane	Zierane
<i>Drepanolejeunea pentadactyla</i>	090	2,2	-	1,9	3,7	-	-	-	10,3	-
<i>Lopholejeunea subfusca</i>	087	0,8	-	1,3	11,4	-	-	-	2,5	-
<i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarlina</i>	023	1,0	-	0,6	1,7	-	-	-	1,7	-
<i>Spruceanthus thozetianus</i>	098	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-
<i>Thysananthus spathulistipus</i>	119	-	-	-	0,9	-	-	0,6	-	0,9
<i>Thysananthus pancheri</i>	121	-	-	-	-	-	2,4	-	-	3,0
	120	-	0,3	0,3	11,1	0,3	5,7	-	1,5	-
<i>Lejeunea sordida</i>	131	-	-	0,7	-	-	0,4	2,4	-	-

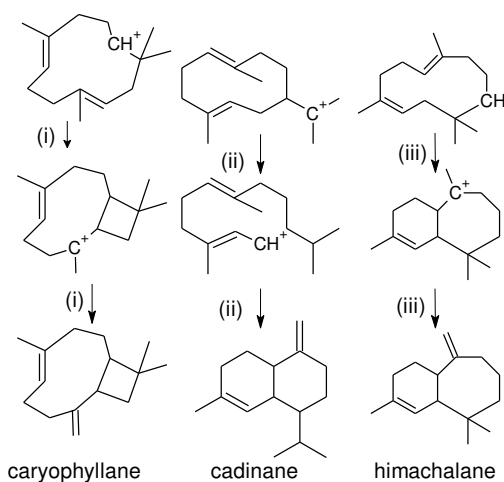
**Tableau 39 : Composition des espèces de la famille Lejeuneaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-germacradiényl. (pourcentage relatif) Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane, Eud. : eudesmane, Ger. : germacrane ((i) : [27], (ii) : [68], (iii) : [101])**

La structure zierane (rare) a été observée chez *Thysananthus spathulistipus* et *Thysananthus pancheri* (MET121) avec la détection de faibles pourcentages de saccogynol (**227**). C'est un fait notable car cette molécule a été plutôt retrouvée dans des espèces des genres *Plagiochila* et *Saccogyna* [21].

Un point intéressant à relever concerne la co-occurrence chez *Drepanolejeunea pentadactyla*, *Lopholejeunea subfusca* et *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina* de composés sesquiterpéniques de type barbatane, bicyclogermacrane, aristolane, élémmane et guaiane.

La structure eudesmane est uniquement détectée chez *Thysananthus pancheri* (dihydroagarofurane (**233**) : 2,4-5,7%) et *Lejeunea sordida* ( $\beta$ -sélinène (**208**) : 0,4%), cette structure est plutôt rare chez la famille des *Lejeuneaceae* [31,39].

Le Tableau 40 montre que la structure cadinane est rencontrée dans six échantillons représentant trois espèces différentes : *Drepanolejeunea pentadactyla*, *lopholejeunea subfusca*, *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina*. Le 4,10(14)-muuroladièn-8 $\beta$ -ol (**225**) est détecté chez *Thysananthus spathulistipus* et *Thysananthus pancheri* (MET121). Bien que le type muurolane soit assez rare, il a été détecté dans plusieurs espèces du genre *Thysananthus*, la littérature fait état d'un pourcentage relativement élevé (9%) de *cis*-muurola-4(15),5-diène (**44**) pour une espèce de *Thysananthus spathulistipus* originaire de Thaïlande [110].



Espèces	Échantillon	Cation (E-E)-humulyl	Cation (E-Z)-germacradiényl	Cation (E-Z)-humulyl
		Caryophyllane	Cadinane	Himachalane
<i>Drepanolejeunea pentadactyla</i>	MET 090	2,7	3,9	-
<i>lopholejeunea subfusca</i>	MET 087	0,6	1,1	0,9
<i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarlina</i>	MET 023	0,8	1,3	-
<i>Spruceanthus thozetianus</i>	MET 098	13,1	-	-
<i>Thysananthus spathulistipus</i>	MET 119	-	1,3	-
<i>Thysananthus pancheri</i>	MET 121	0,5	2,6	-
	MET 120	2,6	-	-
<i>Lejeunea sordida</i>	MET 131	-	-	-

**Tableau 40 : Composition des espèces de la famille des *Lejeuneaceae* en structures sesquiterpéniques affiliées aux cations (E-E)-humulyl, (E-Z)-germacradiényl et (Z-E)-humulyl (pourcentage relatif) (i) : [101], (ii) : [68], (iii) : [29]**

L'étude de plusieurs échantillons de *Thysananthus spathulistipus* originaires de Thaïlande a été reportée dans la littérature [110]. Les résultats concernant ces échantillons ont certaines similarités avec ceux étudiés dans nos travaux telles que la présence de sesquiterpénoïdes de type élémène et bicyclogermacrane. L'échantillon ci-étudié possède une très forte proportion de sesquiterpénoïdes non identifiés alors que les études antérieures montrent plutôt un fort taux de composés diterpéniques non identifiés. L'échantillon MET119 contient un nombre important de diterpénoïdes identifiés présentant une diversité de structures très importante.

Les composés volatils de *Thysananthus pancheri* (espèce endémique) avait déjà fait l'objet d'études antérieures [108], les composés volatils majoritaires détectés étaient alors l'isolépidozène (**111**), l' $\alpha$ -pinguisène (**3**) et le sandvicène (**272**), et une part non négligeable de composés minoritaires inconnus. Sur les deux échantillons étudiés (MET120 et 121), dans le présent travail, seul l'échantillon MET120 partage une grande partie de constituants identifiés des échantillons précédemment étudiés, notamment l'isolépidozène (**111**) et l' $\alpha$ -pinguisène (**3**). L'échantillon MET121 se distingue des échantillons précédemment étudiés par la présence de sesquiterpénoïde de type cadinane.

L'étude des composés diterpéniques détectés dans ces plantes est délicate car peu de structures diterpéniques détectés ici sont mentionnées dans la littérature pour les Lejeuneaceae [21].

Les diterpénoïdes de type clérodane (6,1%) ont été uniquement détectés chez *Thysananthus pancheri* (MET120) avec deux isomères de cléroda-3,14-dien-13-ol (composés (**237**) et (**238**)). Bien que ce type de diterpénoïde soit rare chez la famille des Lejeuneaceae, ce composé a été précédemment détecté chez *Macrolejeunea pallescens* [21]. Deux composés diterpéniques de type clérodane ont été isolés à partir d'un échantillon de *Thysananthus spathulistipus* collecté à Madagascar [111]. Ceci suppose que ce type de diterpénoïde ne serait pas spécifique d'une sous famille de Lejeuneacea, les genres *Lejeunea* et *Thysananthus* appartenant à des sous familles distinctes.

*Thysananthus spathulistipus* contient des composés diterpéniques de type labdane (3,5%), dont les structures sont connues pour être des biomarqueurs de l'espèce *Ptychanthus striatus* [21] et ont aussi été détectées chez des espèces du genre *Tuzibeanthus* [103] Tout comme le genre *Thysananthus*, les genres *Ptychanthus* et *Tuzibeanthus* font partie de la sous famille des Ptychanthoideae de la famille Lejeuneaceae. Les labdanes pourraient alors constituer des marqueurs d'une frontière au niveau de la sous famille des Ptychanthoideae basée sur la présence ou l'absence de ce type de diterpénoïdes. Ce type de marqueur pourrait être intéressant vu le nombre important de genres au sein de cette sous famille (18 genres).

Des structures de type pimarane et rosane sont assez rares chez les hépatiques [21]. Cependant le 13-isopimaradiène (**70**) et le rosa-5,15-diène (**204**) ont été détectés en co-occurrence dans les espèces : *Thysananthus spathulistipus* et *Lejeunea sordida*. Cela suppose qu'il pourrait y avoir une proximité phylétique entre ces deux espèces et *Porella navicularis* qui contient aussi ces deux diterpénoïdes [112].

Les verticillanes (rares dans les hépatiques) sont très peu distribués et la plupart sont détectés chez *Jackiella javanica*, *Odontoschisma denudatum* et *Chandonanthus hirtellus* [21]. Ainsi il est surprenant de détecter 10% de verticillol (**214**) chez *Lopholejeunea subfusca*, et en plus la présence importante d'un diterpénoïde inconnu (à 38.2%) complique la chimiotaxonomie de cette espèce sur la base des composés diterpéniques.

Les dolabellanes (assez rares et peu distribuées) ont été détectés chez *Odontoschisma denudatum*, *Chandonanthus hirtellus* et quelques espèces de *Barbilophozia* [21]. Cependant on détecte le dolabelladiène (**229**) (7,1%) chez *Thysananthus spathulistipus*, bien que dans la littérature, ce type de structure n'ait pas été encore répertorié chez la famille des *Lejeuneaceae*.

Les diterpénoïdes de type fusicoccane a été détecté dans *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina*, *Lopholejeunea subfusca*, *Thysananthus pancheri* (MET121) et *Lejeunea sordida*. Ce résultat est en accord avec la littérature sauf pour l'espèce *Lejeunea sordida* car le type fusicoccane a été décrit plutôt comme marqueur de la sous famille des *Ptychanthoideae* [108].

Nous vous présentons dans le Tableau 41 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des *Lejeuneaceae*.

Espèce	Code (MET)	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	%identifiés		Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires			Caractéristiques
			S.	D.	Sesquiterpénoïdes	Diterpénoïdes	Autres	
Drepanolejeunea pentadactyla	090	(E-E) Ger. (18,1%, 5) (Z-E) Ger. (14,3%, 2) Bisabolyl (11,6%, 2) (E-E) Hum. (2,7%, 1)	36,3	0,4	$\beta$ -barbatène ( <b>81</b> ) (10,4%) $\gamma$ -gurjunène ( <b>201</b> ) (10,3%) $\gamma$ -amorphène ( <b>202</b> ) (10,4%)		octène ( <b>197</b> ) (28,6%) 3,4,7-triméthyl-bicyclo[4,3,0]non-3-ène ( <b>198</b> ) (15%) Alcool aliphatique (10,8%)	composés aliphatiques
Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana	023	Autre (65,1%, 2) (E-E) Ger. (5%, 7) Bisabolyl (4,8%, 3) (Z-E) Ger. (4,4%, 2) (E-E) Hum. (0,8%, 1)	77,0	8,1	norpinguisone méthyl ester ( <b>217</b> ) (63,3%)		3,4,5-triméthyl-bicyclo[4,3,0]non-3-ène ( <b>198</b> ) (5,8%),	Type pinguisone
Spruceanthus thozetianus	098	Autre (32,7%, 1) (E-E) Hum. (13,1%, 1) (E-E) Ger. (3,5%, 3) Bisabolyl (2,6%, 1)	51,9	11,8	cyclofarnesa-5(14),8,10-triène ( <b>223</b> ) (32,7%) caryophyléine-(13) ( <b>203</b> ) (13,1%),	M $\geq$ 270, 145, 91 (70) (17,9%)		type monocyclofarnesane
Thysananthus spathulistipus	119	(E-E) Ger. (2,4%, 3) Bisabolyl (2,2%, 1)	5,9	25,2	M $\geq$ 257, 95, 81 (95) (61,9%)			sesquiterpénoïdes oxygénés non identifiés
Thysananthus pancheri	121	Bisabolyl (8,3%, 2) (E-E) Ger. (6,7%, 4) Autre (3,9%, 3) (E-E) Hum. (0,5%, 1)	22,0	2,0	$\beta$ -atlantol iso2 ( <b>211</b> ) (7,1%)	M $\geq$ 270, 95, 107 (65) (14,9%)		sept sesquiterpénoïdes oxygénés inconnus (29,5%)
	120	(E-E) Ger. (19,2%, 7) Autre (6,1%, 3) Bisabolyl (2,7%, 1) (E-E) Hum. (2,6%, 1)	30,6	6,8	isolépidozène ( <b>111</b> ) (11,1%)	M $\geq$ 272, 149, 177 (95) (52,1%)		diterpénoïde non identifié
Lejeunea sordida	131E	(E-E) Ger. (3,6%, 5) Bisabolyl (2,5%, 1)	6,1	4,3		M $\geq$ 304, 91, 105 (90) (60,8%) M=288, 91, 105 (80) (23,4%)		diterpénoïdes oxygénés non identifié
Lopholejeunea subfusca	087	(E-E) Ger. (15,9%, 7) Bisabolyl (5,1%, 4) (Z-E) Ger. (3,6%, 2) Autre (2,5%, 1) (Z-E) Hum. (0,9%, 1) (E-E) Hum. (0,6%, 1)	26,1	13,0	isolépidozène ( <b>111</b> ) (11,4%)	M $\geq$ 306, 136, 121 (95) (32,8%)	3,4,7-triméthyl-bicyclo[4,3,0]non-3-ène ( <b>198</b> ) (8,6%)	diterpénoïde oxygéné non identifié

Tableau 41 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Lejeuneaceae



### 3.4.4 Conclusion

Nous présentons ici la première étude phytochimique réalisée sur les espèces de *Drepanolejeunea pentadactyla*, *Lejeunea sordida*, *Lopholejeunea subfusca* et *Spruceanthus thozetianus* de Nouvelle-Calédonie.

Un biomarqueur pour *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* et pour *Spruceanthus thozetianus* pourrait être proposé, il s'agit respectivement de l'ester méthylique de norpinguisone (**217**) et du cyclofarnesa-5(14),8,10-triène (**223**).

La présente étude vient conforter l'hypothèse d'une proximité phylétique entre les familles Lejeuneaceae et le genre *Porella*. Ceci est appuyé avec la détection de l'ester méthylique de norpinguisone (**217**), molécule commune aux espèces du genre *Porella*. La co-occurrence du 13-isopimaradiène (**70**) et du rosa-5,15-diène (**204**) dans *Thysananthus spathulistipus* et *lejeunea sordida* et, dans une étude antérieure dans *Porella navicularis* va aussi dans le sens de cette proximité phylétique.

L'hypothèse que les diterpénoïdes de type kaurane puissent être des biomarqueurs propres au clade des Ptychanthoideae a été avancée.

Enfin, il a été montré que les trois espèces suivantes : *Thysananthus spathulistipus*, *Lopholejeunea subfusca* et *Lejeunea sordida* pourraient être des sources de terpénoïdes oxygénés originaux. Ces espèces sont représentatives d'une chimiodiversité à explorer pour apporter plus de connaissances sur les produits naturels des hépatiques.

## 3.5 Composés volatils issus du genre *Frullania*

Les espèces du genre *Frullania* font partie de l'ordre des Porellales, le taux d'endémisme maximal pour ce genre est de 57% en Nouvelle-Calédonie.

Les composants volatils de sept espèces de *Frullania* (*Frullaniaceae*) ont été analysés par CPG-MS afin d'indexer ces plantes à des chimiotypes connus pour ce genre. Cinq espèces sont endémiques de Nouvelle-Calédonie (*F. bella*, *F. scalaris*, *F. mammillosa*, *F. Cornuta* et *F. falsicornuta*) et seule *F. ericoides* a fait l'objet d'une étude phytochimique antérieure.

Les variations chimiques intraspécifiques [113] sont très importantes et ont rendu délicate l'indexation à des chimiotypes déterminés. Néanmoins certaines espèces du genre *Frullania* ont pu être indexées dans les chimiotypes : cyclocolorènone, lactone sesquiterpénique et bibenzyl. Deux des hépatiques endémiques étudiées ne peuvent pas être classées dans des chimiotypes connus pour les *Frullania*.

### 3.5.1 Caractéristiques des espèces du genre *Frullania*

Dans la littérature, sept chimiotypes majeurs spécifiques aux espèces appartenant au genre *Frullania* ont été décrits : lactone sesquiterpénique (chimiotype I), bibenzyl (chimiotype II), bibenzyl (chimiotype III), labdane (chimiotype IV), bazzanane (chimiotype V), pacifigorgiane (chimiotype VI) et cyclocolorènone (chimiotype VII) [21].

En Nouvelle Calédonie, le genre *Frullania* est le seul genre présent au sein de la famille *Frullaniaceae* et 52 espèces de *Frullania* ont été recensées. Le taux maximal d'endémisme est de 57% pour cette famille. C'est la troisième plus grande famille, concernant le nombre d'espèce, après les familles des *Lejeuneaceae* et *Lepidoziaceae* [60].

Sept espèces du genre *Frullania* ont été analysées, cinq de ces espèces sont considérées comme endémiques (repérées par un astérisque). Ces espèces étudiées sont : *F. bella*\* (échantillons COU164 et COU190), *F. cornuta*\* (COU134) *F. falsicornuta*\* (COU178), *F. mammillosa*\* (COU082 COU163), *F. multilacera* (COU183), *F. scalaris*\* (COU187) et *F. ericoides* (MET017 et MET019). Les données relatives à la collecte de ces plantes sont données dans le Tableau 67 (partie II.2.2).

Excepté pour *F. ericoides*, il s'agit de la première étude phytochimique menée sur ces espèces. La classification taxonomique de ces espèces est décrite dans le Tableau 42. Les données relatives à la collecte de ces plantes sont dans le Tableau 68 ( et les composés détectés non identifiés sont présentés en Annexe 3.

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Porellales Schljakov</u>
Sous-ordre	Jubulinea Müll.Frib.
<b>Famille</b>	<b>Frullaniaceae Lorch</b>
Genre	Frullania <b>Raddi</b>
	Frullania bella* Steph.
	Frullania scalaris* S.Hatt.
	Frullania multilacera Steph.
	Frullania falsicornuta* S.Hatt.
	Frullania mammillosa* S.Hatt.
	Frullania cornuta* Steph.
	Frullania ericoides (Nees) Mont.

**Tableau 42 : Classification taxonomique des espèces de la famille des Frullaniaceae**

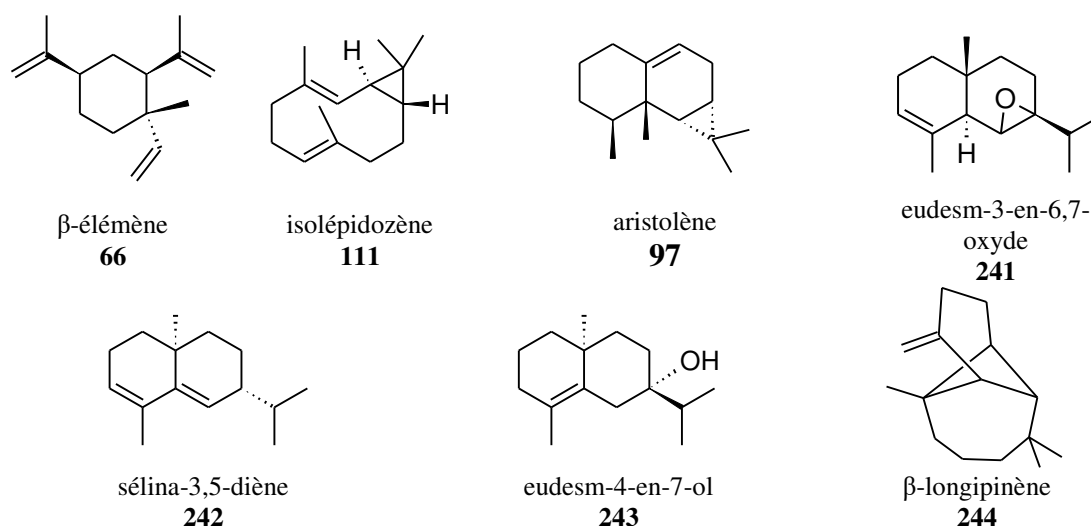
## 3.5.2 Résultats

### 3.5.2.1 *Frullania bella* Steph. (endémique)

Les constituants détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. Les deux échantillons étudiés (COU164 et COU190) sont assez différents au niveau de leur composition chimique. Pour l'échantillon COU164, l'isolépidozène (**111**) a été détecté en tant que composé majoritaire et l'aristolène (**97**), qui n'est pas spécifique du genre *Frullania*, a été détecté en tant que composé secondaire.

Dans l'échantillon COU190, l'eudesm-3-en-6,7-oxyde (**241**) (rare, identifié dans *Lophozia ventricosa* [114]) a été détecté en tant que composé majoritaire. Un composé inconnu ( $[M]^+ = 204$ ) et le sélina-3,5-diène (**242**) ont été détectés en tant que composés secondaires. La plupart des composés minoritaires sont communs aux deux échantillons (COU164 et COU190) : un composé inconnu ( $[M]^+ = 204$ ), l'eudesm-4-en-7-ol (**243**) (rare, isolé de *Bazzania tridens* [115]), le  $\beta$ -longipinène (**244**), le  $\beta$ -élémente (**66**), et l'isolépidozène (**111**).

L'analyse phytochimique a montré qu'il y a deux fois plus de composés détectés dans COU164 que dans COU190. Aucun biomarqueur ne permet de classer ces deux plantes endémiques dans des chimiotypes connus. Leurs chimiotypes diffèrent de ceux des autres plantes du genre *Frullania* étudiées par la présence de sesquiterpénoïdes de type eudesmane portant des fonctions époxyde et alcool et par un nombre plus important de composés indéterminés.



### 3.5.2.2 *Frullania cornuta* Steph. (endémique)

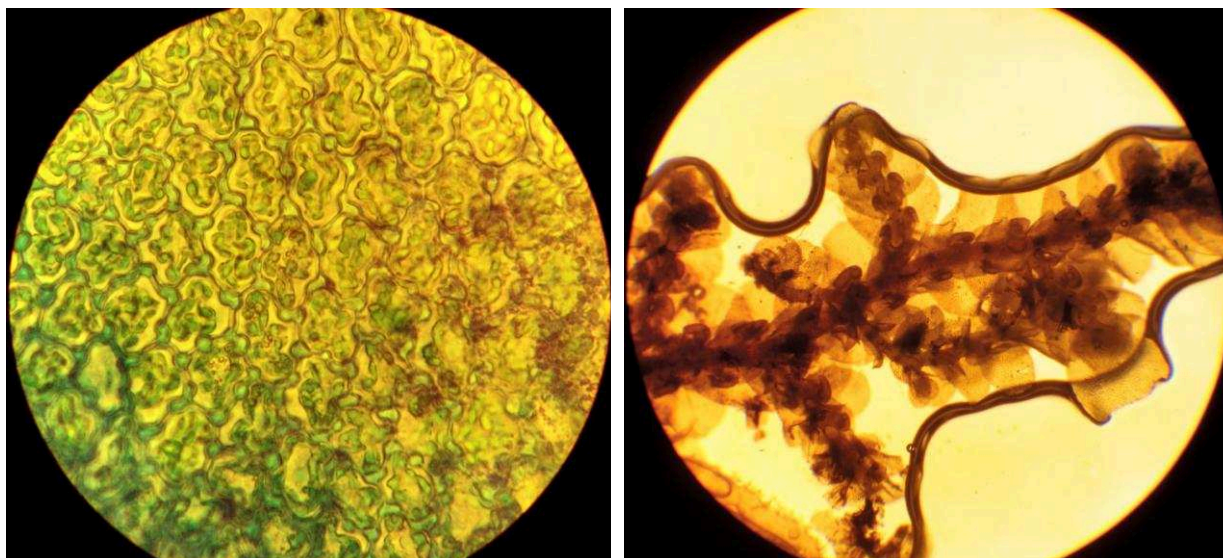
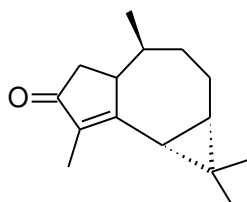
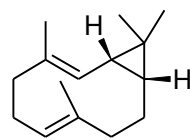


Figure 46 : Détails de *Frullania cornuta*, à gauche : cellules\*1000, à droite face ventrale \*40

Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. Le cyclocolorènone (**245**) (non spécifique du genre *Frullania*) a été détecté comme composé majoritaire, donc *F. cornuta* est indexée dans le chimiotype VII. Deux composés secondaires ont été détectés, ce sont : le bicyclogermacrène (**246**), qui est un des sesquiterpénoïdes les plus communs dans les Marchantiophyta [21], et un composé inconnu de type sesquiterpénique ( $[M]^+ = 204$ ).



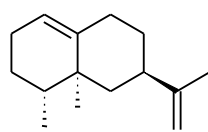
cyclocolorènone  
**245**



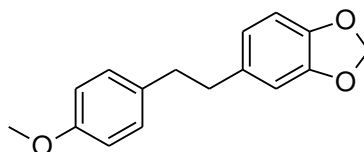
bicyclogermacrène  
**246**

### 3.5.2.3 *Frullania ericoides* (Nees) Mont.

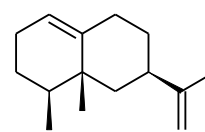
Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. Deux échantillons de cette espèce chimiquement assez différents ont été étudiés (MET017 et MET019). Dans l'échantillon MET017 la dihydrognétine (**220**) (isolée de *Trocholejeunea sandvicencis* [21]) et le valencène (**205**) ont été détectés comme composés majoritaires, puis l'éremophilène (**247**) et deux composés indéterminés comme composés secondaires.



valencène  
**205**

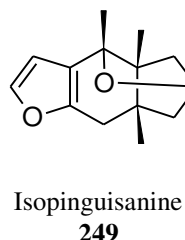
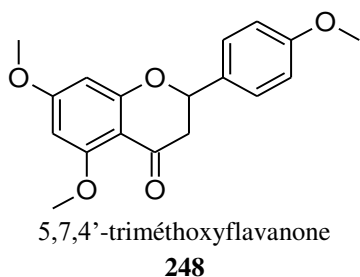


dihydrognétine  
**220**



éremophilène  
**247**

Dans l'échantillon MET019 la 5,7,4'-triméthoxyflavanone (**248**), précédemment isolé de *Frullania hamatiloba* [21], et l'isopinguisanine (**249**) ont été détectés comme composés majoritaires, avec deux composés indéterminés comme composés secondaires. Notons que les sesquiterpénoïdes de type pinguisane se trouvent uniquement dans les hépatiques, mais ne sont pas spécifiques du genre *Frullania*.



Mise à part la flavone, tous les composés détectés dans l'échantillon MET017 ont été aussi détectés dans l'échantillon MET019. La détection de la dihydrognétine (**220**) permet d'indexer l'échantillon MET017 au chimiotype III. Cependant le chimiotype de MET019 n'est pas clairement établi car la dihydrognétine a été détectée seulement en tant que composé minoritaire. Ainsi, une chimiovariabilité importante a été observée entre les deux échantillons de *F. ericoides* car les deux composés majoritaires des échantillons MET017 et MET019 ne sont pas les mêmes (pour l'échantillon MET017 : bibenzyl et sesquiterpénoïde de type valencane alors que pour l'échantillon MET019 : sesquiterpène de type pinguisane et flavone). Ce fait est notable car ces deux échantillons ont été récoltés sur le même lieu et à la même période. Ceci pourrait supposer une variabilité liée à un stade de croissance différent entre ces deux échantillons.



### 3.5.2.3.1 Fractionnement



**Figure 47 : Détails de *Frullania ericoides*, à droite vue macroscopique, en haut à droite : amphigastre \*100, en bas à gauche \*40**

➤ échantillon MET019

55 g de matériel végétal a été extrait avec de l'Et<sub>2</sub>O et 1,9 g d'extrait a été obtenu. Cet extrait a été fractionné selon le mode opératoire détaillé dans II.2.3 pour aboutir à l'isolement de trois molécules purifiées.

Les molécules isolées de l'extrait éther puis caractérisées sont:

- l'**apigénine-7,4'-diméthyl éther (250)** (143 mg)
- le **5,7,4'-triméthoxyflavanone (248)** (185 mg)
- le **3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (251)** (10 mg)

➤ échantillon MET019

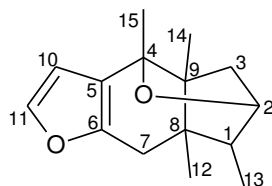
70 g de matériel végétal a été extrait avec de l'Et<sub>2</sub>O et 1,3 g d'extrait ont été obtenus. Cet extrait a été fractionné selon le mode opératoire détaillé dans la partie II.2.3 pour aboutir à l'isolement de deux molécules purifiées.

Les molécules isolées de l'extrait éther puis caractérisées sont:

- l'**isopinguisanine (249)** (188 mg).
- la **dihydrognétine (220)** (12 mg).

3.5.2.3.2 Composé 8 : isopinguisanine (**249**)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 43, la parfaite concordance de ces données [116] nous permet de conclure que le composé 8 est identifié à l'isopinguisanine (**249**).

Isopinguisanine **249**

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	46,81 (CH)	46,2	1,73 (1H, m)	1,73 - 1,79 (1H, m)
2	81,06 (CH)	Non renseigné	3,69 (1H, d, J = 1,8 Hz)	3,70 (1H, d, J = 1,5 Hz)
3	38,27 ( $\text{CH}_2$ )	37,6	1,75 (1H, q, J = 2,5 Hz) 1,80 (1H, d, J = 10,6 Hz)	1,73 - 1,79 (1H, m) 1,81-1,83 (1H, d, J = 11,2 Hz)
4	78,11 (C)	77,4		
5	120,65 (C)	120,0		
6	141,50 (C)	140,8		
7	32,47 ( $\text{CH}_2$ )	31,8	2,39 (1H, dd, J = 0,9 ; 17,1 Hz) 2,56 (1H, d, J = 17,1 Hz)	2,39 - 2,43 (1H, d, J = 17 Hz) 2,56 - 2,60 (1H, d, J = 17Hz)
8	43,16 (C)	42,5		
9	52,08 (C)	51,5		
10	108,62 (CH)	108,0	6,38 (1H, d, J = 2 Hz)	6,40 (d, J = 2,0 Hz)
11	148,81 (CH)	148,1	7,24 (m)	7,26 (d, J = 2,0 Hz)
12	21,38 ( $\text{CH}_3$ )	20,7	1,02 (3H, s)	1,04 (3H, s)
13	13,48 ( $\text{CH}_3$ )	12,8	0,82 (d, J = 7,6 Hz)	0,84 (d, J = 7,6 Hz)
14	11,35 ( $\text{CH}_3$ )	10,7	0,91 (3H, s)	0,93 (3H, s)
15	24,33 ( $\text{CH}_3$ )	23,7	1,37 (3H, s)	1,39 (3H, s)

Tableau 43 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de l'isopinguisanine (**249**)



### 3.5.2.3.3 Composé 9 : 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (248) (Nouvelle molécule naturelle)

La masse de ce composé **9** obtenue par HEIRMS (314,1162) révèle que sa formule brute est  $C_{18}H_{18}O_5$ , correspondant à une structure avec dix insaturations. L'analyse du spectre infra rouge nous permet de repérer plusieurs motifs : cycle aromatique (839, 848, 1599, 1512, 1454  $cm^{-1}$ ), phényl éther (1159, 1205 et 1221  $cm^{-1}$ ) et ester cyclique (1743  $cm^{-1}$ ).

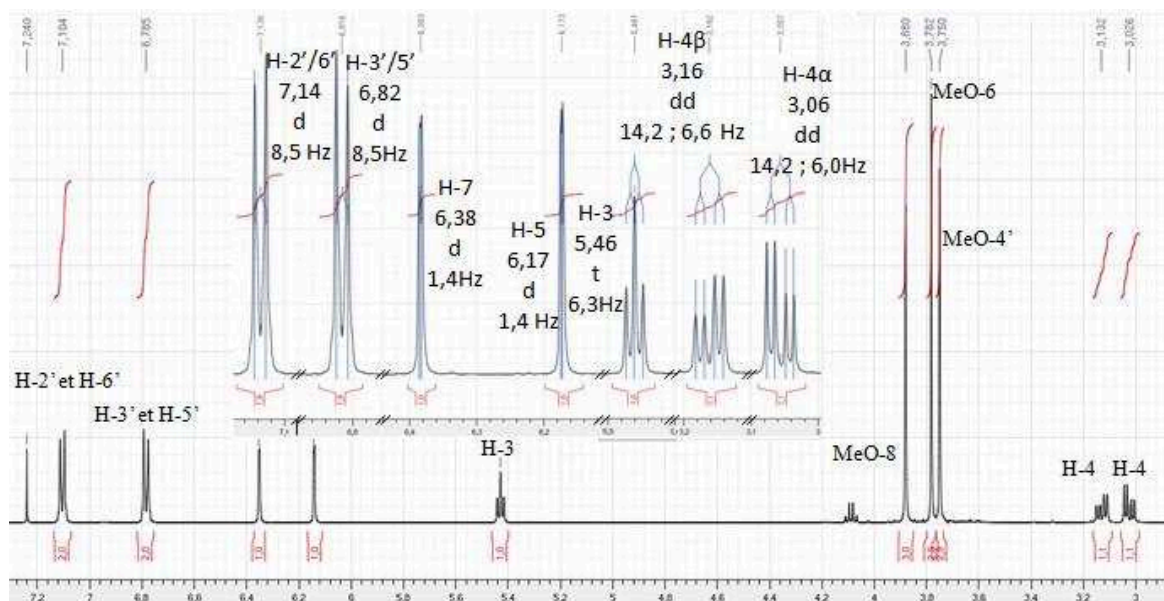


Figure 48 : Spectre RMN  $^1H$  de la 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (248)

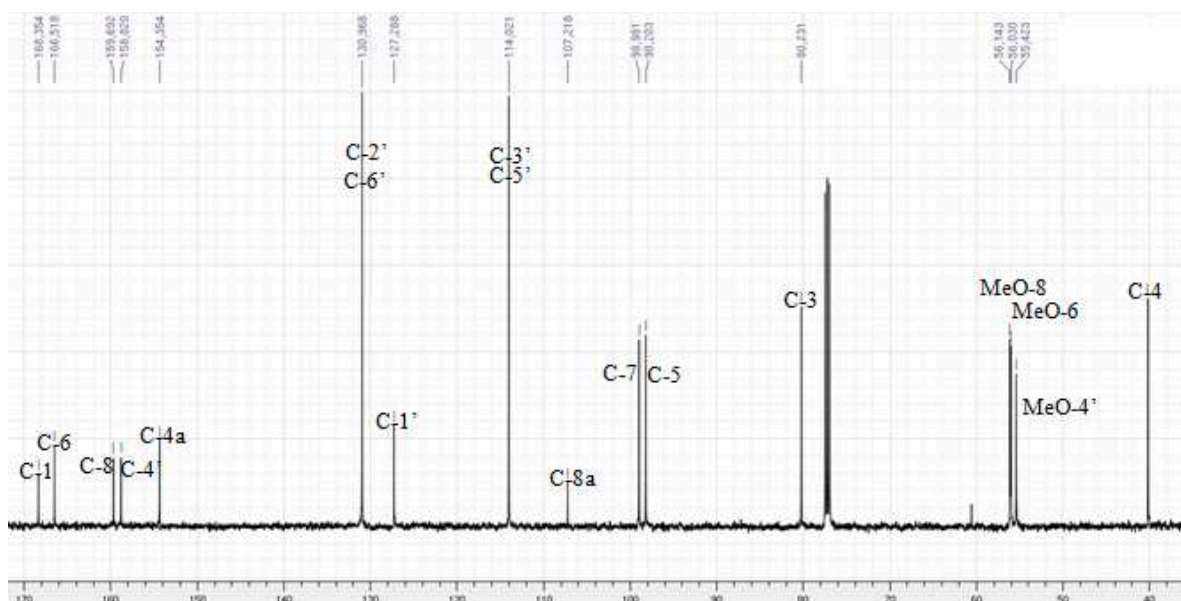
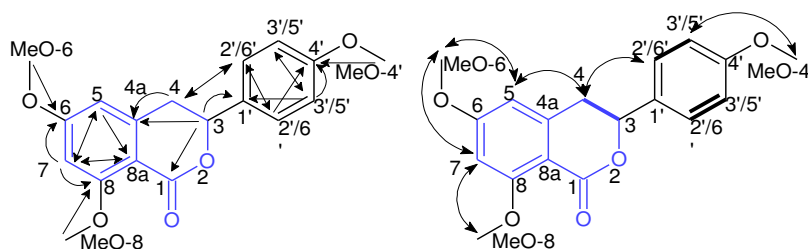
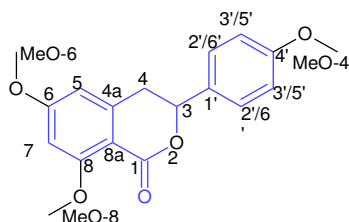


Figure 49 : Spectre RMN  $^{13}C$  de la 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (248)



**Figure 50** : 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (**248**) ; à gauche, flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite, flèches : corrélations NOESY et en gras corrélations  $^3J_{H-H}$  observées sur le spectre COSY

D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 49) et  $^1\text{H}$  (Figure 48) expérimentales obtenues avec celles de la littérature [117], ci-établie dans le Tableau 44, la concordance de ces données nous permet de conclure que le composé **9** est identifié à la 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (**248**), en accord avec les différentes corrélations HMBC et NOESY observées (Figure 50). Ce composé n'étant connu que comme intermédiaire synthétique, il s'agit du premier report de la 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (**248**) en tant que molécule naturelle.



6,8-Dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**248**)

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	exp	Litt.	exp	Litt.
1	168,3 (C)	165,8		
2	O	O		
3	80,2 (CH)	81,6	5,43 (1H, t, J = 6,3 Hz)	5,52 (dd, J = 12,0; 3,6)
4 $\alpha$	40,2 (CH <sub>2</sub> )	36,0	3,06 (1H, dd, J = 14,2 ; 6,0 Hz)	3,08 (1H, dd, J <sub>gem</sub> = 16,3 Hz; J <sub>cis</sub> = 3,2 Hz)
4 $\beta$			3,16 (1H, dd, J = 14,2 ; 6,6 Hz)	3,16 (1H, dd, J <sub>gem</sub> = 16,5; J <sub>trans</sub> = 12,6 Hz)
4a	154,4 (C)	142,0		
5	98,2 (CH)	107,2	6,17 (1H, d, J = 1,6 Hz)	6,45 (d, J = 2,2 Hz)
6	166,5 (C)	163,8		
MeO-6	56,0 (CH <sub>3</sub> )	55,7	3,78 (3H, d, J = 1,4 Hz)	3,85 (3H, s)
7	99,0 (CH)	102,8	6,38 (1H, d, J = 1,4 Hz)	6,37 (1H, d, J = 2,1 Hz)
8	159,7 (C)	163,5		
8a	107,2 (C)	103,9		
MeO-8	56,1 (CH <sub>3</sub> )	56,4	3,88 (3H, d, J = 2 Hz)	3,94 (3H, s)
1'	127,3 (C)	131,2		
2'/6'	131,0 (2*CH)	126,7	7,14 (2*1H, d, J = 8,2 Hz)	7,40 (2H, d, J = 7,5 Hz)
3'/5'	114,0 (2*CH)	117,3	6,82 (2*1H, d, J = 8,2 Hz)	6,89 (2H, d, J = 7,5 Hz)
4'	158,8 (C)	162,1		
MeO-4'	55,4 (CH <sub>3</sub> )	55,6	3,75 (3H, d, J = 1,8 Hz)	3,80 (3H, s)

**Tableau 44** : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la 6,8-diméthoxy-3-(4-méthoxyphényl)-3,4-dihydroisocoumarine (**248**)

3.5.2.3.4 Composé 10 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (**252**)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 45, la parfaite concordance de ces données [118] nous permet de conclure que le composé 10 est identifié au 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (**252**).

5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone <b>252</b>			
# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		Litt.
	Exp.	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ ) Exp.	
1	164,2 (C)		
2	104,5 (CH)	6,56 (1H, s)	6,58 (1H, s)
3	182,7 (C)		
4	157,9 (C)		
5	98,2 (CH)	6,36 (1H, d, J = 2,1 Hz)	6,37 (d, J = 2,4 Hz)
6	165,6 (C)		
7	92,8 (CH)	6,47 (1H, d, J = 2,1 Hz)	6,49 (d, J = 2,4 Hz)
8	162,4 (C)		
9	105,7 (C)		
10	56,0 ( $\text{CH}_3$ )	3,88 (3H, s)	3,89 (3H, s)
11	55,7 ( $\text{CH}_3$ )	3,89 (3H, s)	3,90 (3H, s)
12	123,7 (C)		
1'	128,2 (2*CH)	7,8 (2*1H, d, J = 8,7 Hz)	7,85 (d, J = 9,3 Hz)
2' et 6'	114,7 (2*CH)	7,01 (2*1H, d, J = 8,7 Hz)	7,02 (d, J = 9,3 Hz)
3' et 5'	162,8 (C)		
4'	$\text{C}^5\text{-OH}$	12,81 (1H, s)	12,80 (1H, s)

**Tableau 45 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (**252**)**

### 3.5.2.3.5 Composé 11 : 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (**253**) (Nouvelle molécule)

La masse de ce composé 11 obtenue par HEIRMS (258,3330) révèle que sa formule brute est  $C_{17}H_{20}O_3$ , correspondant à une structure avec huit insaturations.

➤ Analyse des spectres RMN  $^1H$  (Figure 51),  $^{13}C$  (Figure 53) et HSQC édité

Sur le spectre de RMN du  $^{13}C$ , cinq signaux correspondant à des carbones quaternaires hybridés  $sp^2$  sont observés : C-1 ( $\delta_c$  135,5 ppm), C-1' ( $\delta_c$  134,2 ppm) et, dont trois hypothétiquement liés à un oxygène étant donné leurs déplacements chimiques : C-4' ( $\delta_c$  158,0 ppm), C-3 ( $\delta_c$  145,6 ppm), C-4 ( $\delta_c$  145,0 ppm).

Sont observés aussi cinq groupes méthines ayant toutes les caractéristiques de protons aromatiques : C-6 ( $\delta_c$  120,0 ,  $\delta_H$  6,61 (dd; J = 8,1; 2,1 Hz) ppm), C-5 ( $\delta_c$  110,7 ,  $\delta_H$  6,74 (d; J = 8,1 Hz) ppm), C-2 ( $\delta_c$  114,9 ,  $\delta_H$  6,77 (d; J = 2,1 Hz) ppm), dont deux paires de signaux protoniques intégrant chacun pour deux protons : C-2' et 6' ( $\delta_c$  129,5 (2\*CH),  $\delta_H$  7,07 (d; J = 8,7 Hz) ppm), C-3' et 5' ( $\delta_c$  113,9 (2\*CH) ;  $\delta_H$  6,8 (d; J = 8,7 Hz) ppm)

Deux groupes méthylènes ont été observés : C-7 ( $\delta_c$  37,7 (CH<sub>2</sub>),  $\delta_H$  2,76 (m; J = 4,1 Hz) ppm), C-8 ( $\delta_c$  37,3 (CH<sub>2</sub>),  $\delta_H$  2,8 (m; J = 4,1 Hz) ppm).

On observe également deux groupe méthyles qui peuvent attribués à des fonctions méthoxy de part leurs déplacements chimiques : C-9 ( $\delta_c$  56,2 ,  $\delta_H$  3,84 (s) ppm), C-10 ( $\delta_c$  55,5 ,  $\delta_H$  3,77 (s) ppm).

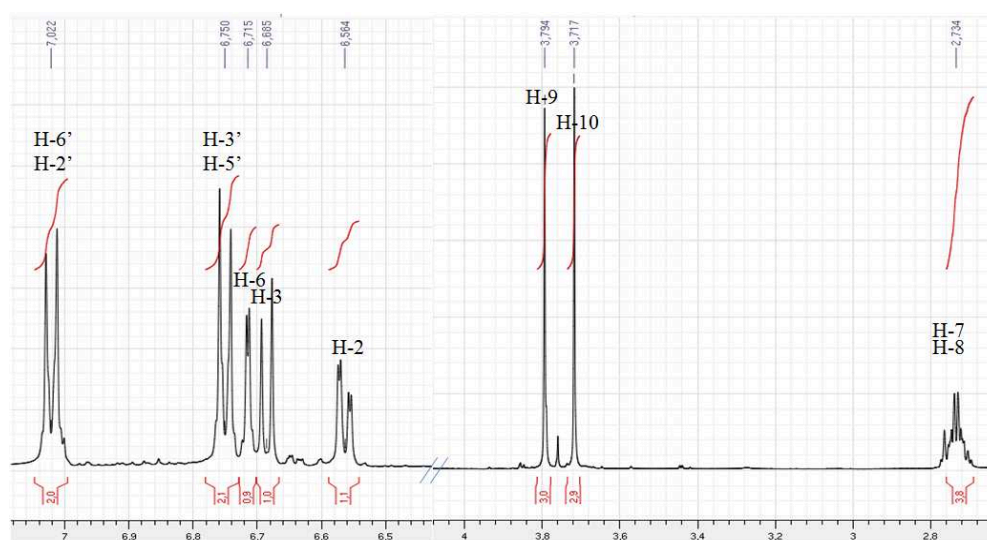
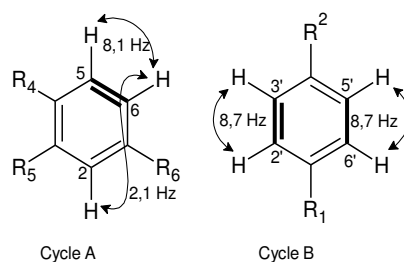


Figure 51 : Spectre RMN  $^1H$  du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (**253**)

➤ Construction de la structure du composé 11

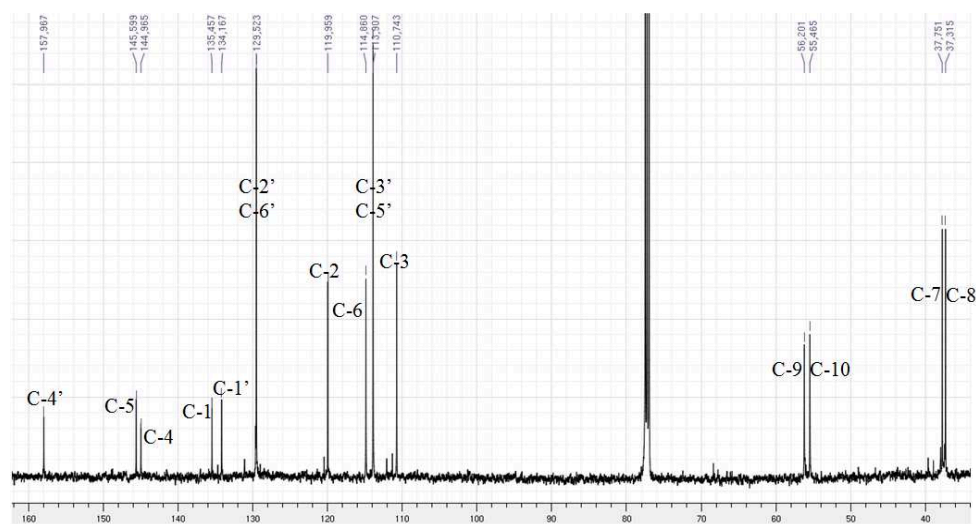
L'analyse des signaux attribués aux groupes méthines sont caractéristiques d'un noyau aromatique. En se basant sur les multiplicités, les valeurs des constantes de couplage de ces

signaux et les corrélations  $^3 J_{H-H}$  deux cycles aromatiques (cycle A et cycle B) sont établis (cf. Figure 52).



**Figure 52 : Dédiction de deux cycles aromatiques sur la base du spectre RMN  $^1H$  et des corrélations  $^3 J_{H-H}$  visibles sur le spectre COSY**

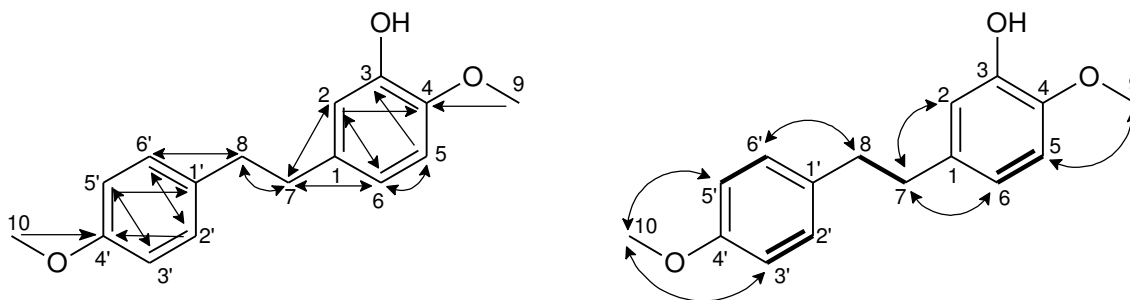
Le spectre COSY montre une corrélation  $^3 J$  entre les protons H-7 et H-8 établissant ainsi la liaison (C-7)-(C-8). Les corrélations clés H-7/C-6/C-2 avec les atomes de carbone du motif (C-7)-(C-8) ont permis de relier ce chaînon aliphatique sur le cycle B. Ensuite la corrélation H-8/C-6' permet de localiser l'atome de carbone C-1' sur lequel est fixé le chaînon aliphatique, (formé par les carbones C-7 et C-8 lié au noyau B) au niveau du cycle A, et constituant ainsi un pont entre les deux cycles aromatiques A et B.



**Figure 53 : Spectre RMN  $^{13}C$  du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybiphenyl (**253**)**

Sont localisés sur le cycle B : le groupe hydroxyl (fonction phénol) fixé sur le carbone C-3 montré par la corrélation H-5/C-3 ; une fonction éther méthylique (correspondant au carbone C-9 caractérisé par un groupe méthyl très déblindé résonant à 56,2 ppm) liée au cycle aromatique par le carbone C-4 d'après les corrélations H-9/C-4 et H-2/C-4 relevés sur le spectre HMBC.

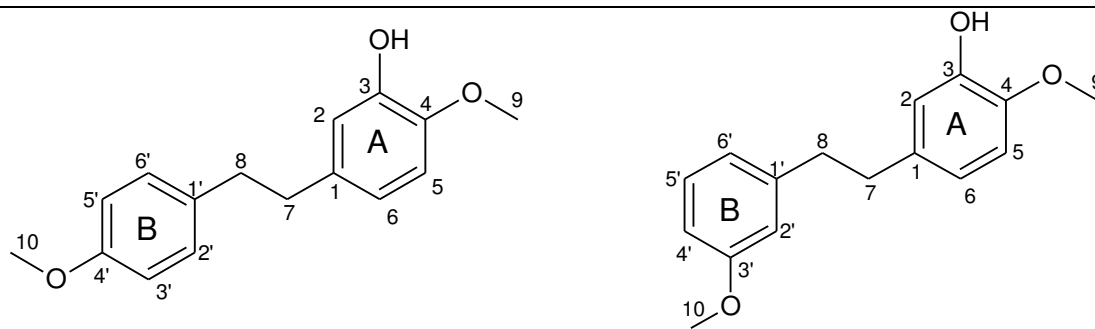
L'élucidation structurale est finalisée avec la localisation sur le cycle A de la fonction éther méthylique (correspondant au carbone C-10 caractérisé par un groupe méthyl déblindé résonant à 55,5 ppm) liée au cycle aromatique par le carbone C-4' d'après les corrélations H-10/C-4' et H-10/C-3' relevés sur le spectre HMBC. Le composé **11** est donc ainsi identifié comme étant le 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybiphenyl (**253**) en cohérence toutes les corrélations observées sur les spectres HMBC et NOESY (Figure 54).



**Figure 54 :** 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybiphenyl (**253**); à gauche, flèches : corrélations  $^3J_{H\rightarrow C}$  observées sur le spectre HMBC; à droite, flèches : corrélations  $^2J$  et  $^4J_{H\rightarrow C}$  observées sur le spectre HMBC et en gras corrélations  $^3J_{H-H}$  observées sur le spectre COSY

Nous avons choisi de comparer les déplacements chimiques  $^{13}C$  et  $^1H$  du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybiphenyl (**253**) avec ceux trouvés dans la littérature pour le 3-hydroxy-4,3'-diméthoxybiphenyl (**254**) [119] car ces molécules ont des structures très proches mais se différencient seulement par la présence position d'une fonction méthoxy. Cette comparaison vient appuyer notre élucidation structurale car les seules différences notables entre les molécules (**253**) et (**254**) sont : la non équivalence des carbones C-2' et C-6' d'une part et C-3' et C-5' d'autre part ceci étant dû à l'absence de symétrie du cycle B pour le composé (**254**) ainsi que les statuts quaternaires / tertiaires des carbones C-4' et C-3'. En effet pour la molécule (**253**), la fonction méthoxy du noyau aromatique B est en position para alors que cette fonction est en position méta pour la molécule (**254**) (Tableau 46).

L'ensemble des déductions effectuées nous permet de conclure que le composé 11 est identifié au 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybiphenyl (**253**). Il s'agit d'un nouveau composé naturel.

3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl **253**3-hydroxy-4,3'-diméthoxybibenzyl **254**

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	Litt.
	Exp.	Exp.		
1	135,5 (C)		6,77 (1H, d, J = 2,1 Hz)	
2	114,9 (CH)			6,80 (1H, d, J = 2,1 Hz)
3	145,6 (C)			
4	145,0 (C)		6,74 (1H, d, J = 8,1 Hz)	
5	110,7 (CH)		6,61 (1H, dd, J = 8,1; 2,1 Hz)	6,76 (1H, d, J = 8,2 Hz)
6	120,0 (CH)			6,65 (1H, dd, J = 8,2 ; 2,1 Hz)
7	37,7 ( $\text{CH}_2$ )		2,76 (2H, m, J = 4,1 Hz)	2,84 (2H, s)
8	37,3 ( $\text{CH}_2$ )		2,80 (2H, m, J = 4,1 Hz)	2,84 (2H, s)
9	56,2 ( $\text{CH}_3$ )		3,84 (3H, s)	3,86 (3H, s)
10	55,5 ( $\text{CH}_3$ )		3,77 (3H, s)	3,79 (3H, s)
1'	134,2 (C)			
2'	129,5 (2*CH)		6,80 (2*1H, d, J = 8,7 Hz)	6,73 (1H, t, J = 1,0 Hz, H-2')
6'				6,78 (1H, ddd, J = 7,5 , 1,0 , 1,0 Hz)
3'	113,9 (2*CH)		7,07 (2*1H, d, J = 8,7 Hz)	
5'				7,19 (1H, d, J = 7,5 , 1,5 Hz, H-4')
4'	158,0 (C)			6,74 (1H, ddd, J = 7,5 , 1,0 , 1,0 Hz)

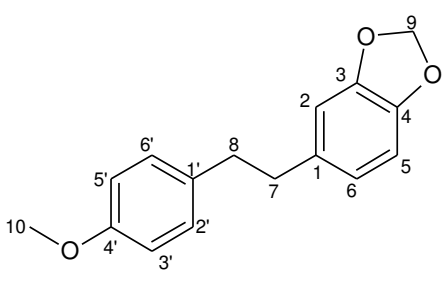
**Tableau 46 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (253)**



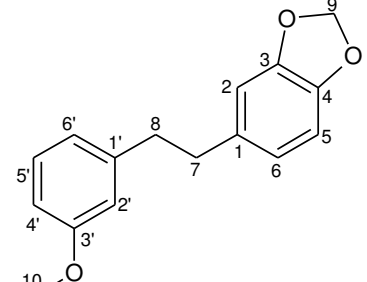
### 3.5.2.3.6 Composé 12 : dihydrognétine (220)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). L'identification structurale du composé 12 mène à la dihydrognétine (220) précédemment isolée de *Trocholejeunea sandvicensis* [120] cependant nous n'avons pas pu trouver dans la littérature les données RMN relatives à ce composé. Les données spectrales du composé 12 ont été comparées avec celles du 3,4-méthylènedioxy-3'-méthoxybibenzyl (255) [119] qui possède une structure très proche.

D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 47, les données concordent sauf pour les cycles aromatiques porteur d'une fonction méthoxy. Cela s'explique par leur position sur ces cycles en para et en méta pour la dihydrognétine (220) et le 3,4-méthylènedioxy-3'-méthoxybibenzyl (255) respectivement. La comparaison de ces données nous permet de conclure que le composé 12 est identifié à la dihydrognétine (220).



dihydrognétine **220**



3,4-méthylènedioxy-3'-  
méthoxybibenzyl **255**

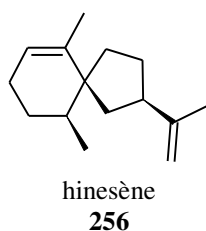
# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Exp.	Litt.	
1	135,8 (C)			
2	109,1 (CH)	6,70 (1H, d, J = 1,7 Hz)	6.68 (1H, d, J = 2.0 Hz)	
3	147,6 (C)			
4	145,8 (C)			
5	108,2 (CH)			
6	121,3 (CH)	6,74 (1H, d, J = 8 Hz)	6.72 (1H, d, J = 7.8 Hz)	
7	38,0 ( $\text{CH}_2$ )	6,63 (1H, dd, J = 6,9 ; 1,7 Hz)	6.62 (1H, dd, J = 7.8, 2.0 Hz)	
8	37,4 ( $\text{CH}_2$ )	2,84 (2H, m)	2.85 (2H, s)	
9	100,9 ( $\text{CH}_2$ )	2,84 (2H, m)	2.85 (2H, s)	
10	55,4 ( $\text{CH}_3$ )	5,92 (2H, s)	5.91 (2H, s)	
1'	133,8 (C)	3,80 (3H, s)	3.80 (3H,s)	
2'	129,5 (2*CH)	7,11 (2*1H, d, J = 1,8 Hz)	6.72 (1H, d, J = 2.0 Hz)	
6'			6.77 (1H, dd, J = 7.5 , 2.0 Hz)	
3'	113,9 (2*CH)	6,86 (2*1H, d, J = 2 Hz)		
5'			7.19 (1H, t, J = 7.5 Hz)	
4'			6.74 (1H, dd, J = 7.5 , 2.0 Hz)	

**Tableau 47 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du dihydrognétine (220)**



### 3.5.2.4 *Frullania falsicornuta* S.Hatt (endémique)

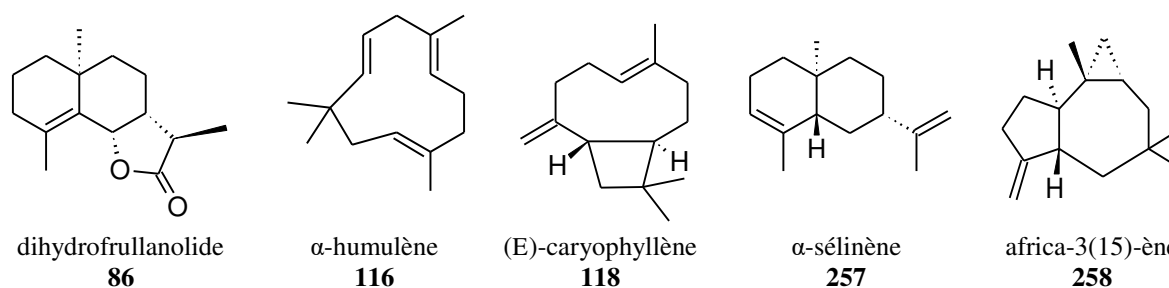
Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. L'érémosphylène (**247**), composé principalement trouvé dans les genres *Frullania* et *Radula* a été détecté comme composé majoritaire. Le cyclocolorène (**245**) a été détecté comme composé secondaire ce qui permet d'indexer *F. falsicornuta* au chimiotype VII. L'hinesène (**256**), le  $\beta$ -élémente (**66**) et deux composés inconnus sesquiterpéniques ( $[M]^{+}=204$ ) ont été détectés comme composés minoritaires.



### 3.5.2.5 *Frullania mammilosa* Steph.

Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. Deux échantillons ont été étudiés (COU082 : chimiotype II et COU163 : chimiotype indéterminé). L'isolépidozène (**111**), qui est répandu dans les hépatiques [121] et le dihydrofrullanolide (**86**) (principalement produit par les espèces du genre *Frullania* [122]), ont été détectés en tant que composés majoritaires dans COU082.

L' $\alpha$ -sélinène (**257**) a été identifié comme composé secondaire dans l'échantillon COU082. Un composé inconnu ( $[M]^{+}=232$ ) et l'isolépidozène (**111**) ont été détectés en tant que composés majoritaires dans l'échantillon COU163. Un composé inconnu sesquiterpénique ( $[M]^{+}=204$ ), l' $\alpha$ -sélinène (**257**) et le  $\beta$ -longipinène (**117**) ont été détectés en tant que composés minoritaires dans l'échantillon COU163.

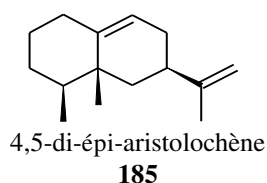


Les composés communs détectés dans les échantillons COU082 et COU163 sont : l' $\alpha$ -humulène (**116**), le (E)-caryophyllène (**118**), le  $\beta$ -élémente (**66**) (ces trois composés ne sont pas spécifiques aux hépatiques et sont trouvés communément dans la nature), un composé inconnu ( $[M]^{+}=232$ ) et l'africa-3(15)-ène (**258**). Les sesquiterpénoïdes de type africane sont assez rares dans la nature, cependant une grande diversité de composés sesquiterpéniques de ce type a été trouvée dans *Porella swartziana* [122]. Le spectre de masse du composé inconnu ( $[M]^{+}=232$ ) n'est pas caractéristique d'une lactone sesquiterpénique : le chimiotype de

l'échantillon COU163 reste indéterminé, alors que l'échantillon COU082 est indexé dans le chimiotype II.

### 3.5.2.6 *Frullania multilacera* Steph. (endémique)

Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. L'hinesène (**256**) (trouvé principalement dans le genre *Frullania*) a été détecté comme composé majoritaire et le (E)-caryophyllène (**118**), le 4,5-di-épi-aristolochène (**185**) (non spécifique du genre *Frullania*) et le valencène (**205**) (principalement trouvé dans les genres *Frullania* et *Radula*) identifiés en tant que composés secondaires. Le  $\beta$ -élémente (**66**) a été détecté comme composé minoritaire.



### 3.5.2.7 *Frullania scalaris* S.Hatt. (endémique)

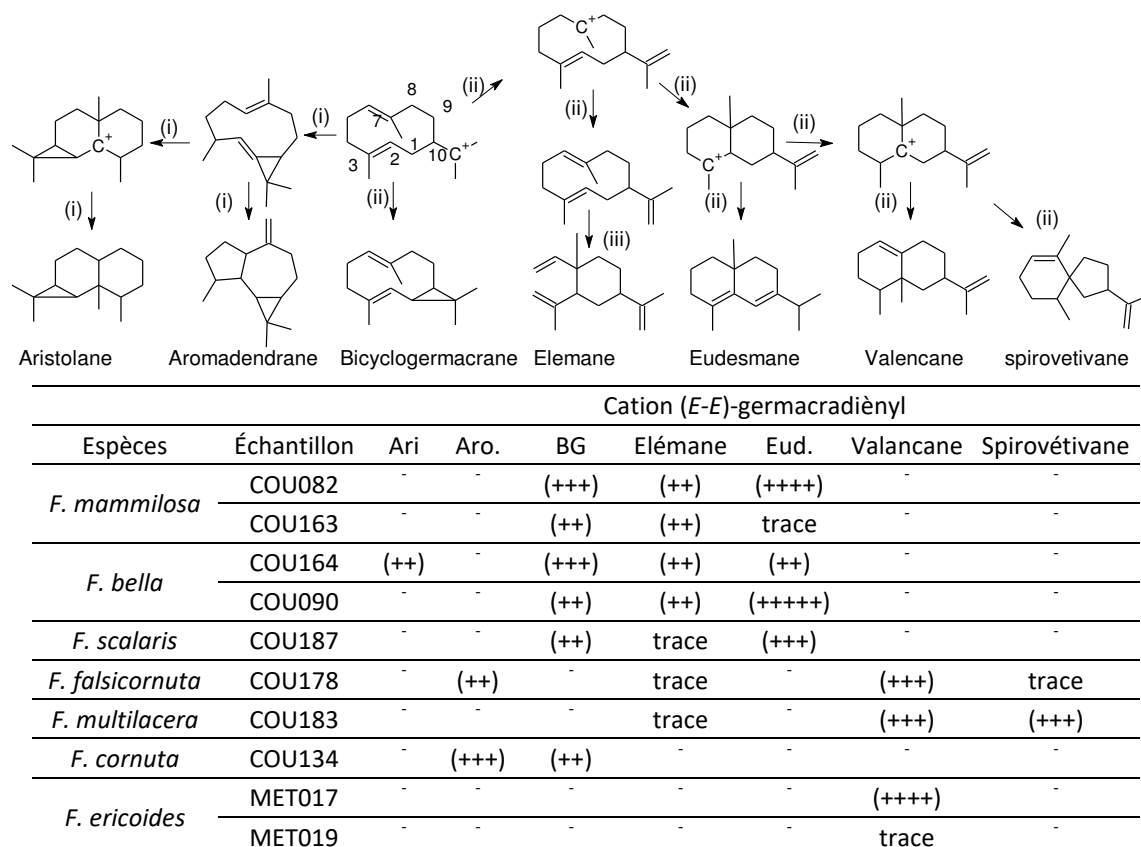
Les composés détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 48. Le dihydrofrullanolide (**86**) et l'isolépidozène (**111**) ont été détectés comme composés majoritaires, donc *F. scalaris* a été indexée dans le chimiotype II. Un composé secondaire inconnu ( $[M]^+ = 232$ ) a été détecté. Le  $\beta$ -élémente (**66**), l' $\alpha$ -humulène (**116**) et le  $\alpha$ -sélinène ont été identifiés comme constituants minoritaires.

	F. ma1	F. ma2	F. b1	F. b2	F. s	F. f	F. mu	F.c	F.e1	F.e2
Chimiotype	II	-	-	-	II	VII	-	VII	III	-
$\alpha$ -Sélinène (257)	++	+			+					
Dihydrofrullanolide (86)	+++				+++					
Eudesm-3-en-6,7-oxyde (241)				+++						
Eudesm-4-en-7-ol (243)			++	++						
Séлина-3,5-diène (242)				++						
4,5-Di-épi-aristolochène (185)							++			
Aristolène (97)			++							
Erémophilène (247)						+++			++	+
Valencène (205)							++		+++	+
Africa-3(15)-ène (258)	++	++								
$\alpha$ -Humulène (116)	++	++		+	+					
(E)-caryophyllène (118)	++	++					++	+		
$\beta$ -Elémène (66)	++	++	++	++	+	+	+			
Bicyclogermacrène (246)				+				++		
$\beta$ -Longipinène (244)		+	++	++						
Cyclocolorène (245)						++		+++		
Hinesène (256)						+	+++			
Isolépidozène (111)	+++	++	+++	++	++					
Isopinguisanine (249)									+	+++
Dihydrognétine (220)									+++	+
5,7,4'-Triméthoxyflavanone (248)										+++

**Tableau 48 : Constituants volatils détectés dans les espèces de la famille des Frullaniaceae (constituants majeurs : +++, constituants secondaires : ++, constituants mineurs : +) F. ma1 : COU082, F. ma2 : COU163, F. bella : F. b1 : COU164 et F. b2 : COU090, F. scalaris : F. s, F. falsicornuta F. f, F. multilacera : F. mu, F. cornuta : F.c, F. ericoides : F.e1 : MET017 et F.e1 : MET019**

### 3.5.3 Discussion

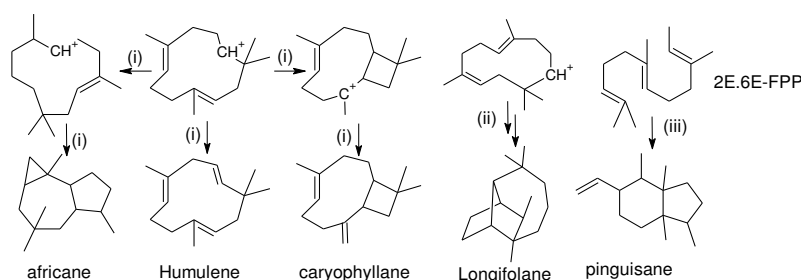
Dans les compositions en constituants volatils d'espèces étudiées du genre *Frullania* nous avons détecté une diversité importante de types de squelettes sesquiterpénique. Cependant, la majorité de ces sesquiterpénoïdes sont de type eudesmane et aristolane/valencane, leurs structures sont dérivées du cation (E-E)-germacradiényl [68] dans la voie de biosynthèse des sesquiterpénoïdes (Tableau 49).



**Tableau 49 : Composition des espèces de la famille Frullaniaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-germacradiényl. Ari. : aristolane, Aro. : aromadendrane, BG : bicyclogermacrane, Eud. : eudesmane. ((i) : [27], (ii) : [68], (iii) : [101])**

Etant donné que le chimiotype lactone sesquiterpénique est souvent dû à la présence de lactones sesquiterpéniques de type eudesmane et comme deux sesquiterpénoïdes oxygénés de type eudesmane ont été détectés dans *F. bella*, on pourrait affilier cette espèce à une variation du chimiotype lactone sesquiterpénique (chimiotype I).

Un nombre important de composés ont été détectés dans *F. mammillosa* en comparaison avec *F. scalaris* mais à l'exception d'un composé inconnu ( $[M\bullet]^+ = 204$ ), tous les sesquiterpénoïdes détectés dans *F. scalaris* sont aussi identifiés dans *F. mammillosa* avec des taux similaires. Ces deux plantes sont indexées dans le chimiotype II et partagent la présence d'un composé inconnu ( $[M]^+ = 232$ ). Même si les profils des composés volatils de ces deux plantes ont de grandes similarités, il n'y pas lieu d'imaginer une proximité génétique importante car les deux plantes ont des morphologies très différentes et appartiennent à des sous-genres différents.



Espèces	Échantillon	Cation (E-E)-humulyl			Cation (Z-E)-humulyl	Autre
		Africane	Humulane	Caryophyllane	Longipinane	Pinguisane
<i>F. mammilosa</i>	COU082	(++)	(++)	(++)	-	-
	COU163	(++)	(++)	(++)	trace	-
<i>F. bella</i>	COU164	-	-	-	(++)	-
	COU090	-	trace	-	(++)	-
<i>F. scalaris</i>	COU187	-	trace	-	-	-
<i>F. falsicornuta</i>	COU178	-	-	-	-	-
<i>F. multilacera</i>	COU183	-	-	(++)	-	-
<i>F. cornuta</i>	COU134	-	-	trace	-	-
<i>F. ericoides</i>	MET017	-	-	-	-	trace
	MET019	-	-	-	-	(+++)

**Tableau 50 : Composition des espèces de la famille Frullaniaceae en structures sesquiterpéniques affiliées au cation (E-E)-humulyl, (Z-E)-humulyl et en structure pinguisane. ((i) : [101], (ii) : [29], (iii) : [21])**

L'érémosphilène (**247**) a été détecté comme composant majoritaire chez *F. falsicornuta* et *F. ericoides*. Le valencène (**205**) a été détecté comme composant majoritaire chez *F. ericoides* et secondaire chez *F. Multilacera*. Cela conforte les données de la littérature faisant état de ces deux sesquiterpénoïdes de type érémosphilane principalement trouvés dans les genres *Frullania* et *Radula*. Ces deux genres appartiennent à l'ordre Porellales mais à des sous-ordres différents.

Malgré la relative diversité des structures sesquiterpéniques détectés dans les espèces de *Frullania* étudiées, on observe des variations intra espèces significatives menant parfois à des difficultés d'indexation dans des chimiotypes connus (*F. mammilosa*). Dans le cas de *F. ericoides*, des facteurs comme le biotope ou la période de collecte (affectant le stade de maturité de la plante) ne suffisent pas pour expliquer cette variabilité.

Le contenu moléculaire de *F. mammilosa* n'a pas pu être indexé dans un chimiotype connu à cause de la présence d'un composé majoritaire inconnu. L'isolement de ce constituant majoritaire pourrait mener à la découverte éventuelle d'un nouveau composé et d'un nouveau chimiotype.

Nous vous présentons dans le Tableau 51 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des Frullaniaceae.

Espèce	Code	diversité sesquiterpénique : cation (importance, nb de composés identifié)	Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires		Composés caractérisés par RMN	caractéristiques
			Sesquiterpénoïdes	Autres		
F. mammosa*	COU082	(E-E) Ger. (élevé, 3) (E-E) Hum. (élevé, 2)	dihydrofrullanolide ( <b>86</b> ) isolépidozène ( <b>111</b> )			type eudesmane, chimiotype II : lactone sesquiterpénique
	COU163	(E-E) Ger. (moyen, 3) (E-E) Hum. (élevé, 3) (Z-E) Hum. (faible, 1)	(E)-caryophyllène ( <b>118</b> )			composés dérivant du cation (E-E) Hum.
F. bella*	COU164	(E-E) Ger. (élevé, 4) (Z-E) Hum. (faible, 1)	eudesm-4-en-7-ol ( <b>243</b> ) isolépidozène ( <b>111</b> )			sesquiterpénoïdes oxygénés de type eudesmane
	COU090	(E-E) Ger. (élevé, 6) (E-E) Hum. (faible, 1) (Z-E) Hum. (faible, 1)	eudesm-3-en-6,7-oxyde ( <b>241</b> ) eudesm-4-en-7-ol ( <b>243</b> )			
F. scalaris*	COU187	(E-E) Ger. (moyen, 4) (E-E) Hum. (faible, 1)	dihydrofrullanolide ( <b>86</b> )			lactone sesquiterpénique (type eudesmane)
F. falsicornuta*	COU178	(E-E) Ger. (élevé, 4)	érémophilène ( <b>247</b> )			type érémophilane
F. multilacera	COU183	(E-E) Ger. (élevé, 4) (E-E) Hum. (faible, 1)	hinesène ( <b>256</b> )			type spirovétivane
F. cornuta*	COU134	(E-E) Ger. (moyen, 2) (E-E) Hum. (faible, 1)	cyclocolorène ( <b>245</b> )			chimiotype VII : cyclocolorène
F. ericoides	MET017	(E-E) Ger. (moyen, 3) Autre (faible, 1)	isopinguisanine ( <b>249</b> ) valencène ( <b>205</b> )	dihydrognétine ( <b>220</b> )	isopinguisanine ( <b>249</b> ) dihydrognétine ( <b>220</b> )	chimiotype III : bibenzyl
	MET019	(E-E) Ger. (faible, 4) Autre (moyen, 1)		5,7,4'- triméthoxyflavanone ( <b>248</b> )	deux flavonoïdes : ( <b>259</b> ) et ( <b>248</b> ) 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl*	Flavonoïdes, chimiotype III : bibenzyl

**Tableau 51 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour les espèces de la famille des Frullaniaceae nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes)**

### 3.5.4 Conclusion

Cette partie de l'étude a porté sur l'analyse phytochimique de sept espèces du genre *Frullania*. Cinq des sept espèces ci-étudiées sont endémiques de Nouvelle-Calédonie (*F. bella*, *F. scalaris*, *F. mammillosa*, *F. Cornuta* et *F. falsicornuta*) et seule *F. ericoides* a fait l'objet d'une étude phytochimique antérieure. Les composants volatils de ces espèces ont été analysés par CPG-MS afin d'indexer ces plantes à des chimiotypes connus pour ce genre. Les constituants détectés dans ces espèces de *Frullania* sont principalement des composés sesquiterpéniques, ainsi que la 5,7,4'-triméthoxyflavanone (**248**), la dihydrognétine (**220**) et le 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (**261**).

Les espèces endémiques *F. bella* et *F. mammillosa* n'ont pas pu être indexées. De par son contenu riche en sesquiterpénols, *F. bella* pourrait être affiliée au chimiotype I (lactone sesquiterpénique) alors que *F. mammillosa* possède un sesquiterpénoïde dioxygéné inconnu et serait affiliée à un autre chimiotype à déterminer.

Nous avons remarqué qu'aucun sesquiterpénoïde issu du cation bisaboly, pourtant souvent présent dans la majorité des autres familles, n'a été détecté dans les espèces néo-calédoniennes du genre *Frullania*.

## 3.6 Composés volatils de *Porella viridissima*

Les espèces du genre *Porella* font partie de l'ordre des Porellaceae. La plupart des espèces répertoriées sont distribuées dans l'Est asiatique. Ce genre a déjà fait l'objet d'un nombre important d'études phytochimiques. Une étude phytochimique de l'espèce *Porella viridissima* a été effectuée afin d'indexer son contenu moléculaire à un chémotype connu.

### 3.6.1 Caractéristiques du genre *Porella*

On dénombre environ 130 espèce d'hépatiques du genre *Porella* à travers le monde. En Nouvelle-Calédonie 5 espèces dont une endémique ont été inventoriées.

Dans la littérature, six chimiotypes majeurs spécifiques aux espèces appartenant au genre *Porella* ont été décrits : drimane (chimiotype I), sacculatane (chimiotype II), pinguisane-sacculatane (chimiotype III), guaiane-germacrane (chimiotype IV), pinguisane (chimiotype V) et africane (chimiotype VI).

*Porella viridissima* est une plante distribuée dans le Pacifique Sud et il s'agit de la première investigation phytochimique menée sur cette espèce. Trois échantillons (MET014, MET015 et MET035) ont été collectés, les détails de ces collectes sont présentés dans le Tableau 67 (partie II.2.2). La classification taxonomique de cette espèce est décrite dans le Tableau 52 et les composés détectés non identifiés sont présentés en dans le Tableau 77 (Annexe 3).

Classe	Jungermanniopsida Stotler et Crand.-Stotl.
Sous-classe	Jungermanniidae Engl.
<u>Ordre</u>	<u>Porellales Schljakov</u>
Sous-ordre	Porellineae R.M.Schust.
<b>Famille</b>	<b>Porellaceae Cavers nom. Conserv</b>
Genre	<i>Porella</i> L. <i>Porella viridissima</i> (Mitt.) Grolle

**Tableau 52 : Classification taxonomique de *Porella viridissima***

### 3.6.2 Résultats

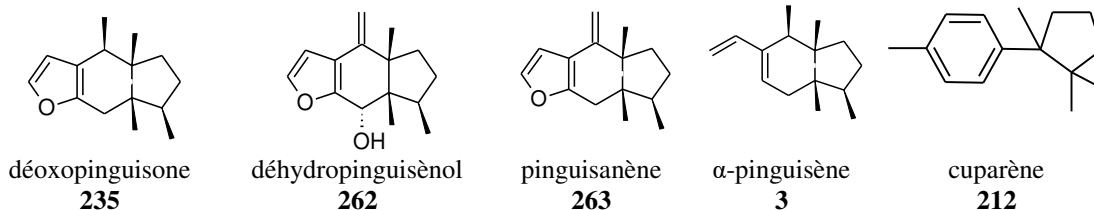
Sur les trois échantillons analysés de cette espèce (MET014, MET015 et MET035), deux d'entre eux (MET014 et MET015) ont un contenu en composés volatils similaire dominé par un taux important de composés diterpéniques non identifiés (25,2-27%) et sesquiterpéniques non identifiés (41-47,7%). L'échantillon MET035 est dominé par la présence de sesquiterpénoïdes identifiés (57,4%) et un faible pourcentage de composé non sesquiterpénique (0,7%). Ces deux types de profils seront donc traités séparément. Les composants détectés et identifiés de cette espèce sont détaillés dans le Tableau 53.

#### ➤ Échantillons MET014 et MET015

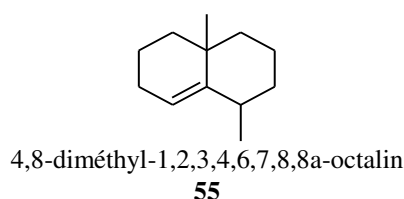
Les composés sesquiterpéniques détectés sont majoritairement du type pinguisane avec : le déoxopinguisone (**235**) (4-5,7%), le déhydropinguisènol (**262**) (3,1-3,6%), le pinguisanène



(**263**) (0,8-0,9%) et l' $\alpha$ -pinguisènol (**271**) (0-0,8%). Le perhydrofarnesyl acétone (**131**) (1,8-2,8%) et le cuparène (**212**) (0-1,1%) ont été aussi détectés.

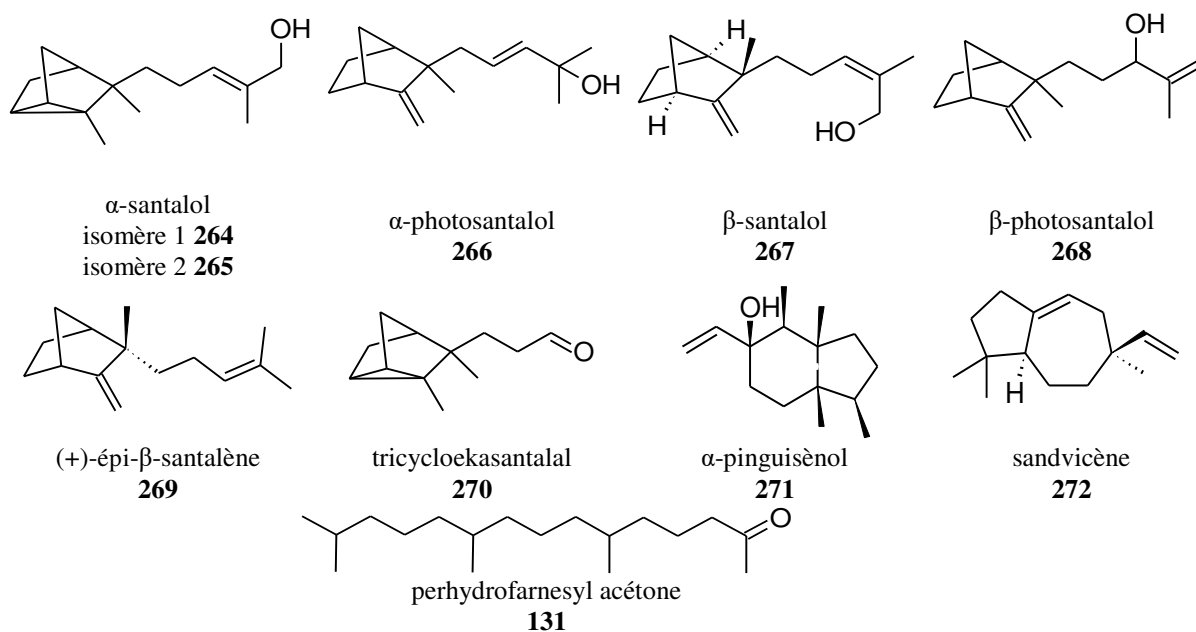


Les deux échantillons possèdent des composés non terpéniques : un composé non identifiés  $M \geq 168$ , 108, 95 (**90**) (10,1-15,7%), un alcool aliphatique (0,9-2,6%), le 4,8-diméthyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octalin (**55**) (0-2,5%), et deux alcanes non identifiés (0,3-1%) et (0,4-0,9%).



#### ➤ Échantillon MET035

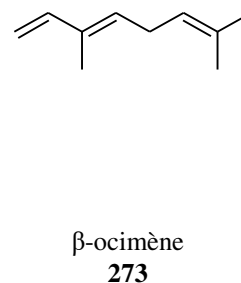
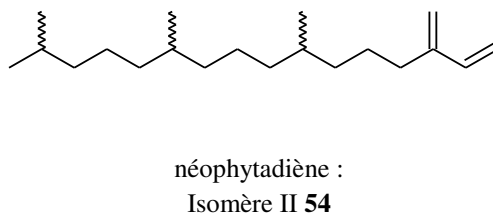
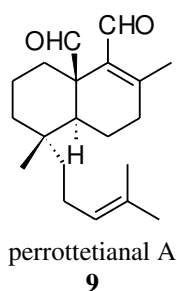
Le contenu en composés sesquiterpéniques de cet échantillon est dominé par des sesquiterpénoïdes de type santalane avec : l' $\alpha$ -santalol isomère 2 (**264**) (8,8%) et isomère 1 (**265**) (12,8%), le  $\alpha$ -photosantalol (9,4%), le  $\beta$ -santalol (**267**) (6%), le  $\beta$ -photosantalol (**268**) (4,4%), le (+)-épi- $\beta$ -santalène (**269**) (4%) (utilisé dans la parfumerie [123]) et le tricycloekasantalal (**270**) (1,2%).



Les sesquiterpénoïdes de type santalane possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques. L' $\alpha$ -santalol et le  $\beta$ -santalol sont les constituants majeurs du bois de santal (*Santalum album*) qui sont responsables de ses propriétés olfactives très appréciées en parfumerie [123], de plus ils sont actifs contre *Helicobacter pylori* (bactérie de l'estomac humain) [124]. Le  $\beta$ -santalol possède des propriétés antivirales [123] et l' $\alpha$ -santalol des propriétés antitumorales [125] et antipsychotiques [126].

Des sesquiterpénoïdes de type pinguisane ont été aussi détectés avec le déoxopinguisone (**235**) (3,9%), l' $\alpha$ -pinguisène (**3**) (3,3%), le déhydropinguisénol (**262**) (1,6%) et l' $\alpha$ -pinguisénol (**271**) (1,2%). Le sandvicène (**272**) (0,7%) a été aussi détecté.

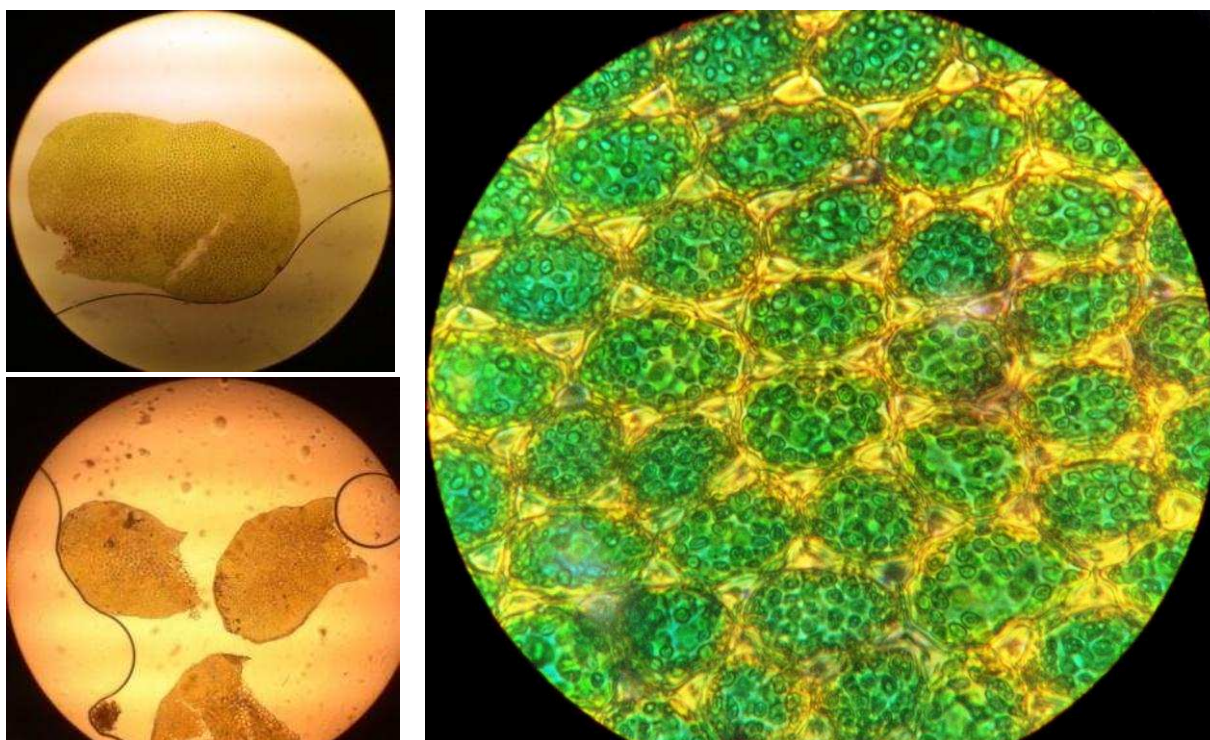
Un taux important de perrottetianal A (**9**) (11,8%) a été détecté ainsi que du néophytadiène II (**54**) (1,3%). La présence du  $\beta$ -ocimène (**273**) (0,7%), un monoterpène, a été aussi décelée.



Attribution	I <sub>R</sub>	t <sub>R</sub>	<i>Porella viridissima</i>	
			MET014-015	MET035
Tricycloekasantalal ( <b>270</b> )	1349,2	23,76	-	1,2
Sandvicène ( <b>272</b> )	1418,2	25,51	-	0,7
(+)-épi-β-Santalène ( <b>269</b> )	1429,3	25,78	-	4,0
α-Pinguisène ( <b>3</b> )	1458,7	26,49	-	3,3
Cuparène ( <b>212</b> )	1522,2	28	0-1,1	-
α-Santalol iso1 ( <b>264</b> )	1530	28,18	-	8,8
β-Santalol ( <b>267</b> )	1540	28,41	-	6,0
Pinguisanène ( <b>263</b> )	1566,1	29,01	0,8-0,9	-
Déoxopinguisone ( <b>235</b> )	1591,3	29,59	4-5,7	3,9
α-Photosantalol ( <b>266</b> )	1597	29,72	-	9,4
α-Pinguisénol ( <b>271</b> )	1614,5	30,11	0,8	1,2
β-Photosantalol ( <b>268</b> )	1708,2	32,17	-	4,4
α-Santalol iso2 ( <b>265</b> )	1723,1	32,48	-	12,8
Perhydrofarnesyl acétone ( <b>274</b> )	1843	34,94	1,8-2,8	-
Déhydropinguisénol ( <b>262</b> )	2009,8	38,17	3,1-3,6	1,6
Total sesquiterpénoïdes identifiés			11,8-12,8	57,3
Total sesquiterpénoïdes non identifiés			41-47,7	10,3
Néophytadiène II ( <b>54</b> )	1838,5	34,85	-	1,3
Perrottetianal A ( <b>9</b> )	2441,4	45,98	-	11,8
Total diterpénoïdes identifiés			-	13,1
Total diterpénoïdes non identifiés			25,2-27	18,6
Alcane non identifié	2398,9	45,05	0,4-0,9	-
Alcool aliphatique	2295,2	43,16	0,9-2,6	-
Alcane non identifié	2001,6	38,02	0,3-1	-
M≥168, 108, 95 ( <b>90</b> )	1682,4	31,61	10,1-15,7	-
β-Ocimène ( <b>273</b> )	1320,5	23,02	-	0,7
4,8-Diméthyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octalin ( <b>55</b> )	1247,1	21,05	0-2,5	-
Total non terpéniques			14,2-20,2	0,7

**Tableau 53 : Pourcentages relatifs des constituants volatils détectés dans *Porella viridissima***

### 3.6.2.1 Fractionnement



**Figure 55 : Détails de *Porella viridissima*, en haut à gauche : feuille\*100, en bas à gauche : lobule \*100, à droite cellules \*1000**

Un kilogramme de matériel végétal a été extrait. 13 g d'extrait étheré a été obtenu ainsi que 16 g d'extrait MeOH. Cet extrait a été fractionné selon le mode opératoire détaillé dans II.2.3.

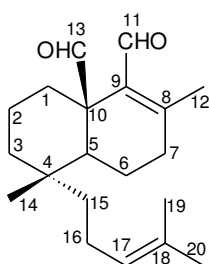
Les molécules isolées de l'extrait éther puis caractérisées sont :

- l'ester méthylique de norpinguisone (217) (1,4 g)
- le perrottetianal A (9) (600 mg)
- le stigmastérol (11) (10 mg).
- l'éthoxyphéophorbide (275) : isomère a + isomère b, ratio 10/3 (3mg)
- l'éthoxyphéophorbide (276): isomère c + isomère d, ratio 10/3 (27mg).

Une recristallisation dans le MeOH de l'extrait brut méthanol a permis d'isoler le  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (277) (1g).

### 3.6.2.2 Composé 13 : (+)-perrottétianal A (9)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 54, la parfaite concordance de ces données [127] nous permet de conclure que le composé 13 est identifié au perrottétianal A (9).



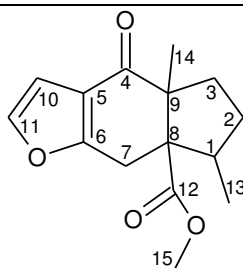
Perrottétianal A 9

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	42,8 ( $\text{CH}_2$ )	42,1	1,20 (2H, m)	Non renseigné
2	16,8 ( $\text{CH}_2$ )	19,5	1,77 (1H, m) 1,62 (1H, m)	Non renseigné Non renseigné
3	36,1 ( $\text{CH}_2$ )	36,0	2,3 (1H, dd, $J = 10,5 ; 5,7$ Hz) 2,32 (1H, dd, $J = 5,7 ; 1,5$ Hz)	Non renseigné Non renseigné
4	35,8 (C)	35,7		
5	51,2 (CH)	51,4	1,44 (1H, d, $J = 12,3$ Hz)	Non renseigné
6	18,9 ( $\text{CH}_2$ )	18,8	1,59 (1H, m) 1,81 (1H, m)	Non renseigné Non renseigné
7	31,9 ( $\text{CH}_2$ )	31,8	0,94 (1H, td, $J = 13,6 ; 4,2$ Hz) 2,81 (1H, dt, $J = 13,5 ; 3,4$ Hz)	Non renseigné Non renseigné
8	158,2 (C)	157,9		
9	138,5 (C)	138,6		
10	50,5 8 (C)	50,5		
11	190,3 (CH)	191,3	2,1 (1H, s)	2,16 (1H, s)
12	19,6 ( $\text{CH}_3$ )	16,7	9,78 (3H, d, $J = 1,5$ Hz)	Non renseigné
13	204,1 (CH)	204,5	10,01 (1H, s)	
14	21,9 ( $\text{CH}_3$ )	21,8	0,65 (3H, d, $J = 1,4$ Hz)	0,72 (3H, s)
15	36,4 ( $\text{CH}_2$ )	36,4	1,35 (1H, d, $J = 8,8$ Hz) 1,34 (1H, dd, $J = 3,6 ; 1,4$ Hz)	Non renseigné
16	21,9 ( $\text{CH}_2$ )	21,8	1,83 (1H, m)	
17	124,7 (CH)	124,7	5,02 (1H, tm, $J = 7,2 ; 1,4$ Hz)	5,10 (1H, bt, $J = 7$ Hz)
18	131,5 (C)	131,5		
19	17,7 ( $\text{CH}_3$ )	17,6	1,54 (3H, s)	1,66 (3H, s)
20	25,8 ( $\text{CH}_3$ )	25,7	1,63 (3H, q, $J = 1,2$ Hz)	1,70 (3H, s)

Tableau 54 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du (+)-perrottétianal A (9)

### 3.6.2.3 Composé 14 : (-)-Ester méthylique de norpinguisone (217)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 55, la parfaite concordance de ces données [128] nous permet de conclure que le composé 14 est identifié à l'ester méthylique de norpinguisone (217).



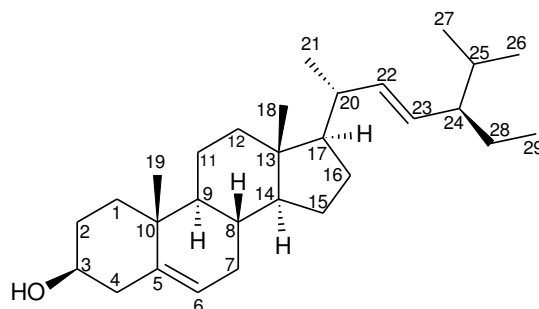
Ester méthylique de norpinguisone **217**

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	39,9 (CH)	39,87	2,04 (1H, m)	2,10 (1H, m)
2	29,7 ( $\text{CH}_2$ )	29,53	1,76 (1H, m) 1,49 (1H, m)	1,81 (1H, dddd, $J = 12,7 ; 9,8 ; 6,6 ; 3,0$ Hz) 1,55 (1H, dddd, $J = 12,7 ; 9,5 ; 9,4 ; 3,4$ Hz)
3	33,4 ( $\text{CH}_2$ )	33,27	2,00 (1H, m) 2,66 (1H, ddd, $J = 13,1 ; 9,7 ; 3,5$ Hz)	2,72 (1H, ddd, $J = 13,2 ; 9,8 ; 3,4$ Hz) 2,10 (1H, m)
4	197,4 (C)	197,32		
5	116,9 (C)	116,75		
6	163,3 (C)	163,21		
7	25,3 ( $\text{CH}_2$ )	25,14	3,02 (1H, d, $J = 18,8$ Hz) 3,47 (1H, d, $J = 18,8$ Hz)	3,28 (1H, d, $J = 18,8$ Hz) 3,55 (1H, d, $J = 18,8$ Hz)
8	62,0 (C)	61,83		
9	58,6 (C)	58,46		
10	107,2 (CH)	107,09		6,64 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
11	143,6 (CH)	144,44	6,65 (1H, d, $J = 2$ Hz) 7,36 (1H, d, $J = 2$ Hz)	7,35 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
12	173,3 (C)	173,16		
13	15,7 ( $\text{CH}_3$ )	15,58		0,91 (3H, d, $J = 6,8$ Hz)
14	20,8 ( $\text{CH}_3$ )	20,64	0,86 (3H, d, $J = 6,8$ Hz)	1,12 (3H, s)
15	51,8 ( $\text{CH}_3$ )	51,63	1,06 (3H, s) 3,71 (3H, s)	3,77 (3H, s)

**Tableau 55 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du (-)-ester méthylique de norpinguisone (217)**

## 3.6.2.4 Composé 15 : stigmastérol (11)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC). D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 56, la parfaite concordance de ces données [129] nous permet de conclure que le composé 15 est identifié au stigmastérol (11).

Stigmastérol **11**

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	37,5 ( $\text{CH}_2$ )	37,6	1,84 (1H, m) et 1,03 (1H, m)	1,84(1H, m) et 1,08 1H, (m)
2	31,9 ( $\text{CH}_2$ )	31,9	1,47 (1H, m) et 1,82 (1H, m)	1,51(1H, m) et 1,83 (1H, m)
3	72,0 (CH)	72,0	3,5 (1H, m, J = 11,2 ; 4,6 Hz)	3,51 (1H, m)
4	42,5 ( $\text{CH}_2$ )	42,5	2,21 (1H, m) et 2,26 (1H, m)	2,30(1H, m) et 2,23(1H, m)
5	141,0 (C)	140,8		
6	121,9 (CH)	121,8	5,33 (1H, m, J = 5,3 Hz)	5,34 (1H, m)
7	32,1 ( $\text{CH}_2$ )	32,1	1,43 (1H, m) et 1,96 (1H, m)	1,97 (1H, m) et 1,5 (1H, m)
8	32,1 (CH)	32,2	1,42 (1H, m)	1,46 (1H, m)
9	50,4 (CH)	50,5	0,91 (1H, m)	0,94 (1H, m)
10	36,7 (C)	36,5		
11	21,3 ( $\text{CH}_2$ )	21,2	1,51 (1H, m)	1,5 (1H, m)
12	39,9 ( $\text{CH}_2$ )	40,0	1,97 (1H, m) et 1,14 (1H, m)	2,0 (1H, m) et 1,18 (1H, m)
13	42,4 (C)	42,2		
14	57,1 (CH)	57,1	0,98 (1H, m)	1,01 (1H, m)
15	24,6 ( $\text{CH}_2$ )	24,5	1,05 (1H, m) et 1,53 (1H, m)	1,56 (1H, m) et 1,06 (1H, m)
16	29,1 ( $\text{CH}_2$ )	28,9	1,27 (1H, m) et 1,68 (1H, m)	1,72 (1H, m) et 1,28 (1H, m)
17	56,2 (CH)	56,3	1,14 (1H, q, J = 9,9 Hz)	1,15 (1H, q, J = 9,9 Hz)
18	12,5 ( $\text{CH}_3$ )	12,2	0,676 (3H, brds)	0,70 (3H, s)
19	19,6 ( $\text{CH}_3$ )	19,5	0,987 (3H, s)	1,01 (3H, s)
20	40,7 (CH)	40,	2,02 (1H, m)	2,06 (1H, m)
21	21,4 ( $\text{CH}_3$ )	21,4	0,987 (3H, brds)	1,03 (3H, d,)
22	138,5 (CH)	138,3	5,13 (1H, dd, J = 13,3 ; 8,5 Hz)	5,17 (1H, dd, J = 15,2 ; 8,6 Hz)
23	129,5 (CH)	129,7	4,99 (1H, dd, J = 15 ; 8,7 Hz)	5,04 (1H, dd, J = 15,2 ; 8,6 Hz)
24	51,5 (CH)	51,5	1,51 (1H, m)	1,54 (1H, m)
25	32,1 (CH)	32,2	1,51 (1H, m)	1,55 (1H, m)
26	21,3 ( $\text{CH}_3$ )	21,2	0,817 (3H, brds)	0,85 (3H, d)
27	19,2 ( $\text{CH}_3$ )	19,2	0,767 (3H, brds)	0,80 (3H, d)
28	25,6 ( $\text{CH}_2$ )	25,4	1,34 (1H, m) et 1,4 (1H, m)	1,43 (1H, m) et 1,18 (1H, m)
29	12,3 ( $\text{CH}_3$ )	12,2	0,657 (3H, brds)	0,81 (3H, t)

Tableau 56 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du stigmastérol (11)

### 3.6.2.5 Composé 16 et 17 : $^{17}\text{O}$ -éthoxyphéophorbide (275) et (276)

Le composé 16 est de couleur verte foncée ce qui nous a orienté vers un dérivé de la chlorophylle. Une comparaison entre les données RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) des déplacements chimiques du noyau porphyrine (motif de base de la chlorophylle) et de nos valeurs expérimentales nous a permis de conclure que le composé 16 possède un noyau porphyrine (Figure 56, les liaisons constitutives de ce motif sont bleues). Ainsi, les valeurs de déplacements chimiques proton et carbone du composé 17 ont été attribuées à l'aide de la comparaison avec les données de la littérature et les corrélations observées sur le spectre HMBC expérimental. Les données RMN expérimental du composé 17 sont en accord avec celles de la littérature [130].

Les signaux de résonances des atomes de carbone des isomères b et d étant de faibles amplitudes (carbone quaternaire dans le bruit de fond), seules les données RMN des isomères a et c ont été comparées avec les données de la littérature (Tableaux 57 et 58).

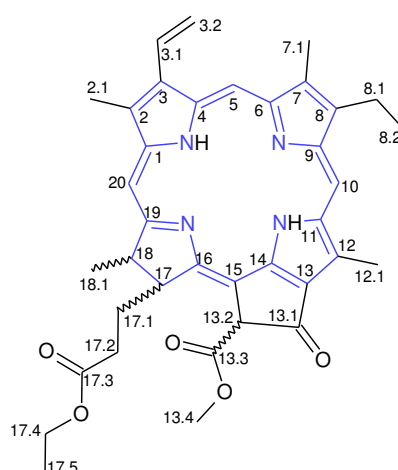


Figure 56 :  $^{17}\text{O}$ -éthoxyphéophorbide (275) et (276)



17 <sup>3</sup> -Éthoxyphéophorbide (275) isomère a				
# C	δ <sup>13</sup> C (ppm, CDCl <sub>3</sub> )		δ <sup>1</sup> H (ppm, CDCl <sub>3</sub> )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	142,4 (C)	141,93		
2	132,1 (C)	131,66		
2.1	12,3 (CH <sub>3</sub> )	11,93	3,66 (3H, s)	3,31 (3H, s)
3	136,4 (C)	135,90		
3.1	129,3 (CH)	128,83	7,91 (1H, dd, J = 18 ; 11,5 Hz)	7,77 (1H, dd, J = 17,5 ; 12,5 Hz)
3.2	122,9 (CH <sub>2</sub> )	122,47	6,13 (1H, dd, J = 11,5 ; 1,4 Hz) 6,23 (1H, dd, J = 17,8 ; 1,5 Hz)	6,14 (1H, d, J = 17,5 Hz) 6,05 (1H, d, J = 17,5 Hz)
4	136,9 (C)	135,94		
5	97,7 (CH)	97,24	9,27 (1H, s)	9,07 (1H, s)
6	156,1 (C)	155,37		
7	136,5 (C)	135,90		
7.1	11,3 (CH <sub>3</sub> )	10,89	3,14 (3H, s)	2,98 (3H, s)
8	145,4 (C)	144,88		
8.1	19,6 (CH <sub>2</sub> )	19,14	3,59 (2H, q, J = 7,8 Hz)	3,41 (2H, q, J = 15,0 Hz)
8.2	17,6 (CH <sub>3</sub> )	17,22	1,65 (3H, t, J = 7,6 Hz)	1,58 (3H, t, J = 10,0 Hz)
9	150,6 (C)	150,74		
10	104,7 (CH)	104,12	9,43 (1H, s)	9,28 (1H, s)
11	138,0 (C)	137,78		
12	129,1 (C)	128,80		
12.1	12,3 (CH <sub>3</sub> )	11,98	3,362 (3H, s)	3,63 (3H, s)
13	129,2 (C)	128,80		
13.1	189,9 (C)	189,58		
13.2	66,0 (CH)	64,72	6,26 (1H, s)	6,30 (1H, s)
13.3	171,0 (C)	172,89		
13.4	53,2 (CH <sub>3</sub> )	52,80	4,20 (3H, ddd, J = 8,8 ; 2,2 ; 3,2 Hz)	3,93 (3H, s)
14	149,1 (C)	149,60		
15	106,0 (C)	105,14		
16	161,1 (C)	161,17		
17	51,9 (CH)	51,16	2,32 (1H, dddd, J = 14,1 ; 9,1 ; 9,4 ; 5 Hz)	4,24 (1H, brd, J = 10,0 Hz)
17.1	29,9 (CH <sub>2</sub> )	29,82	2,63 (1H, dddd, J = 10,1 ; 13,9 ; 6,5 ; 3,5 Hz) 2,48 (1H, ddd, J = 15,6 ; 6,5 ; 9,5 Hz)	1,27 (2H, brs)
17.2	31,4 (CH <sub>2</sub> )	31,26	2,19 (1H, ddd, J = 9,9 ; 15,6 ; 4,9 Hz) 4,03 (1H, m)	2,22–2,39 (2H, m)
17.3	173,2 (C)	172,11		
17.4	60,6 (CH <sub>2</sub> )	60,48	3,88 (2H, s)	4,07 (2H, q, J = 12,5 Hz)
17.5	14,3 (CH <sub>3</sub> )	14,06	1,10 (3H, t, J = 7,1 Hz)	1,15 (3H, t, J = 5,0 Hz)
18	51,0 (CH)	50,10	4,46 (1H, qd, J = 7,4 ; 1,8 Hz)	4,48 (1H, m)
18.1	22,8 (CH <sub>3</sub> )	23,04	1,81 (3H, d, J = 7,4 Hz)	1,85 (3H, d, J = 5,0 Hz)
19	172,6 (C)	169,61		
20	93,4 (CH)	92,98	8,54 (1H, s)	8,53 (1H, s)

**Tableau 57 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du 17<sup>3</sup>-éthoxyphéophorbide (276)**

17 <sup>3</sup> -Ethoxyphéophorbide ( <b>276</b> ) isomère c					
# C	δ <sup>13</sup> C (ppm, CDCl <sub>3</sub> )		δ <sup>1</sup> H (ppm, CDCl <sub>3</sub> )		
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.	
1	142,4 (C)	143,57			
2	132,1 (C)	132,44			
2.1	12,3 (CH <sub>3</sub> )	12,05	3,62 (3H, s)	3,36 (3H, s)	
3	136,4 (C)	135,54			
3.1	129,3 (CH)	128,65	7,9 (1H, dd, J = 18 ; 11,5 Hz)	7,97 (1H, dd, J = 15,0 ; 10,0 Hz)	
3.2	122,9 (CH <sub>2</sub> )	123,57	6,13 (1H, dd, J = 11,5 ; 1,4 Hz) 6,23 (1H, dd, J = 17,8 ; 1,5 Hz)	6,20 (1H, d, J = 15,0 Hz) 6,23 (1H d, J = 10,0 Hz)	
4	136,9 (C)	137,19			
5	97,7 (CH)	101,60	9,23 (1H, s)	10,33 (1H, s)	
6	156,1 (C)	159,38			
7	136,4 (C)	137,19			
7.1	11,3 (CH <sub>3</sub> )	187,72	3,12 (3H, s)	11,12 (3H, s)	
8	145,4 (C)	147,19			
8.1	19,6 (CH <sub>2</sub> )	19,13	3,59 (2H, q, J = 7,8 Hz)	4,00 (2H, m)	
8.2	17,6 (CH <sub>3</sub> )	19,36	1,62 (3H, t, J = 7,6 Hz)	1,62 (3H, m)	
9	150,6 (C)	150,73			
10	104,7 (CH)	105,01	9,39 (1H, s)	9,61 (1H, s)	
11	138,0 (C)	138,04			
12	129,1 (C)	129,75			
12.1	12,4 (CH <sub>3</sub> )	12,23	3,34 (3H, s)	3,66 (3H, s)	
13	129,2 (C)	132,20			
13.1	189,9 (C)	189,49			
13.2	66,0 (CH)	64,58	6,147 (1H, s)	6,21 (1H, s)	
13.3	171 (C)	172,76			
13.4	53,2 (CH <sub>3</sub> )	52,95	3,82 (3H, s)	3,88 (3H, s)	
14	149,1 (C)	151,25			
15	106,0 (C)	104,96			
16	161,089 (C)	164,03			
17	51,9 (CH)	51,35	4,27 (1H, ddd, J = 8,8 ; 2,2 ; 3,2 Hz)	4,44 (2H, brd, J = 10,0 Hz)	
17.1	29,9 (CH <sub>2</sub> )	31,25	2,32 (1H, dddd, J = 14,1 ; 9,1 ; 9,4 ; 5 Hz) 2,63 (1H, dddd, J = 10,1 ; 13,9 ; 6,5 ; 3,5 Hz)	2,46–2,61 (2H, m)	
17.2	31,4 (CH <sub>2</sub> )	29,70	2,19 (1H, ddd, J = 9,9 ; 15,6 ; 4,9 Hz) 2,48 (1H, ddd, J = 15,6 ; 6,5 ; 9,5 Hz)	2,20–2,33 (2H, m)	
17.3	173,2 (C)	174,00			
17.4	60,6 (CH <sub>2</sub> )	60,55	4,02 (2H, m)	4,00 (2H, m)	
17.5	14,3 (CH <sub>3</sub> )	14,07	1,11 (3H, t, J = 7,1 Hz)	1,10 (3H, t, J = 7,5 Hz)	
18	51,0 (CH)	50,12	4,46 (1H, qd, J = 7,4 ; 1,8 Hz)	4,18 (1H, brd, J = 10,0 Hz)	
18.1	22,8 (CH <sub>3</sub> )	23,04	1,63 (3H, d, J = 7,4 Hz)	1,80 (d, J = 5,0 Hz)	
19	172,6 (C)	169,25			
20	93,4 (CH)	93,55	8,47 (1H, s)	8,52 (1H, s)	

**Tableau 58 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du 17<sup>3</sup>-éthoxyphéophorbide (**276**)**

### 3.6.2.6 Composé 18 : α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranoside (**277**)

Nous avons effectué l'identification structurale sur la base de l'étude des spectres RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H (présentés en annexe) ainsi que les spectres de RMN 2D (COSY, HMBC et HSQC).

D'après la comparaison des données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  expérimentales obtenues avec celles de la littérature, ci-établie dans le Tableau 59, la parfaite concordance de ces données [131] nous permet de conclure que le composé 18 est identifié à l' $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (**277**) appelé « sucrose » ou « saccharose ».

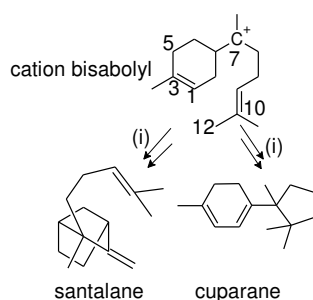
$\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (**277**)

# C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )		$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ )	
	Exp.	Litt.	Exp.	Litt.
1	95,0 (CH)	94,84	5,49 (1H, d; J = 3,9 Hz)	5,4 (1H, d, J = 3,89 Hz)
2	73,9 (CH)	73,80	3,56 (1H, dd, J = 10 ; 3,9 Hz)	3,55 (1H, dd, J = 9,98 Hz)
3	75,4 (CH)	75,10	3,76 (1H, t; J = 9,5 Hz)	3,75 (1H, t, J = 9,57 Hz)
4	72,1 (CH)	71,98	3,47 (1H, t; J = 9,4 Hz)	3,46 (1H, t, J = 9,3 Hz)
5	75,2 (CH)	75,33	3,85 (1H, m)	3,87 (1H, dd, J = 6,46 Hz)
6	65,2 ( $\text{CH}_2$ )	65,08	3,83 (2H, d; J = 3,3 Hz)	3,82 (2H, m)
1'	64,2 ( $\text{CH}_2$ )	64,14	3,68 (2H, s)	3,67 (2H, s)
2'	106,5 (C)	106,35		
3'	79,3 (CH)	79,24	4,22 (1H, d; J = 8,7 Hz)	4,21 (1H, d, J = 8,75 Hz)
4'	76,8 (CH)	76,78	4,05 (1H, t; J = 8,5 Hz)	4,04 (1H, t, J = 8,59 Hz)
5'	84,2 (CH)	84,05	3,9 (1H, m)	3,89 (1H, dd, J = 6,5 Hz)
6'	63,0 ( $\text{CH}_2$ )	62,88	3,81 (2H, d, J = 3,3 Hz)	3,82 (2H, m)

**Tableau 59 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (**277**)**

### 3.6.3 Discussion

Les échantillons de *Porella viridissima* récoltés n'appartiennent pas au même chimiotype. Les échantillons MET014 et ME015 appartiennent au chimiotype V (type pinguisane), alors que l'échantillon MET035 appartient au chimiotype III (type pinguisane et sacculatane) mais qui est en plus se distingue par la présence de sesquiterpénoïdes de type santalane tant par la diversité que leur pourcentage relatif important. Dans la littérature, il semble que les sesquiterpénoïdes de type santalane soient assez rares chez les hépatiques et majoritairement distribués dans les genres *Porella* et *Radula* [21]. Ces deux genres appartiennent au même ordre (Porellales) mais à des sous-ordres différents.



	Cation bisabolyl		Autre		
	Cuparane	Santalane	Farnesane	Pinguisane	Sandvicène
MET014	1,1	-	2,8	7,9	-
MET015	-	-	1,8	11,1	-
MET035	-	46,7	-	10,0	0,7

**Tableau 60 : Structures sesquiterpéniques détectées chez *P. viridissima* (pourcentage relatif) ((i : [69]))**

L'échantillon MET035 pourrait avoir des proximités avec *Porella navicularis* appartenant au chimiotype III et produisant des sesquiterpènes de type santalane [31]. De par sa diversité en type santalane et la détection de l' $\alpha$ -photosantalol (**266**) et du  $\beta$ -photosantalol (**267**), l'échantillon MET035 pourrait être assez proche de l'espèce *Gackstroemia decipiens* [132]. Les genres *Gackstroemia* et *Porella* font partie du même sous-ordre Porellineae, laissant supposer que la détection de type santalane dans ces deux genres serait un lègue d'un ancêtre commun.

Parmi les espèces du genre *Porella* du chimiotype III produisant les composés respectifs **ester méthylique de norpinguisone (217)** et **perrottetianal A (9)**, on peut citer : *P. grandiloba* (distribution : côte nord-est de la République de Chine, Fédération de Russie et Pacifique sud) et *P. elegantula* (distribution : Pacifique sud, Amérique du sud, Canada, Groenland). Ces plantes évoluant dans des milieux assez différents possèdent le même chimiotype [21].

Nous vous présentons dans le Tableau 61 une synthèse des principaux résultats au niveau des espèces étudiées de la famille des Frullaniaceae. Ce tableau met en évidence une faible diversification des voie de biosynthèse sesquiterpéniques avec uniquement des sesquiterpénoïdes provenant de la voie bisabolyl et issus de la cyclisation 11,6 du cation nérolidyl (sesquiterpénoïdes de type pinguisane).

	Code	diversité sesquiterpénique : cation (% relatif, nb de composés identifié)	% identifiés		Composés détectés par CPG-FID-SM majoritaires			Composés caractérisés par RMN	caractéristiques
			S.	D.	Sesquiterpénoïdes	Diterpénoïdes	Autres		
Porella viridissima	014	Autre (10,7-12,8%, 1)	11,8-12,8	-	déoxopinguisone <b>(235)</b> (4,0-5,7%)		M $\geq$ 168, 108, 95 (90) (10,1-15,7%)		chimiotype V : pinguisane
	015	Bisabolyl (0-1,1%, 1)			M $\geq$ 236, 93, 108 (20) (22,2%)				
	035	Bisabolyl (46,7%, 1) Autre (10,0%, 1)	57,3	13,1	$\alpha$ -santalol iso2 ( <b>265</b> ) (12,8%)	perrottetianal A <b>(9)</b> (11,8%)		ester méthylique de norpinguisone ( <b>217</b> ) perrottetianal A ( <b>9</b> ) stigmastérol ( <b>11</b> ) dérivés de la chlorophylle ( <b>275</b> ) et ( <b>276</b> )	type santalane (46,7%) chimiotype III : pinguisane- sacculatane

**Tableau 61 : Synthèse des principaux résultats analytiques pour l'espèce Porella viridissima ( nb. : nombre, Ger. : germacradiényl, Hum. : humulyl, S. : sesquiterpénoïdes, D. : diterpénoïdes)**

### 3.6.4 Conclusion

Les composants de trois échantillons de *Porella viridissima* ont été investigués par CPG-FID-SM. Cette étude a mis à jour deux compositions différentes au sein de cette espèce. Les échantillons étudiés appartiennent à des chimiotypes déjà observés dans le genre *Porella*, à savoir le chimiotype pinguisane-sacculatane et le chimiotype pinguisane. La détection d'une diversité importante en sesquiterpénoïdes de type santalane pour un des échantillons de *Porella viridissima* constitue une originalité notable.

## 4 Conclusion générale des travaux phytochimiques

L'étude phytochimique des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie a été réalisée sur 34 espèces d'hépatique (dont 14 endémiques) appartenant à 6 familles (Plagiochilaceae, Lophocoleaceae, Lepidoziaceae, Porellaceae, Lejeuneaceae et Frullaniaceae) affiliées à deux ordres : Jungermanniales (sous-ordre des Lophocoleineae) et Porellales (sous-ordres des Porellineae et des Jubulineae). La composition chimique, notamment en constituants volatils, de ces espèces a pu être établie pour la première fois pour la majorité des espèces étudiées (sauf pour *Frullania ericoides*, *Thysananthus pancheri*, *Thysananthus spathulistipus* et *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarliana* ayant fait l'objet d'études antérieures) et il s'agit de la première étude phytochimique réalisée sur les genres *Chiastocaulon* et *Acromastigum*.

En accord avec les données de la littérature portant sur la composition chimique des hépatiques en général, environ 260 constituants ainsi déterminés pour ces espèces ci-étudiées appartiennent en majorité à la famille des terpénoïdes (sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes), et à d'autres familles de métabolites secondaires d'intérêt notamment des composés aromatiques tels que des bibenzyls, un bis(bibenzyl) et des dérivés du chromène. 18 constituants ont pu être isolés et caractérisés par RMN, dont quatre nouveaux produits naturels : un dérivé du chromène (le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl (**74**) isolé de *Plagiochila bicornuta*), un sesquiterpénoïde (zier-13,14-dien-5-ol (**160**) isolé de *Bazzania francana*), un bibenzyl (le 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl (**253**) isolé de *Frullania ericoides*) et un bis(bibenzyl) (la vittatin (**183**) isolée de *Bazzania vittata*). Ces molécules isolées et identifiées avec certitude, pourront servir de référence (standard) pour d'autres études et aussi être soumis à différents tests d'activités biologiques pour révéler leurs potentialités.

L'établissement des compositions chimiques des espèces étudiées a permis de porter une attention particulière au niveau de leur chimiodiversité. Les chimiotypes auxquels leurs compositions sont rattachées possèdent certaines originalités révélées dans le cadre de cette étude. Parmi les points notables, nous pouvons citer :

- Au sein de la famille des Plagiochilaceae la présence : du chimiotype chromène/acide benzoïque prénylé (*Plagiochila bicornuta*), du chimiotype amorphe (*Chiastocaulon caledonicum*), du chimiotype V à diterpènes (*Plagiochila tesmanii* qui est la plus singulière des espèces de cette famille), du chimiotype indéterminé (*Plagiochilon theriotanus*). Au niveau des constituants sesquiterpéniques, la faible présence de composés issus du cation bisabolyl est particulièrement remarquée pour ces espèces de Plagiochilaceae de Nouvelle-Calédonie. Ces quatre espèces possèdent des compositions chimiques très différentes. De légères variations intraspécifiques ont été observées.
- La famille des Lophocoleaceae présente une chimiodiversité marquée par une diversité de composition avec néanmoins la présence des sesquiterpénoïdes de type eudesmane

(tel que le 10-épi- $\gamma$ -eudesmol (**85**)) et aromadendrane (issus du précurseur cation (E-E)-germacradiényl) commune à toutes les espèces étudiées (*Chiloscyphus latistipus*, *Chiloscyphus confertus* et *Heteroscyphus argutus*) qui pourrait être considéré comme un biomarqueur de cette famille. La forte proportion du 1(10)-aristolène (**96**) dans l'espèce endémique *Chiloscyphus confertus* permet d'avancer l'hypothèse d'un nouveau chimiotype aristolane, chimiotype non encore répertorié dans la famille des Lophocoleaceae mais qui serait à prospecter sur un nombre plus significatif d'échantillons en Nouvelle-Calédonie. Les sesquiterpénoïdes de l'espèce *Heteroscyphus argutus*, dont un certain nombre sont issus du cation (Z-E)-germacradiényl pourraient être affiliés au chimiotype calaménane, non encore répertorié pour le genre *Hétérosyphus* mais bien connu dans le genre *Bazzania* qui appartient aussi au même sous-ordre des Lophocoleineae.

- Dans la famille de Lepidoziaceae, les deux espèces endémiques du genre *Acromastigum* (*Acromastigum caledonicum* et *Acromastigum tenax*) sont proposées à indexer au chimiotype bicyclogermacrane avec l'isolépidozène (**111**) comme biomarqueur. L'analyse multivariée par ACP des différentes espèces du genre *Bazzania* a mis en évidence leur classification en deux groupes distincts suivant l'importance de leurs teneurs en (Z)-biformène (**138**) (groupe 1) et fusicocca-2,5-diène (**80**) (groupe 2). Trois chimiotypes très distincts de l'espèce *Bazzania francana* ont été mis à jour, avec les types zierane, monocyclofarnesane et microbiotane (affilié au cuparane), posant alors la question de l'origine d'une telle chimiodiversité si elle serait liée aux aspects génétiques (génotypes, espèces cryptiques ?), ou environnementaux (phénotype ou écotype ?).
- L'étude des échantillons de la famille des Lejeuneaceae a permis d'émettre l'hypothèse d'un chimiotype pinguisane pour l'espèce endémique *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina* (biomarqueur : ester méthylique de norpinguisone (**217**)) et d'un chimiotype monocyclofarnesane pour l'espèce *Spruceanthus thozetianus* (biomarqueur : cyclofarnesa-5(14),8,10-triène (**223**)). La proximité phylétique entre les espèces du genre *Porella* et celles de la famille des Lejeuneaceae a été confortée par la présence de certains composés tels que l'ester méthylique de norpinguisone (**217**) dans l'espèce *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina* ainsi que le 13-isopimaradiène (**70**) et le rosa-5,15-diène (**204**) dans les espèces de *Thysananthus* *spathulistipus* et *Lejeunea sordida*.
- Les constituants volatils d'espèces étudiées du genre *Frullania* (de la famille des Frullaniaceae) appartiennent à une diversité importante de types de squelettes sesquiterpénique. Cependant, la majorité de ces sesquiterpénoïdes sont de type eudesmane et aristolane/valencane, leurs structures sont dérivées du cation (E-E)-germacradiényl. Les espèces endémiques *F. bella* et *F. mammilosa* n'ont pas pu être indexées. De par son contenu riche en sesquiterpénols, *F. bella* pourrait être affiliée au chimiotype I (lactone sesquiterpénique) alors que *F. mammilosa* possède un sesquiterpénoïde dioxygéné inconnu et serait affiliée à un autre chimiotype à



déterminer. L'absence de sesquiterpénoïdes dérivant du cation bisabolyyl a été remarquée.

- Les échantillons étudiés de *Porella viridissima* (de la famille des Porellaceae) appartiennent à des chimiotypes déjà observés dans le genre *Porella* : le chimiotype pinguisane-sacculatane et le chimiotype pinguisane. La détection d'une diversité importante en sesquiterpénoïdes de type santalane pour un des échantillons de *Porella viridissima* constitue une originalité notable. Cette particularité soutient aussi l'hypothèse d'une proximité entre le genre *Porella* et la famille des Lejeuneaceae à travers le genre *Bryopteris*.

Certains extraits, notamment issus d'espèce de la famille des Lejeuneaceae, présentent un ou deux composés non identifiés avec des forts pourcentages relatifs. Des travaux phytochimiques de fractionnement pourraient mener à la découverte de nouvelles molécules en ciblant ces composés en particulier.

Cette étude a ainsi permis ainsi d'acquérir de nouvelles données sur la composition en métabolites secondaires de la bryoflore de la Nouvelle-Calédonie contribuant ainsi à une meilleure connaissance de la richesse de cette biodiversité par l'originalité et la complexité de sa chimiodiversité.

PARTIE III.     ESSAIS ANTIMICROBIENS MENES  
SUR LES HEPATIQUES DE NOUVELLE-  
CALEDONIE

# 1 Introduction

Les essais biologiques antibactériens peuvent fournir des informations quant aux propriétés bactéricides et bactériostatiques d'une substance. Nous nous intéresserons seulement aux extraits possédant des propriétés bactéricides. Dans le cas d'effet bactériostatique, la bactérie peut reprendre une croissance normale après introduction dans un milieu adapté or le but de ces tests serait d'évaluer les extraits d'hépatiques afin de fournir des « hits » (molécules bactéricides identifiées par criblage).

Il existe essentiellement deux types d'essais antibactériens (i) les essais d'inhibition de croissance sur milieu gélosé (traditionnellement le milieu Mueller-Hinton) [133] par diffusion du principe actif à partir d'un filtre ou d'un puits, le diamètre du halo d'inhibition de croissance obtenu est comparé à celui d'un antibiotique de référence pour la souche bactérienne concernée et (ii) le suivi de croissance en milieu liquide par mesure de turbidimétrie à 600 nm de la culture, cette technique est souvent réalisée en microplaque afin de miniaturiser l'essai et de réaliser des répliquats. De plus, la valeur du pourcentage d'inhibition obtenue par la méthode en milieu liquide est beaucoup plus fiable et apporte un degré de précision supérieur à la méthode par diffusion. La méthode utilisée au laboratoire [134] est une adaptation des méthodes standardisées données par l'Institut des standards de laboratoire et cliniques [133].

Parmi les souches communément testées en laboratoire de microbiologie, nous avons choisi de tester trois souches bactériennes : (i) *Escherichia coli* (Gram-), (ii) *Staphylococcus aureus* et (iii) *Staphylococcus epidermidis* (Gram+ pour les Staphylocoques). Ce matériel biologique a été choisi à travers plusieurs critères : **l'infection, la résistance et la production de biofilm**. Ces trois facteurs représentent des problèmes majeurs de santé publique.

-*Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie commensale de l'homme et pathogène opportuniste. Elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie, à des concentrations trop élevées l'hôte peut tomber malade. Certaines souches peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou sepsis [135].

-*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est retrouvée chez 15 à 30 % des individus sains au niveau des fosses nasales et de la gorge. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques).

-*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) est fréquemment retrouvé sur la peau et les muqueuses des mammifères. Due à sa facilité de contamination, *S. epidermidis* est probablement l'espèce la plus commune des staphylocoques. Ce microorganisme est responsable d'infections cutanées, d'infections nasales comme des sinusites et d'infections urinaires.

*S. epidermidis* est une cause importante d'infection chez les patients dont le système immunitaire est compromis ou des patients qui ont des cathéters ou des prothèses. Le taux de résistance à la méticilline (molécule de type  $\beta$ -lactamine, antibiotique de premier choix contre les infections staphylococciques) est de 75 à 90% chez les isolats hospitalisés de *S. epidermidis*.

Malgré une résistance généralisée à la méticilline et à d'autres antibiotiques, 80% des cathéters infectés par *S. epidermidis* peuvent encore être traités avec des antibiotiques tels que la vancomycine (molécule de type glycopeptide) [136].

L'espèce *S. aureus* possède une bonne résistance aux mécanismes d'épuration naturels (oxydation, dessiccation...) [137]. Les hôpitaux rapportent des faits de résistance de **S. aureus** envers la méticilline.

Issus d'études sur les isolats hospitaliers, le taux de résistance à la méticilline pour **S. aureus** est de 40 à 60% [137].

Une tendance significative à la hausse de la résistance a été observée pour l'ampicilline, le sulfonamide et la tétracycline. La multirésistance chez **E. coli** est passée de 7,2% pendant les années 1950 à 63,6% au cours des années 2000 [138].

Les bactéries testées : *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* produisent un biofilm. En effet, l'observation des micro-organismes dans leur environnement a montré que la plupart des bactéries préféreraient vivre à l'état sessile, c'est-à-dire attachées à une surface (vivante ou non vivante) plutôt qu'à l'état libre [139]. L'aptitude de ces bactéries à former des biofilms explique en partie les mécanismes de résistances de ces bactéries aux principes actifs. Elle fournit une résistance supplémentaire aux bactéries vis-à-vis des antibiotiques, notamment en agissant comme une barrière physique. En plus de produire un écran envers les antibiotiques, le biofilm, à partir d'un certain stade de développement, favorise la dissémination des bactéries, notons que plusieurs souches peuvent se trouver au sein d'un biofilm [140].

Ces biofilms sont très souvent la cause d'infections nosocomiales. Les infections les plus nombreuses sont urinaires (30%, souvent liées à la pose de sondes urinaires) et pneumoniques (16,7%, souvent liées à l'intubation et la ventilation assistée). En effet, 5% des patients qui séjournent à l'hôpital contractent une infection au sein de l'établissement. Cela représente environ 750 000 infections par an, qui seraient la cause directe de 4 000 décès en France [141]. Deux bactéries représentent plus d'un tiers des germes isolés dans le cadre d'infections nosocomiales [142]. Il s'agit d'*Escherichia coli* (26%) et de *Staphylococcus aureus* (16%), ce dernier étant la première cause d'infection sur les sites chirurgicaux cardiaque et orthopédique [143].

Dans le cadre de nos travaux nous allons sélectionner plusieurs extraits d'hépatique issus de la biodiversité néo-calédonienne susceptible de fournir des « hits ». Ces travaux représentent une base de « biosourcing » importante dans la perspective d'isoler des molécules naturelles antibactériennes.

## 2 Matériel et méthode

### 2.1 Matériel végétal d'étude

Les données relatives au matériel végétal sont détaillées dans la partie II.2.1 Néanmoins les échantillons étudiés dans la partie II n'ont pas tous fait l'objet de tests antibactériens. Les plantes testées sont détaillées dans le Tableau 62.

Lepidoziaceae		Lejeuneacea		Plagiochilaceae	
Espèce	Echantillon	Espèce	Echantillon	Espèce	Echantillon
Acromastigum caledonicum	113B	Thysananthus pancheri	120	Plagiochila bicornuta.	093
Acromastigum tenax	116	Thysananthus spathulistipus	119	Chiastocaulon caledonicum	101
Bazzania serrifolia	099	Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana*	023		
Bazzania francana	106	Lejeunea sordida	045		
Bazzania sp. AD212	117 068	Lopholejeunea subfusca	087		
Bazzania deplanchei	115				
Bazzania marginata	048				
Bazzania subintegra	113A				
Bazzania parisii	109A				

**Tableau 62 : Plantes dont les extraits ont fait l'objet d'essais anti microbiens**

## 2.2 Culture de souches bactériennes

### 2.2.1 Présentation des souches bactériennes

Plusieurs souches bactériennes pathogènes opportunistes ou commensales ont été utilisées pour ce travail de thèse. Les souches proviennent de la collection de l'Institut Pasteur (CIP) et sont référencées également dans la collection américaine ATCC (American Type Culture Collection). La liste des souches étudiées pour leur sensibilité à nos extraits est présentée dans le Tableau 63.

Germe	Phénotype	CIP	ATCC
Staphylococcus aureus	Sauvage	7625	25923
Staphylococcus epidermidis	Sauvage	6821	12228
Escherichia coli	Sauvage	7624	25922

**Tableau 63 : références des souches utilisées**

Toutes les souches bactériennes sont conservées dans une "souchothèque" à -80°C dans des cryotubes stériles contenant un mélange de 50% de suspension bactérienne et 50% de glycérol (50% (v/v)).

## 2.3 Les milieux de culture

Le milieu Mueller Hinton composé d'infusion de bœuf (300 g/l), Hydrolysate d'acide caséine (17,5 g/l), amidon (17 g/l) et agar (17 g/l) (biochem chemopharma, France) est une gélose riche utilisée pour la culture en milieu solide à partir d'un prélèvement du soucier ou pour l'étalage à partir d'une suspension bactérienne en milieu liquide pour vérifier l'absence de contamination.

Le milieu Luria Broth composé de tryptone (10 g/l), chlorure de sodium (5 g/l) et extrait de levure (5g/l) (Sigma Aldrich, USA) est un milieu de culture riche utilisé pour réaliser les cultures liquides ainsi que pour les tests antibactériens en microplaques.

## 2.4 Conditions de culture

Pour toutes les bactéries, les milieux gélosés sont incubés à 37°C dans une étuve et les croissances en bouillon sont mises à 37°C dans un incubateur à agitation rotative (Forma Orbital Shaker, modèle 420, Thermo Fischer scientific, USA) à 120 rpm.

## 3 Tests antibactériens

### 3.1 Préparation des extraits pour les tests

Des tests précédents menés au laboratoire ont montré l'innocuité du DMSO (Univar, Ajax Finnechem, Auckland) à 1% dans du milieu LB pour les souches testées. Les tests sur dose unique se feront à 50 µg / ml, ce qui permettra une première sélection d'extraits.

Selon les recommandations du Comité Européen sur les Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST), une molécule de référence a été choisie pour chaque souche bactérienne testée. Il s'agit de la gentamicine (sulfate de gentamicine, Biological industries, Kibbutz beit Haemek) comme référence pour *S. aureus* et *S. epidermidis* et le chloramphénicol (Sigma, St Louis, USA) pour *E. coli* [144].

La concentration des essais en dose unique (50 µg / ml) a été choisie par rapport à la valeur des IC<sub>50</sub> des antibiotiques de référence utilisés lors de la mise en place du protocole des essais : de l'ordre de 1 µg / ml pour la gentamicine (*S. aureus* et *S. epidermidis*) et de l'ordre de 8 µg / ml pour le chloramphénicol (*E. coli*) [134].

Les extraits sont filtrés sur cartouche de polyamide (Sep-Pak®, Waters) afin d'éliminer les tannins qui peuvent être la cause de faux positifs. En effet ces molécules peuvent s'agglomérer avec les protéines présentes dans le milieu de culture et donc fausser les lectures de turbidimétrie. Ces extraits filtrés sont évaporés puis pesés afin de préparer des solutions mères à 5 mg/ml dans le DMSO.

Des solutions filles à une concentration de 500 µg/ml sont préparées à partir d'une dilution au dixième des solutions mères dans du milieu LB, ces solutions contiennent donc 10% de DMSO, le milieu du puits de la microplaque dans lequel l'extrait sera testé ne contiendra plus que 1% de DMSO dans du milieu LB.

La même stratégie est appliquée lors de la préparation de gammes de dilution de molécules ou d'extraits dans le cadre de la détermination des concentrations inhibitrices à 50% de croissance (CI<sub>50</sub>).

### 3.2 Préparation de suspension bactérienne

Un isolement sur boîte de pétri est réalisé à partir du souchier sur milieu gélosé et mis à incuber une nuit à 37°C. Une préculture est ensuite réalisée par ensemencement d'une colonie dans 5 ml de milieu LB. Après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation rotative (120 rpm), l'absorbance à 600 nm de la préculture est mesurée (spectrophotomètre Thermo scientist, Evolution 201) puis amenée à une absorbance de 0,3 par dilution dans du LB. Cette suspension fille sera utilisée pour ensemercer les microplaques.

### 3.2.1 Suivi de croissance en microplaque

Les essais se déroulent en microplaques stériles (polystyrène) 96 puits à fond plat avec couvercle (Falcon®, Becton Dickinson, USA).

Les microplaques (de 96 puits) utilisées comportent huit lignes et douze colonnes. Les colonnes une et douze sont uniquement remplies de milieu afin d'éviter les effets de bord. Les données exploitées concerneront les colonnes deux à onze incluses et les lignes A et H seront exclusivement réservées aux essais à blanc (milieu de culture additionné de la solution à tester). Les cellules B2 à H2 sont dédiées au témoin négatif (milieu de culture additionné de suspension bactérienne) et les cellules A11 à H11 au témoin positif (milieu de culture additionné de suspension microbienne et antibiotique de référence). Pour chaque extrait testé un blanc et trois réplicats sont réalisés. Deux essais indépendants ont été réalisés pour chaque étude.

Pour les tests à dose unique les microplaques sont remplies comme montré sur la Figure 57. Seize extraits (E1 à E16) différents au maximum peuvent être testés sur une microplaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>7</sub>	E <sub>8</sub>		
D												
E												
F			E <sub>9</sub>	E <sub>10</sub>	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	E <sub>13</sub>	E <sub>14</sub>	E <sub>15</sub>	E <sub>16</sub>		
G												
H												
<b>Légende</b>												
200 µl de LB												
180 µl de LB + 20 µl d'extrait E <sub>n</sub>												
160 µl de LB + 20 µl d'extrait E <sub>n</sub> + 20 µl de suspension bactérienne												
160 µl de LB + 20 µl de suspension bactérienne + 20 µl de solution antibiotique												
180 µl de LB + 20 µl de solution antibiotique												
180 µl de LB + 20 µl de suspension bactérienne												

**Figure 57 : Procédure de remplissage d'une microplaque pour les essais en dose unique**

Pour la détermination de la concentration inhibitrice de 50% croissance (CI<sub>50</sub> en µg/ml) les microplaques sont remplies de façon similaire à celles des essais en dose unique. La différence vient du remplissage des plaques contenant les extraits. Pour la détermination de CI<sub>50</sub>, la plaque est divisée horizontalement en deux parties, une pour l'extrait E<sub>1</sub> l'autre pour l'extrait E<sub>2</sub> tel que montré sur Figure 58. Pour une microplaque on peut tester au maximum deux extraits (E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>) à huit concentrations différentes (C<sub>1</sub> à C<sub>8</sub>).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>		
C			C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>		
D												
E			E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>		
F			C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>		
G												
H												
<b>Légende</b>												
200 µl de LB												
180 µl de LB + 20 µl d'extrait E <sub>n</sub> à la concentration C <sub>n</sub>												
160 µl de LB + 20 µl d'extrait E <sub>n</sub> à la concentration C <sub>n</sub> + 20 µl de suspension bactérienne												
160 µl de LB + 20 µl de suspension bactérienne + 20 µl de solution antibiotique												
180 µl de LB + 20 µl de solution antibiotique												
180 µl de LB + 20 µl de suspension bactérienne												

Figure 58 : Procédure de remplissage d'une microplaque pour l'obtention de CI<sub>50</sub>

Une fois remplie, une cinétique de croissance est réalisée par pas de 30 min. La lecture de la turbidimétrie des puits de la microplaque est effectuée à 610 nm sur le lecteur de microplaque (MRX microplate Reader, Dynex technologies, Chantilly, USA). La plaque est incubée durant le suivi sous agitation rotative à 37°C.

### 3.2.2 Suivi et analyse de la croissance bactérienne

Le suivi de croissance a été réalisé grâce à une mesure de la DO<sub>610nm</sub> toutes les demi-heures jusqu'à atteindre le palier de croissance. Le taux de croissance  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) a été calculé aux différentes concentrations testées grâce à l'équation ci dessous:

$$N=N_0 \cdot e^{\mu t}$$

Où: N = nombre de bactérie au temps t

N<sub>0</sub> = nombre de bactérie au temps t<sub>0</sub>

$\mu$  = taux de croissance

Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé grâce à l'équation ci-dessous:

$$(\mu_i - \mu_0 / \mu_0) \cdot 100$$

Où:  $\mu_i$  = taux de croissance pour un extrait à une concentration donnée (C<sub>i</sub>)

$\mu_0$  = taux de croissance de la bactérie seule

La courbe sigmoïde dose-réponse de type : % d'inhibition de croissance = f (Log C<sub>i</sub>) est tracée permettant de calculer la valeur de CI<sub>50</sub>. Ces calculs sont effectués via un logiciel adapté (cf. III.3.2.2).

### 3.2.3 Analyse des données

Les essais antimicrobiens ont été effectués en dose unique. Afin de vérifier la répétabilité des résultats, cet essai est réalisé en triplicata (cf. III.3.2.1). Afin de vérifier la reproductibilité ce même essai est réalisé sur une autre colonie bactérienne de la souche précédemment utilisée.

Ces données sont modélisées via le logiciel graph pad prism 7.03. Les tables de calculs sont renseignés tels que suit:

- Un axe X pour les pas de temps de contrôle de croissance
- Un axe Y pour les trois absorbances mesurées (triplicatas) pour un extraits donné (ôté de l'absorbance du blanc)

Les croissances bactériennes sont modélisées avec des équations de type "exponentiel de modélisation de croissance".

Nous obtenons pour chaque extrait un taux de croissance moyen, minimal et maximal. Les essais menés sur une seconde colonie fournissent le même jeu de données, à partir de ces 6 données nous calculons le pourcentage d'inhibition moyen et l'écart type pour chaque extrait testé à dose unique.

Des essais visant à calculer des concentrations inhibitrices de croissance ont été effectués en triplicata. Dans un premier temps les données sont transformées tel que décrit précédemment, permettant ainsi d'acquérir des taux d'inhibition moyen, maximal et minimal. Ces nouvelles données sont traitées telles que suit :

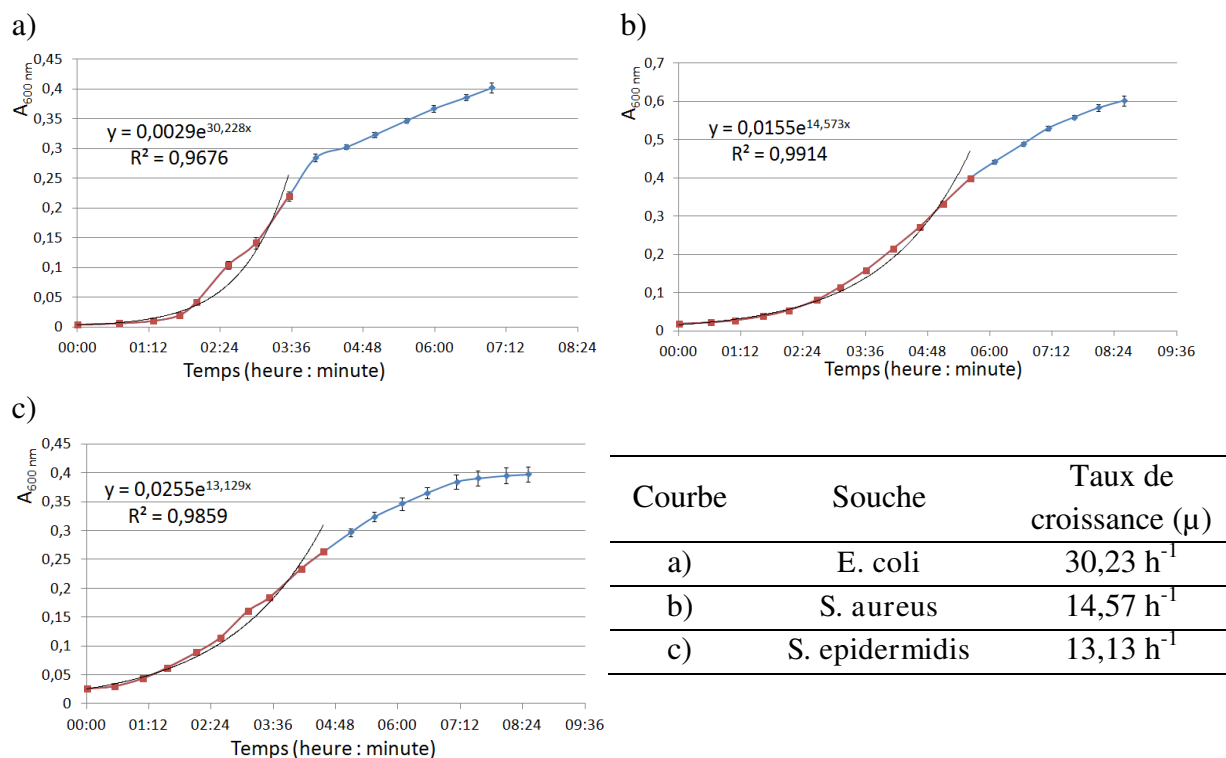
- un axe X représentant le logarithme (Log) de chaque concentration testée
- un axe Y : pour chaque concentration, les taux d'inhibition moyen, maximal et minimal relatives à chaque concentration testées son renseignées.

Une modélisation de type sigmoïde (dose-réponse) fournit une valeur de  $CI_{50}$  ainsi qu'un écart type pour chaque extrait testé.

## 4 Résultats

Le suivi de croissance a été réalisé sur différents temps selon la bactérie étudiée. Les courbes de croissance bactériennes pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* sont présentées dans la Figure 59 : Courbe de croissance microbienne et courbe de modélisation des phases exponentielles. L'équation de la courbe de modélisation de la phase exponentielle est de la forme  $A * e^{\mu t}$ , les points utilisés pour cette modélisation sont en rouge sur cette même figure.

Les taux de croissance maximaux pour *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* sont respectivement de 30,23 , 14,57 et 13,13  $h^{-1}$ . Le palier de croissance d'*E. coli* est atteint le plus rapidement au bout de quatre heures alors qu'il faut environ sept heures pour *S. aureus* et *S. epidermidis*.



**Figure 59 : Courbe de croissance microbienne et courbe de modélisation des phases exponentielles**

Les activités des extraits méthanol et éther de 17 échantillons et l'extrait éther pour quatre autres échantillons ont été testés sur trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* (SA), *Staphylococcus epidermidis* (SE) et *Escherichia coli* (EC)) à une concentration de 50  $\mu g / ml$ . Les résultats obtenus sur *Escherichia coli* ne sont pas référencés dans ce document car aucun extrait ne possède une activité inhibitrice de croissance contre cette souche.

Une grande partie des extraits testés sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* ont montrés des effets inhibiteurs de croissance (Tableau 64). Les données non surlignées dans ce tableau concernent les extraits ayant montrés une très faible activité inhibitrice de croissance, celles en jaune ont une activité moyenne mais leurs phases de croissance n'a pu être modélisée avec précision. Enfin les données surlignées en vert représentent les meilleures inhibitions de croissance. Ces derniers seront donc étudiés plus en avant avec la détermination des  $CI_{50}$ .

Espèce	Code (MET)	SA		SE	
		éter	Méthanol	éter	Méthanol
<i>Acromastigum caledonicum</i>	113B	13,7±10,3 (0,98)	20,6±10,4 (0,93)	30,5±12,3 (0,97)	25,5±8,7 (0,98)
<i>Acromastigum tenax</i>	116	13,8±6,5 (0,98)	20,7±10,9 (0,99)	16,6±9,9 (0,97)	19,5±15,8 (0,99)
<i>Bazzania serrifolia</i>	099	17,6±5,2 (0,98)	~ 100**	~ 0*	~ 100**
<i>Bazzania francana</i>	106	23,1±10,6 (0,99)	~ 100**	11,5±22,9 (0,98)	~ 0*
<i>Bazzania sp. AD212</i>	117	15,1±3,9 (0,98)	~ 0*	~ 0*	~ 100**
	068	15,2±9,6 (0,98)	~ 0*	19±7,1 (0,97)	~ 0*
<i>Bazzania deplanchei</i>	115	8,1±7,8 (0,98)	15,7±6,5 (0,98)	12,6±6,2 (0,98)	15,1±5 (0,99)
<i>Bazzania marginata</i>	048	NR***	NR***	~ 100**	~ 100**
<i>Bazzania subintegra</i>	113A	~ 100**	~ 100**	78,6±4 (0,89)	82,5±2,7 (0,91)
<i>Bazzania parisii</i>	109A	92,6±2,7 (0,66)	95,5±2,5 (0,48)	~ 100**	82,4±3,8 (0,83)
<i>Thysananthus pancheri</i>	120	~ 100**	30,2±10,6 (0,91)	17,3±8 (0,98)	46,3±7,9 (0,91)
<i>Thysananthus spathulistipus</i>	119	18,2±4,7 (0,99)	27,2±10,3 (0,99)	13,6±7,2 (0,98)	18±7,5 (0,99)
<i>Schiffneriolejeunea tumida</i> var <i>haskarlina</i> *	023	10,9±4,6 (0,99)	***	46,2±45 (0,65)	***
<i>Lejeunea sordida</i>	045	0,7±4,7 (0,99)	***	9,3±14,3 (0,98)	***
<i>Lopholejeunea subfusca</i>	087	13,5±6,9 (0,99)	11,6±7,3 (0,99)	22,6±8,8 (0,90)	5,5±13,2 (0,98)
<i>Plagiochila bicornuta</i> .	093	10,9±5 (0,99)	~ 0*	11,1±11,4 (0,99)	3,2±11,7 (0,97)
<i>Chiastocaulon caledonicum</i>	101	23,2±5,7 (0,98)	~ 100**	18,2±9,8 (0,99)	22±17,3 (0,99)

**Tableau 64 : Pourcentage d'inhibition des extraits à 50 µg / ml, pourcentage inhibition ± écart type ( $R^2$  de la courbe de croissance)**

\*pourcentage d'inhibition nul, valeurs calculées négatives

\*\*courbe de croissance proche du témoin négatif, valeurs calculées aberrantes

\*\*\*Non renseigné

Les extraits présentant un taux d'inhibition proche de 100% ont été sélectionnés. Afin d'évaluer plus finement leurs activités antimicrobiennes, des essais visant à déterminer leur  $CI_{50}$  ont été effectués. Dans un objectif de « biosourcing » de qualité, visant à la caractérisation de « hits », seuls les extraits possédant un taux d'inhibition proche de 100% (dose unique à 50 µg / ml) sont sélectionnés. Cette sélection a permis de mettre en valeurs onze extraits pour leurs propriétés antibactériennes, représentant en tout neuf espèces différentes.

Nous n'avons pas pu déterminer les gammes de concentration visant à avoir les assurances nécessaires d'une valeur précise de  $CI_{50}$  (conditions de distribution des concentrations testées sur la sigmoïde "dose réponse" et réplicats). Ces calculs visent à établir une valeur approchée

de la  $CI_{50}$ . Ils permettent d'avoir des échelles de valeurs de  $CI_{50}$  justifiant une investigation phytochimique dans le but de découvrir des « hits ». Ces valeurs approchées sont présentées dans le Tableau 65 ci-dessous.

	Code (MET)	SA		SE	
		Ether	Méthanol	Ether	Méthanol
<b>Bazzania serrifolia</b>	099	-	17,7±1,9 (0,93 ; 9)	-	26±5,2 (0,91 ; 7)
<b>Chiastocaulon caledonicum</b>	101	-	6,7±1 (0,97 ; 7)	-	
<b>Bazzania francana</b>	106	-	30,8±0,7 (0,98 ; 5)	-	17,0±1,6 (0,87 ; 9)
<b>Bazzania sp. AD212</b>	117		-	-	14,1±1 (0,93 ; 9)
Thysananthus pancheri	120	51,3±11 (0,98 ; 4)	-	-	-
<b>Bazzania parisii</b>	109A	-	-	19,3±0,8 (0,97 ; 9)	-
<b>Bazzania subintegra</b>	113a	16,3±1,1 (0,94 ; 6)	56,7±38,8 (0,95 ; 4)	-	-
(-)-β-herberténol ( <b>89</b> ) Isolé de <i>Bazzania marginata</i> (MET048)					11,4±2,2 (0,84 ; 6)

**Tableau 65 : Valeur de  $CI_{50}$  en  $\mu\text{g} / \text{ml}$  des extraits sélectionnés : valeur de  $CI_{50} \pm$  écart type ( $R^2$  pour la sigmoïde ; nombre point sur la sigmoïde)**

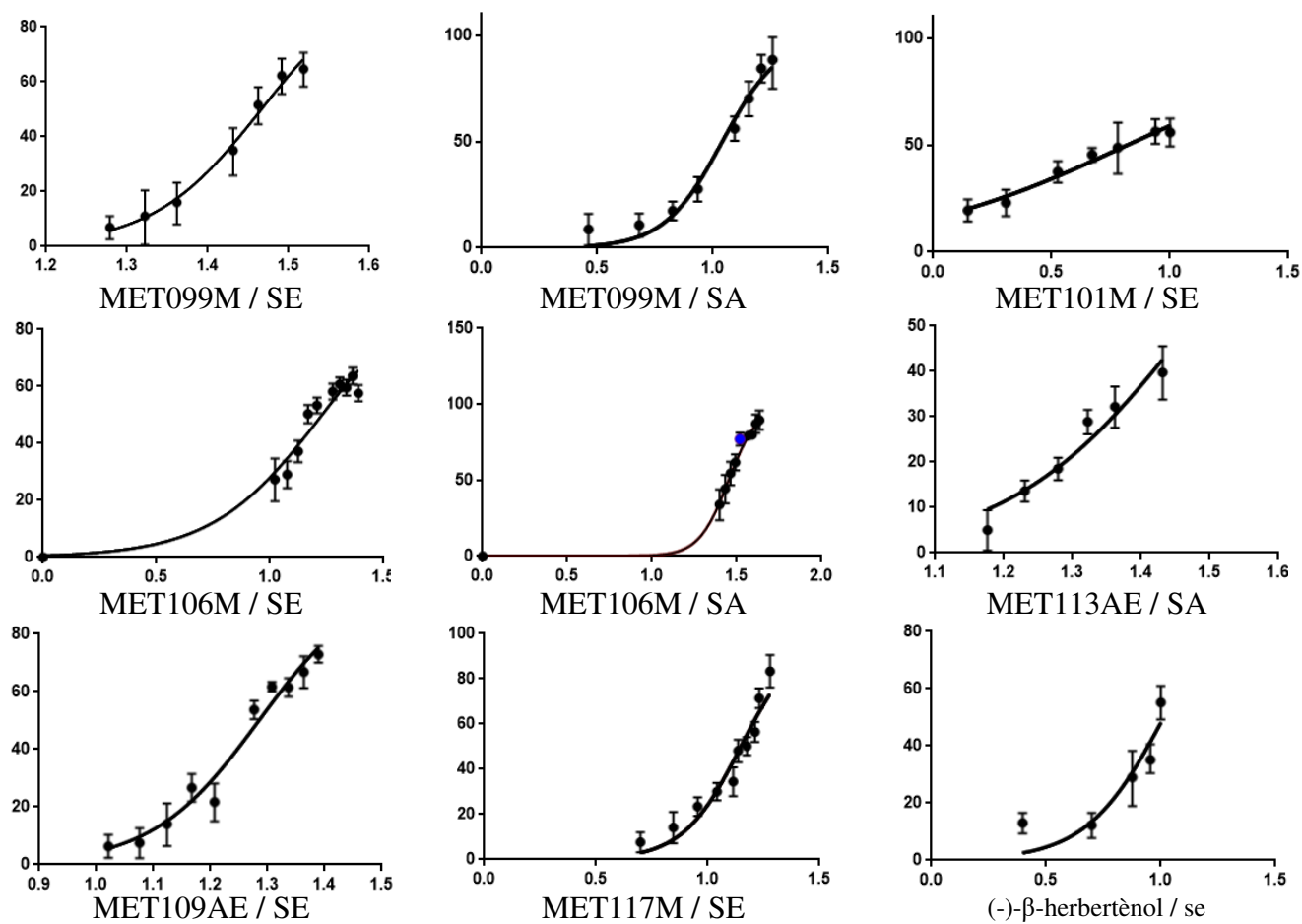
Il a été remarqué qu'aucun des extraits testés n'a montré une activité inhibitrice de croissance envers *E. coli* alors que beaucoup d'extraits perturbent la croissance de *S. aureus* et *S. epidermidis*. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les staphylocoques sont des bactéries à GRAM positif alors que *E. coli* est à GRAM négatif. Ainsi la membrane bactérienne extérieure des bactéries à GRAM négatif serait un facteur limitant l'activité des extraits testés.

Trois extraits ont une  $CI_{50}$  inférieure à  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  sur *S. aureus*, il s'agit des extraits méthanol de *Bazzania francana* (MET106,  $17,0 \pm 1,6 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), de *Bazzania sp. AD212* (MET112,  $14,1 \pm 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) ainsi que l'extrait étheré de *Bazzania parisii* (MET109A,  $19,3 \pm 0,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). L'allure des modélisations par une courbe de type sigmoïdale (dose-réponse) pour les extraits les plus actifs est montrée dans la Figure 60.

Trois extraits ont une  $CI_{50}$  inférieure à  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  sur *S. epidermidis*, il s'agit des extraits méthanol de *Bazzania serrifolia* (MET099,  $17,7 \pm 1,9 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) et *Chiastocaulon caledonicum* (MET101,  $6,7 \pm 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) ainsi que de l'extrait éther de *Bazzania subintegra* (MET113A,  $16,3 \pm 1,1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

Enfin le composé majoritaire de *Bazzania marginata* (MET048), dont les extraits éther et méthanol avait montré un taux d'inhibition sur *S. epidermidis* (cf. Tableau 64) a été extrait et caractérisé (cf. III.3.3.2.7.1). Il s'agit du (-)-β-herberténol (**89**) détecté avec un pourcentage

relatif de 95,9% par analyse CPG-FID-SM, ce composé possède une  $CI_{50}$  de  $11,4 \pm 2,2 \mu\text{g} / \text{ml}$  contre *S. epidermidis*.



**Figure 60 :** Allures des modélisations de type sigmoïde Dose-réponse pour les extraits les plus actifs,  $f(\text{Log } C) = \% \text{ inhibition}$  (M : extrait méthanol, E : extrait éther), extrait ou composé testé / souche de l'essai,

## 5 Discussion

Les résultats obtenus mènent tout naturellement à envisager un « biosourcing ». Les extraits étant composés d'une multitude de constituant, la  $CI_{50}$  de ceux-ci ne reflète pas le potentiel réel antimicrobien de la ou les molécule (s) qui pourraient être à l'origine de l'activité, ceux-ci étant supposés avoir une meilleur  $CI_{50}$  que l'extrait. Ce type de raisonnement étant valable car on se place dans un cas où l'activité serait due à un ou plusieurs composés, faisant abstraction des possibles effets de synergie ou antagonie des composés ou encore des effets d'inhibition.

Il faut aussi avoir en tête que le méthanol est un solvant d'extraction moins spécifique que l'éther, et donc extrait une diversité chimique plus importante en théorie. Ceci suppose que les molécules aient globalement des concentrations individuelles plus faibles dans l'extrait au méthanol que dans l'extrait à l'éther diéthylique.

Concernant *Bazzania serrifolia* (MET099,  $CI_{50} = 17,7 \pm 1,9 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. epidermidis*), *Bazzania francana* (MET106,  $CI_{50} = 17,0 \pm 1,6 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. aureus*), *Bazzania* sp. AD212 (MET117,  $CI_{50} = 14,1 \pm 1 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. epidermidis*) et *Chiastocaulon caledonicum* (MET101,  $CI_{50} = 6,7 \pm 1$  pour *S. aureus*), seuls les extraits au méthanol ont montré une activité intéressante et les essais menés en en dose unique sur les extraits au méthanol tendent à montrer que seuls les composés obtenus par extraction au méthanol de ces deux plantes seraient des « hits » potentiels. Les probabilités pour détecter le ou les composés responsables de la bioactivité par CPG-MS sont donc faibles.

Les extraits éther des plantes suivantes ont montré des activités inhibitrices de croissance pour au moins une des souches testées : *Thysananthus pancheri* (MET120,  $CI_{50} = 51,3 \pm 11 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. aureus*), *Bazzania parisii* (MET109A,  $CI_{50} = 19,3 \pm 0,8 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. epidermidis*) et *Bazzania subintegra* (MET113A,  $CI_{50} = 16,3 \pm 1,1 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour *S. aureus*). A ce titre, l'analyse en CPG-FID-SM peut révéler le ou les composant(s) responsables de cette activité. Pour cela les constituants principaux des extraits à l'éther des plantes citées précédemment sont listés ci-dessous dans le Tableau 66.

Espèces	Souches	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Molécules majoritaires détectées par CPG-FID-MS
Bazzania parisii (MET109A)	SE	19,3±0,8	β-bazzanène ( <b>5</b> ) (21,5%) β-barbatène ( <b>81</b> ) (17,8%) M≥286, 121, 79 ( <b>85</b> ) (12,9%) (12Z)-abiènol ( <b>169</b> ) (10,7%)
Bazzania subintegra (113A)	SA	16,3±1,1	M=288, 95, 107( <b>80</b> ) (17,67%) fuscocca-2,5-diène ( <b>80</b> ) (16,7%) M≥286, 95, 107 ( <b>90</b> ) (16,1%) oxyde de 13-épi-manoyl ( <b>158</b> ) (11,5%) α-herbertènol isomère 1 ( <b>167</b> ) (12,1%) α-herbertènol isomère 2 ( <b>168</b> ) (9,7%) (+)-β-herbertènol ( <b>171</b> ) (7,5%)
Thysananthus pancheri (MET120)	SA	51,3±11	M≥272, 149, 177 (95) (52,1%) isolépidozène ( <b>111</b> ) (11,1%)

**Tableau 66 : Molécules majoritaires des extraits éthérés ayant montrés de bonnes activités**

➤ Activité de l'extrait éther de *Bazzania parisii* sur *S. epidermidis*

Le β-bazzanène (**5**) est le composé volatil majoritaire de *Scapania nemorea* dont l'extrait possède des activités contre plusieurs bactéries [145]. Le (12Z)-abiènol (**169**) possède des effets inhibiteurs sur *Ralstonia solanacearum*, bactérie du sol à Gram-négative [146]. Enfin La littérature ne mentionne pas d'activités antibactériennes pour le (12Z)-abiènol (**169**) (10,7%) et le β-barbatène (**81**) (17,8%).

Le β-bazzanène (**5**) pourrait être responsable de la bioactivité de l'extrait mais seul l'isolement des composants de l'extrait éthéré de *Bazzania parisii* et l'évaluation de leurs activités sur *S. epidermidis* pourrait permettre de lier cette activité à l'un de ces composés. Il n'est pas exclu que le composé indéterminé M≥286, 121, 79 (**85**) (12,9%) soit responsable de cette activité.

➤ Activité de l'extrait éther de *Bazzania subintegra* sur *S. aureus*

L'analyse CPG-FID-SM a montré un pourcentage relatif de 23,3% de sesquiterpénoïdes oxygénés de type herbertane au sein de *Bazzania subintegra* et il est reporté que le (-)-β-herbertènol (**89**) possède une activité modérée contre *S. aureus* [21]. Par conséquent l'activité antimicrobienne pourrait être due aux sesquiterpénoïdes de type herbertane. Notons tout de même que cette plante possède deux diterpénoïdes oxygénés inconnus avec des pourcentages relatifs élevés.

➤ Activité de l'extrait éther de *Thysananthus pancheri* sur *S. aureus*

Les composés volatils majoritaires de *Thysananthus pancheri* sont un diterpénoïde indéterminé M≥272, 149, 177 (95) (52,1%) et l'isolépidozène (**111**) (11,1%). Nous notons l'absence de rapport de bioactivité sur l'isolépidozène (**111**) dans la littérature ainsi seul l'isolement des composés de cet extrait suivis d'essai antimicrobiens pourrait nous renseigner sur la ou les molécules responsable de l'activité antimicrobienne.



## 6 Conclusion des travaux biologiques

L'ensemble des extraits testés à dose unique nous a permis de sélectionner neuf extraits ayant une activité d'inhibition de croissance bactérienne inférieure à 60 µg / ml.

Les données de la littérature montrent que l'activité des extraits éther de *Bazzania parisii* (actif sur *S. epidermidis*) et *Bazzania subintegra* (actif sur *S. aureus*) pourrait être due respectivement à de forte teneur en β-bazzanène (**5**) (21,5%) et en herberténol (composé (**167**), (**168**) et (**171**)) mais seul des tests réalisés sur les molécules isolées pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. L'extrait éther de *Thysananthus pancheri* actif sur *S. aureus* revêt un intérêt particulier car le composé majoritaire est inconnu : M ≥272, 149, 177 (95) (52,1%) et est donc potentiellement une nouvelle molécule active.

Quatre extraits au méthanol possèdent des CI<sub>50</sub> comprises entre 6,7 et 30,8 µg / ml. Les extraits les plus intéressants dans la recherche de molécules ayant un fort potentiel bactéricide envers *S. aureus* étant les extraits méthanol de *Bazzania serrifolia* (CI<sub>50</sub> = 17,7±1,9 µg / ml) et *Chistocaulon caledonicum* (CI<sub>50</sub> = 6,7±1 µg / ml).

Ce « biosourcing » souligne aussi l'intérêt des extraits méthanol de *Bazzania* sp. AD212 (CI<sub>50</sub> = 14,1±1 µg / ml) et *Bazzania francana* (CI<sub>50</sub> = 17,0±1,6 µg / ml) dans la recherche d'agents antimicrobiens actif contre *S. epidermidis*.

Mis à part les extraits de *Bazzania serrifolia* et *Bazzania francana*, les autres extraits sélectionnés ne sont actifs que sur une seule souche signifiant ainsi une probable sélectivité de l'activité biologique.

Dans l'objectif de trouver de nouvelles molécules actives les extraits sélectionnés devraient être fractionnés et les molécules ainsi isolées faire l'objet d'essais antibactériens. Il est préférable que les plantes dont l'extrait méthanol est actif fassent l'objet d'une première extraction à l'éther afin de simplifier le fractionnement de l'extrait au méthanol (l'extrait éther de ces plantes n'ayant pas montré d'activité).

Il serait important de mener une étude phytochimique visant à isoler les composés des extraits de plantes ayant montrés d'intéressantes activités bactéricides. Cela permettrait de connaître la source de cette activité. Des essais antibactériens complémentaires tels que des tests antibiofilms et des tests anti adhésion pourraient également être envisagés.

## PARTIE IV.      CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse apportent une contribution à la connaissance de la bryoflore de Nouvelle-Calédonie qui est connue pour être un « hot-spot » de la biodiversité et particulièrement l'un des endroits les plus riches du monde en diversité d'hépatiques (avec le Japon, la Nouvelle-Zélande et le Costa Rica). L'approche phytochimique et l'évaluation des activités biologiques ont été choisies comme domaines d'investigation sachant que peu de données existent à l'heure actuelle à ce sujet sur les hépatiques néo-calédoniennes qui méritent d'être mieux connues. Ainsi l'étude réalisée a porté sur 71 échantillons d'hépatiques collectées en Nouvelle-Calédonie provenant de 34 espèces (dont 14 endémiques) appartenant à 6 familles (Plagiochilaceae, Lophocoleaceae, Lepidoziaceae, Porellaceae, Lejeuneaceae et Frullaniaceae) affiliées à deux ordres : Jungermanniales (sous-ordre des Lophocoleineae) et Porellales (sous-ordres des Porellineae et des Jubulineae).

Au terme de cette étude, les résultats obtenus ont permis :

- L'établissement de la composition chimique, notamment en constituants volatils, des 34 espèces étudiées dont seules quatre avaient déjà fait l'objet d'études antérieures. Il s'agit également de la première étude phytochimique réalisée sur les genres *Chistiocaulon* et *Acromastigum*. C'est un pan entier de connaissances sur la phytochimie des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie qui a été ainsi établie avec l'identification d'environ 260 constituants appartenant à d'importantes familles de métabolites secondaires (terpénoïdes et composés aromatiques).
- La révélation de l'originalité de cette bryoflore par sa chimiodiversité avec les compositions chimiques et chimiotypes observés pour les différentes espèces, mettant en lumière les voies biosynthétiques majeures empruntées par certaines familles de composés (surtout des sesquiterpénoïdes).
- L'isolement et la caractérisation de 18 constituants dont 4 nouvelles molécules (un dérivé du chromène, un sesquiterpénoïde, un bibenzyls et un bis(bibenzyl) qui vont accroître la liste des produits naturels issus de la biodiversité néo-calédonienne. L'ensemble de ces composés isolés pourront servir de molécules de référence (standard) pour d'autres études phytochimiques à mener et être testés pour révéler leurs potentialités en activités biologiques.
- L'évaluation des activités microbiennes des extraits d'hépatiques, montrant les potentialités de ces plantes et leurs extraits pour lutter contre certaines souches pathogènes. Ces extraits et molécules actifs ainsi révélés pourraient apporter de nouvelles alternatives aux antibiotiques utilisées jusque-là et limiter les risques de résistance.

Le bilan de ces travaux et des résultats ainsi obtenus, a suscité à proposer un certain nombre de perspectives à mener à l'issue de cette étude, portant sur divers points :

- Poursuivre les premières études phytochimiques sur les hépatiques de Nouvelle-Calédonie qui sont prometteuses pour apporter de plus amples connaissances de la composition chimique des espèces déjà étudiées. Ces investigations restent à approfondir (telles que les produits inconnus à isoler et identifier), l'élargissement de l'étude sur un échantillonnage plus étoffé pour confirmer de manière plus significative les chimiotypes nouvellement identifiés, l'investigation sur d'autres taxons (espèces, genres, familles) non encore étudiées au niveau phytochimique.
- Réaliser des études complémentaires en génétique et phylogénie pour d'une part identifier de manière précise les taxons étudiés dans la présente étude mais encore non précisés au niveau taxonomique et d'autre part analyser la cohérence de la phylogénie et de la chimiodiversité au niveau de la chimiotaxonomie.
- Explorer les aspects biosynthétiques des familles de composés identifiés pour mieux expliquer l'obtention de l'ensemble des composés formés et leur diversité et acquérir ainsi des informations utiles aux voies de synthèse possibles applicables à la synthèse biomimétique par exemple.
- Réaliser des tests d'activités biologiques adaptées aux extraits, fractions et molécules isolées pour une valorisation raisonnée des molécules actives de ces espèces. Notamment insecticide contre les larves de moustiques et de papillons piqueurs locales pour les extraits de *Schiffneriolejeunea tumida* var *haskarlina*, *Chiloscyphus confertus*, *Chiloscyphus latistipus* et *Acromastigum caledonicum*. Il serait aussi intéressant d'évaluer le potentiel de l'extrait de *Chiloscyphus confertus* contre les espèces de tiques locales sévissant dans les troupeaux bovins en Nouvelle-Calédonie
- Réaliser des bioprospections (screening biologique) sur les différents extraits disponibles pour sonder leurs potentialités autres que les activités antimicrobiennes, par exemple par des tests d'activité sur des lignées cancéreuses ou autres.

Il serait intéressant aussi d'évaluer l'importance olfactive de certaines espèces d'hépatiques odorantes telle que les celles riches en composés de type santalane (*Porella perrottetiana*) pour leur valorisation en parfumerie. La diversification des souches microbiennes testées seraient aussi une voie de valorisation importante des hépatiques néo-calédoniennes, avec notamment des essais antifongiques des extraits de *Heteroscyphus argutus*, *Plagiochila tesmanii* et *Bazzania serrifolia*.

## PARTIE V. BIBLIOGRAPHIE

1. Wellman CH, Osterloff PL, Mohiuddin U. 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature*. 425:282–285.
2. Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS. 2012. Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* 109:851–871.
3. Pires ND, Dolan L. 2012. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367:508–518.
4. Hallingbäck T, Hodgetts NG, IUCN/SSC Bryophyte Specialist Group, Sveriges lantbruksuniversitet, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2000. Mosses, liverworts, and hornworts: status survey and conservation action plan for bryophytes. IUCN in collaboration with the Swedish Threatened Species Unit, Gland.
5. von Konrat M, Renner M, Söderström L, Hagborg A, Mutke J. 2008. Chapter Nine: Early Land Plants Today: Liverwort Species Diversity and the Relationship with Higher Taxonomy and Higher Plants. *Fieldiana Bot.* 47:91.
6. Gerson U. 1982. Bryophytes and Invertebrates. In Smith, AJE, ed., *Bryophyte Ecol.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 291–332. doi:10.1007/978-94-009-5891-3\_9.
7. Gradstein SR, Homeier J, Gansert D. 2008. The tropical mountain forest: patterns and processes in a biodiversity hotspot. Univ.-Verl. Göttingen, Göttingen.
8. Gignac LD. 2001. Bryophytes as Indicators of Climate Change. *The Bryologist*. 104:410–420.
9. Olarinmoye SO. 1974. Ecology of epiphyllous liverworts: growth in three natural habitats in Western Nigeria. *J. Bryol.* 8:275–289.
10. He X, Sun Y, Zhu R-L. 2013. The Oil Bodies of Liverworts: Unique and Important Organelles in Land Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32:293–302.
11. Glime JM. 2015. Water Relations: Leaf Strategies.
12. CLEE DA. 1937. Leaf Arrangement in Relation to Water Conduction in the Foliose Hepaticae. *Ann. Bot.* 1:325–328.
13. Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS. 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 355:795–813.
14. Proctor MC, Nagy Z, Csintalan Z, Takács Z. 1998. Water-content components in bryophytes: analysis of pressure-volume relationships. *J. Exp. Bot.* 49:1845–1854.
15. Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Abadía A, Barreno E. 1998. Changes in chlorophyll a fluorescence, photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta*. 207:224–228.
16. Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6:1720–1731.
17. Sofia A, de Almeida AM, da Silva AB, da Silva JM, Paula A, Santos D, Fevereiro P, Sousa Araujo S de. 2013. Abiotic Stress Responses in Plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive. In Vahdati, K, ed., *Abiotic Stress - Plant Responses Appl. Agric. InTech*. doi:10.5772/52779.
18. Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27–58.
19. Wise RR. 1995. Chilling-enhanced photooxidation: The production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* 45:79–97.
20. Schwartner C, Michel C, Stettmaier K, Wagner H, Bors W. 1996. Marchantins and related polyphenols from liverwort: Physico-chemical studies of their radical-scavenging properties. *Free Radic. Biol. Med.* 20:237–244.
21. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. 2013. Chemical Constituents of Bryophytes. *Bio- and Chemical Diversity, Biological Activity, and Chemosystematics*. 95, Kinghorn AD, Falk H, Kobayashi J., Vienna.

22. Smanski MJ, Peterson RM, Huang S-X, Shen B. 2012. Bacterial diterpene synthases: new opportunities for mechanistic enzymology and engineered biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16:132–141.
23. Asakawa Y. 1995. *Chemical Constituents of the Bryophytes*. 65, Herz W, Kirby GW, Moore RE, Steglich W, Tamm Ch., Vienna.
24. Asakawa Y. 1982. *Chemical Constituents of the Hepaticae*. 42, Herz W, Grisebach H, Kirby GW, Vienna.
25. Dewick PM. 2002. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 19:181–222.
26. Schuman MC, Palmer-Young EC, Schmidt A, Gershenzon J, Baldwin IT. 2014. Ectopic Terpene Synthase Expression Enhances Sesquiterpene Emission in *Nicotiana attenuata* without Altering Defense or Development of Transgenic Plants or Neighbors. *PLANT Physiol.* 166:779–797.
27. Durán-Peña MJ, Botubol Ares JM, Hanson JR, Collado IG, Hernández-Galán R. 2015. Biological activity of natural sesquiterpenoids containing a gem-dimethylcyclopropane unit. *Nat Prod Rep.* 32:1236–1248.
28. Picman AK. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 14:255–281.
29. Sell C. 2003. *A fragrant introduction to terpenoid chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
30. Komala I, Ito T, Nagashima F, Yagi Y, Kawahata M, Yamaguchi K, Asakawa Y. 2010. Zierane sesquiterpene lactone, cembrane and fusicoccane diterpenoids, from the Tahitian liverwort *Chandonanthus hirtellus*. *Phytochemistry*. 71:1387–1394.
31. Ludwiczuk A, Asakawa Y. 2014. Fingerprinting of Secondary Metabolites of Liverworts: Chemosystematic Approach. *J. AOAC Int.* 97:1234–1243.
32. Grammes C, Burkardt G, Veith M, Huch V, Becker H. 1997. epi-neoverrucosane- and epi-homeoverrucosane-type diterpenoids from *Fossombronia alaskana*. *Phytochemistry*. 44:1495–1502.
33. stoker JR, Bellis DM. 1962. The biosynthesis of coumarin in *Melilotus Alba*. *J. Biol. Chem.* 237.
34. Kraut L, Mues R. 1999. The First Biflavone Found in Liverworts and Other Phenolics and Terpenoids from *Chandonanthus hirtellus* ssp. *giganteus* and *Plagiochila asplenioides*. *Z Naturforsch.* 54c:6–10.
35. Feld H, Rycroft DS, Zapp J. 2004. Chromenes and Prenylated Benzoic Acid Derivatives from the Liverwort *Pedinophyllum interruptum*. *Z Naturforsch.* 59b:825–828.
36. Kiang F-M, Chang S-J, Wu C-L. 1994. Naphthalene and isocoumarin derivatives from the liverwort *Wettsteinia inversa*. *Phytochemistry*. 37:1459–1461.
37. Yoshikawa H, Ichiki Y, Sakakibara KD, Tamura H, Suiko M. 2002. The biological and structural similarity between lunularic acid and abscisic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:840–846.
38. Asakawa Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and European liverworts. *Phytochemistry*. 56:297–312.
39. Asakawa Y. 2004. Chemosystematics of the Hepaticae. *Phytochemistry*. 65:623–669.
40. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Toyota M. 2014. Chemical Analysis of Bryophytes. In Meyers, RA, ed., *Encycl. Anal. Chem.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 1–53. doi:10.1002/9780470027318.a9932.
41. Nagashima F, Sekiguchi T, Takaoka S, Yoshinori A. 2004. Terpenoids and Aromatic Compounds from the New Zealand Liverworts *Plagiochila*, *Schistochila* and *Heteroscyphus* Species. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 52:556–560.

42. Martini U, Zapp J, Becker H. 1998. Chlorinated macrocyclic bisbibenzyls from the liverwort *Bazzania trilobata*. *Phytochemistry*. 47:89–96.
43. Pichersky E, Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci*. 5:439–445.
44. Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64:3–19.
45. Asakawa Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure Appl. Chem*. 79.
46. Shirsat RP. 2008. Ethnomedicinal Uses of Some Common Lower Plants Used by Tribals of Melghat Region (MS) India. *Ethnobot. Leaflet*. 2008:88.
47. Chandra S, Chandra D, Barh A, Pankaj, Pandey RK, Sharma IP. 2017. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *J. Tradit. Complement. Med*. 7:94–98.
48. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. 2013. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*. 91:52–80.
49. Wu C, Gunatilaka AL, McCabe FL, Johnson RK, Spjut RW, Kingston DG. 1997. Bioactive and other sesquiterpenes from *Chiloscyphus rivularis*. *J. Nat. Prod*. 60:1281–1286.
50. Burgess EJ, Larsen L, Perry NB. 2000. A Cytotoxic Sesquiterpene Caffeeate from the Liverwort *Bazzania novae-zelandiae*. *J. Nat. Prod*. 63:537–539.
51. Nagashima F, Kasai W, Kondoh M, Fujii M, Watanabe Y, Braggins JE, Asakawa Y. 2003. New ent-kaurene-type diterpenoids possessing cytotoxicity from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 51:1189–1192.
52. Shu Y-F, Wei H-C, Wu C-L. 1994. Sesquiterpenoids from liverworts *Lepidozia vitrea* and *L. Fauriana*. *Phytochemistry*. 37:773–776.
53. Niu C, Qu J-B, LOU H-X. 2006. Antifungal Bis[bibenzyls] from the Chinese Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Chem Biodivers*. 3:34–40.
54. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F, Toyota M, Hashimoto T, Tori M, Fukuyama Y, Harinantenaina L. 2009. Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity, Bioactivity and Chemosystematics. *HETEROCYCLES*. 77:99.
55. Komala I, Ito T, Nagashima F, Yagi Y, Asakawa Y. 2010. Cytotoxic, radical scavenging and antimicrobial activities of sesquiterpenoids from the Tahitian liverwort *Mastigophora diclados* (Brid.) Nees (Mastigophoraceae). *J. Nat. Med*. 64:417–422.
56. Harinantenaina L, Kida S, Asakawa Y. 2007. Phytochemistry of three selected liverworts: *Conocephalum conicum*, *Plagiochila barteri* and *P. terebrans*. *Arkivoc*. 7:22–29.
57. Hashimoto T, Tori M, Asakawa Y. 1988. A highly efficient preparation of lunularic acid and some biological activities of stilbene and dihydrostilbene derivatives. *Phytochemistry*. 27:109–113.
58. La forêt humide | Observatoire de l'environnement Nouvelle Calédonie. [cited 22 May 2017]. Available from <http://www.oeil.nc/fr/natural-environment/t-humide>.
59. Jiang Y, Wang T, de Bie CAJM, Skidmore AK, Liu X, Song S, Zhang L, Wang J, Shao X. 2014. Satellite-derived vegetation indices contribute significantly to the prediction of epiphyllous liverworts. *Ecol. Indic*. 38:72–80.
60. Thouvenot L, Gradstein SR, Hagborg A, Söderström L, Bardat J. 2011. Checklist of the Liverworts and Hornworts of New Caledonia. *Cryptogam. Bryol*. 32:287–390.
61. Nuzillard J-M, Georges M. 1991. Logic for structure determination. *Tetrahedron*. 47:3655–3664.
62. Heinrichs J, Gradstein SR, Groth H, Lindner M. 2003. *Plagiochila cucullifolia* var. *anomala* var. *nov.* from Ecuador, with notes on discordant molecular and morphological variation in *Plagiochila*. *Plant Syst. Evol*. 242:205–216.
63. Rontani J-F, Volkman JK. 2003. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Org. Geochem*. 34:1–35.

64. Nawrath T, Dickschat JS, Müller R, Jiang J, Cane DE, Schulz S. 2008. Identification of (8S,9S,10S)-8,10-Dimethyl-1-octalin, a Key Intermediate in the Biosynthesis of Geosmin in Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 130:430–431.
65. Salem MZM, Elansary HO, Elkelish AA, Zeidler A, Ali HM, EL-Hefny M, Yessoufou K. 2016. In vitro Bioactivity and Antimicrobial Activity of *Picea abies* and *Latrix decidua* Wood and Bark Extracts. *BioResources.* 4:9421–9137.
66. Ali S, Zhang C, Mohamed A, El-Baz F, Hegazy A, Kord M, Nair M. 2013. Major constituents of *Boswellia carteri* resin exhibit cyclooxygenase enzyme inhibition and antiproliferative activity. *Nat. Prod. Commun.* 8:1365–1366.
67. Greve HL, Kaiser M, Brun R, Schmidt TJ. 2016. Search for new antiprotozoal leads in oleo-gum-resins from plants of the family Burseraceae: Indian frankincense and myrrh. *Planta Med.* 82, Georg Thieme Verlag KG, p P275.
68. Kanehisa M, Susumu G. 2000. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28:27–30.
69. Hong YJ, Tantillo DJ. 2014. Branching Out from the Bisabolyl Cation. Unifying Mechanistic Pathways to Barbatene, Bazzanene, Chamigrene, Chamipinene, Cumacrene, Cuprenene, Dunniene, Isobazzanene, Iso- $\gamma$ -bisabolene, Isochamigrene, Laurene, Microbiotene, Sesquithujene, Sesquisabinene, Thujopsene, Trichodiene, and Widdradiene Sesquiterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 136:2450–2463.
70. Tabanca N, Wang M, Avonto C, Chittiboyina AG, Parcher JF, Carroll JF, Kramer M, Khan IA. 2013. Bioactivity-Guided Investigation of Geranium Essential Oils as Natural Tick Repellents. *J. Agric. Food Chem.* 61:4101–4107.
71. Jain SC, Pancholi B, Jain R. 2012. Antimicrobial, free radical scavenging activities and chemical composition of *Peltophorum pterocarpum* Baker ex K. Heyne stem extract. *Pharm Chem.* 4:2073–2079.
72. Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G. 2016.  $\delta$ -Cadinene, Calarene and  $\delta$ -4-Carene from *Kadsura heteroclita* Essential Oil as Novel Larvicides Against Malaria, Dengue and Filariasis Mosquitoes. [cited 18 June 2017]. Available from <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cchts/2016/00000019/00000007/art00006>.
73. Singh D, Agarwal SK. 1988. Himachalol and  $\beta$ -himachalene: Insecticidal principles of himalayan cedarwood oil. *J. Chem. Ecol.* 14:1145–1151.
74. Liu Y, Wiedle Jr. H, Brodie PJ, Callmander MW, Rakotondrajaona R, Rakotobe E, Rasamison VE, Kingston DGI. 2015. Antiproliferative Diterpenes from a *Malleastrum* sp. from the Madagascar dry forest[1]. *Nat. Prod. Commun.* 10:1509–1512.
75. Freiburghaus F, Steck A, Pfander H, Brun R. 1998. Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J. Ethnopharmacol.* 61:179–183.
76. Scher JM, Speakman J-B, Zapp J, Becker H. 2004. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. Gray. *Phytochemistry.* 65:2583–2588.
77. Hashimoto T, Nakamura I, Tori M, Takaoka S, Asakawa Y. 1995. epi-Neoverrucosane- and ent-clerodane-type diterpenoids and ent-2, 3-secoaromadendrane- and calamenene-type sesquiterpenoids from the liverwort *Heteroscyphus planus*. *Phytochemistry.* 38:119–127.
78. Söderström L, Hagborg A, von Konrat M, Bartholomew-Began S, Bell D, Briscoe L, Brown E, Cargill DC, da Costa DP, Crandall-Stotler BJ, Cooper E, Dauphin G, Engel J, Feldberg K, Glenny D, Gradstein SR, He X, Hentschel J, Ilkiu-Borges AL, Katagiri T, Konstantinova NA, Larraín J, Long D, Nebel M, Pócs T, Puche F, Reiner-Drehwald E, Renner M, Sass-Gyarmati A, Schäfer-Verwimp A, Segarra-Moragues J, Stotler RE,



- Sukkharak P, Thiers B, Uribe J, Vána J, Wigginton M, Zhang L, Zhu R-L. 2016. World checklist of hornworts and liverworts. *PhytoKeys*. 59:1–828.
79. Govindarajan M, Benelli G. 2016.  $\alpha$ -Humulene and  $\beta$ -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 115:2771–2778.
  80. Legault J, Dahl W, Debiton E, Pichette A, Madelmont J-C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69:402–407.
  81. Bougatsos C, Ngassapa O, Runyoro DKB, Chinou IB. 2004. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum* Species from Tanzania. *Z Naturforsch.*:368–372.
  82. Ziaei A, Ramezani M, Wright L, Paetz C, Schneider B, Amirghofran Z. 2011. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytother. Res.* 25:557–562.
  83. da Costa FB, Albuquerque S, Vichnewski W. 1996. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanocidal activity. *Planta Med.* 62:557–559.
  84. Robles-Kelly C, Rubio J, Thomas M, Sedán C, Martínez R, Olea AF, Carrasco H, Taborga L, Silva-Moreno E. 2016. Effect of drimenol and synthetic derivatives on growth and germination of *Botrytis cinerea*: Evaluation of possible mechanism of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* doi:10.1016/j.pestbp.2016.11.006.
  85. Sahi NM. 2016. Evaluation of insecticidal activity of bioactive compounds from *Eucalyptus citriodora* against *Tribolium castaneum*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8.
  86. Inagaki F, Abe A. 1985. Analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of spathulenol by two-dimensional methods. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*:1773–1778.
  87. Chavan SP, Thakkar M, Kharul RK, Pathak AB, Bhosekar GV, Bhadbhade MM. 2005. First enantiospecific synthesis of (+)- $\beta$ -herbertenol. *Tetrahedron.* 61:3873–3879.
  88. Ghelardini C, Galleotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A. 2001. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *IL Farm.* 56:387–389.
  89. Legault J, Pichette A. 2007. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.* 59:1643–1647.
  90. Oztürk M, Duru M, Aydoğmuş-Oztürk F, Harmandar M, Mahlıçlı M, Kolak U, Ulubelen A. 2009. GC-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. *Nat. Prod. Commun.* 4:109–114.
  91. Sköld M, Karlberg A-T, Matura M, Börje A. 2006. The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem. Toxicol.* 44:538–545.
  92. Choudhary MI, Batool I, Atif M, Hussain S, Atta-ur-Rahman. 2007. Microbial Transformation of (–)-Guaiol and Antibacterial Activity of Its Transformed Products. *J. Nat. Prod.* 70:849–852.
  93. Vats S, Gupta T. 2017. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. from Rajasthan, India. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 23:239–248.
  94. Khadem S, Marles RJ. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules.* 15:7985–8005.
  95. Ngbolua K, Herintsoa R, Hajatiana R, Mudogo V, Tshilanda D, Tshibangu D, Mpiana P. 2015. In vitro Anti-erythrocyte Sickling Effect of Lunularic Acid of Natural Origin. *Int. Blood Res. Rev.* 4:1–6.

96. Zerbe P, Chiang A, Yuen M, Hamberger B, Hamberger B, Draper JA, Britton R, Bohlmann J. 2012. Bifunctional cis-Abienol Synthase from *Abies balsamea* Discovered by Transcriptome Sequencing and Its Implications for Diterpenoid Fragrance Production. *J. Biol. Chem.* 287:12121–12131.
97. Chen SY. 2016. Sclareol Enhance Susceptibility to Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer. *FASEB J.* 30:1193.11-1193.11.
98. Demetzos C, Stahl B, Anastassaki T, Gazouli M, Tzouvelekis LS, Rallis M. 1999. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin *Ladano*, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med.* 65:76–78.
99. Sashidhara KV, Rosaiah JN, Kumar A, Bid HK, Konwar R, Chattopadhyay N. 2007. Cell growth inhibitory action of an unusual labdane diterpene, 13-epi-sclareol in breast and uterine cancers in vitro. *Phytother. Res.* 21:1105–1108.
100. Ludwiczuk A, Asakawa Y. 2008. Chapter Five: Distribution of Terpenoids and Aromatic Compounds in Selected Southern Hemispheric Liverworts. *Fieldiana Bot.* 47:37.
101. Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. 2009. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol. Microbiol.* 72:1181–1195.
102. Moore BS. 2006. Biosynthesis of marine natural products: macroorganisms (Part B). *Nat. Prod. Rep.* 23:615.
103. Gradstein SR, Asakawa Y, Mues R, Klein R. 1988. On the taxonomic significance of secondary metabolites in the Lejeuneaceae (Hepaticae). *Journ Hortic Bot Lab.*:159–168.
104. Soderstrom L, Gradstein G, Hagborg A. 2014. Checklist of the hornworts and liverworts of Java. *Phytotaxa.* 9:53–149.
105. García M, Gonzalez-Coloma A, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME. 2007. Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochem. Syst. Ecol.* 35:181–187.
106. Corzo FL, Gilabert M, Alcaide MF, Bardón A. 2012. Toxicity of *Porella chilensis* Sesqui- and Diterpenoids against Larvae of the Corn Pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 41:414–419.
107. Shpatov AV, Popov SA, Salnikova OI, Kukina TP, Shmidt EN, Um BH. 2017. Composition and Bioactivity of Lipophilic Metabolites from Needles and Twigs of Korean and Siberian Pines ( *Pinus koraiensis* SIEBOLD & ZUCC . and *Pinus sibirica* DU TOUR ). *Chem. Biodivers.* 14:e1600203.
108. Coulerie, Paul, Thouvenot L, Nour M, Asakawa Y. 2015. Chemical Originalities of New Caledonian Liverworts from Lejeuneaceae Family. *Nat. Prod. Commun.* 10:1501–1504.
109. Nagashima F, Izumo H, Takaoka S, Tori M, Asakawa Y. 1994. Sesqui- and diterpenoids from the panamanian liverwort *Bryopteris filicina*. 37:433–439.
110. Sukkharak P, Ludwiczuk A, & YA, Gradstein R. 2011. Studies on the Genus *Thysananthus* (Marchantiophyta, Lejeuneaceae) 3. Terpenoid Chemistry and Chemotaxonomy of Selected Species of *Thysananthus* and *Dendrolejeunea fruticosa*. *Cryptogam. Bryol.* 32:199–209.
111. Harinantenaina L, Takahara Y, Nishizawa T, Kohchi C, Soma G-I, Asakawa Y. 2006. Chemical constituents of malagasy liverworts, Part V: Prenyl bibenzyls and clerodane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 54:1046–1049.
112. Bungert M, Gabler J, Adam K-P, Zapp J, Becker H. 1998. Pinguisane sesquiterpenes from the liverwort *Porella Navicularis*. *Phytochemistry.* 49:1079–1083.
113. Asakawa Y, Matsuda R, Cheminat A. 1987. Bibenzyl derivatives from *Frullania* Species. *Phytochemistry.* 26:1117–1122.

114. Chungfeng S, Tiantao Z, Runhua L, König WA. 2007. Essential Oil composition of Liverwort *Lophozia ventricosa*. Chin. J. Appl. Environ. Biol. 13:458–460.
115. Wu C-L, Chen C-L. 1992. Oxygenated sesquiterpenes from the liverwort *Bazzania tridens*. Phytochemistry. 31:4213–4217.
116. Fricke C. 1999. Terpenoide Inhaltsstoffe von Lebermoosen und Heilpflanzen. Terpenoide Inhaltsstoffe Von Lebermoosen Heilpflanzen. [cited 16 April 2017]. Available from <https://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/1999/DissertationFricke.pdf>.
117. Saeed A. 2006. Synthesis of 6- O -methyl ether of Scorzocreticin and Scorzocreticoside I, metabolites from *Sorzonera cretica*. J. Asian Nat. Prod. Res. 8:417–423.
118. Miura K, Nakatani N. 1989. Antioxidative Activity of Flavonoids from Thyme ( *Thymus vulgaris* L.). Agric. Biol. Chem. 53:3043–3045.
119. Asakawa Y, Takikawa K, Tori M. 1987. Bibenzyl derivatives from the Australian liverwort *Frullania falciloba*. Phytochemistry. 26:1023–1025.
120. PCIDB. [cited 10 July 2017]. Available from [http://www.genome.jp/db/pcidb/kna\\_cpds/15525](http://www.genome.jp/db/pcidb/kna_cpds/15525).
121. Hardt IH, Rieck A, König WA, Muhle H. 1995. Isolepidozene, a diastereomer of bicyclogermacrene, in some liverworts. Phytochemistry. 40:605–606.
122. Bovi Mitre G, Kamiya N, Bardón A, Asakawa Y. 2004. Africane-Type Sesquiterpenoids from the Argentine Liverwort *Porella swartziana* and Their Antibacterial Activity. J. Nat. Prod. 67:31–36.
123. Paulpandi M, Kannan S, Thangam R, Kaveri K, Gunasekaran P, Rejeeth C. 2012. In vitro anti-viral effect of  $\beta$ -santalol against influenza viral replication. Phytomedicine. 19:231–235.
124. Ochi T, Shibata H, Higuti T, Kodama K, Kusumi T, Takaishi Y. 2005. Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from *Santalum album*. J. Nat. Prod. 68:819–824.
125. Dwivedi C, Maydew ER, Hora JJ, Ramaeker DM, Guan X. 2005. Chemopreventive effects of various concentrations of  $\alpha$ -santalol on skin cancer development in CD-1 mice. Eur. J. Cancer Prev. 14:473–476.
126. Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato K. 2000. Effects of sesquiterpenoids from ‘Oriental incenses’ on acetic acid-induced writhing and D2 and 5-HT2A receptors in rat brain. Phytomedicine. 7:417–422.
127. Asakawa Y, Toyota M, Takemoto T. 1979. New diterpenes from *Porella perrottetiana*. Phytochemistry. 18:1681–1685.
128. Fukuyama Y, Tori M, Wakamatsu M, Asakawa Y. 1988. Norpinguisone methyl ester and norpinguisanolide, pinguisane-type norsesquiterpenoids from *porella elegantula*. Phytochemistry. 27:3557–3561.
129. Chaturvedula VSP, Prakash I. 2012. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. [cited 16 April 2017]. Available from <http://imsear.li.mahidol.ac.th/handle/123456789/152876>.
130. Chaves O, Gomes R, Tomaz A, Fernandes M, das Graças Mendes Junior L, de Fátima Agra M, Braga V, de Fátima Vanderlei de Souza M. 2013. Secondary Metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the Vasorelaxant Activity of Cryptolepinone. Molecules. 18:2769–2777.
131. Human Metabolome Database: 1H NMR Spectrum (HMDB00258). [cited 17 April 2017]. Available from [http://www.hmdb.ca/spectra/nmr\\_one\\_d/1293](http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1293).
132. Geis W, Becker H. 2001. Odoriferous sesquiterpenoids from the liverwort *Gackstroemia decipiens*. Flavour Fragr. J. 16:422–424.
133. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6:71–79.

134. Thieury C. 2016. Recherche de composés anticancéreux dans la biodiversité végétale de la Nouvelle-Calédonie. <http://www.theses.fr>. [cited 8 July 2017]. Available from <http://www.theses.fr/s83876>.
135. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
136. Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:555–567.
137. Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111:1265–1273.
138. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, McDermott PF. 2012. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 18:741–749.
139. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 284:1318–1322.
140. Tremblay YD, Hathroubi S, Jacques M. 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.* 78:110–116.
141. Thiolet J, Vaux S, Lamy M, Gautier A, Barret A, Léon L, Coignard B. 2012. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012.
142. Lucet J-C. 2015. Infections nosocomiales.
143. Saadatian-Elahi M, Teyssou R, Vanhems P. 2008. *Staphylococcus aureus*, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature review. *Int. J. Surg.* 6:238–245.
144. 2017. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
145. Bukvicki D, Gottardi D, Tyagi AK, Veljic M, Marin PD, Vujisic L, Guerzoni ME, Vannini L. 2014. *Scapania nemorea* liverwort extracts: Investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and control of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 55:452–458.
146. Seo S, Gomi K, Kaku H, Abe H, Seto H, Nakatsu S, Neya M, Kobayashi M, Nakaho K, Ichinose Y, Mitsuhashi I, Ohashi Y. 2012. Identification of Natural Diterpenes that Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 53:1432–1444.



**ANNEXE 1 : SPECTRES RMN  $^1\text{H}$  ET  $^{13}\text{C}$  DES  
COMPOSES ISOLEES CONNUS**

## Composé 1 : méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)- benzoate (73)

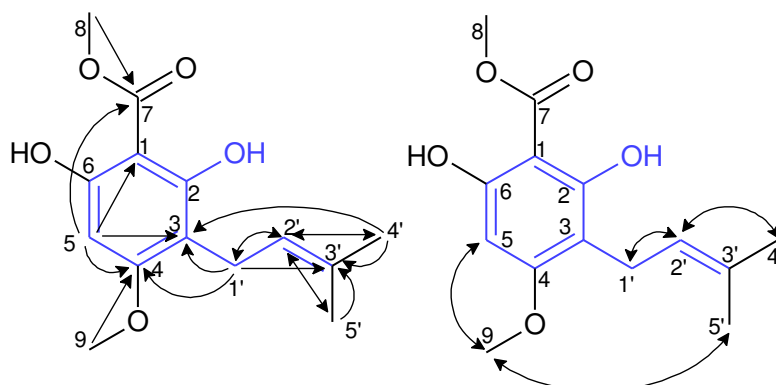


Figure 61 : Méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)- benzoate; à gauche corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY

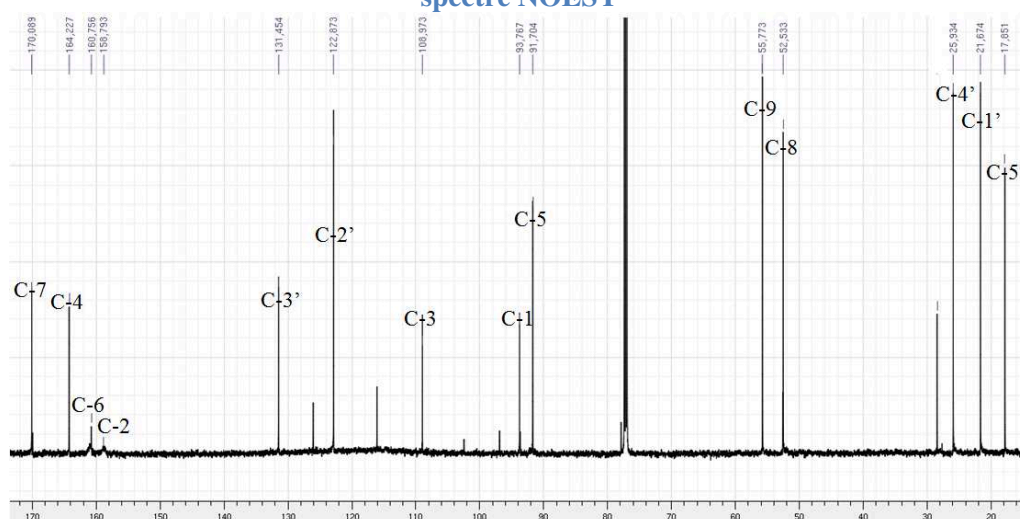


Figure 62 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)-benzoate

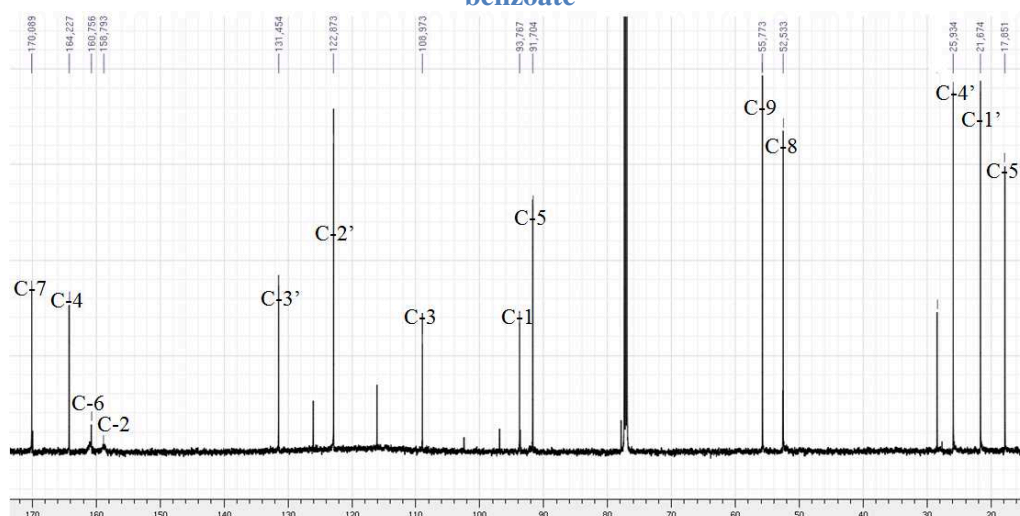


Figure 63 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du méthyl 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butenyl)-benzoate

## Composé 3 : méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate (72)

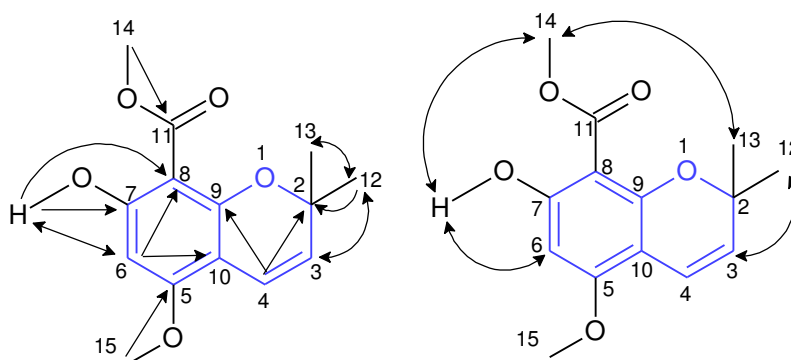


Figure 64 : Méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate : à gauche, flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC; à droite : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY

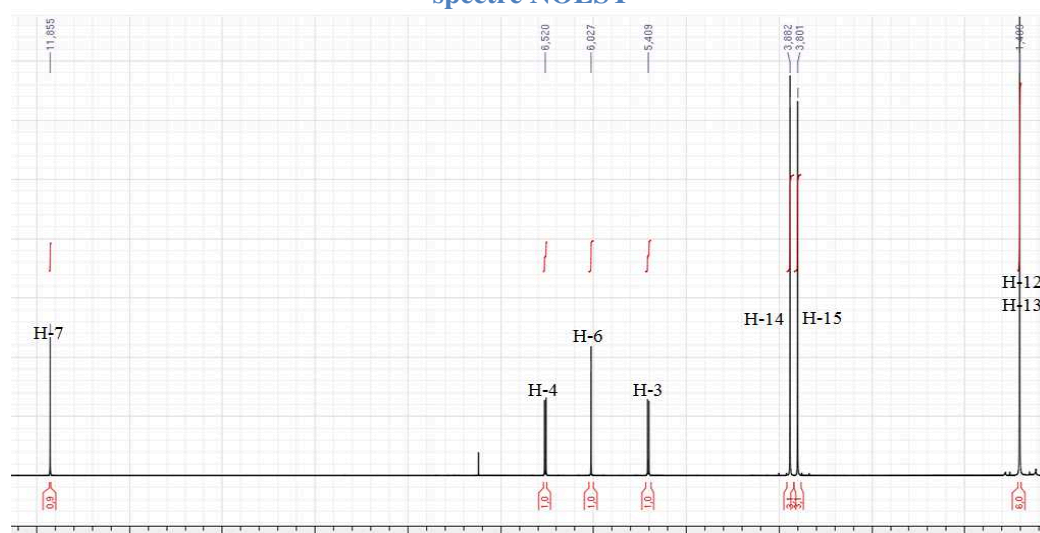


Figure 65 : Spectre RMN 1H du méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate

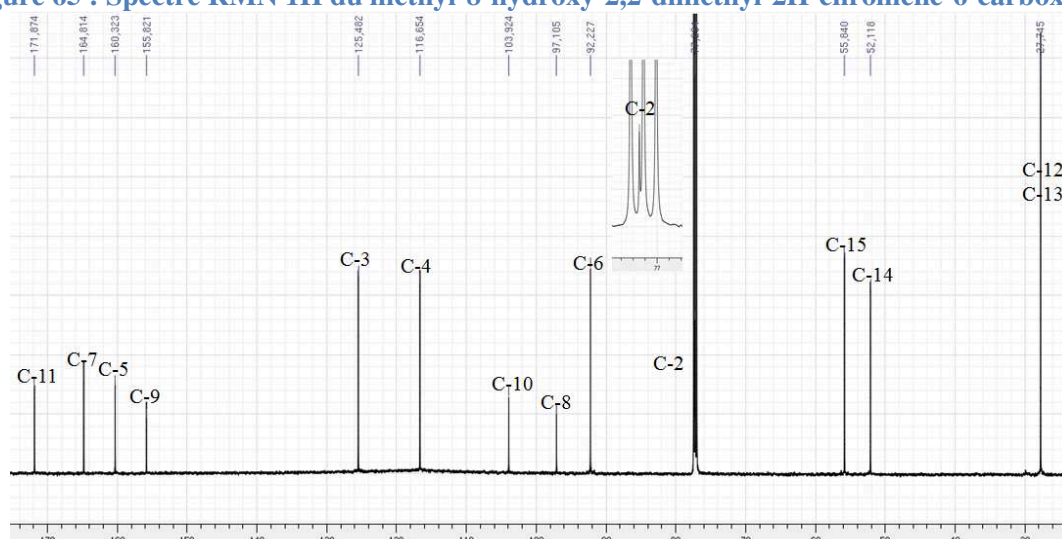


Figure 66 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du méthyl-8-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-chromène-6-carboxylate



## Composé 5 : ent-spathulenol (46)

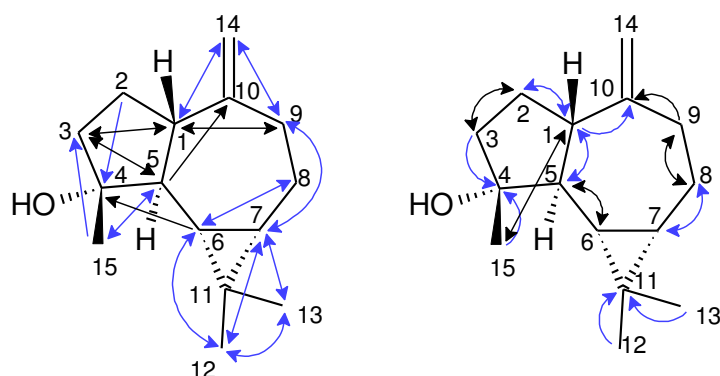


Figure 67 : ent-Spathulenol; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC, en bleu corrélation utilisée pour le programme LSD

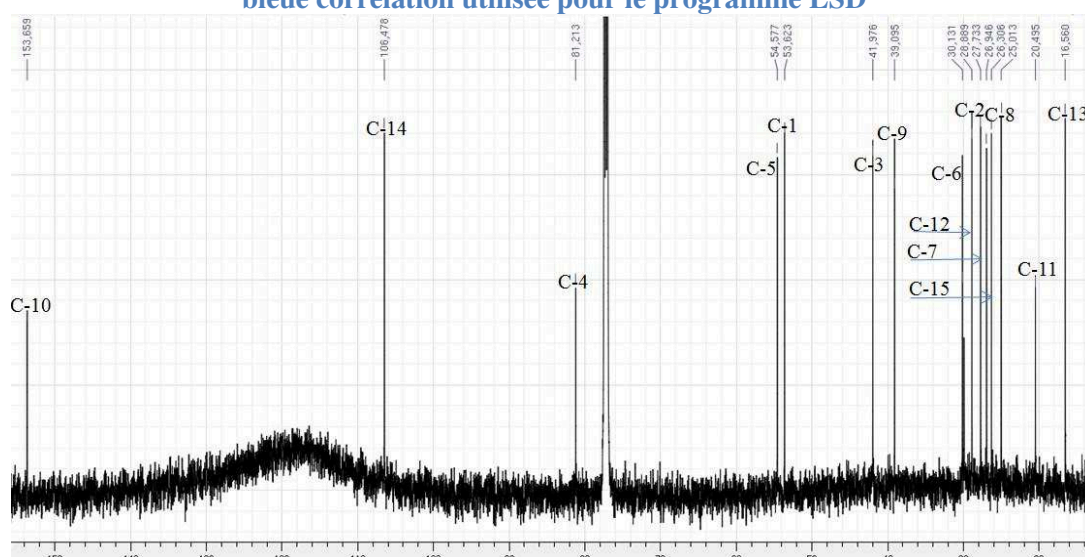


Figure 68 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'ent-spathulenol

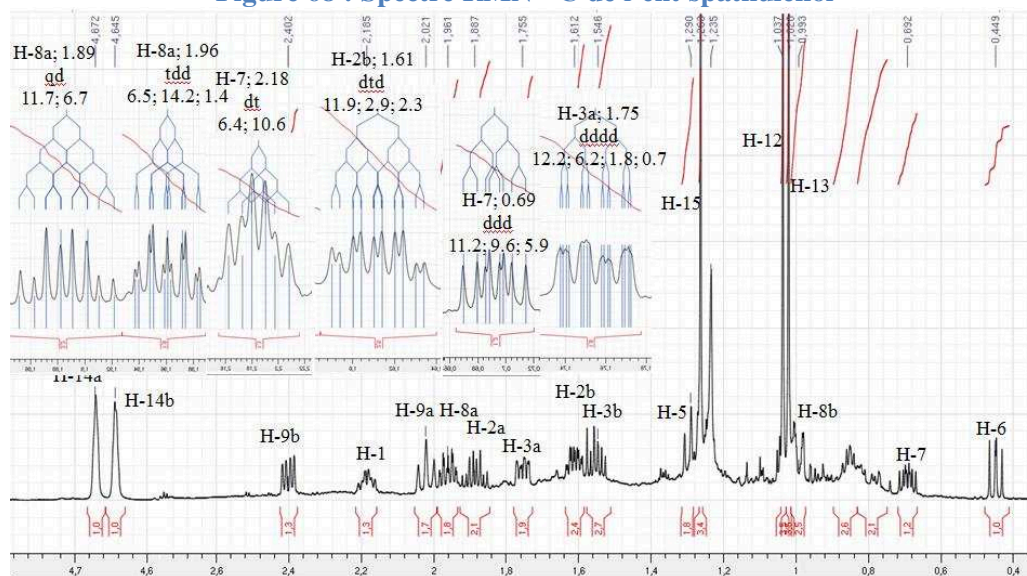


Figure 69 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'ent-spathulenol

## Composé 6 : (-)- $\beta$ -herbertenol (89)

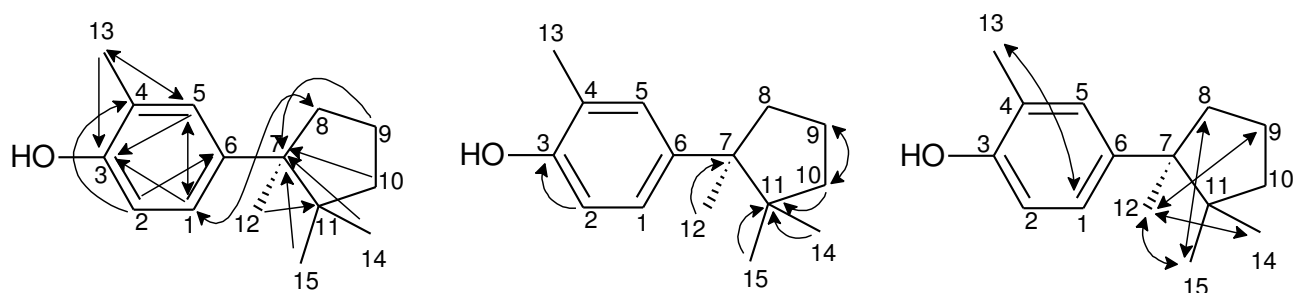


Figure 70 : Résultats du spectre HMBC du (-)- $\beta$ -herbertenol : à gauche les corrélations  $^3J$  H $\rightarrow$ C, au milieu les corrélations  $^2J$  H $\rightarrow$ C, à droite les corrélations  $^4J$  H $\rightarrow$ C

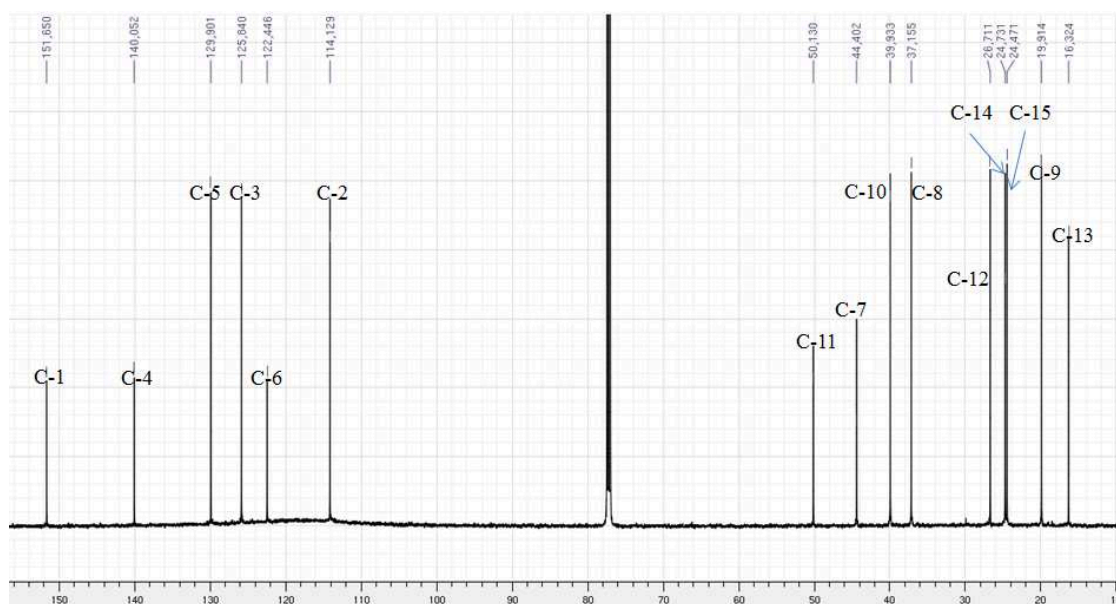


Figure 71 : Spectre RMN  $^{13}C$  du (-)- $\beta$ -herbertenol

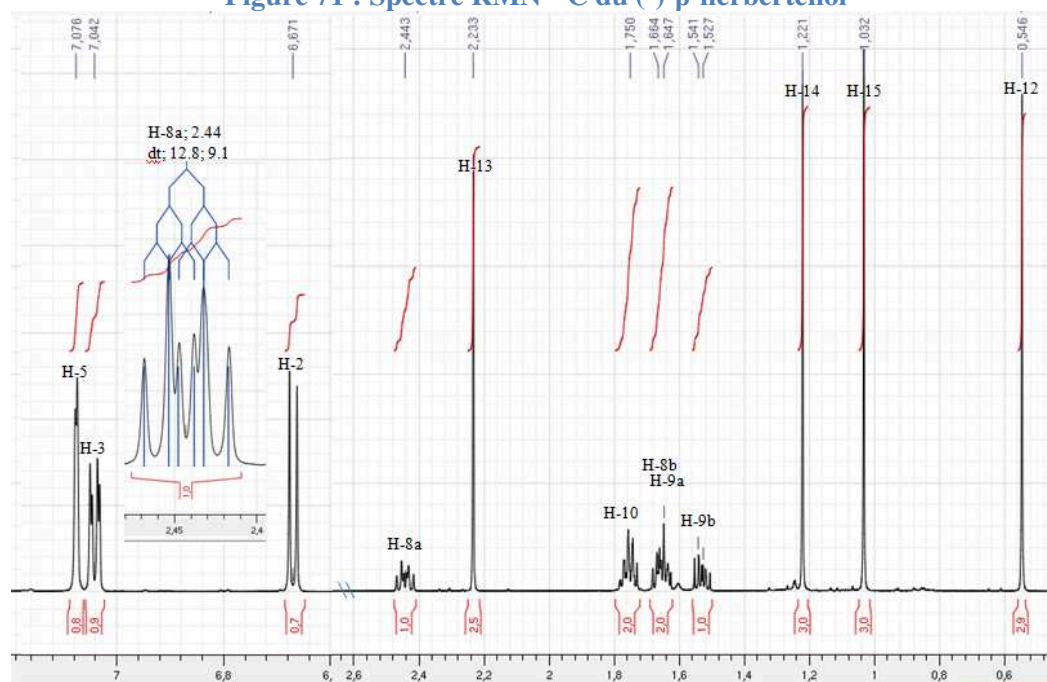


Figure 72 : Spectre RMN  $^1H$  du (-)- $\beta$ -herbertenol

## Composé 8 : isopinguanine (249)

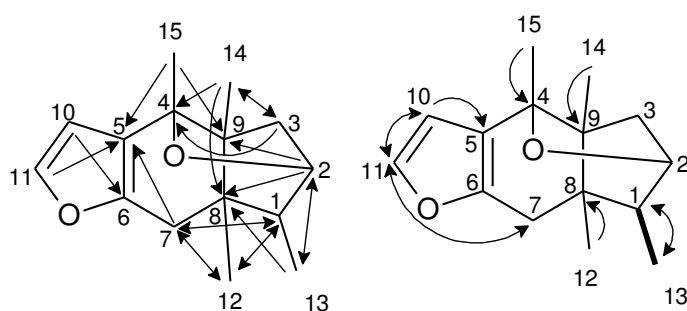


Figure 73 : Molécule d'isopinguanine; à droite : corrélations  $^3J$  H→C observées sur le spectre HMBC; à gauche : corrélations  $^2J$  et  $^4J$  H-C observées sur le spectre HMBC et  $^3J$  H-H observées sur le spectre COSY

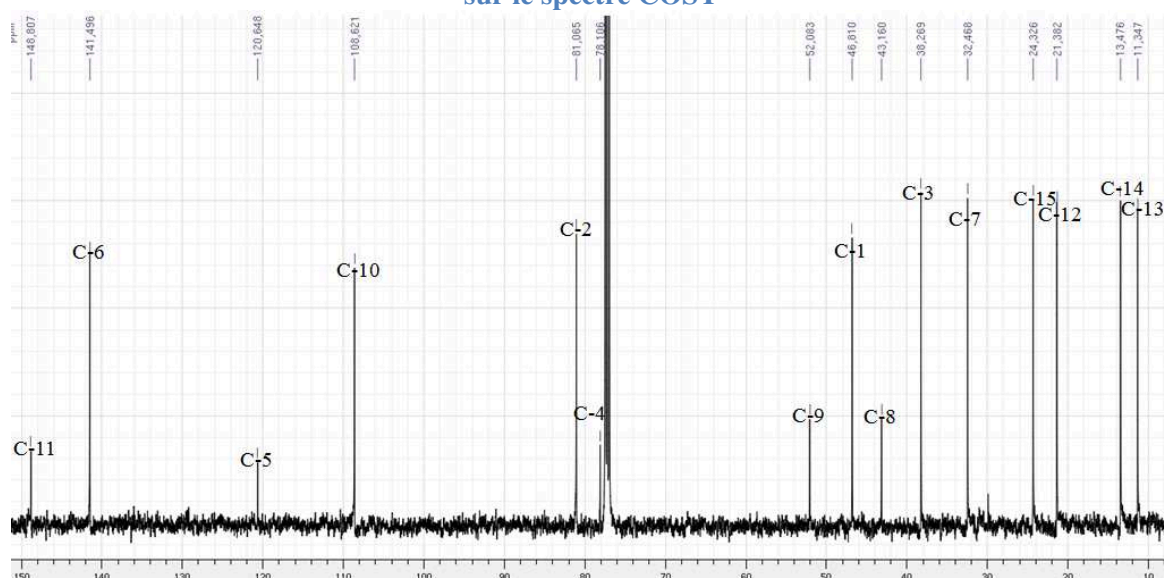


Figure 74 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'isopinguanine (249)

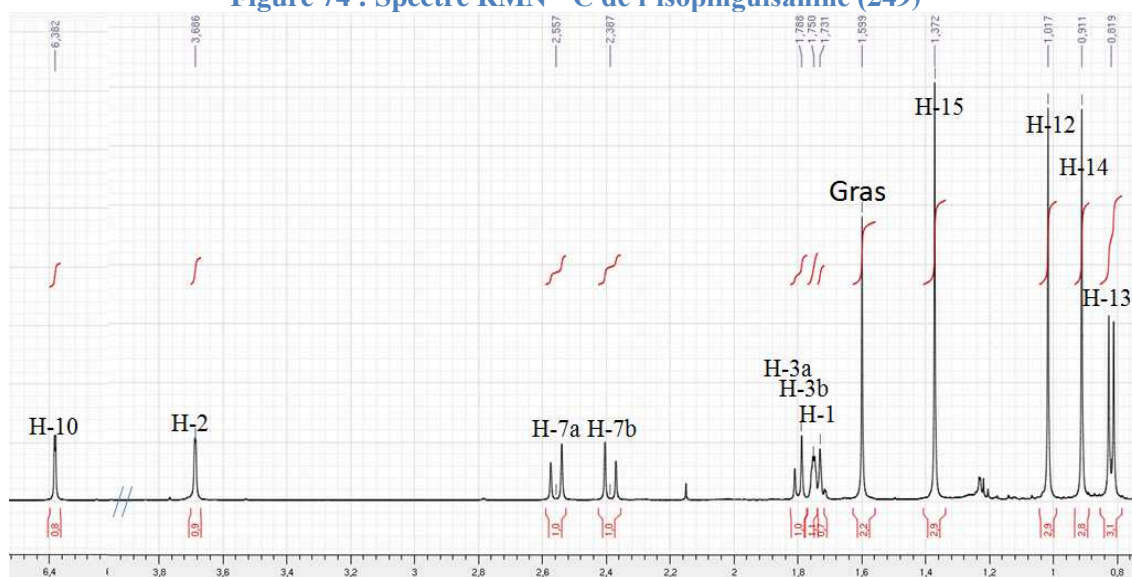


Figure 75 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'isopinguanine (249)

## Composé 9 : 5,7,4'-triméthoxyflavanone (248)

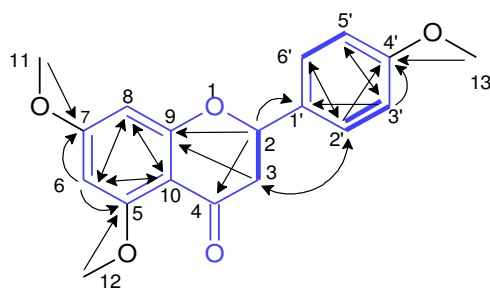


Figure 76 : 4',5,7-triméthoxy-flavanone; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC, liaison en gras : corrélations  $^3J$  H-H observées sur le spectre COSY

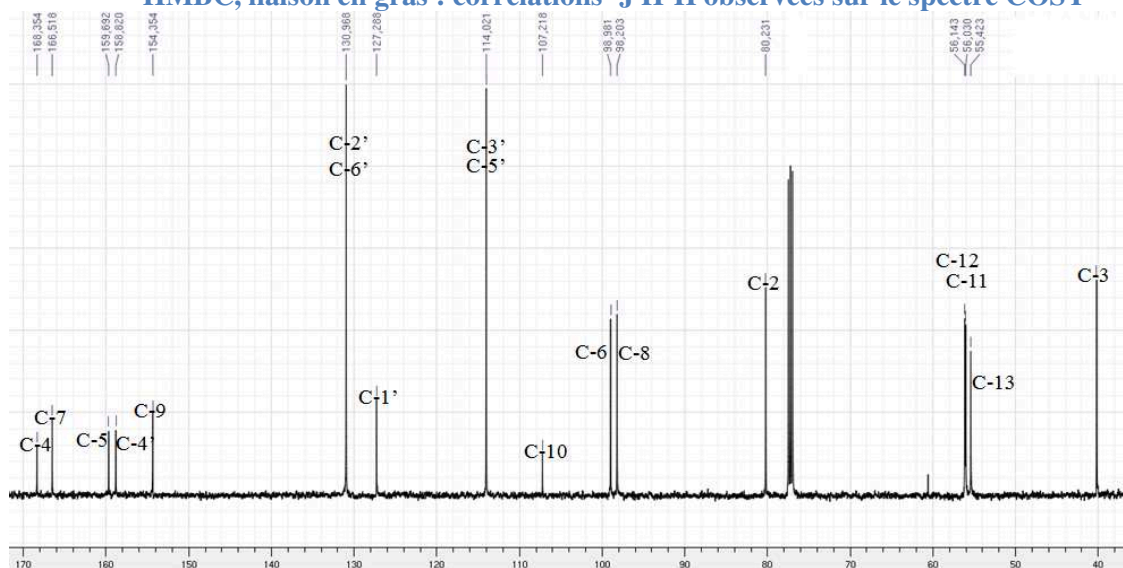


Figure 77 : Spectre RMN  $^{13}C$  du 5,7,4'-triméthoxyflavanone

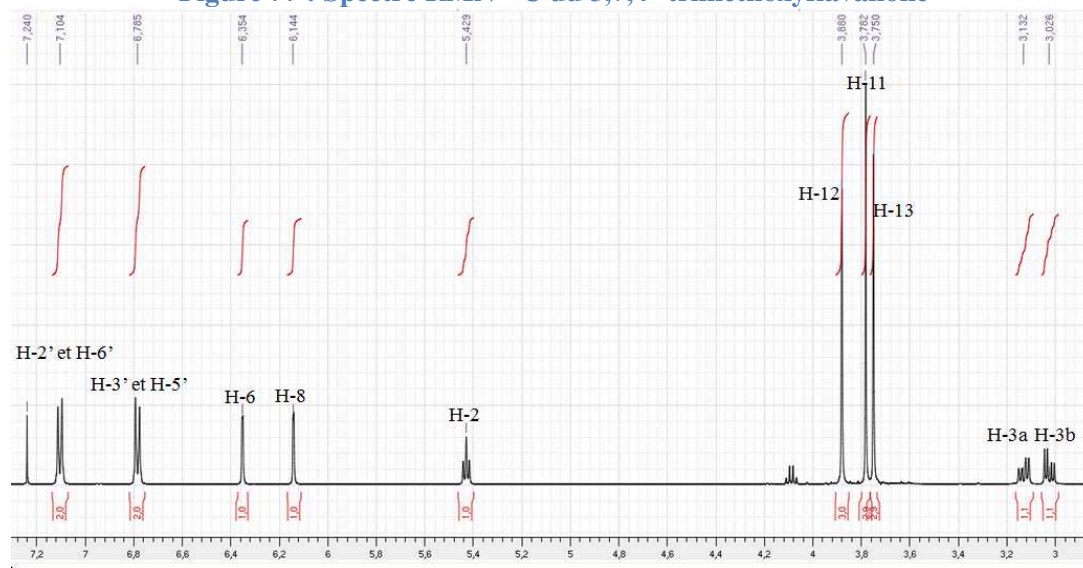


Figure 78 : Spectre RMN  $^1H$  du 5,7,4'-triméthoxyflavanone



## Composé 10 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone (278)

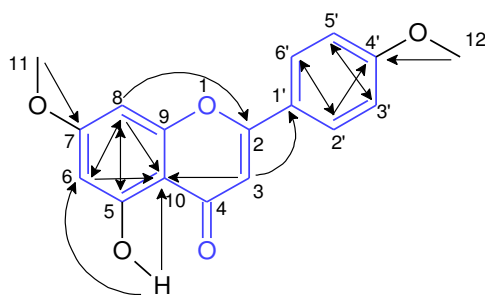


Figure 79 : 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC

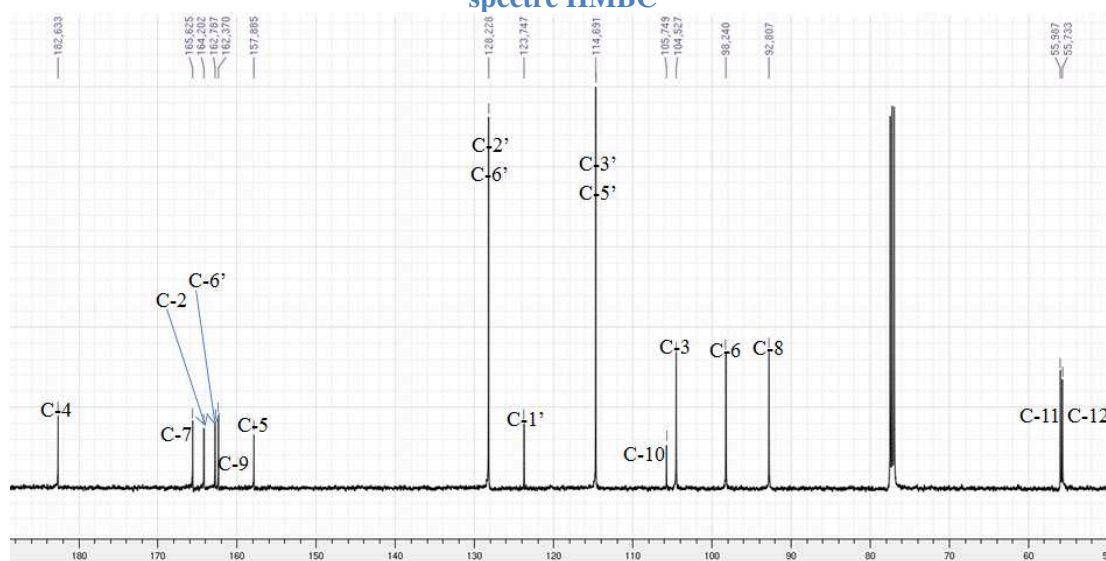


Figure 80 : Spectre RMN <sup>13</sup>C du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone

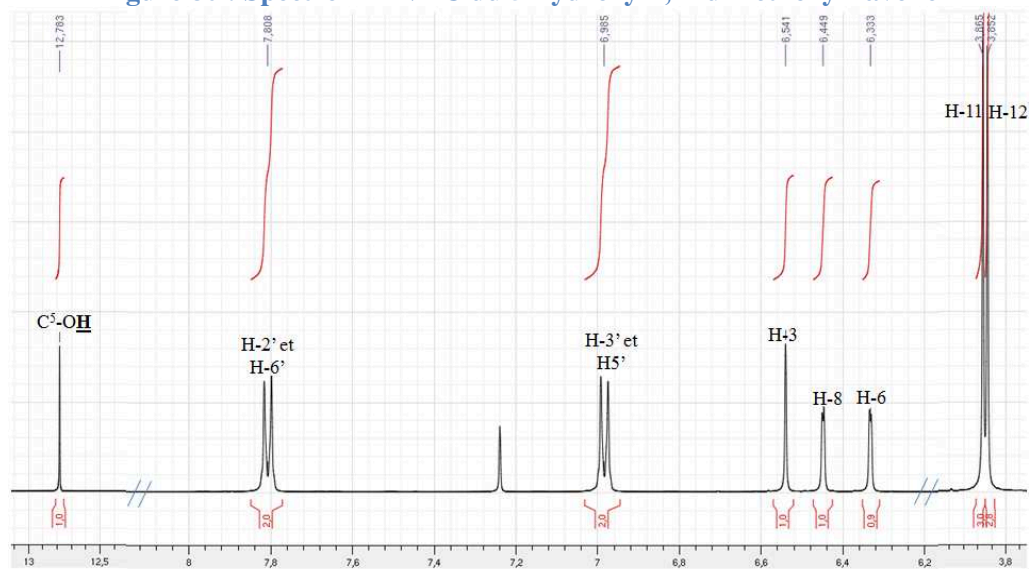


Figure 81 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du 5-hydroxy-7,4'-diméthoxy-flavone

## Composé 12 : dihydrognétine (220)

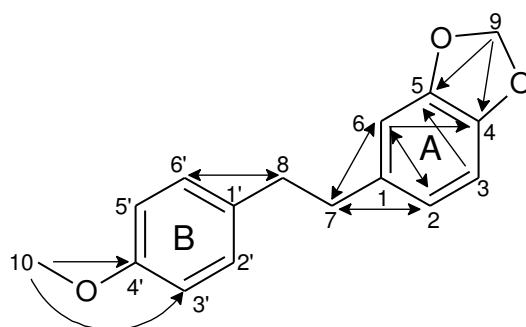
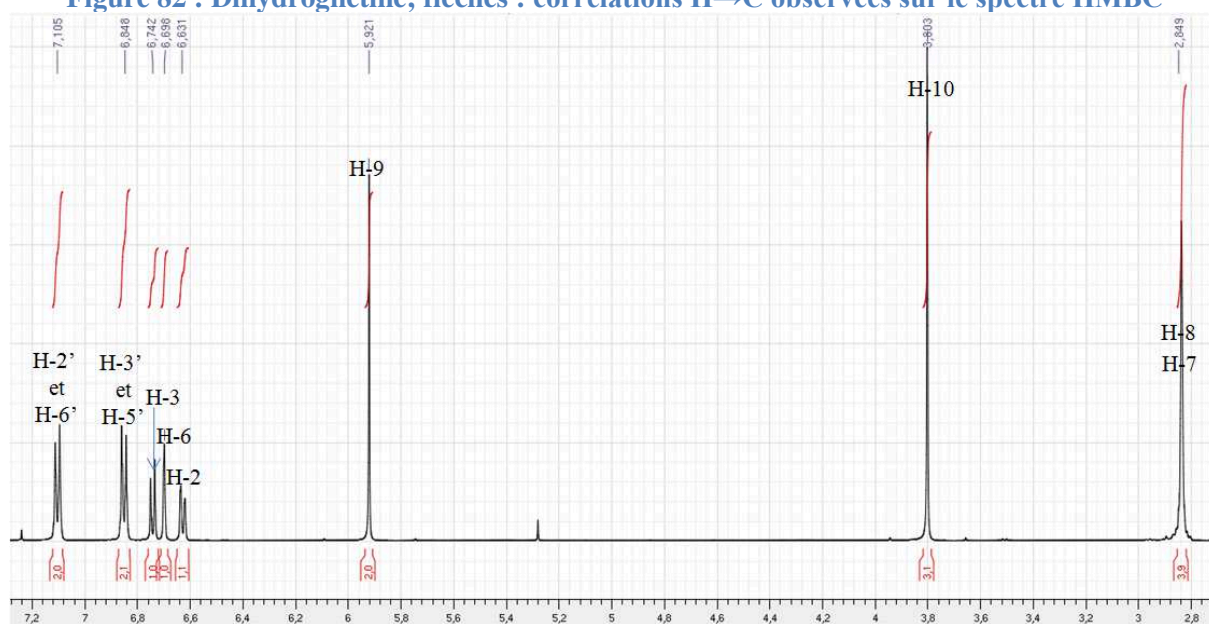
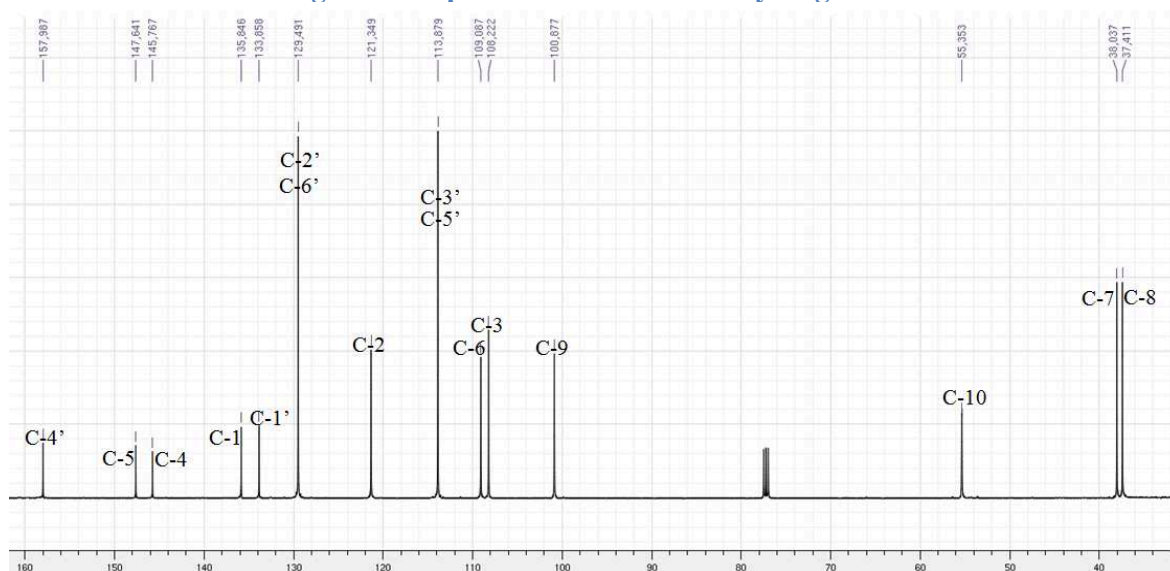


Figure 82 : Dihydrognétine; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC

Figure 83 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la dihydrognétineFigure 84 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la dihydrognétine

## Composé 13 : (+)-perrottetianal A (9)

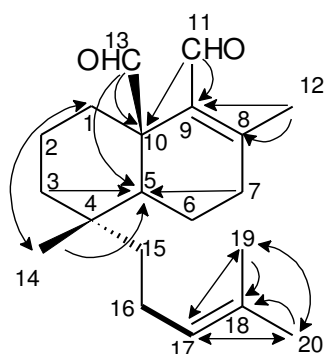


Figure 85 : (+)-Perrottetianal A; liaisons en gras : corrélations  $^3J$  H-H observées sur le spectre COSY; flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC

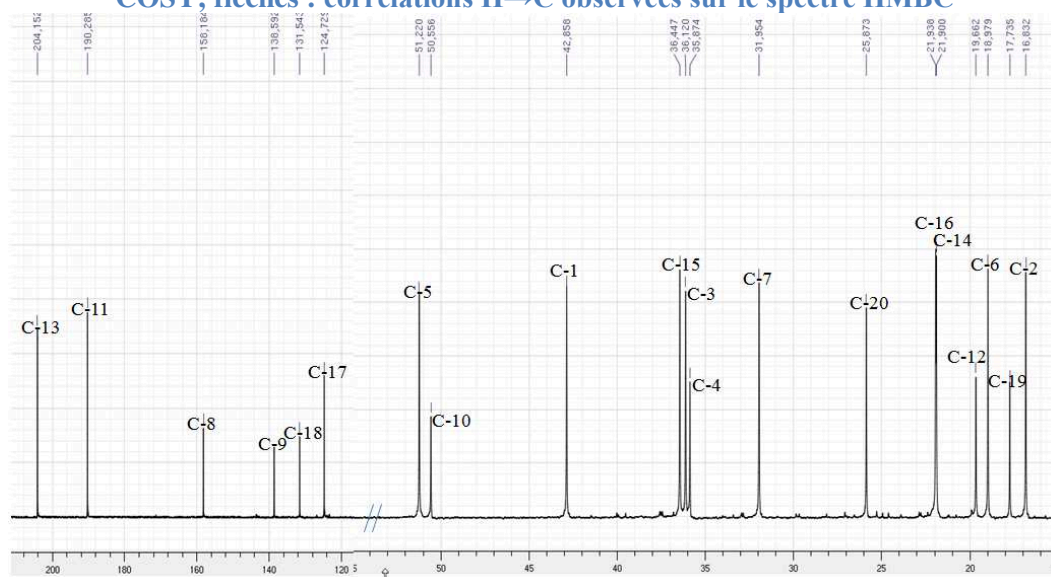


Figure 86 : Spectre RMN  $^{13}C$  du (+)-Perrottetianal A

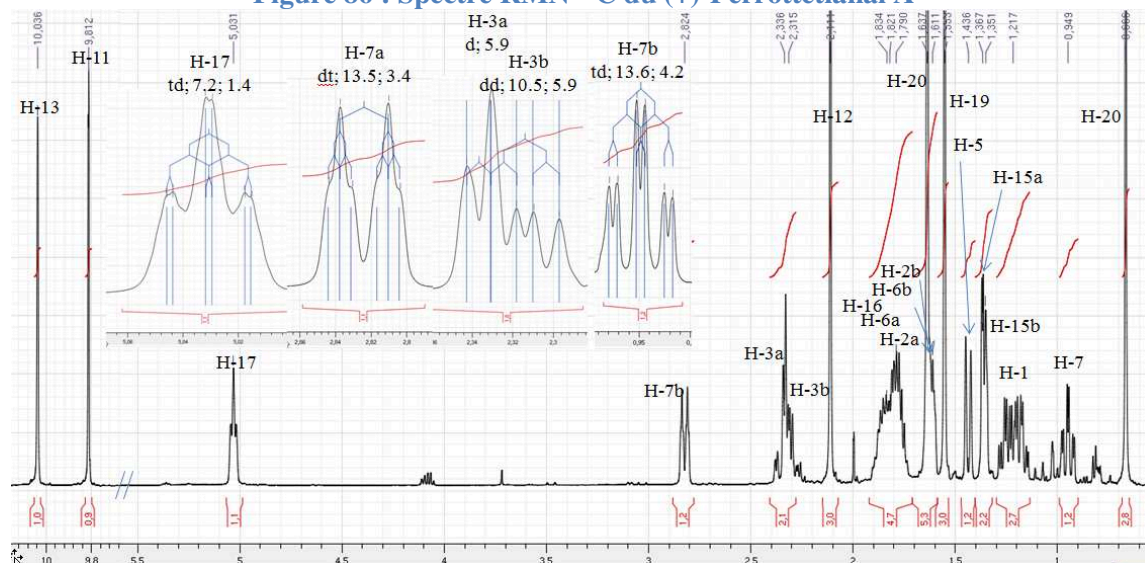


Figure 87 : Spectre RMN  $^1H$  du (+)-Perrottetianal A

## Composé 14 : (-)-ester méthylique de norpinguione (217)

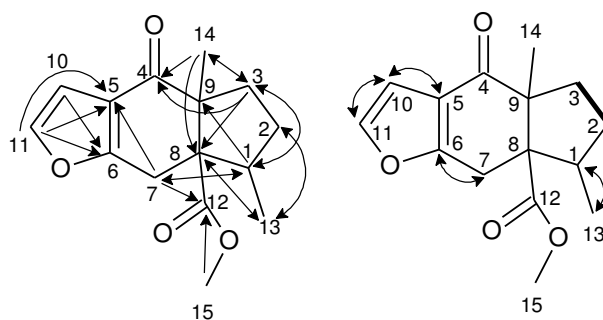


Figure 88 : Ester méthylique de (-)-norpinguione ; à gauche, flèches : corrélations H→C<sup>3J</sup> observées sur le spectre HMBC ; à droite, en gras : corrélation H-H<sup>3J</sup> observée sur le spectre COSY et flèches corrélations H→C<sup>2J</sup> observées sur le spectre HMBC

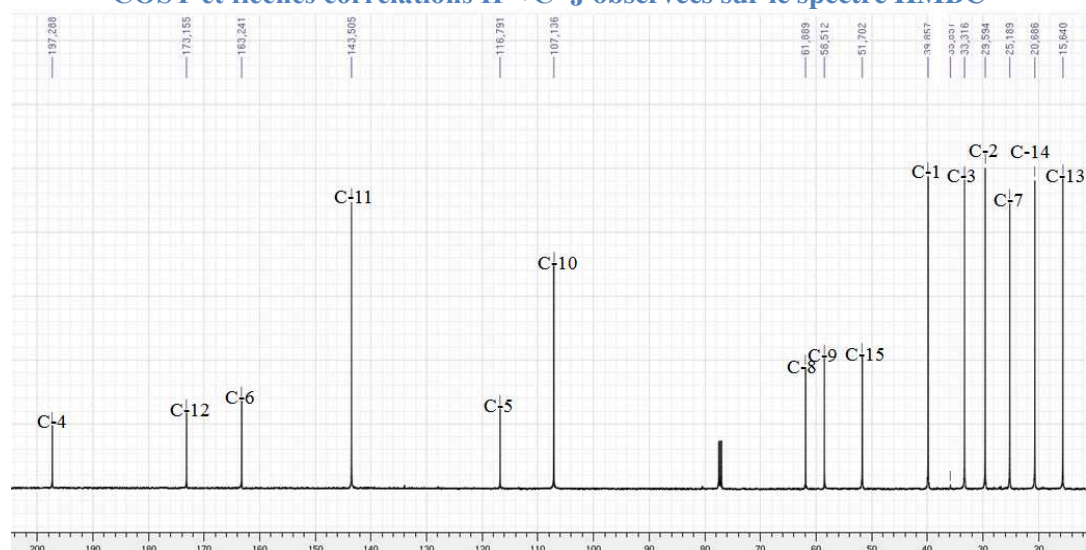


Figure 89 : Spectre RMN <sup>13</sup>C de l'ester méthylique de (-)-norpinguione

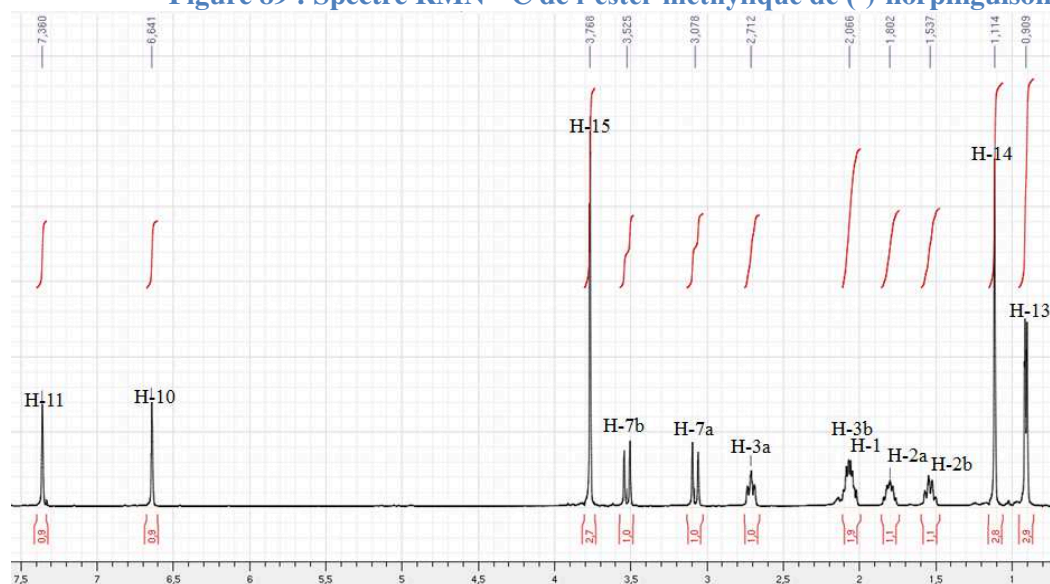


Figure 90 : Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'ester méthylique de (-)-norpinguione



## Composé 15 : stigmastérol (11)

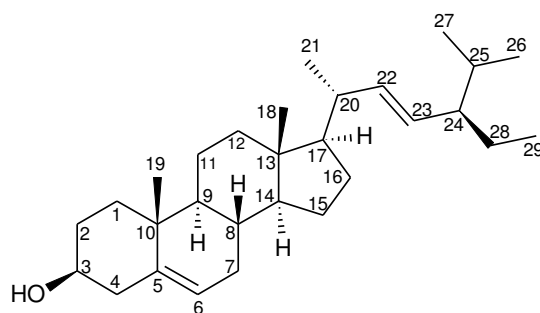
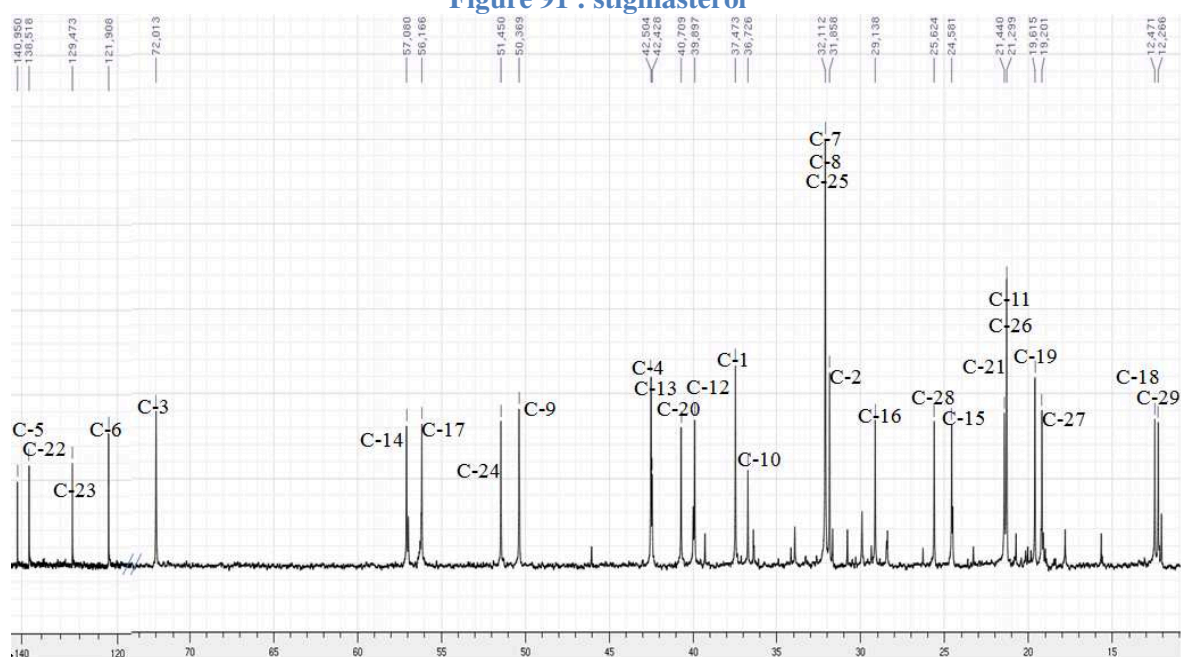
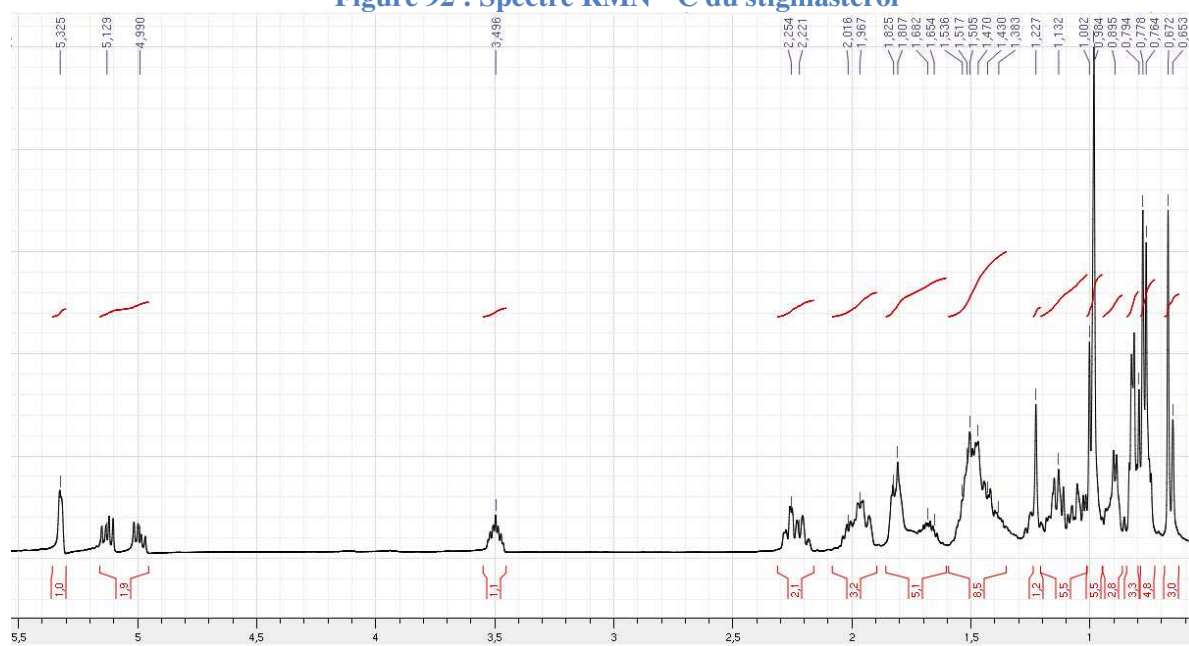


Figure 91 : stigmastérol

Figure 92 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du stigmastérolFigure 93 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du stigmastérol

## Composé 16 : 17<sup>3</sup>-éthoxyphéophorbide A (279)

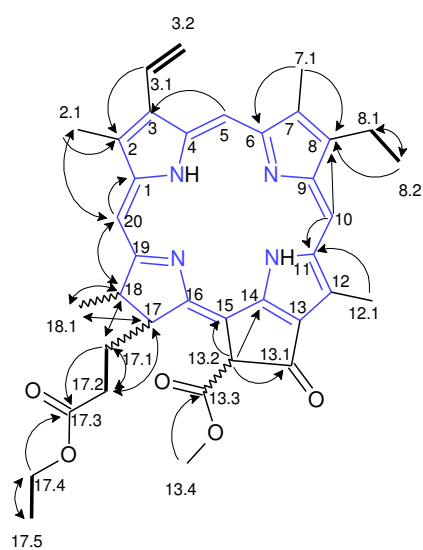


Figure 94 : 17<sup>3</sup>-éthoxyphéophorbide A; liaisons en gras : corrélations <sup>3</sup>J H-H observées sur le spectre COSY, flèches : corrélations H→C observées sur le spectre HMBC

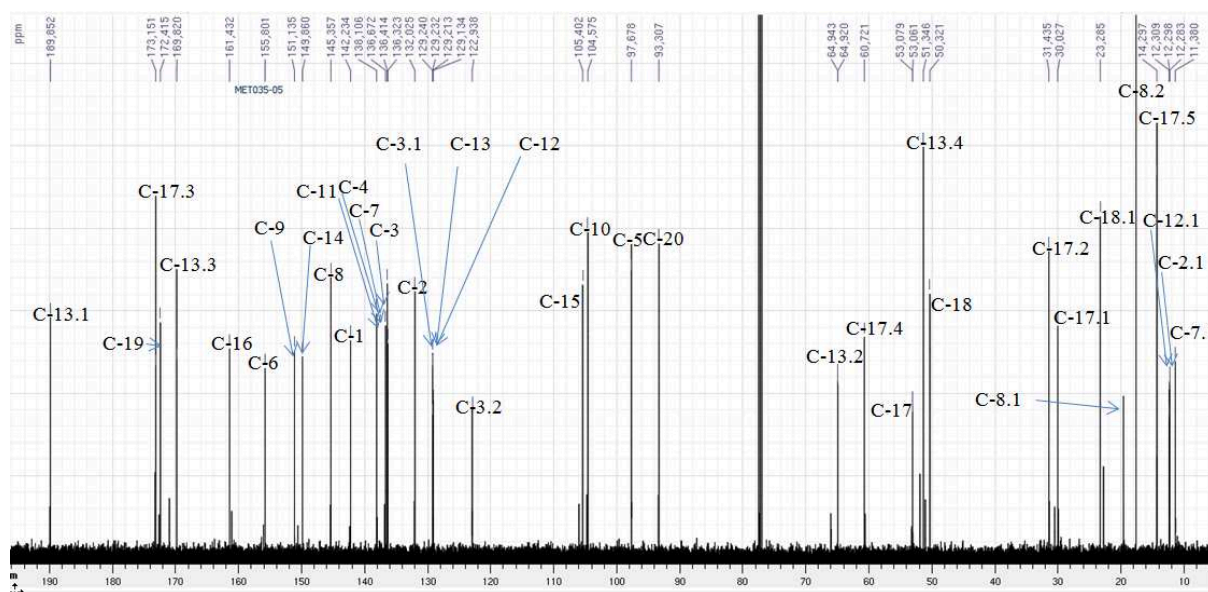
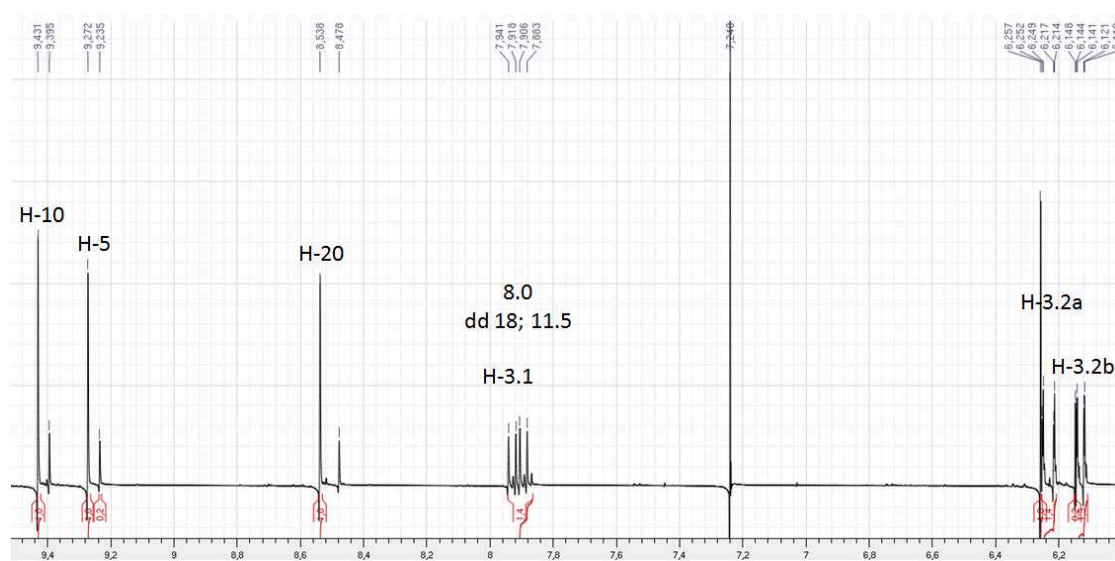
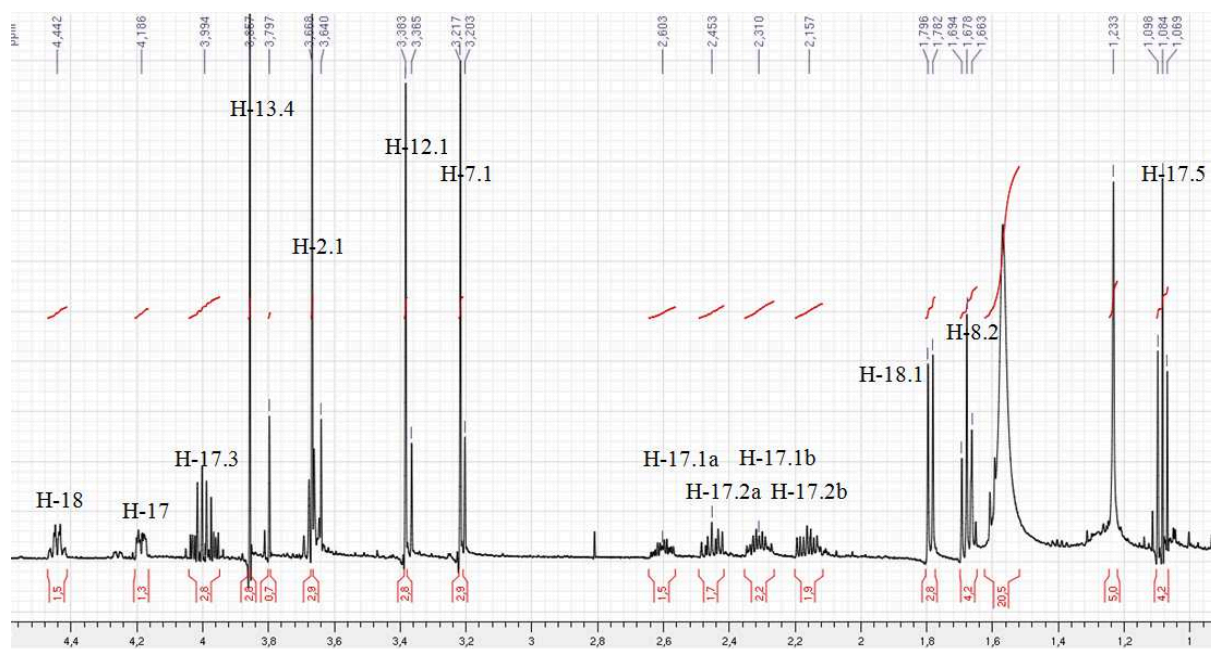


Figure 95 : Spectre RMN <sup>13</sup>C du 17<sup>3</sup>-éthoxyphéophorbide A



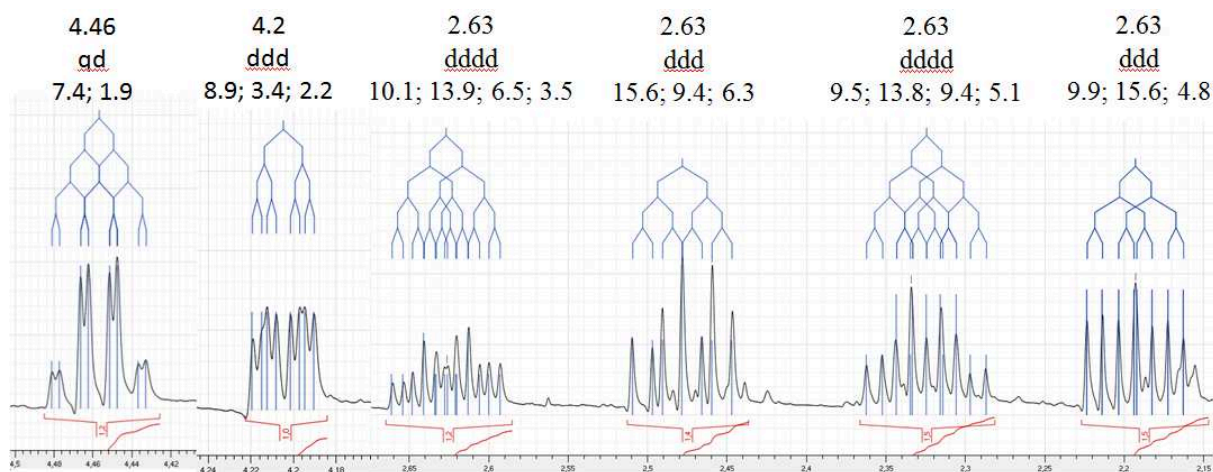


Figure 98 : Multiplicités remarquables d'ordre deux ou supérieures résolues

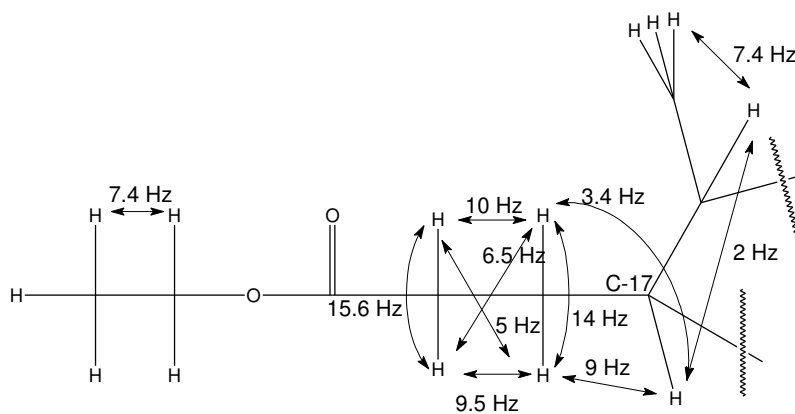


Figure 99 : Réseau de spin pour la chaîne latérale partant du carbone C-17

Composé 18 :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (280)

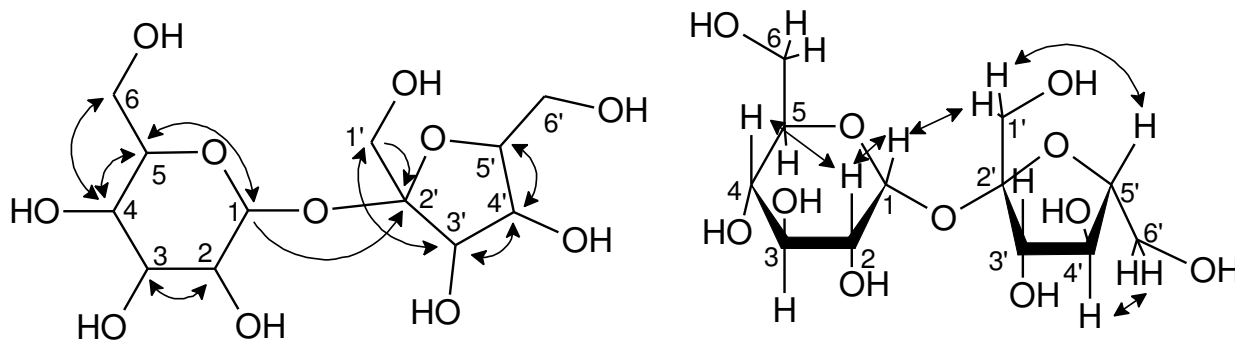


Figure 100 :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside; à gauche : liaison en gras : corrélations  $^3J$  H-H observées sur le spectre COSY et flèches : corrélations H $\rightarrow$ C observées sur le spectre HMBC; à droite : doubles flèches : corrélations H-H observées sur le spectre NOESY

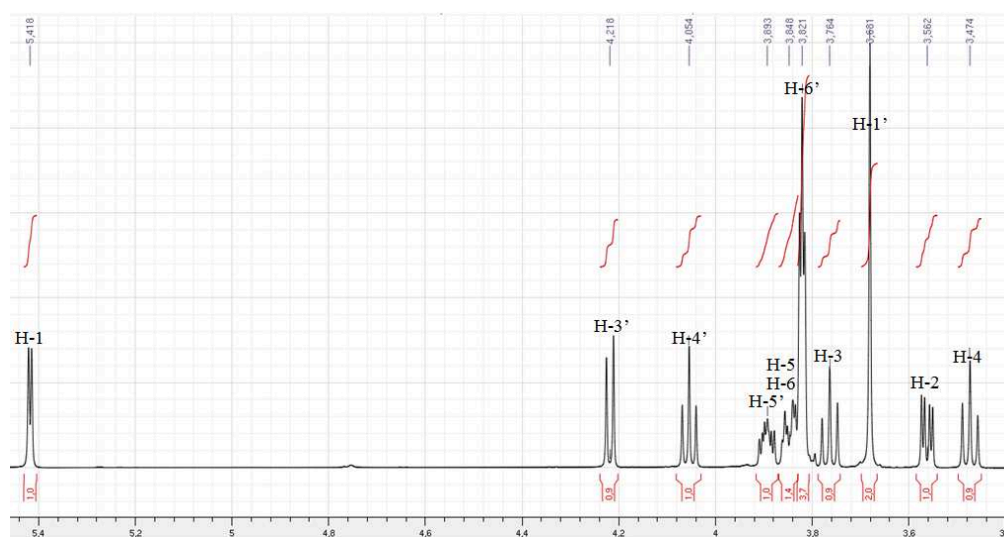


Figure 101 : Spectre RMN  $^1H$  du  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside

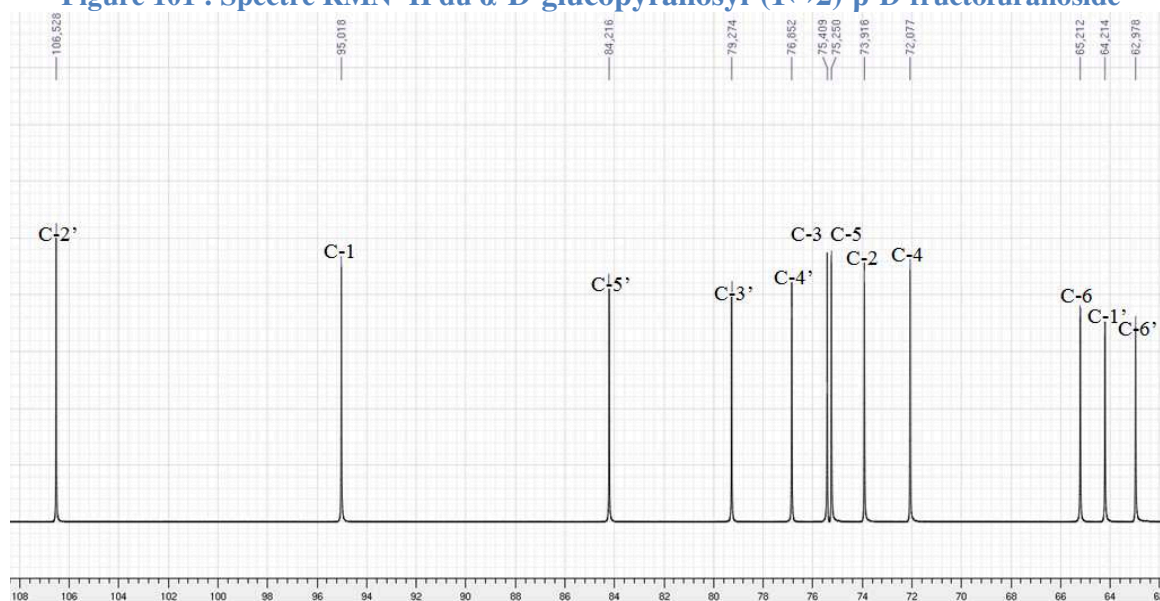


Figure 102 : Spectre RMN  $^{13}C$  du  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside

## **ANNEXE 2 : COORDONNEES GPS DES PLANTES RECOLTEES**



Code	date	Espèces	Biotope	Points GPS	
				Sud	Est
<b>Porellaceae (genre Porella)</b>					
MET035	09-2014		Forêt ouverte	21,9	166,36209
MET014	07-2014	P, viridissima	Forêt humide	22,17607	166,50972
MET015	07-2014		Forêt humide	22,1762	166,50964
<b>Lejeuneaceae</b>					
MET023	07-2014	Schiffneriolejeunea tumida var haskarliana*	maquis ombragé	22,20443	166,6954
MET087	12-2015	Lopholejeunea subfusca	forêt sèche	21,3341*	164,9718*
MET090	12-2015	Drepanolejeunea pentadactyla	forêt humide	21,3341*	164,9718*
MET098	12-2015	Spruceanthus thozetianus	forêt sèche	21,3341	164,9718
MET119	06-2016	Thysananthus spathulistipus	forêt humide	22,26924	166,96529
MET120	06-2016		forêt humide	22,27784	166,96548
MET121	06-2016	Thysananthus Pancheri*	forêt humide	22,27944	166,97489
MET131	08-2016	Lejeunea Sordida	forêt humide	21,6506	165,7791
<b>Frullaniaceae (genre frullania)</b>					
COU164	01-2013	F, bella*	Maquis	22,3190	166,8277
COU190	02-2013		Maquis	22,16737	166,83462
COU134	12-2012	F, cornuta*	Forêt humide	22,1778	166,5088
COU178	02-2013	F, falsicornuta*	Forêt humide	22,17729	166,50827
COU082	10-2012		Maquis	22,1808	166,8433
COU163	01-2013	F, mammillosa*	Maquis	22,3187	166,8274
COU183	02-2013	F, multilacera	Forêt humide	22,17721	166,50686
COU187	02-2013	F, scalaris*	Maquis	22,16672	166,83451
MET017	07-2014		Urbain	22,30116	166,44485
MET019	07-2014	F, ericoides	Urbain	22,30167	166,44453

**Tableau 67 : Échantillons appartenant à l'ordre des Porellales : famille Porellaceae, Lejeuneaceae et Frullaniaceae**

Code	date	Espèce	biotope	Points GPS	
				Sud	Est
<b>Lophocoleaceae</b>					
MET029	08-2014		Forêt humide	22,18009	166,50918
MET058	05-2015	Chiloscyphus latistipus*	Forêt humide	21,62156	165,87302
MET061	09-2015	Heteroscyphus argutus	Forêt humide	21,62693	165,86691
MET122	06-2016	Chiloscyphus confertus*	Forêt ouverte	22,27753	166,96552
<b>Plagiochilaceae</b>					
MET101	03-2016		Forêt ouverte	22,27858	166,96831
MET103	03-2016	Chiastocaulon caledonicum	Forêt ouverte	22,27753	166,96552
MET114	04-2016		Forêt ouverte	22,277211	166,9378
MET091	12-2015	Plagiochila teysmannii	Forêt humide	21,3341*	164,9718*
MET088	12-2015		Forêt humide	21,3341*	164,9718*
MET093	12-2015	Plagiochila bicornuta	Forêt humide	21,3341*	164,9718*
MET050	11-2014	Plagiochilion theriotanus	Forêt humide	21,62162	165,87299

**Tableau 68 : Échantillons appartenant à l'ordre Jungermanniales (2/2) : famille Lophocoleaceae et Plagiochilaceae (\* approximatif)**

Code	Date	Espèce	Point GPS			
			Sud	Est		
<b>Lepidoziaceae (Genres Acromastigum et Bazzania)</b>						
MET113B	06-2016	A. caledonicum*	Forêt ouverte	22,26912	166,9453	
MET107	03-2016		Forêt ouverte	22,27307	166,9673	
MET109B	03-2016		Forêt ouverte	22,26912	166,9453	
MET116	06-2016	A. tenax*	Forêt ouverte	22,28125	166,96336	
MET028	08-2014	B. bernieri	Forêt humide	22,1806	166,501	
MET031	08-2014		Forêt humide	22,18065	166,51132	
MET038	11-2014			21,88165	166,40433	
MET040	11-2014			21,88149	166,40521	
MET047	11-2014		Forêt humide	21,62181	165,87515	
MET063	06-2015		Forêt ouverte	22,22144	166,66037	
MET066	06-2015			22,17	166,79	
MET067	06-2015			22,17	166,79	
MET069	06-2015			22,17	166,79	
MET125	06-2015		B. Deplanchei*	Forêt ouverte	22,28134*	166,96877*
MET062	06-2015	B. francana	Forêt ouverte	22,22144	166,66037	
MET065	06-2015			22,17	166,79	
MET032	08-2014		Forêt humide	22,1806*	166,501*	
MET106	03-2016	B. marginata*	Forêt ouverte	22,2779	166,96547	
MET048	11-2014		Forêt humide	21,62181	165,87515	
MET109A	03-2016	B. parisii	Forêt humide	22,26912	166,9453	
MET041	09-2014	B. serrifolia		21,88232	166,40294	
MET051	11-2014		Forêt humide	21,622068	165,85166	
MET052	11-2014		Forêt humide	21,622068	165,85166	
MET053	11-2014		Forêt humide	21,622068	165,85166	
MET092	12-2015		Forêt humide	Lieu dit : marais kik		
MET099	12-2015		Forêt humide			
MET039	11-2014	B. sp (AD211)		21,88153	166,40412	
MET110	03-2016	B. sp (AD212)	Forêt ouverte	22,28134	166,96877	
MET118	06-2015		Forêt ouverte	22,27656	166,96281	
MET102	03-2016		Forêt ouverte	22,27875	166,96834	
MET124	06-2015		Forêt ouverte	22,28125	166,96336	
MET117	06-2015		Forêt ouverte	22,28125	166,96336	
MET064	06-2015		Forêt ouverte	22,22144	166,66037	
MET068	06-2015		Forêt ouverte	22,17	166,79	
MET072	06-2015		Forêt ouverte	22,22144	166,66037	
MET100	03-2016		B. subintegra*	Forêt ouverte	22,27779	166,96547
MET049	11-2014		B. vittata	Forêt humide	21,622068	165,87166
MET060	05-2015	Forêt humide		21,62693	165,86691	

**Tableau 69 : Échantillons appartenant à l'ordre Jungermanniales (1/2) : famille Lepidoziaceae (\* approximatif)**



**ANNEXE 3 : COMPOSES DETECTES PAR  
CPG-FID-MS NON IDENTIFIES**

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	plagiochila bicornuta		plagiochila	Plagiochilion	Chiastocaulon caledonicum		
			MET093	MET088	tesmanii	theriotanus	met103	MET101	MET114
Sesquiterpénoïdes non identifiés									
M≥204, 91, 193 (70)	1627,7	30,402	-	-	2,1	-	1	1,4	1
M=222, 91, 161 (90)	1720,6	32,429	-	-	-	-	2,2	0,8	5,2
M=?, 81, 96 (55)	1645,1	30,786	-	-	-	-	0,7	0,7	2,7
M≥236, 69, 95 (90)	1822	34,519	-	2,0	-	-	-	0,7	-
M=218, 91, 105 (60)	1746,3	32,962	-	-	-	-	-	0,7	-
M=234, 91, 81 (60)	1740,6	32,845	-	-	-	-	2,2	0,2	8,6
M=236, 95, 69 (95)	1830	34,679	3,1	1,8	-	-	0,7	-	4,9
M=218, 95, 69 (75)	1823,1	34,541	0	-	-	-	0,4	-	1,5
M≥264, 179, 211 (40)	2251,4	42,423	7,3	-	-	-	-	-	-
<b>M=234, 135, 185 (65)</b>	2063,9	39,159	-	-	5,3	<b>71,6</b>	-	-	-
M=236, 95, 91 (90)	2000,9	38,007	-	-	1,1	-	-	-	-
Diterpénoïdes ou autres non identifiés									
M=294, 220, 179 (85)	2041,7	38,754	1,4	-	-	-	0,6	-	6,5
<b>M=266, 219, 179 (85)</b>	2105,6	39,917	-	-	-	-	<b>47,9</b>	-	-
<b>M=304, 119, 105 (70)</b>	2147,9	40,653	-	-	<b>14,8</b>	-	-	-	-
M=304, 191, 95 (95)	2194,4	41,463	-	-	4,7	-	-	-	-
M=280, 193, 233 (65)	2125,8	40,269	3,5	12	0	-	-	-	-
M≥250, 203, 235 (70)	1961,8	37,261	12	-	0	-	-	-	-
M=294, 179, 276 (55)	2206,3	41,666	1,5	-	0	-	-	-	-

**Tableau 70 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Plagiochilaceae**

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	Chiloscyphus latistipus MET029	Chiloscyphus confertus MET122	Chiloscyphus latistipus MET058	Heteroscyphus argutus MET061
Sesquiterpénoïdes non identifiés						
M=234 93, 57(19)	1533,9	28,269	2,2	-	0,5	-
M=222 97, 179 (68)	1563,5	28,951	-	-	-	1,1
M=218, 147, 91 (42)	1739,4	32,82	1,1	-	1,7	-
M=216, 145, 173 (98)	1909,9	36,269	2,3	-	3,9	-
<b>M=234, 191, 173 (32)</b>	1961,8	37,261	-	-	-	<b>22,0</b>
Diterpénoïdes non identifiés						
M=276, 191, 233 (25)	2006,2	38,103	-	-	-	0,4
M=286, 81, 95 (60)	2176,7	41,154	-	-	-	2,3
M≥416 108, 326(20)	> 2700	53,57	-	-	-	3,4
<b>M≥382 108, 326(20)</b>	> 2700	54,178	-	-	-	<b>9,8</b>

**Tableau 71 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Lophocoleaceae**

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	B. Deplanchei	B. marginata	B. subintegra	B.vittata	B. Parisii	A. tenax	A. caledonicum
Sesquiterpénoïdes non identifiés									
M=234, 161, 203 (70)	1496,3	27,4	-	-	-	-	1,9	-	-
M=220, 161, 91 (85)	1500,4	27,5	-	-	-	-	0,5	-	-
M=204, 93, 121 (95)	1539	28,386	-	-	-	-	-	-	0,6-0,7
M=218, 137, 95 (95)	1606,9	29,943	-	-	-	-	-	0,4	-
<b>M=204, 137, 95 (60)</b>	1615,2	30,125	<b>71,4</b>	-	-	-	-	-	-
M=220, 159, 145 (80)	1621,4	30,263	-	-	-	0-6,6	-	-	-
M=?, 105, 77 (75)	1634,9	30,562	-	-	-	0-6	-	4,5	0-1
M=218, 91, 79 (65)	1648	30,85	-	-	-	-	-	-	0,4-1,1
M=?, 93, 67 (50)	1682,7	31,618	-	-	-	-	-	-	1,4-4,6
M=234, 161, 219 (75)	1764,2	33,335	-	-	-	0-12	-	-	-
M≥236, 69, 95(90)	1821,5	34,509	-	-	-	-	-	-	0,6-1
M=248, 91, 105 (95)	1926,1	36,578	-	-	-	-	-	-	4,7-7,8
M=248, 163, 91 (70)	1935,5	36,759	-	-	-	-	-	-	0,6-1,3
Diterpénoïdes ou autres non identifiés									
M≥272,135, 122 (45)	1852,4	35,13	1,1	-	-	-	0,2	-	-
M≥272,135, 122 (55)	1866,8	35,42	0,3	-	-	-	-	-	-
M=272, 135, 82 (50)	1883,3	35,75	0,5	-	-	-	-	-	-
M=274, 124, 137 (40)	1998,1	37,95	1,4	-	-	-	-	-	-
M=272, 73, 91 (15)	2009,1	38,16	-	-	-	0-2,3	-	-	-
M≥288, 179, 81 (70)	2044,6	38,81	-	-	-	-	0,4	-	-
M>=278, 71, 95 (85)	2110,5	40,00	-	-	-	0-8,9	-	0,8	0,3-0,8
M=288, 95, 137 (90)	2189,5	41,38	0,6	-	-	-	-	-	-
M=288, 91, 105 (80)	2212	41,76	0,2	-	-	-	-	-	-
M≥280, 95, 119 (50)	2251,4	42,42	-	-	8,7	-	-	-	-
<b>M=288, 95, 107(80)</b>	2256,5	42,51	-	-	<b>17,7</b>	-	-	-	-
M≥288, 135, 95 (90)	2257,1	42,52	1,8	-	-	-	-	-	-
M≥286, 95, 107 (90)	2294	43,14	-	-	<b>16,1</b>	-	-	-	-
M≥304, 147, 95 (75)	2294,6	43,15	1,6	-	-	-	-	-	-
M≥341, 95, 147 (90)	2294,6	43,149	-	-	-	-	1,1	-	-
M=286, 81, 95 (85)	2325,3	43,70	-	-	-	-	-	-	-,6
M≥286, 95, 243 (80)	2339,9	43,97	-	-	-	-	-	2,5	-,2
M≥355, 83, 286 (90)	2353,9	44,23	-	-	-	-	1,1	-	-
<b>M≥286, 121, 79 (85)</b>	2405,3	45,186	-	-	-	-	<b>12,9</b>	-	-

Tableau 72 : Composés volatils non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (espèces du genre *Bazzania* : *B. Deplanchei*, *B. marginata*, *B. subintegra*, *B.vittata*, *B. Parisii* ainsi que du genre *Acromastigum* : *A. tenax* et *A. caledonicum*)

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	B. sp. AD212		B. sp. AD211	B. francana			B. serrifolia		B. bernieri	
			G1	G2	MET039	MET065	MET106	MET032	G2	G1	MET038	G1
M=202, 91, 105(90)	1431,2	25,83	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-
M=204, 91, 77 (97)	1501,9	27,533	0-1,8	-	1,4	0-2,9	-	-	-	0,4-0,5	-	-
M=220, 110, 91(60)	1503,3	27,57	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
M=220, 91, 119 (90)	1575,1	29,218	-	-	-	-	-	-	0-1,2	-	3,1	-
M=220, 79, 55 (70)	1596,9	29,719	-	-	-	-	-	0,5	-	0-0,2	0,8	0-0,4
M=218, 137, 95 (95)	1606,9	29,943	0-1,7	0-1,5	6,6	-	-	0	-	0,2-0,2	-	-
M=220 105, 91 (95)	1609,8	30,007	-	-	0	-	-	0	0,5-1,9	-	-	-
M≥216, 91, 135 (75)	1610,3	30,018	-	-	0	0-1,1	-	1,5	-	-	-	-
M=220, 91, 105 (80)	1610,3	30,018	-	-	0	-	-	0	-	-	3,6	0-0,4
M=218, 91, 175 (85)	1620	30,231	-	-	0	-	0,9	0,8	-	-	-	-
M=220, 159, 145 (80)	1621,4	30,263	0-2,7	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-
M=222 , 91, 79 (85)	1622,4	30,285	0-1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M=232, 145, 91 (90)	1633	30,52	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
M=?, 105, 77 (75)	1634,9	30,562	0-0,4	-	-	-	-	-	0-0,4	-	-	-
M=218, 161, 91 (60)	1640,2	30,68	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
M=234, 91, 107 (95)	1648,9	30,87	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-
M=? 69, 111 (70)	1655,2	31,01	0-1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M=218, 91, 145 (85)	1662,4	31,17	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-
M=234, 91, 145 (95)	1679,3	31,543	-	-	-	-	0,3	0,5	-	-	-	-
M=236, 112, 91 (80)	1683,7	31,639	-	-	-	-	-	0,6	0-1,1	-	1,6	-
M=234, 91, 105 (45)	1711,4	32,24	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-
M=234, 91, 159 (70)	1737	32,77	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-
M=250, 91, 105 (95)	1755,5	33,154	0-0,9	0-0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
M=236, 69, 97 (75)	1779,6	33,655	-	0-2,2	-	-	-	-	-	-	-	-
M=218, 107, 91(45)	1788,3	33,837	-	-	-	-	-	-	1,5-3,4	-	4,5	0-0,9
M=220, 91, 105 (70)	1796,5	34,007	-	-	-	-	-	-	0-1,1	-	-	-
M=? , 91, 95 (70)	1820,9	34,498	-	-	-	-	-	-	0,8-1,4	-	-	-
M≥236, 69, 95(90)	1821,5	34,509	0-0,3	0-1,2	-	-	-	-	-	-	-	0-1,2
M≥234, 145, 91 (95)	1831,1	34,70	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
M≥238 , 121, 71 (95)	1913,2	36,333	-	0-3,9	-	-	-	-	-	-	-	-
M=236, 69, 55 (85)	1990,3	37,805	-	-	-	-	-	-	0-1,3	-	-	-

**Tableau 73 : Sesquiterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (Espèce du genre Bazzania : B. sp. AD212, B. sp. AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri)**

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	B. sp AD212		B. sp AD211		B. francana		B. serrifolia		B. bernieri
			G1	G2	MET039	MET065	MET106	MET032	G2	G1	MET038
M=272, 121, 229 (70)	1802	34,1	0-0,6	-	2,7	-	-	-	1,1-1,7	0,4-0,5	2,5
M≥272,135, 122 (45)	1852,4	35,1	0-0,6	-	-	-	-	-	-	0,5-0,5	-
M≥272,135, 122 (35)	1866	35,4	-	0-0,2	-	-	-	-	-	-	-
M=272, 135, 91 (80)	1881,7	35,7	0-0,5	-	-	-	-	-	-	0-0,5	-
M≥281, 95, 107 (70)	1976,9	37,5	0,7-3,3	-	-	-	-	-	0-0,3	-	-
M=274, 124, 137 (30)	1999,2	38	-	1-1,8	-	-	-	-	-	-	-
M=272, 73, 91 (15)	2009,1	38,2	-	-	-	-	-	-	-	5,9-6,8	-
M≥288, 179, 81 (70)	2044,6	38,8	-	0-1,5	-	-	-	-	-	-	-
M≥272, 95, 81 (45)	2066,8	39,2	-	-	-	-	-	-	0-3,2	-	-
M≥286, 69, 105 (95)	2101,9	39,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M≥270, 69, 105 (80)	2103,1	39,9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
M>=278, 71, 95 (85)	2110,5	40	0-1,8	0-0,5	-	-	-	0,7	0-1,1	0-0,5	0,6
M≥270, 105, 119 (90)	2212	41,8	-	-	-	-	-	-	0-2,6	-	-
M≥280, 95, 119 (50)	2251,4	42,4	0-2,7	-	-	-	-	-	-	-	-
M≥300, 95, 81 (55)	2254,6	42,5	-	0-3,5	-	-	-	-	-	-	-
M=288, 95, 107(80)	2256,5	42,5	0-2	0-1	-	-	-	-	0-1,6	-	-
M=304, 95, 137 (85)	2259	42,6	-	0-7,6	-	-	-	-	-	-	-
M=288, 81, 91 (90)	2285,7	43	0-1,9	-	-	-	-	-	-	-	-
M≥286, 95, 107 (90)	2294	43,1	0-2,6	0-8,9	-	-	-	-	0-4,3	-	-
M≥286, 79, 91 (95)	2310,2	43,4	-	-	-	-	-	-	0-5,1	-	-
M≥288, 81, 95 (95)	2319,5	43,6	-	0-2,5	-	-	-	-	-	-	-
M≥286, 95, 119 (90)	2321,8	43,6	-	-	-	-	-	-	0-8	-	-
M=286, 81, 95 (85)	2325,3	43,7	0-1,7	-	-	-	-	-	-	0-0,3	-
M≥286, 93, 79 (55)	2336,4	43,9	-	0-15,9	-	-	-	-	-	-	-
M≥286, 95, 243 (80)	2339,9	44	0-2,1	-	-	-	-	-	0-3,5	-	-
M≥286, 91, 243 (85)	2355,6	44,3	-	-	-	-	-	-	0-2	-	-
M≥288, 137, 19 (55)	2402,9	45,1	0-2,9	-	-	-	-	-	3,8-5,5	0-0,6	-
M≥286, 121, 79 (85)	2405,3	45,2	-	<b>13,9-31,3</b>	-	-	-	-	-	-	-
M≥286,95, 107 (50)	2408,7	45,3	0-0,7	-	-	-	-	-	-	0-0,5	-
M≥286, 55, 95 (95)	2413,5	45,4	0-2,4	-	-	-	-	-	1,7-3,9	-	-
M≥300, 95, 148 (50)	2426,6	45,7	-	0-3,5	-	-	-	-	-	-	-
M≥286,137, 95 (80)	2487,2	47	0-1,7	-	-	-	-	-	1,4-6,7	-	-

**Tableau 74 : Diterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lepidoziaceae (Espèce du genre Bazzania : B. sp. AD212, B. sp. AD211, B. francana, B. serrifolia et B. bernieri)**

Attribution			Drepanolejeunea	lopholejeunea	Schiffneriolejeunea	Spruceanthus	Thysananthus	Thysananthus	lejeunea		
	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	pentadactyla	subfusca	tumida var haskarliana	thozetianus	spathulistipus	pancheri	MET121	MET120	MET131
			MET090	MET087	MET023	MET098	MET119	MET121	MET120	MET131	
M≥272,135, 122 (55)	1866,8	35,415	-	-	-	-	-	-	-	0,6	
M≥281, 95, 108 (75)	1924,4	36,546	-	-	-	-	-	6,4	0,4	-	
M≥281, 109, 95 (40)	1937,8	36,802	-	-	-	-	-	1,6	0,3	-	
M=272, 91, 107 (85)	1964,6	37,314	-	-	-	3,7	-	-	-	-	
M≥281, 124, 137 (45)	1998,1	37,954	-	0,6	-	-	-	-	-	-	
M=274, 124, 137 (40)	1998,1	37,954	-	-	-	-	-	-	-	1,8	
M=272, 91, 107 (85)	1998,7	37,965	-	-	-	5,1	-	-	-	-	
<b>M≥270, 145, 91 (70)</b>	2103,1	39,874	-	-	-	<b>17,9</b>	-	-	-	-	
M>=286, 133, 91 (90)	2128,2	40,311	-	-	-	9,6	-	-	-	-	
M>=272, 91, 105 (50)	2195,1	41,474	-	-	-	-	-	3,9	-	-	
<b>M=288, 91, 105 (80)</b>	2212	41,762	-	-	-	-	-	-	-	<b>23,4</b>	
M≥288, 135, 95 (90)	2257,1	42,519	-	-	-	-	-	-	-	0,8	
<b>M≥232, 149, 177 (95)</b>	2264,1	42,637	-	-	-	-	-	-	<b>52,1</b>	-	
M≥304, 91, 107 (90)	2271,7	42,765	-	4,8	-	-	-	-	-	-	
M≥304, 147, 95 (75)	2294,6	43,149	-	-	-	-	-	-	-	1,5	
M≥280, 95, 189 (35)	2295,2	43,159	-	-	-	-	-	-	0,7	-	
<b>M≥306, 136, 121 (95)</b>	2315,4	43,522	-	<b>32,8</b>	-	-	-	-	-	-	
M≥281, 95, 81 (95)	2331,7	43,821	-	-	-	-	-	-	1,0	-	
M≥281, 95, 81 (95)	2334	43,863	-	-	-	-	-	7,2	-	-	
M≥276, 125, 91 (20)	2343,4	44,034	-	-	-	-	0,8	-	-	-	
<b>M≥270, 95, 107 (65)</b>	2427,1	45,666	-	-	-	-	-	<b>14,9</b>	-	-	
M≥281, 221, 95 (95)	2449,9	46,167	-	-	-	-	-	2,5	-	-	
M≥285, 125, 81 (95)	2463	46,455	-	-	-	-	0,5	-	2,6	-	
<b>M≥304, 91, 105 (90)</b>	2478,5	46,797	-	-	-	-	-	-	-	<b>60,8</b>	
M≥281, 95, 221 (95)	2613	50,455	-	-	-	-	-	4,8	-	-	

Tableau 75 : Diterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lejeuneaceae

Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	Drepanolejeunea	lopholejeunea	Schiffneriolejeunea	Spruceanthus	Thysananthus	Thysananthus pancheri		lejeunea
			pentadactyla	subfusca	tumida var haskarliana	thozetianus	spathulistipus	MET121	MET 120	sordida
			MET090E	MET087	MET023	MET098	MET119	MET121	MET 120	MET131E
M=220, 82, 95 (70)	1584,4	29,431	-	-	-	-	-	-	1,0	-
M=220, 91, 105 (90)	1634,9	30,562	-	1,3	-	-	1,3	5,2	1,8	0,8
M=218, 133, 91 (90)	1643,1	30,743	-	-	-	-	-	0,8	-	-
M≥202, 159, 91 (70)	1745,2	32,941	-	-	-	-	1,0	-	-	-
M=218, 109, 91 (50)	1777	33,602	-	1,9	-	-	-	-	-	-
M=218, 95, 81 (70)	1794,5	33,965	-	-	-	-	1,5	5,7	0,7	-
M=222, 95, 191 (50)	1803,3	34,146	-	6,0	-	-	-	-	-	-
M=250, 109, 137 (70)	1835,9	34,797	-	-	-	-	-	8,3	1,5	-
M≥236, 109, 91 (70)	1880,1	35,682	-	-	-	-	-	-	0,5	-
M≥236, 91, 175 (75)	1894,5	35,97	-	-	-	-	-	2,5	-	-
M≥234, 91, 55 (85)	1931,1	36,674	-	-	-	-	0,5	-	-	-
M=232, 91, 175 (75)	2008,5	38,146	-	-	-	-	1,1	5,4	-	-
M≥232, 95, 107 (35)	2009,7	38,167	-	-	0,5	-	-	-	-	-
<b>M≥257, 95, 81 (95)</b>	2224,1	41,965	-	-	-	-	<b>61,9</b>	1,6	-	-

**Tableau 76 : Sesquiterpénoïdes non identifiés des espèces de la Famille des Lejeuneaceae**



Attribution	I <sub>R</sub>	T <sub>R</sub>	Porella viridissima		
			MET014	MET015	MET035
Sesquiterpénoïdes non identifiés					
M≥192, 109, 91 (80)	1521,8	27,991	0,0	3,2	0,0
M≥220, 95, 109 (50)	1548,7	28,61	0,0	0,0	3,0
M≥206, 91, 79 (50)	1574,7	29,207	0,0	1,0	0,0
M=208, 105, 91 (95)	1582,1	29,378	3,5	5,2	0,0
M≥206, 109, 54 (40)	1609,4	29,997	3,9	3,3	0,0
M≥218, 117, 91 (50)	1673,5	31,415	0,0	0,0	1,3
<b>M≥236, 93, 108 (20)</b>	1696,7	31,927	<b>22,0</b>	<b>22,0</b>	0,0
M≥266, 155, 238 (85)	1833,7	34,754	0,0	0,0	3,9
M≥235, 109, 121 (85)	1835,9	34,797	8,8	7,2	0,0
M≥250, 108, 91 (45)	1846	34,999	0,0	0,8	0,0
M≥246, 192, 91 (45)	1864,7	35,373	0,0	0,0	2,1
M≥250, 108, 91 (45)	1871,6	35,511	2,8	5,0	0,0
Autres composés non identifiés					
M≥276, 217, 94 (85)	1945,1	36,941	0,0	0,0	1,6
M>=278, 71, 95 (85)	2110,5	40,002	0,0	0,0	2,7
M≥340, 207, 91 (95)	2514,3	47,661	3,8	3,4	0,0
M≥278, 124, 155 (40)	1957,9	37,186	0,0	0,0	4,1
M≥280, 219, 91 (95)	2516,7	47,725	0,0	0,0	4,6
M=232, 84, 55 (55)	2141,7	40,546	4,6	3,0	0,0
M≥281, 105, 91 (80)	2625	50,871	5,9	4,9	3,6
<b>M≥278, 109, 175 (35)</b>	2089,6	39,629	<b>12,7</b>	<b>13,9</b>	1,9

Tableau 77 : Composés volatils non identifiés de l'espèce *Porella viridissima*

## Résumé

L'étude phytochimique des hépatiques de la Nouvelle-Calédonie a été réalisée sur 34 espèces d'hépatique (dont 14 endémiques) appartenant à six familles (Plagiochilaceae, Lophocoleaceae, Lepidoziaceae, Porellaceae, Lejeuneaceae et Frullaniaceae). La composition chimique, notamment en constituants volatils, de ces espèces a pu être établie pour la première fois pour la majorité des espèces étudiées, et il s'agit de la première étude phytochimique réalisée sur les genres *Chiastocaulon* et *Acromastigum*. Environ 260 constituants ont pu être déterminés pour ces espèces ci-étudiées, ils appartiennent en majorité à la famille des terpénoïdes, et à d'autres familles de métabolites secondaires d'intérêt tels que les composés aromatiques. Quatre nouveaux produits naturels ont pu être isolés et caractérisés : un dérivé du chromène (le 2-hydroxy-4,6-diméthoxy-3-(3'-méthyl-2'-butényl)-benzoate de méthyl isolé de *Plagiochila bicornuta*), un sesquiterpénoïde (le zier-13,14-dien-5-ol isolé de *Bazzania francana*), un bibenzyls (le 3-hydroxy-4,4'-diméthoxybibenzyl isolé de *Frullania ericoides*) et un bis(bibenzyl) (la vittatin isolé de *Bazzania vittata*).

L'activité antibactérienne d'extraits d'espèces issues de trois familles (Plagiochilaceae, Lepidoziaceae, Lejeunaceae) a été montrée sur deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). Les extraits à l'éther les plus actifs sont ceux de *Bazzania parisii* (actif sur *S. epidermidis* avec une  $CI_{50}$  de  $19,3 \pm 0,8$   $\mu\text{g/ml}$ ) et de *Bazzania subintegra* (actif sur *S. aureus* avec une  $CI_{50}$  de  $16,3 \pm 1,1$   $\mu\text{g/ml}$ ). Les extraits méthanoliques les plus actifs sont ceux : de *Bazzania serrifolia* (actif sur *S. aureus* avec une  $CI_{50}$  de  $17,7 \pm 1,9$   $\mu\text{g/ml}$ ), de *Chiastocaulon caledonicum* (actif sur *S. aureus* avec une  $CI_{50}$  de  $6,7 \pm 1$   $\mu\text{g/ml}$ ), de *Bazzania* sp. AD212 (actif sur *S. epidermis* avec une  $CI_{50}$  de  $14,1 \pm 1$   $\mu\text{g/ml}$ ) et de *Bazzania francana* (actif sur *S. epidermis* avec une  $CI_{50}$  de  $17,0 \pm 1,6$   $\mu\text{g/ml}$ ).

## Abstract

Phytochemical survey of 34 New-Caledonian liverwort species (including 14 endemic species) belonging to six families (Plagiochilaceae, Lophocoleaceae, Lepidoziaceae, Porellaceae, Lejeuneaceae, and Frullaniaceae) had been performed. Chemical composition of these species, mostly of volatile constituents, had been established for the first time for most of them and phytochemical study of species from *Chiastocaulon* of *Acromastigum* genus had been performed for the first time. Nearly 260 compounds were reported as identified constituents of these plants extracts, most of them being terpene components and the others belonging to other interesting secondary metabolites families such as aromatic compounds. Four new natural products had been characterized respectively : a chromene derivative named as 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl)-methyl benzoate isolated from *Plagiochila bicornuta*, a sesquiterpene compound called zier-13,14-dien-5-ol isolated from *Bazzania francana*, a bibenzyl named 5-hydroxy-4,4'-dimethoxy bibenzyl isolated from *Frullania ericoides*, and a bis(bibenzyl)isolated from *Bazzania vittata*.

Antibacterial activity of liverworts extracts from three Hepaticae families (Plagiochilaceae, Lepidoziaceae, and Lejeuneaceae) had been shown on two strains (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). The most active ether extracts were found to be those from *Bazzania parisii* (active on *S. epidermidis* having an  $IC_{50}$  of  $19.3 \pm 0.8$   $\mu\text{g/ml}$ ) and from *Bazzania subintegra* (active on *S. aureus* having an  $IC_{50}$  of  $16.3 \pm 1.1$   $\mu\text{g/ml}$ ). The most active methanolic extracts were found to be respectively from : *Bazzania serrifolia* (active on *S. aureus* having an  $IC_{50}$  of  $17.7 \pm 1.9$   $\mu\text{g / ml}$ ), *Chiastocaulon caledonicum* (active on *S. aureus* having an  $IC_{50}$  of  $6,7 \pm 1$   $\mu\text{g/ml}$ ), *Bazzania* sp. AD212 (active on *S. epidermis* having an  $IC_{50}$  of  $14.1 \pm 1$   $\mu\text{g/ml}$ ) and *Bazzania francana* (active on *S. epidermis* having an  $IC_{50}$  of  $17.0 \pm 1.6$   $\mu\text{g/ml}$ ).