

Département des Sciences et Techniques
Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées



THESE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA NOUVELLE-CALEDONIE

Spécialité : Physiologie végétale et phytochimie

Présentée et soutenue publiquement par

M. Bruno FOGLIANI

*De la connaissance physiologique des Cunoniaceae
endémiques de la Nouvelle-Calédonie,
à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et
biologiques de leurs substances bioactives d'intérêt*

Soutenue le 20 novembre 2002 devant le jury composé de :

M. Daniel Côme, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6	Rapporteur
M. Emile Gaydou, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Université Aix Marseille III	Rapporteur
M. Saliou Bouraïma-Madjebi, Maître de Conférence, Université de la Nouvelle-Calédonie	Directeur de thèse
M. Jean-Pierre Bianchini, Professeur, Université de la Polynésie Française	Examineur
M. René Pineau, Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie	Examineur
M. Jason Bradford, Research Scientist, Missouri Botanical Garden	Examineur



Université de la
Polynésie Française



Province Sud
de la Nouvelle-Calédonie

DOI:10.6098/2005NCAL0007

L'univers nous aide toujours à nous battre pour nos rêves, si bêtes qu'ils puissent paraître.
Parce que ce sont nos rêves, et nous sommes seuls à savoir combien il nous a coûté de les rêver.

Paulo Coelho



La recherche procède par des moments distincts et durables, intuition, aveuglement, exaltation et fièvre. Elle aboutit un jour à cette joie, et connaît cette joie celui qui a vécu des moments singuliers.

Albert Einstein

A tous les êtres chers, parents et amis perdus
tout au long de la route

et

A mon grand-père qui nous a quitté il y a
quelques mois, trop tôt pour assister à
l'aboutissement de mon parcours
qui lui procurait tant de fierté.

AVANT-PROPOS

Cette thèse se veut le résultat d'une collaboration entre de nombreuses équipes de recherche appartenant à plusieurs laboratoires qui ont mis à ma disposition leurs capacités matérielles et humaines.

Le Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées (L.B.P.V.A.) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie dirigé par le Pr. René Pineau a été à l'origine du sujet et la majeure partie du travail y a été effectuée sous la direction bienveillante du Dr Saliou Bouraïma-Madjebi. Ce dernier a en particulier mis son expérience de physiologiste au service des études consacrées à ce domaine chez les Cunoniaceae.

Les autres partenaires sont divers et chacun a joué un rôle en fonction de la thématique concernée :

- *l'Institut pour la Recherche et le Développement (I.R.D.) de Nouméa avec en particulier le Laboratoire des Substances Naturelles dirigé par le Dr Pierre Cabalion, nous a permis de réaliser des études chimiques préliminaires à la purification des biomolécules. Le Dr Jean-Marie Veillon et le Dr Tanguy Jaffré du Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Végétale ont été d'un grand secours pour l'approfondissement de mes connaissances botaniques et pour l'identification des espèces végétales.*
- *le Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée (L.C.A.A.) de l'Université de Polynésie Française, dirigé par le Pr. Jean-Pierre Bianchini, au sein duquel les purifications de biomolécules ont été effectuées pendant un stage de 3 semaines. Le Pr. Jean-Pierre Bianchini et le Dr Phila Bianchini ont pris en charge les analyses structurales qui ont été réalisées en collaboration avec le Dr R. Faure du Centre Régional de RMN (C.R.R.M.N.) de Marseille.*
- *le Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) de Nouméa dirigé en ce temps par le Dr Marc Litaudon, aujourd'hui par le Dr Vincent Dumontet, qui m'a permis au cours de mes 16 mois de Volontariat à l'Aide Technique de me familiariser avec les espèces de la famille et qui a fourni quelques poudres végétales dans le cadre des tests préliminaires chimiques et biologiques.*
- *les Dr Helen Fortune Hopkins (Université de Lancaster) et Jason Bradford (Missouri Botanical Garden), en mission durant le mois de décembre 2000 dans le cadre de la révision de certains genres de la famille des Cunoniaceae, qui m'ont transmis leurs connaissances botaniques et qui ont accepté de confirmer l'identification des différentes espèces récoltées.*

Enfin, ce projet n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier de la Province Sud qui a dès la création du L.B.P.V.A. participé à son essor et qui de surcroît m'a octroyé un Prix d'Encouragement à la Recherche. La création de ce prix est en grande partie due à la bienveillance de Mme Marie-Noëlle Thémereau qui a su écouter les doléances des étudiants de 3^{ème} cycle calédoniens aux cours des différentes rencontres que nous avons pu avoir.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, en particulier Messieurs Daniel Côme et Emile Gaydou pour l'honneur qu'il m'ont fait d'en être les rapporteurs.

Toute ma reconnaissance va à M. Jean-Pierre Bianchini et à Mme Phila Bianchini pour l'accueil sans pareil qu'ils m'ont réservé au sein du Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de l'Université de Polynésie Française. Leurs compétences et leurs conseils m'ont permis de réaliser un travail important dans le temps court qui m'était imparti, sans oublier leur amitié et leur gentillesse qui ont rendu le séjour encore plus agréable.

Je remercie vivement M. Jason Bradford ainsi que Mlle Helene Fortune Hopkins qui ont bien voulu authentifier les identifications botaniques des espèces de la famille qu'ils étudient par ailleurs et pour toutes les informations échangées au cours de nos conversations amicales.

Une thèse est un travail d'équipe, c'est pourquoi je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui y ont participé de près ou de loin au sein du Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées. Je commencerai par mon directeur de thèse M. Saliou Bouraïma-Madjèbi qui au delà de sa présence permanente et de ses conseils m'a apporté de grandes leçons d'humanité ; mon amitié lui est acquise et je souhaite que le chemin qu'il nous reste à parcourir ensemble soit tel que nous l'avons imaginé.

Merci à M. René Pineau, directeur du laboratoire qui en plus de l'intérêt qu'il apporte à chacun des étudiants et stagiaires m'a permis d'assimiler de nombreux rouages du monde universitaire.

Une mention particulière à Valérie Médevielle pour son aide technique et son amitié, elle seule sait combien les moments traversés au cours de ces années ont pu être difficiles ou agréables. Je la remercie pour l'exemple de courage qu'elle nous apporte chaque jour.

Merci à Véronique Gaudichon pour sa bonne humeur, son humour, son café et sa gentillesse de tous les instants.

Il me reste à remercier les autres membres de l'équipe pour diverses raisons : Danielle Saintpierre pour chaque jour où nous avons échangé une amitié forte et des connaissances scientifiques depuis notre D.E.A. à Toulouse jusqu'à son départ pour une contrée plus éloignée ; Hamid Amir pour ses conseils précieux, Atika Amir pour les mêmes raisons mais avec des temps de parole plus longs ; Eliane Hely-Joly pour son aide technique ; Virginie Leon à qui j'ai fini par pardonner le sacrifice de mes plantes ; à tous merci pour leur bonne humeur qui contribue chaque jour à transformer le laboratoire en un lieu de vie des plus agréables.

Je n'oublierai pas les différents stagiaires et étudiants qui ont contribué à mes recherches.

Les collaborations développées m'ont amené à travailler avec de nombreuses équipes que je tiens à mentionner : Pelenato Maituku, Marc Litaudon et Vincent Dumontet du C.N.R.S. de Nouméa dont la gentillesse et la disponibilité ne sont plus à prouver ; Tanguy Jaffre, Jean-Marie Veillon, Gilles Dagostini et Frédéric Rigault du Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Végétale Appliquée de l'I.R.D. toujours prêts à apporter une aide éco-botanique ; Pierre Cabalion, Daniel Duhet, Josiane Patissou et Jean Waikedre du Laboratoire des Substances Naturelles Végétales de l'I.R.D. pour leur aide et leurs conseils avertis au cours des différentes manipulations qui m'ont conduit dans leur structure, HPLC, tests sur cellules cancéreuses etc. ; Dominique Laurent, Jacques Pusset, Maryvonne Frostin et Edouard Hnawia du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles de l'I.R.D.-U.N.C. qui m'ont guidé et conseillé.

J'aurai une pensée pour tous les enseignants et enseignantes qui ont jalonné mon parcours d'écolier, de collégien, de lycéen et d'étudiant. Nous avons trop tendance à oublier que ce sont ces hommes et ces femmes qui construisent jour après jour le chemin de nombreuses vies.

Ces remerciements n'auraient aucun sens si je n'exprimais ma reconnaissance à mes parents sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Les nombreux sacrifices qui ils ont concédés tout au long de ces années ne sont pas vains et je les sais fiers du résultat. Leur soutien moral, leurs encouragements invariables et le libre choix qu'il m'ont toujours laissé font d'eux, des parents exemplaires à mes yeux. Aucun mot n'est assez fort pour exprimer ce que je ressens mais qu'ils sachent que ma gratitude leur est éternelle. Merci à mon frère, qu'il sache que mon plus grand regret est la déchirure provoquée par l'espace physique qui nous a séparé toutes ces années, pour autant elle n'a eu aucun effet sur les sentiments que nous avons l'un pour l'autre. Je suis fier du chemin qu'il a parcouru et je lui souhaite d'arriver au bout de ces rêves.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille qui par leurs courriers postaux et leurs appels téléphoniques m'ont permis de conserver le moral durant mon séjour métropolitain. Chaque jour était accompagné d'un rayon de soleil de notre caillou. Merci à tous mes amis de longue date et à ceux de passage pour les moments de joie partagés dans tout l'hexagone.

Enfin, je remercie amoureusement ma femme Héléna qui depuis 5 ans supporte ma mauvaise humeur dans les moments de fatigue, ses encouragements journaliers et sa tendresse ont su me transcender. Merci pour le merveilleux cadeau qu'elle m'a fait le 21 mai 1999, la vie n'a de sens qu'au travers des êtres que nous chérissons et notre Océane nous apporte chaque jour le parfum du bonheur.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
--------------------------------------	----------

I/ LA NOUVELLE-CALÉDONIE ET SES DÉPENDANCES	5
--	----------

A/ Présentation générale.....	5
-------------------------------	---

B/ Evolution géologique de ce Pays d'Outre-Mer et types de sols le composant	7
--	---

C/ Eléments généraux du climat	9
--------------------------------------	---

D/ La flore néo-calédonienne et son originalité	13
---	----

II/ LA FAMILLE DES CUNONIACEAE	24
---	-----------

A/ Présentation générale.....	24
-------------------------------	----

B/ La famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie	28
---	----

C/ Phytochimie des Cunoniaceae	31
--------------------------------------	----

D/ Utilisation des Cunoniaceae en médecine traditionnelle.....	31
--	----

E/ Intérêt économique des espèces de la famille des Cunoniaceae.....	31
--	----

F/ Connaissances physiologiques et écologiques de la famille des Cunoniaceae.....	33
---	----

III/ LES SUBSTANCES NATURELLES VÉGÉTALES ET LEUR VALORISATION	42
--	-----------

A/ Les Tanins.....	42
--------------------	----

B/ Les Flavonoïdes	49
--------------------------	----

C/ Activités biologiques d'autres métabolites secondaires	52
---	----

PARTIE I: Récolte et identification d'espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie

Chapitre 1: La récolte	53
-------------------------------------	-----------

INTRODUCTION	53
---------------------------	-----------

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES	53
--------------------------------------	-----------

A/ Equipement de base	53
B/ Reconnaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae	55
C/ Collecte des différentes parties de plante	55
D/ Prélèvement de l'échantillon botanique	55
E/ Réalisation d'une fiche type descriptive de l'espèce.....	57
F/ Traitement des collectes	57
G/ Séchage et réalisation de l'herbier.....	59

III/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 59

Chapitre 2: Identification des échantillons botaniques et contribution à la connaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie.....61

INTRODUCTION 61

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES 61

III/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 62

A/ Les espèces du genre *Acsmithia*..... 63

B/ Les espèces du genre *Cunonia* 67

C/ Les espèces du genre *Weinmannia* 83

D/ Les espèces du genre *Geissois*..... 85

E/ Les espèces du genre *Codia*..... 91

F/ Les espèces du genre *Pancheria*..... 95

CONCLUSION 106

PARTIE II: Tests préliminaires chimiques et biologiques pour la sélection des espèces de Cunoniaceae néo-calédoniennes d'intérêt

Chapitre 1: Tests chimiques préliminaires.....107

INTRODUCTION 107

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES	107
A/ Recherche de terpénoïdes.....	107
B/ Recherche de polyphénols.....	108
C/ Recherche d'alcaloïdes	109
II/ RÉSULTATS ET DISCUSSION	110
Chapitre 2: Tests d'activités biologiques pour la sélection des espèces d'intérêt.....	113
INTRODUCTION	113
I/ PRÉPARATION DES EXTRAITS BRUTS	113
A/ Matériel et Méthodes	113
B/ Résultats et Discussion	115
II/ TEST D'ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES	116
A/ Introduction.....	116
B/ Article paru : Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties. (Fogliani <i>et al.</i> , 2002a).....	116
C/ Conclusion	127
III/ TESTS D'INHIBITIONS ENZYMATIQUES	128
A/ Activités inhibitrices à l'encontre de la xanthine oxydase	128
B/ Activités inhibitrices à l'encontre de l'élastase	137
C/ Conclusion globale sur les tests enzymatiques.....	142
IV/ TESTS D'ACTIVITÉS TOXIQUES ET CYTOTOXIQUES	142
A/ Test d'activité cytotoxique.....	142
B/ Test d'activité toxique.....	150
V/ BILAN DES TESTS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES ET CHOIX DES ESPÈCES À ÉTUDIER.	151

PARTIE III: Purification et caractérisation chimique de molécules bioactives synthétisées par quelques espèces de Cunoniaceae

Chapitre 1: Purification des molécules d'intérêt.....153

INTRODUCTION 153

I/ PURIFICATION DE MOLÉCULES ANTIBIOTIQUES CHEZ L'ESPÈCE *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 153

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s)..... 154

B/ Purification de molécules extraites des feuilles de *Cunonia macrophylla* 159

II/ PURIFICATION DE MOLÉCULES INHIBITRICES DE LA XANTHINE OXYDASE CHEZ L'ESPÈCE *WEINMANNIA DICHOTOMA* 176

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s)..... 176

B/ Purification de molécules extraites d'écorce de *Weinmannia dichotoma*..... 181

Chapitre 2: Identification structurale des molécules purifiées de *Cunonia macrophylla* et *Weinmannia dichotoma*189

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES 189

II/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 189

A/ Etude des molécules purifiées de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla* 189

B/ Etude des molécules purifiées de l'extrait acétate d'éthyle d'écorce de *Weinmannia dichotoma* 210

CONCLUSION SUR LES ÉTUDES CHIMIQUES EFFECTUÉES SUR *CUNONIA MACROPHYLLA* ET *WEINMANNIA DICHOTOMA* 212

PARTIE IV: Voies et moyens de pérennisation des espèces d'intérêt *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*

INTRODUCTION: CHOIX DES ESPECES 213

Chapitre 1: Multiplication par voie sexuée: Etude de la capacité germinative et optimisation de la germination des semences de deux espèces de Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.....213

INTRODUCTION 215

I/ DE LA COLLECTE DU FRUIT À LA SEMENCE D'ASPECT FERTILE 215

A/ Matériel et méthodes..... 216

B/ Résultats et Discussion 218

II/ ETUDE DE L'IMPACT DE DIFFÉRENTS FACTEURS ABIOTIQUES SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA*.. 222

A/ Matériel et méthodes..... 222

B/ Résultats 223

C/ Discussion..... 226

III/ TENTATIVES D'OPTIMISATION DE LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA*..... 227

A/ Impact de la désinfection, de la scarification et du froid sur la capacité germinative des semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*..... 228

B/ Effet de la prégermination sur les semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*..... 236

IV/ IMPACT DES ÉLÉMENTS DU SYNDROME SERPENTINIQUE SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA* ... 239

A/ Matériel et méthodes..... 239

B/ Résultats 239

C/ Discussion..... 243

CONCLUSION 244

Chapitre 2: Multiplication par voie asexuée: Bouturage et culture *in vitro* de deux espèces de Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*245

INTRODUCTION 245

I/ LE MACROBOUTURAGE DE *C. MACROPHYLLA* ET DE *G. PRUINOSA* 245

A/ Matériel et méthodes..... 246

B/ Résultats et discussion.....	250
C/ Conclusion	255

III/ LA CULTURE *IN VITRO* DE *C. MACROPHYLLA* ET DE *G. PRUINOSA*..... 255

A/ Culture <i>in vitro</i> de <i>Cunonia macrophylla</i>	256
B/ Culture <i>in vitro</i> de <i>Geissois pruinosa</i>	264
C/ Conclusion	275

BILAN ET PERSPECTIVES SUR LES VOIES ET MOYENS DE MULTIPLIER LES ESPÈCES *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 278

PARTIE V: Contribution à la connaissance du développement de deux Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*

INTRODUCTION 279

I/ CROISSANCE DE *GEISSOIS PRUINOSA* SUR DIFFÉRENTS TYPES DE SOLS. 280

A/ Matériel et méthodes.....	280
B/ Résultats et discussion.....	282

III/ EFFET DU NICKEL SUR LA CROISSANCE DE *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA* 286

A/ Matériel et méthodes.....	286
B/ Résultats et discussion.....	287

III/ SUIVI MORPHOLOGIQUE DE *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 289

A/ Matériel et méthodes.....	289
B/ Résultats et Discussion	290
C/ Comparaison des deux espèces	299

CONCLUSION GENERALE.....303

BIBLIOGRAPHIE.....307

TABLE DES MATIERES.....	321
--------------------------------	------------

ANNEXES

ANNEXE I: RESULTATS DES TESTS PRELIMINAIRES CHIMIQUES.....	A1
ANNEXE II: RENDEMENTS DES EXTRACTIONS AU METHANOL ET A L'ACETATE D'ETHYLE.....	A13
ANNEXE III: COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE MICROBIENS.....	A24
ANNEXE IV: PROFILS D'ELUTIONS ET SPECTRES ULTRAVIOLETS DES MOLECULES PURIFIEES.....	A25

ABREVIATIONS

CCM : Chromatographie sur couche mince
C.N.R.S. : Centre National de la Recherche Scientifique
d : doublet
DO : Densité optique
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDTA : ethylenediaminetetracetic acid
HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC : Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
Hz : Hertz
IC₅₀ : Concentration provoquant 50% d'inhibition
I.R.D. : Institut pour la Recherche et le Développement
J : Constante de couplage
L.B.P.V.A. : Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées
L.C.A.A. : Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée
m : multiplet
MeOH : Méthanol
MH : Milieu Mueller-Hinton
N.d. : Non déterminé
N. f : Non fourni
q : quadruplet
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
s : singulet
t : triplet
TMS : Tétraméthylsilane
UV : Ultraviolet
XOD : Xanthine oxydase
VIH : Virus d'immunodéficience humaine



INTRODUCTION

Université de la Nouvelle-Calédonie

INTRODUCTION GENERALE

Le monde végétal a de tout temps été au service de l'homme. Dès l'apparition de l'*Homo sapiens*, il y a trois millions d'années, une relation s'est développée entre l'humain et les plantes. En ces temps, les plantes servaient de nourriture ou de poison pour tuer le gibier. Nous étions loin des connaissances actuelles et l'homme a dû apprivoiser ce monde qui existait bien avant lui. Les acquis présents sont le fruit de milliers d'années d'études plus ou moins avancées. Le savoir ancestral reste une référence et les enquêtes ethnopharmacologiques permettent, au contact des populations autochtones, de découvrir des plantes aux vertus thérapeutiques encore insoupçonnées. En Nouvelle-Calédonie, les Mélanésiens restent détenteurs de nombreux secrets, et lorsque l'on sait que ce Pays d'Outre-Mer renferme une richesse florale exceptionnelle pour sa petite superficie (Morat, 1993), on réalise combien les possibilités de découvertes de nouvelles substances sont immenses.

L'utilisation des plantes en thérapeutique est tout aussi ancienne, les guérisseurs en Mélanésie, les sorciers ou les tradipraticiens en Afrique, utilisent encore de nos jours des plantes qui traitent les symptômes de la maladie ou les guérissent. Les autres pays du monde ne sont pas en reste, quelle que soit la région considérée, les plantes ont toujours fait partie de la vie et de la mort de l'être humain. « Des plantes bien connues comme le pavot, le séné, la jusquiame, la digitale, la belladone... plantes des pays tempérés, le quinquina, le coca... plantes tropicales, constituent des chefs de file des principales classes thérapeutiques (analgésiques, anesthésiques, antispasmodiques, tonocardiaques...) » (Sévenet, 1994). Dans le domaine des antibiotiques et des antifongiques en particulier, les plantes ont su se positionner même si dès l'origine de leur découverte, on les considérait comme des substances chimiques produites essentiellement par des microorganismes. Le développement de plus en plus important des cancers a aussi montré leur nécessité dans certains traitements. La vinblastine, le taxol ou encore l'ellipticine en sont les exemples les plus connus. Malheureusement, l'apparition de nouveaux types de tumeurs ou de microbes résistants aux traitements actuels, font de la recherche médicamenteuse un réel sujet d'actualité.

La cosmétologie, pour sa part, occupe dans nos vies une place tout aussi importante. Depuis la Grèce antique, l'homme s'est de plus en plus préoccupé de son corps. Il fallait soulager les traces du temps et divers moyens étaient utilisés comme les pigments végétaux ou encore des crèmes et des huiles préparées à partir de plantes. L'hygiène a fait apparaître les parfums qui à certaines époques servaient à parfumer un corps propre et à d'autres à masquer de mauvaises odeurs. Les plantes sont là aussi une source essentielle de la parfumerie. Le XX^{ème} siècle a vu l'essor considérable de la cosmétologie et de nombreuses industries sont aujourd'hui à la recherche de nouvelles molécules pour permettre aux femmes et de plus en plus aux hommes de se sentir bien dans leur corps.

Aujourd'hui, la recherche se réoriente fortement vers les substances naturelles. Même si elles n'avaient pas été totalement abandonnées, la chimie organique et la technologie informatique ont conduit les chercheurs vers la fabrication de molécules nouvelles dont la structure ne tenait plus compte de celles existant dans la nature. Cependant, excepté dans de rares cas, les résultats ont été décevants et très peu ont abouti à la fabrication de nouveaux médicaments. Ainsi, il paraît plus aisé de s'inspirer de ce que la nature a mis des milliers voire des millions d'années à fabriquer et d'utiliser nos connaissances chimiques pour tenter de la copier. Malgré tout, les biomolécules actives sont la plupart du temps très complexes et il nous est encore impossible de toutes les synthétiser. Au début de ce XXI^{ème} siècle, les substances naturelles représentent 60% des médicaments dont nous disposons (dont 70% sont fournis par les plantes), les 40% restants provenant de médicaments de synthèse copiés sur les végétaux ou les animaux, voire légèrement modifiés.

Ces chiffres montrent combien il semble indispensable, tout en cherchant de nouvelles biomolécules, de maîtriser la pérennisation des espèces d'intérêt. La physiologie des plantes est aujourd'hui encore un domaine où tout reste à découvrir. La complexité du fonctionnement du végétal au cours du cycle de la graine à la graine est importante. Même s'il est vrai que depuis longtemps les hommes ont su multiplier les plantes en semant des graines ou en réalisant un bouturage, la question de savoir pourquoi une semence germe dans telles ou telles conditions et pourquoi la réussite d'une bouture est dépendante de la période de l'année ou d'autres facteurs n'a trouvé sa réponse que pour très peu d'entre-elles. La compréhension de tous ces phénomènes apportera à coup sûr des réponses essentielles pour permettre aux exploitants de rentabiliser leurs productions végétales. Ainsi, dans le cadre d'une exploitation culturale à grande échelle d'une plante exprimant des potentialités bioactives, la maîtrise de la germination des semences et l'optimisation du bouturage permettront de mieux orienter les choix des cultivateurs. Plus encore, si l'on se place d'un point de vue fondamental, les résultats expérimentaux qui seront obtenus sur des végétaux, tels que ceux présents en Nouvelle-Calédonie, d'origine sub-tropicale, peu étudiés à ce jour, seront d'une grande utilité pour mieux appréhender les phénomènes intimes engendrés au cours de leur développement qu'il soit germinatif ou végétatif.

A l'heure actuelle, la recherche de nouvelles espèces végétales susceptibles de produire des substances naturelles d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique passe par diverses étapes chronologiques. Il faut dans un premier temps réaliser un inventaire des plantes, de leurs éventuelles utilisations en médecine traditionnelle, les récolter et confirmer leur identification avant d'en étudier les propriétés biologiques. L'étude des capacités bioactives de ces végétaux consiste par la suite en une batterie de tests biologiques à l'encontre de diverses cibles susceptibles de provoquer des pathologies (bactéries, champignons, cellules cancéreuses) ou d'intervenir dans des processus biochimiques à l'origine du vieillissement de la peau par exemple (élastase, xanthine oxydase). Une fois des espèces sélectionnées, la connaissance de leurs caractéristiques chimiques, au travers de tests préliminaires qualitatifs, permet d'orienter la purification de la ou des molécules responsables de l'activité biologique. Vient ensuite l'analyse structurale qui confirmera la découverte ou non d'une molécule nouvelle. Les dernières étapes et non des moindres consistent en la détermination de son mode d'action, à sa synthèse (ou héli-synthèse) ou à sa production par culture. Enfin, une fois les études chimiques, biologiques et toxicologiques exécutées, la mise en forme médicamenteuse permet sa mise sur le marché. L'ensemble de ce travail, de la découverte d'une espèce d'intérêt à la vente d'un médicament peut aller de 10 à 20 ans.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les capacités matérielles et humaines à notre disposition au sein de notre laboratoire, le L.B.P.V.A. (Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie et les collaborations développées avec l'I.R.D. (Institut de Recherche pour le Développement, centre de Nouméa), le L.C.A.A. (Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée, Université de la Polynésie Française), le C.N.R.S. (Centre National de la Recherche Scientifique, centre de Nouméa), nous ont permis de mettre en place la même stratégie de recherche (Figure 1 p. 4). Notre investigation nous a conduit jusqu'à l'identification structurale de bio-molécules actives avec en parallèle l'étude de voies et moyens de multiplication des espèces d'intérêt dans l'optique d'une production par culture mécanisée du végétal.

Ce travail est consacré à l'exploration d'une famille végétale très répandue en Nouvelle-Calédonie, les Cunoniaceae, dont la majeure partie des espèces se développent sur des sols ultramafiques, plus communément appelés « sols miniers », si particuliers à la Nouvelle-Calédonie. Ces sols représentent un milieu extrême, avec un des taux d'endémisme végétal les plus élevés au monde (Jaffre *et al.*, 1987). Ce choix a fait suite à des résultats préliminaires encourageants obtenus par les différents organismes de recherche et à une logique d'exploitation qui voudrait que cette endémicité permette d'entrevoir une exclusivité dans la production de molécules bioactives issues de telles espèces.

Le travail présenté dans ce manuscrit, s'articule autour de 5 grandes parties :

- la première décrit la collecte et l'identification des différentes espèces,
- la seconde reporte les résultats des tests préliminaires chimiques et biologiques dont elles ont fait l'objet, ainsi que le choix des espèces les plus intéressantes,
- la troisième développe les étapes de purification et d'identification des molécules bioactives extraites de ces espèces,
- la quatrième se réfère aux voies et moyens de multiplier les espèces d'intérêt, soit par voie sexuée (germination), soit par voie asexuée (macrobouturage ou microbouturage),
- enfin, la cinquième est une contribution à la connaissance du développement de deux espèces de la famille, de la graine à l'état adulte.

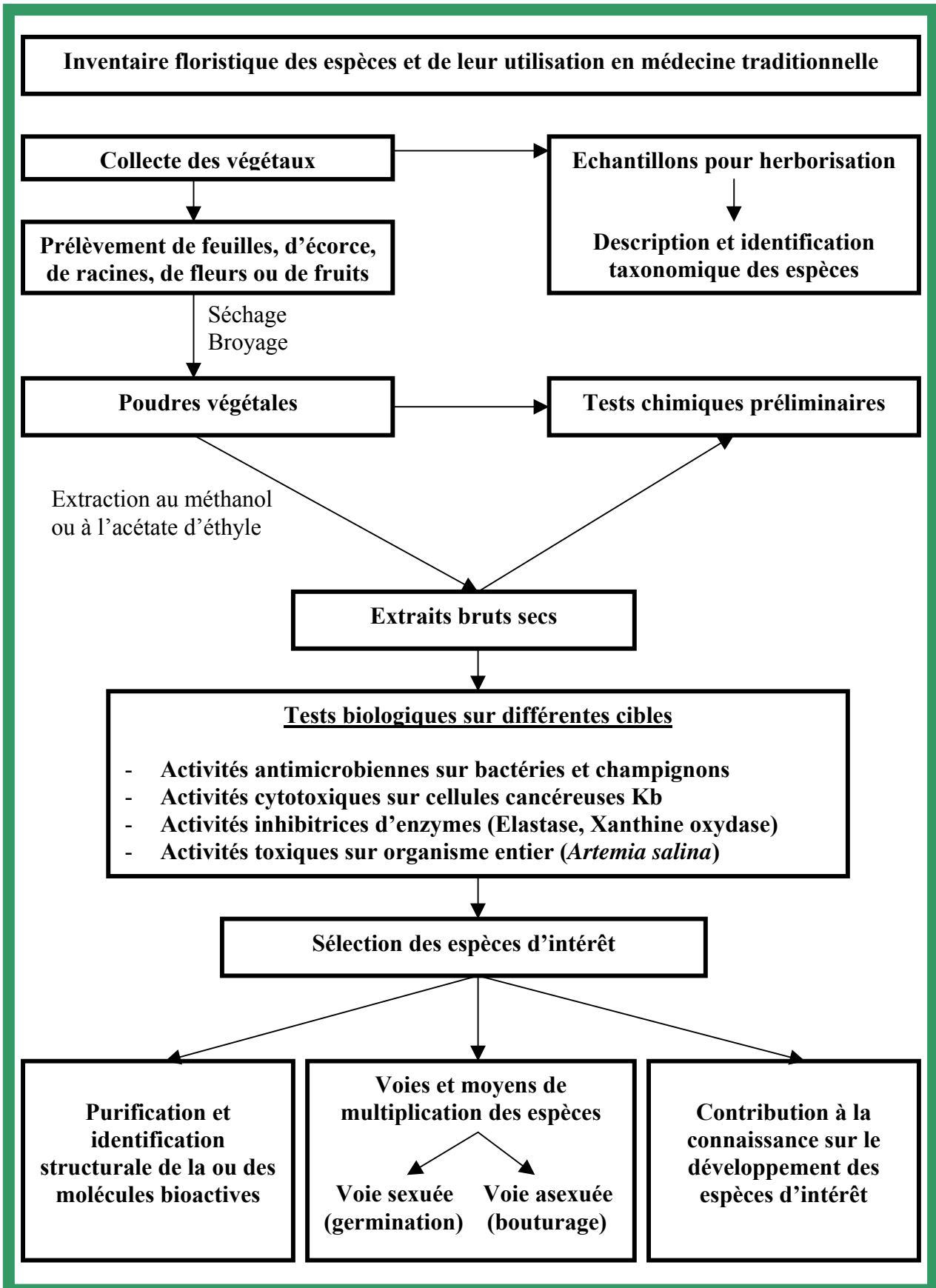


Figure 1 : Stratégie expérimentale mise en place au cours des investigations effectuées sur les espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie.

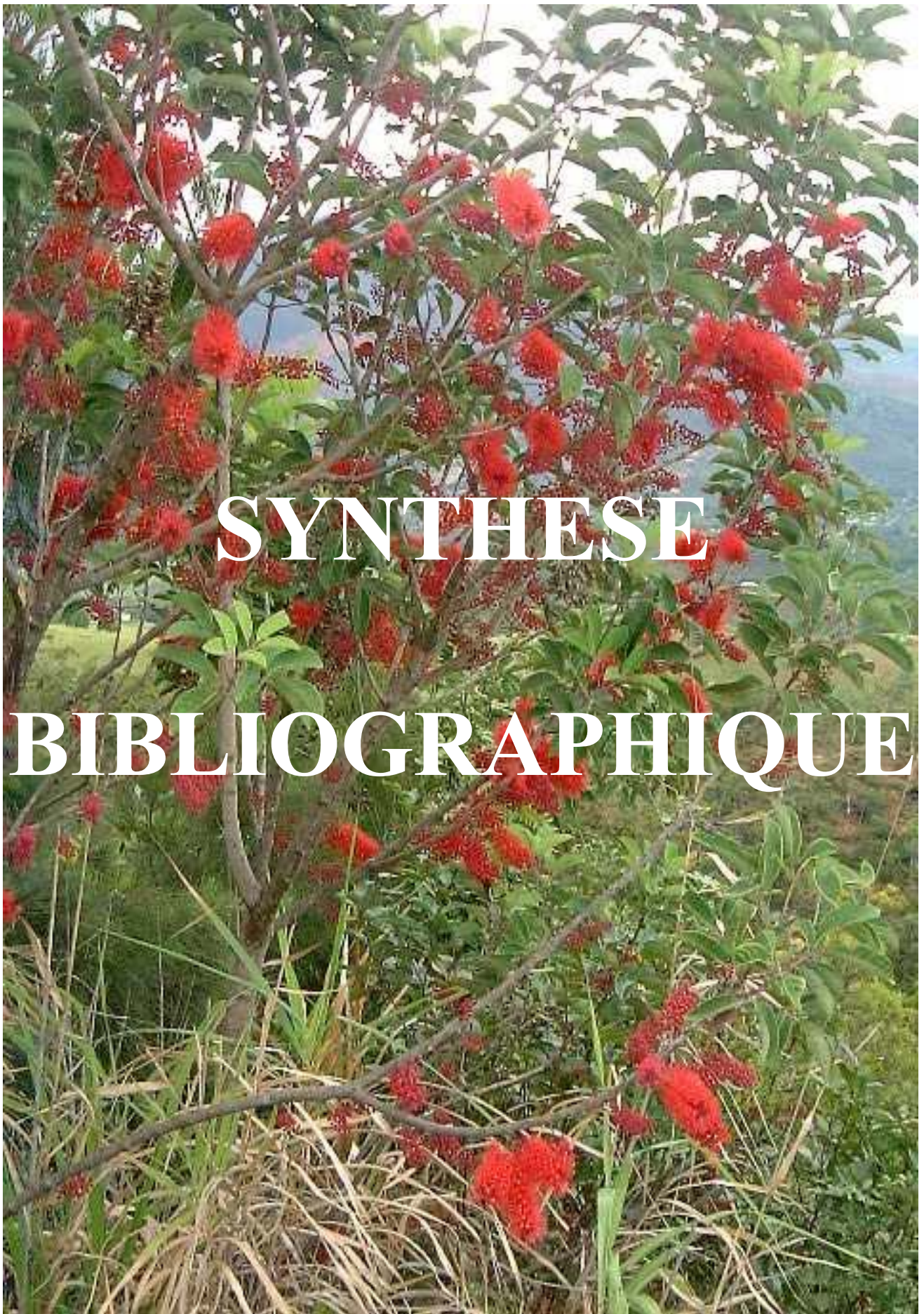


Photo de *Geissois pruinosa* (Mont Dzumac, 2001)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ La Nouvelle-Calédonie et ses dépendances

A/ Présentation générale

La Nouvelle-Calédonie est un Pays d'Outre-Mer (anciennement territoire) situé entre 19° et 23° de latitude sud, juste au-dessus du tropique du Capricorne. Cette terre française est la plus éloignée de la Métropole, puisque 23 000 Km les séparent. Elle appartient à l'arc mélanésien et se positionne entre l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Figure 2).

C'est le navigateur anglais, James Cook, qui le premier la découvrit en 1774, cependant c'est la France qui l'annexa en 1853. Elle devint Territoire d'Outre-Mer en 1946 et son évolution politique actuelle depuis la signature des Accords de Matignon-Oudinot en 1988 et ceux de Nouméa en 1998, la classe comme Pays d'Outre-Mer.

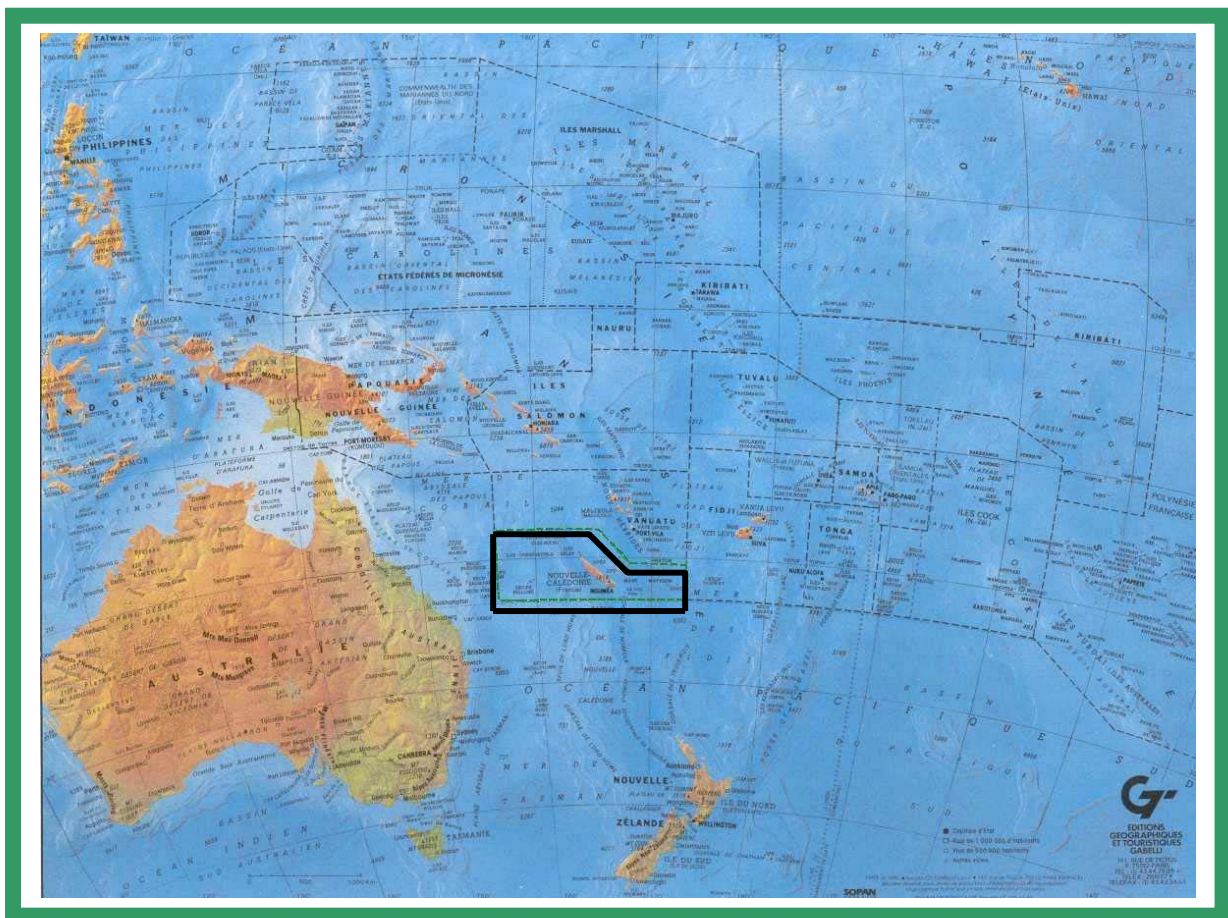


Figure 2 : Situation de la Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique Sud

« Le Territoire de Nouvelle-Calédonie et dépendances comprend : La Nouvelle-Calédonie ou Grande Terre, l'île des Pins, l'archipel des Belep, Huon et Surprise, les îles Chesterfield et les récifs Bellone, les îles Loyautés (Maré, Lifou, Tiga et Ouvéa), l'île Walpole, les îles Beautemps-Baupré et de l'Astrolabe, les îles Matthew et Fearn ou Hunter, ainsi que les îlots proches du littoral » (Art. 1 de la loi n°76.122 du 28-12-1976). Ceci lui confère une superficie totale émergée de 19100 km² à laquelle s'ajoute 1 740 000 km² de zone maritime (Figure 2).

Les zones habitées sont (Figure 3):

- la Grande Terre, qui à elle seule représente environ 17000 km². Elle s'étend sur une longueur d'environ 370 km pour une largeur d'environ 50 km. Elle est subdivisée en deux Provinces, Nord et Sud. La Province Sud et surtout le Grand Nouméa (Nouméa, Dumbéa, Païta, Mont-Dore, Tontouta) regroupe près de 68% de la population estimée à environ 200 000 en 1996 (Roos, 1997). Quant à la Province Nord, elle compte près de 40 000 habitants.
- l'Archipel des Loyautés, 1970 km² constitue la Province des Iles avec environ 20 000 habitants.



Figure 3 : Présentation générale de la Nouvelle-Calédonie.

La Nouvelle-Calédonie est une terre pluriethnique puisqu'on estime à plus de 10 le nombre d'ethnies qui y vivent en communauté, avec une prédominance des Mélanésiens (44%) et des Européens (39.2 %). On y retrouve également des Wallisiens, des Futuniens, des Tahitiens, des Indonésiens, des Vietnamiens, des ni-Vanuatu, et d'autres ethnies, provenant toutes de migrations ou de réquisitions comme main d'œuvre. Tous ces hommes et ces femmes sont à l'origine de la construction de ce « paradis » et ont décidé en commun de préparer un avenir de paix et de prospérité pour leurs enfants.

B/ Evolution géologique de ce Pays d'Outre-Mer et types de sols le composant

La position actuelle de la Nouvelle-Calédonie fait suite à une lente évolution géologique qui confère à ce territoire de nombreuses particularités tant au niveau de ses sols qu'au niveau de la richesse de sa faune et de sa flore. Elle s'est séparée dans un premier temps de l'Australie, il y a environ 65 millions d'années, puis a dérivé vers le nord-est pendant près de 15 millions d'années (Raven, 1980).

La Nouvelle-Calédonie, associée à la Nouvelle-Guinée et les Iles Norfolk, fait partie de l'Arc mélanésien qui a subi une première phase d'orogénèse à la fin du paléozoïque (-500 à -190 millions d'années) suivie d'une élévation au-dessus des océans. Viennent ensuite des périodes de sédimentation pendant le mésozoïque (-190 millions d'années), de métamorphisme avec une élévation partielle pendant le jurassique (-195 à -140 millions d'années), puis de nouveau des périodes de sédimentation pendant le crétacé (-140 à -65 millions d'années) et l'éocène (-55 à -37 millions d'années). C'est à la fin de l'éocène que débute l'orogénèse alpine qui aboutira à la formation de la chaîne de montagnes centrale de la Grande Terre et à la mise en place d'un important manteau de roches ultrabasiques, de plus de deux kilomètres d'épaisseur ; ce manteau provient d'un copeau de lithosphère charrié depuis le nord-est de la Grande Terre (Brooks, 1987). Ce copeau aurait probablement recouvert la quasi-totalité du territoire avant d'être réduit par l'érosion (Guillon, 1975) à sa surface actuelle (5500 km²) ; c'est ainsi que près d'un tiers de la surface de la Nouvelle-Calédonie (Jaffré *et al.*, 1987) se trouve répartie sous forme de massifs ultrabasiques discontinus dont un très large, le Grand massif du Sud (Figure 4).

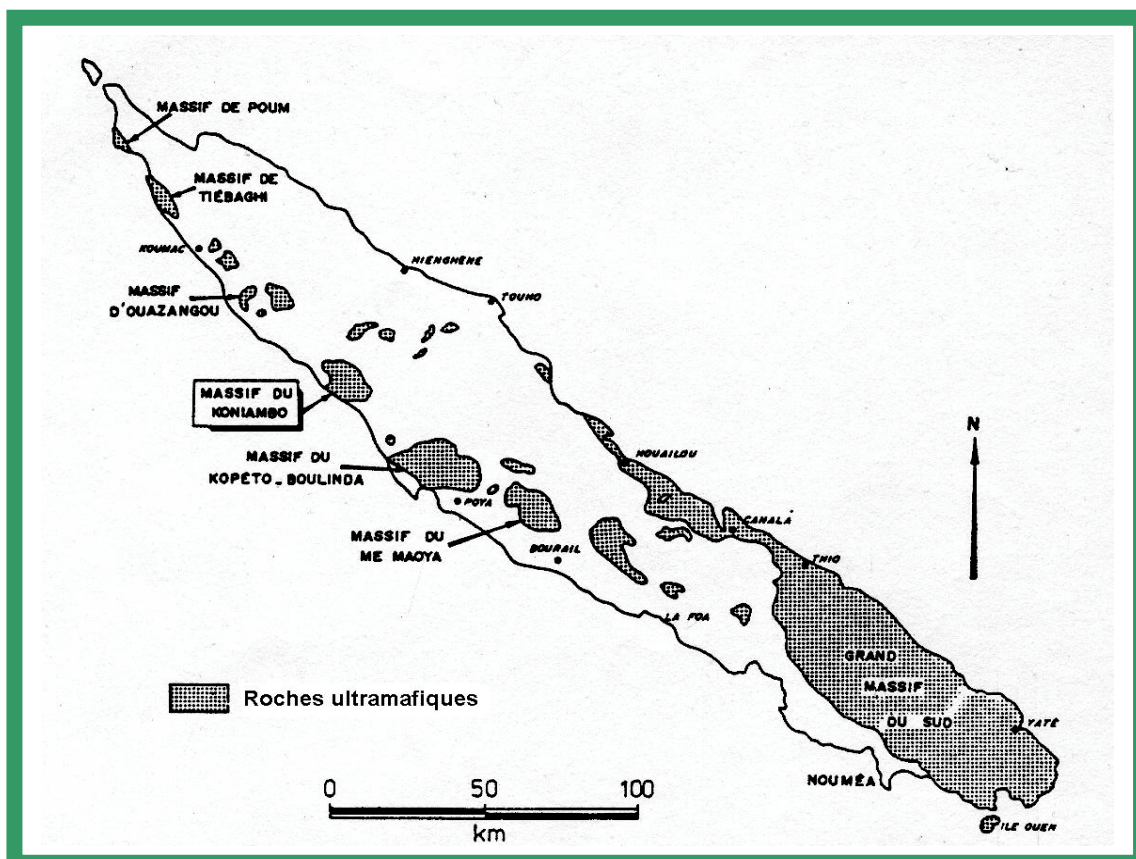


Figure 4 : Répartition des massifs de roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie (d'après Jaffré *et al.*, 1987)

Cette étape importante de son histoire géologique a eu pour effet de confronter les espèces végétales s'y développant à de nouvelles contraintes auxquelles elles ont dû faire face. Cette nécessité d'adaptation a très certainement marqué l'évolution de la flore néo-calédonienne qui présente aujourd'hui un taux d'endémicité de plus de 90% sur ce type de sols (98% dans le cas des espèces qui y sont strictement inféodées) (Jaffré *et al.*, 1987). Ces végétaux croissent sur des sols, surnommés maquis miniers, dont la composition chimique est caractéristique des sols serpentiniques, à savoir une forte toxicité métallique due à une concentration importante en éléments sidérophiles (Fe, Cr, Ni, Co, Mn et le Magnésium qui caractérise son côté hypermagnésien), ainsi qu'une faible teneur en matière organique et en éléments nutritifs tels que N, P, Ca et K. Les teneurs en métaux peuvent excéder 80%, cependant seule une faible partie est accessible sous forme extractible et est susceptible d'être toxique. Ainsi les teneurs extractibles en Ni, Co et Fe varient de 1 à 100 ppm (Brooks, 1987). A ceci s'ajoute une faible rétention en eau de ces sols du fait de leur nature poreuse.

Les péridotites (roches ultrabasiqes) ont été sujettes aux processus d'altérations dus aux eaux de pluies, aux modifications de pH et aux variations climatiques. En effet, l'hydrolyse des silicates primaires qui les composent provoque la libération de silice, de magnésie (éléments solubles rapidement emportés vers le fond), de fer (qui s'oxyde rapidement en oxyde ferrique insoluble transporté mécaniquement vers les zones basses) et d'éléments mineurs (le chrome, le nickel, l'aluminium, qui se concentrent dans les parties basses, le manganèse et le cobalt, qui s'oxydent et restent dans la partie moyenne). L'ensemble de ces phénomènes conduit à un profil type d'altération qui peut varier en fonction de la roche mère, du degré d'altération et de l'érosion. Celui-ci se décompose de la manière suivante du bas vers le haut (Figure 5 ; Pelletier, 1990):

- la roche mère constituée de péridotites dont la structure est conservée car pas ou peu altérée
- les saprolites qui sont des péridotites partiellement altérées dans lesquelles la structure de la roche mère est encore parfaitement reconnaissable, elles sont enrichies en produits nickelifères
- les latérites qui correspondent à une altération plus avancée des péridotites. La structure de la roche mère n'est plus visible, les principaux constituants sont des hydroxydes de fer plus ou moins cristallisés en goethite. On y retrouve des latérites jaunes puis rouges de bas en haut
- la partie supérieure qui correspond au résultat ultime de l'altération est une cuirasse constituée de goethite bien cristallisée et d'un peu d'hématite. C'est cette partie qu'un grand nombre d'êtres vivants ont colonisée et qui forme le « top-soil ». Celui-ci abrite des végétaux, des animaux et des micro-organismes contribuant à la dégradation de la matière organique morte et au recyclage des nutriments.

Les roches ultramafiques, du fait de leurs caractéristiques physiques et chimiques ont contribué à l'enrichissement et à la diversification de groupes d'êtres vivants qui se sont adaptés à la vie sur sols pauvres et parfois toxiques. (Jaffré *et al.*, 1987).

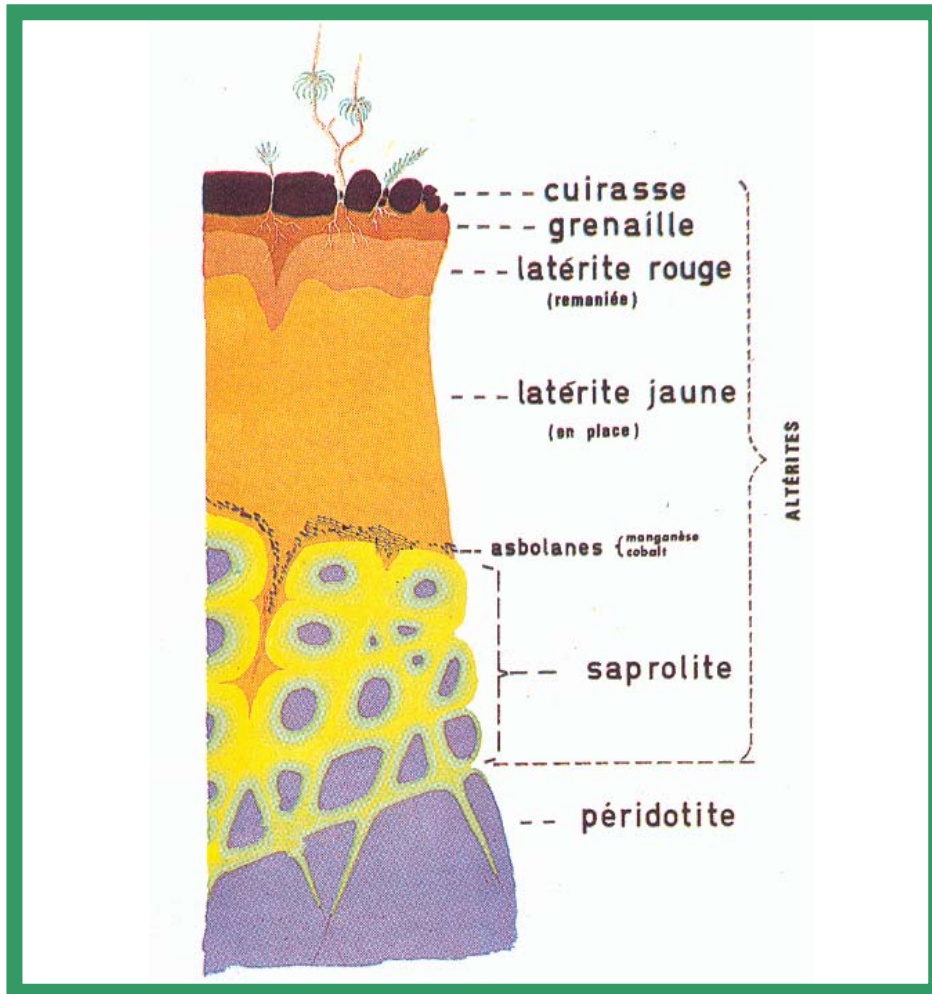


Figure 5 : Profil d'altération des péridotites en Nouvelle-Calédonie (d'après Pelletier, 1990)

C/ Eléments généraux du climat (Figure 6)

La Nouvelle-Calédonie située dans une zone intertropicale bénéficie d'un climat de type « tropical océanique ». L'année peut être subdivisée en quatre saisons, à savoir une saison chaude allant de mi-novembre à mi-avril, une saison de transition de mi-avril à mi-mai, une saison fraîche de mi-juin à mi-septembre suivie d'une saison de transition de mi-septembre à mi-novembre (Service météorologique de Nouvelle-Calédonie et dépendances, 1981). Chacune de ces saisons est caractérisée par des pluviométries et des températures différentes.

- Durant la saison chaude, de nombreuses perturbations tropicales (dépressions ou cyclones) peuvent affecter le territoire et sont à l'origine de fortes pluies faisant de cette saison la plus arrosée. Les périodes de beau temps sont quant à elles dues à la présence de l'anticyclone de la mer de Tasman. Le maximum de température est atteint durant le mois de février (entre 25°8 et 29°C en moyenne, certaines régions passent au-dessus de la barre des 35°C).
- La saison de transition allant de mi-avril à mi-mai voit la pluviosité et la température diminuer.

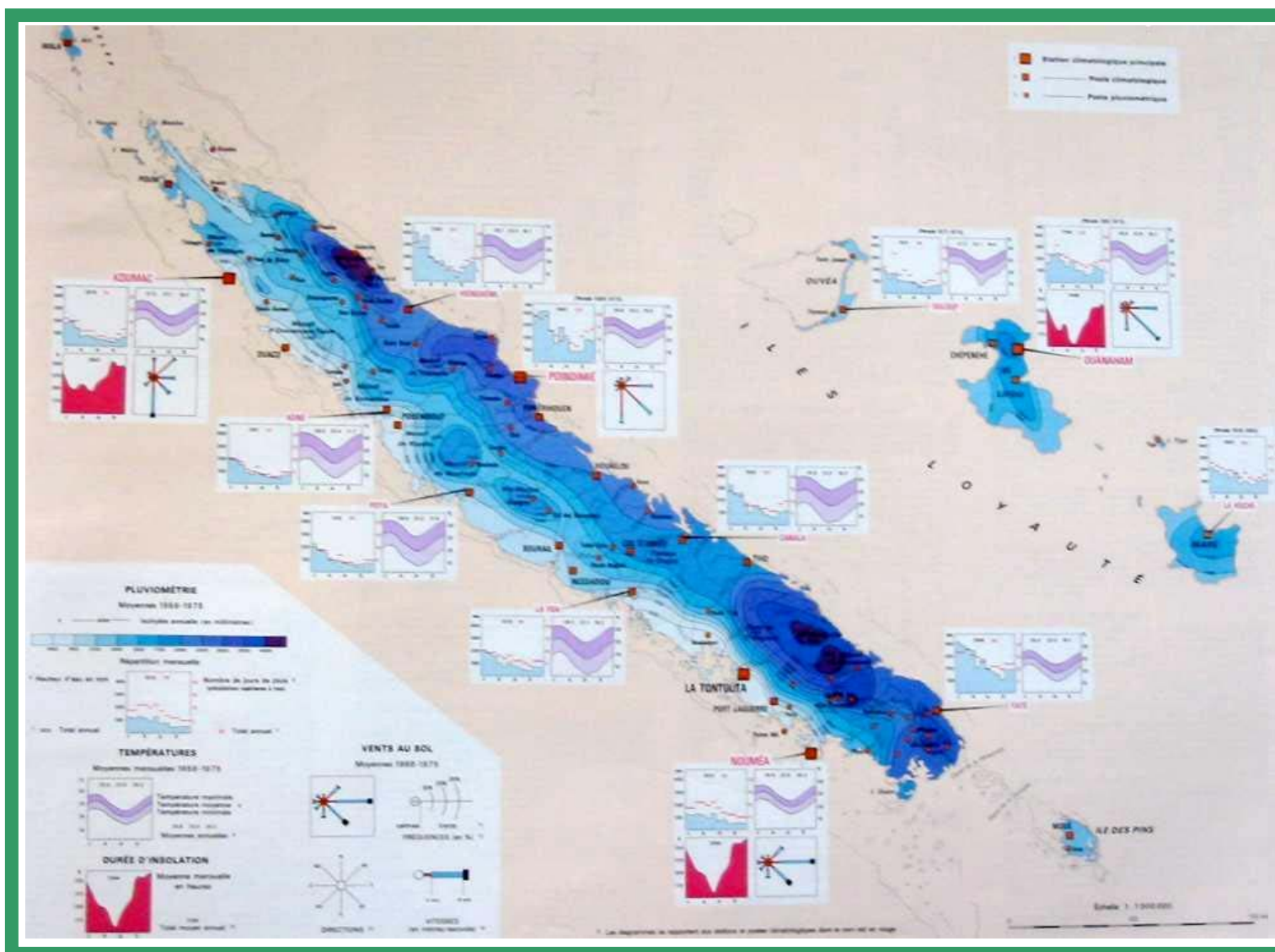


Figure 6 : Eléments généraux du climat : Pluviométrie, Températures, Durée d'insolation, Vents au sol (d'après Atlas de la Nouvelle-Calédonie, 1981, O.R.S.T.O.M., Paris).

- La saison fraîche est due au passage de fronts froids associés aux perturbations polaires qui circulent d'ouest en est et qui apportent du mauvais temps avec du vent d'ouest parfois violent. Là encore la présence d'anticyclones permet le retour de périodes de calme. Cette saison est plus ou moins pluvieuse et la température minimale est atteinte soit au mois de juillet, soit au mois d'août (entre 16°3 et 20°3 en moyenne, certaines régions passent sous la barre des 10°C).
- La saison de transition de mi-septembre à mi-novembre ou « belle saison » est en général la plus belle période de l'année.

Mais en Nouvelle-Calédonie, de nombreuses irrégularités de climat rendent difficile le report d'une année sur l'autre des chiffres de pluviométrie. En effet, celle-ci reste dépendante du passage des dépressions et cyclones qui soit passent à proximité du territoire, soit à des distances éloignées. Même pendant les périodes de transition qui sont considérées comme les plus calmes, des événements ponctuels surviennent, comme durant le mois d'octobre 2001 où Nouméa et sa région ont vu 174 mm de pluie tomber en 4 heures provoquant la crue de nombreux cours d'eau et des inondations imprévisibles. Ces événements inexplicables sont souvent associés aux phénomènes d'El Niño et de la Niña qui jouent un rôle non négligeable dans l'équilibre climatique mondial.

Malgré tout, certaines constantes sont observées, comme la répartition géographique de la pluviométrie. L'orientation de l'île et la présence excentrée de la chaîne montagneuse centrale étendue sur toute la longueur de l'île, créent un déséquilibre est-ouest. La côte Est possédant une bande littorale plus étroite et exposée aux vents dominants reçoit deux fois plus de pluie que la côte Ouest. Les massifs montagneux dont l'altitude avoisine les 1000 mètres avec cinq sommets excédant les 1500 mètres, sont pour leur part les plus arrosés avec plus de 3000 mm de pluie par an. Les plaines basses littorales abritées par ces massifs ont la pluviométrie la plus basse avec 1000 mm par an. L'extrême sud, en particulier la plaine des lacs, vaste plateau ouvert aux alizés et bordé par des falaises escarpées, est aussi très arrosé.

La température annuelle moyenne est comprise entre 22 et 24°C. La différence entre le Nord et le Sud est faible puisque l'écart est de 2°C. Les zones d'altitudes comme le col d'Amieu voient leurs températures ne diminuer que de 0°5 par tranche de 100 mètres en saison fraîche et de 0°8 en saison chaude ; malgré tout, les températures en saison fraîche descendent sous la barre des 10°C. La différence entre les maximums de température de la saison fraîche et de la saison chaude est de 6 à 7°C sur la côte Ouest et de 5°C sur la côte Est.

L'ensoleillement est maximum durant les mois d'octobre à décembre ; à Nouméa par exemple, il représente 63 à 67% du jour contre 51% en mars et 48 % en juin, mois le moins ensoleillé (Section d'Hydrologie de l'ORSTOM et Service Territorial de la Météorologie, 1981).

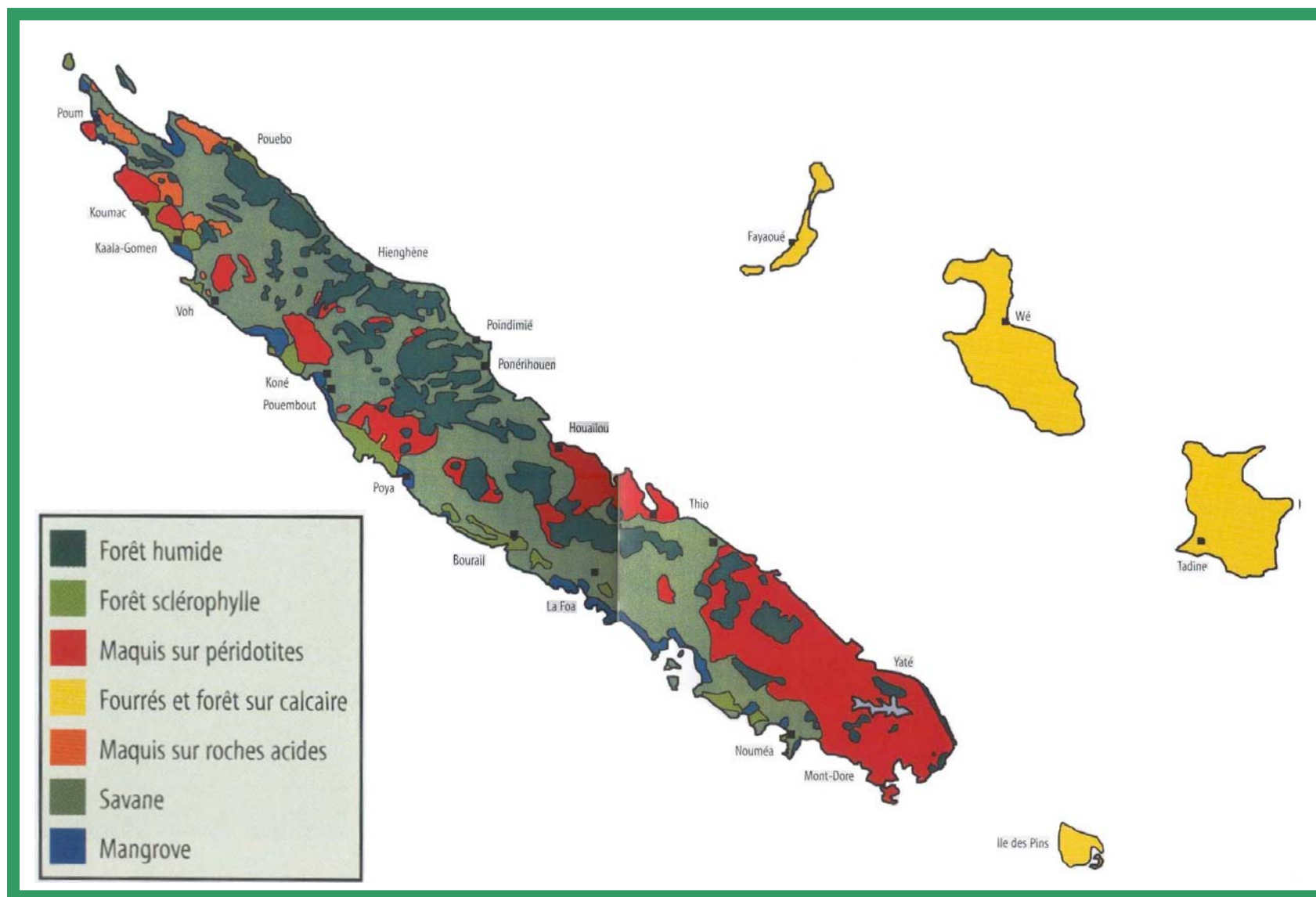


Figure 7 : La végétation de la Nouvelle-Calédonie (d'après Vallès & Estournès, 2001).

D/ La flore néo-calédonienne et son originalité

De part son isolement géographique, il y a environ 65 millions d'années (Raven, 1980), son évolution géologique conduisant à une multiplicité de substrats et son climat nuancé par un relief variable, la Nouvelle-Calédonie possède une flore particulièrement riche pour sa petite superficie (Figure 7). La pression anthropique (défrichage, culture, élevage, chasse etc.) a de surcroît provoqué une modification de la végétation autochtone conduisant à la formation de fourrés secondaires et de savanes à Niaouli. Une estimation récente indique qu'il existerait 4720 espèces de plantes dont 1400 ont été introduites ou cultivées (MacKee, 1994).

D.1/ La végétation autochtone

La végétation autochtone qui recouvre près de la moitié de la Nouvelle-Calédonie est très riche. Elle est caractérisée par la présence de 3322 espèces indigènes (Morat *et al.*, 1999) représentées en majeure partie par quatre grandes familles (Myrtaceae, Rubiaceae, Orchidaceae, Euphorbiaceae) possédant entre 193 et 223 espèces chacune pour un total de 831 et par 7 autres familles de taille moyenne. Ces dernières comprennent plus de 80 espèces chacune pour un total de 631 (Poaceae, Apocynaceae, Cyperaceae, Cunoniaceae, Rutaceae, Araliaceae, Sapotaceae) (Morat, 1993). Sur les 3322 espèces considérées, 3017 sont des angiospermes, 44 des gymnospermes, et 261 des ptéridophytes. Cette grande diversité de végétaux confère à la Nouvelle-Calédonie un taux d'endémicité de 76.8% (2551 espèces endémiques), la plaçant au quatrième rang mondial derrière Hawaii, la Nouvelle-Zélande et Madagascar. Cinq familles de plantes sont reconnues comme endémiques au territoire (Amborellaceae, Oncothecaceae, Paracryphiaceae, Phellinaceae, Strasburgeriaceae) et de nombreux genres le sont également, 108 genres de phanérogames dont deux pour la famille des Cunoniaceae et 2 genres de ptéridophytes.

Toutes ces espèces sont inféodées à différents types de milieux (Morat *et al.*, 1981) :

- les forêts humides sempervirentes
- les forêts sclérophylles
- les maquis
- la mangrove
- la végétation palustre ou marécageuse

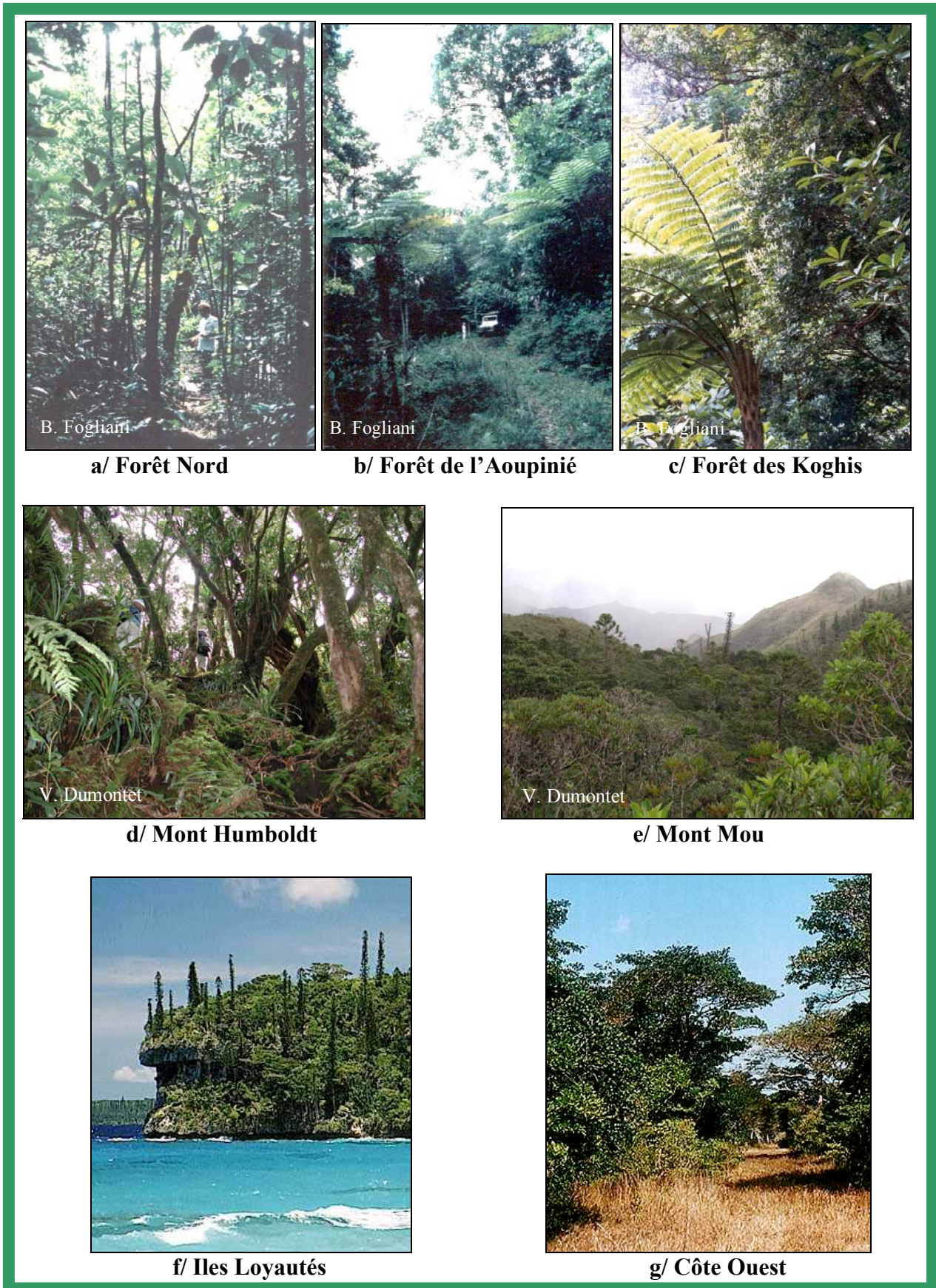


Figure 8 : Exemples de forêts de Nouvelle-Calédonie. a. Forêt dense humide de basse altitude; b, c. Forêts denses humides de moyenne altitude ; d, e. Forêts denses humides d'altitude ; f. Forêt calcaire ; g. Forêt sclérophylle.

D.1.1/ Les forêts denses humides sempervirentes

Les forêts humides sempervirentes sont subdivisées en trois groupes :

- les forêts denses humides sempervirentes de basse et moyenne altitude sur roches acides ou ultrabasiques
 - les forêts denses humides sempervirentes d'altitude sur roches acides ou ultrabasiques
 - les forêts sur calcaire.
-
- Les forêts denses humides de basse et moyenne altitude sont présentes de manière discontinue sur l'ensemble de la Grande Terre, du nord au sud le long de la chaîne centrale (Figure 8 a,b,c). Elles se développent en particulier dans les zones où la pluviométrie est comprise entre 1500 et 3500 mm par an, de préférence dans le haut des vallées et sur les pentes. On les retrouve également sur les versants ouest de certains massifs isolés (Me Maoya, forêt de la Thy, les Koghis, le Mont Mou). La strate supérieure à 10 mètres est formée par des arbres de taille plutôt modeste (taille moyenne 20 mètres), on y retrouve les principales essences comme les kaoris (*Agathis lanceolata* ou *ovata*), le houp (*Montrouziera cauliflora*), le tamanou (*Calophyllum caledonicum*), les hêtres (*Kermadecia spp.*, *Macadamia spp.*,...) mais également diverses Lauraceae, Myrtaceae, **Cunoniaceae**, etc... qui sont relayées à des altitudes supérieures à 700 mètres par des arbres plus adaptés aux sols moins profonds (*Araucaria montana*, *Metrosideros spp.* et *Eleocarpus spp.*). La strate comprise entre 1 et 10 mètres est constituée d'une grande diversité de familles (Rubiaceae, Myrsinaceae, Sapindaceae, Meliaceae, Araliaceae, Winteraceae, **Cunoniaceae**, etc.) mais on y voit également le développement de nombreux palmiers et fougères arborescentes (*Cyathea spp.*). La strate inférieure comprise entre 10 cm et 1 mètre, plus rare, est constituée d'orchidées et de fougères ainsi que des plantules des strates supérieures. Enfin la strate du sol moins riche réunit des champignons et des lichens.
 - Les forêts denses humides d'altitudes sont localisées à des altitudes supérieures à 1000 mètres et bénéficient d'une pluviométrie élevée de 3500 à 4000 mm par an. Leur couvert est discontinu et leurs strates sont peu distinctes. Les espèces s'y développant subissent des conditions climatiques particulières, couverts nuageux fréquents, températures basses inférieures à 10°C, lessivage des sols. Ceci a conduit à une sélection naturelle provoquant un appauvrissement du nombre d'espèces, c'est pourtant là que sont localisées les familles endémiques à la Nouvelle-Calédonie (Paracryphiaceae, Phellinaceae, Strasburgeriaceae). La strate supérieure est constituée d'arbres de 3 à 8 mètres recouverts d'épiphytes (orchidées, mousses, fougères). On y retrouve de nombreux gymnospermes (*Podocarpus spp.*, *Dacrydium spp.*, *Agathis montana*), ainsi que d'autres familles (Palmae, Myrtaceae, Rubiaceae, Myrsinaceae, etc.). La strate herbacée est essentiellement constituée de fougères. Dans certains cas, au sein même de ces forêts, on constate la présence de formations particulières localisées entre 1100 et 1300 mètres poussant sur des sols rocheux ou avec une cuirasse. Celles-ci possèdent une flore pauvre constituée malgré tout d'espèces comme *Metrosideros spp.*, ***Cunonia montana***, ***Weinmannia dichotoma***, ***Dacrophyllum verticilatum***, etc. dont les feuilles, les rameaux, les branches et les troncs sont recouverts de voiles épais d'hymenophylaceae, de lichens ou de bryophytes. Ces formations ne se retrouvent que sur des massifs péridotitiques (Me Maoya, Kouakoué, Boulinda, Mont Humboldt, Mont Mou) (Figure 8 d,e).

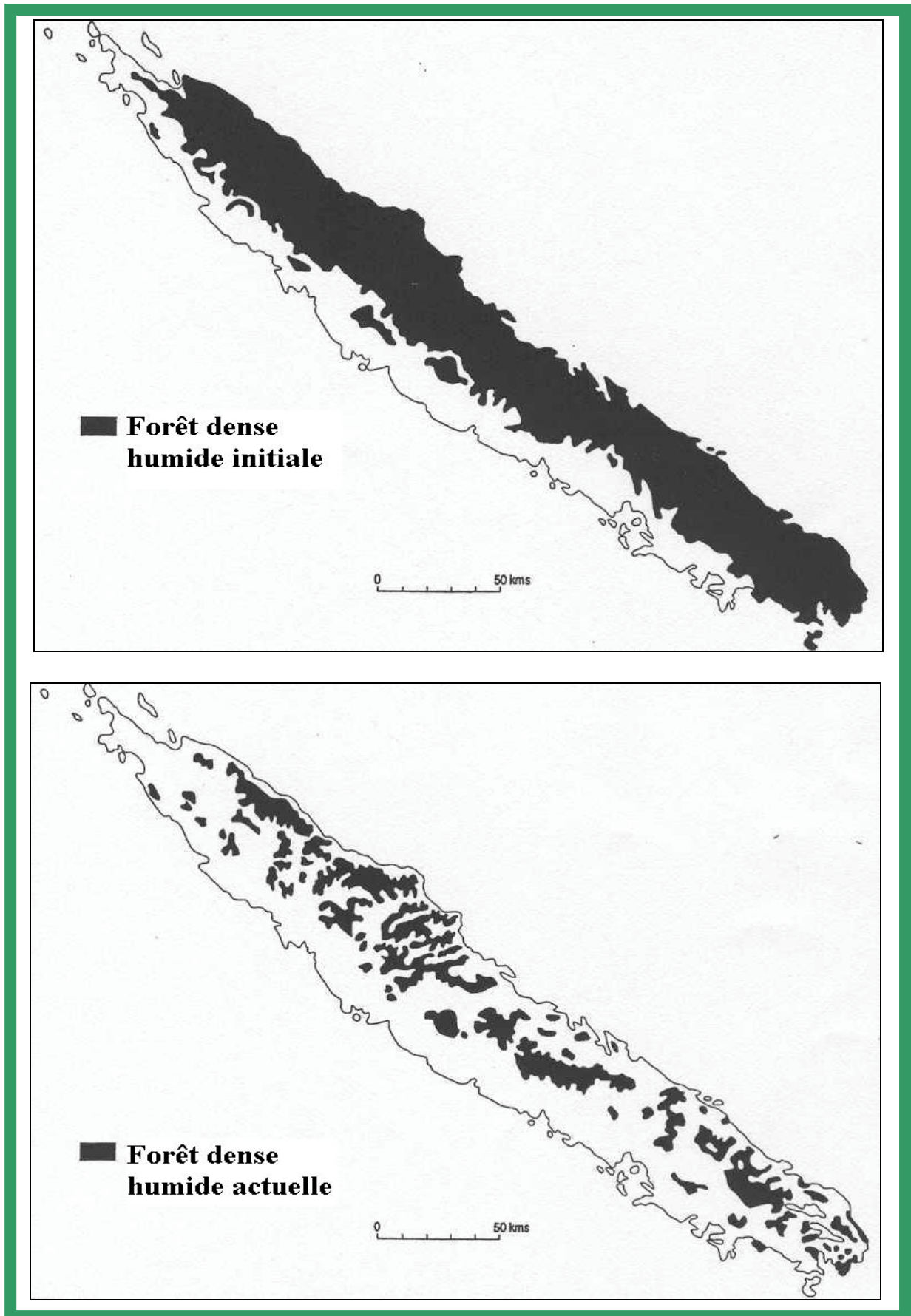


Figure 9 : Régression de la forêt dense humide depuis l'arrivée de l'homme (d'après Morat *et al.*, 1999).

- Les forêts sempervirentes sur calcaire sont localisées aux îles Loyautés, à l'île des Pins, à Poya, Hienghène, Gomen, Bourail et Koumac sur d'anciens récifs coralliens surélevés. Elles reçoivent entre 1300 et 1800 mm de pluie par an et leur architecture particulière présentent des cavités permettant le maintien d'une humidité importante pour le développement des espèces végétales. On y retrouve une strate arborée homogène constituée d'arbres de 20 mètres environ (*Mimusops spp.*, *Albizia spp.*, *Syzygium spp.*, *Intsia bijuga* ou Kohus, *Manilkara sp.* ou Bounis), une strate arbustive de 1 à 10 mètres regroupant différentes espèces (*Diospyros spp.*, *Bischofia javanica*, etc.) et une strate herbacée discontinue du fait de l'architecture du milieu. Le long du littoral, on constate la présence de nombreux Pandanus ainsi que d'*Araucaria* au nombre de 13 en Nouvelle-Calédonie contre 19 dans le monde et en particulier de pins colonnaires (*Araucaria columnaris*) (Figure 8f).

On estime que les forêts sempervirentes humides couvrent 20.9% du territoire soit près de 3560 km² (C.T.F.T., 1975), et qu'à l'origine, elles représentaient 75% de cette surface (Figure 9). Le taux d'endémicité y est estimé à 82.4% réparti en 1659 espèces, 484 genres et 132 familles (Jaffré *et al.*, 1994), mais surtout elles renferment 2011 espèces soit 58% des espèces totales (Morat *et al.*, 1999).

D.1.2/ La forêt sèche ou forêt sclérophylle

Celle-ci ne représente plus que 2.3% de la surface de la grande terre soit 350 km² (C.T.F.T., 1975) alors qu'on estime qu'elle occupait 1/3 de cette surface avant l'arrivée de l'homme (Figure 10). Elle est située sur la côte Ouest entre 0 et 300 mètres d'altitude avec un ensoleillement important et ne reçoit que 1100 mm de pluie par an. Les végétaux qui la constituent sont de taille modeste et sont adaptés à ces conditions de sécheresse puisqu'ils sont formés de feuilles coriaces, vernissées et petites qui réduisent au maximum la transpiration. Leurs racines se développent tant en surface pour le captage de l'eau de pluie qu'en profondeur vers les nappes phréatiques. L'endémicité de ces forêts en danger sous la pression de l'homme est estimée à 56.9% représentée par 233 espèces, alors qu'elle ne renferme que 13% des espèces totales (Morat *et al.*, 1999), soit 409 espèces réparties en 246 genres et 91 familles (Jaffré *et al.*, 1994).

La strate supérieure de 5 à 7 mètres est essentiellement constituée de gaïacs (*Acacia spirorbis*) associés à des espèces sclérophylles du genre *Gardenia*, *Pittosporum*, etc. La strate moyenne plus riche est constituée d'espèces comme *Codia montana*, *Styphelia symbulæ*, etc. Enfin la strate herbacée est représentée par des graminées et des cypéracées. (Figure 8g).

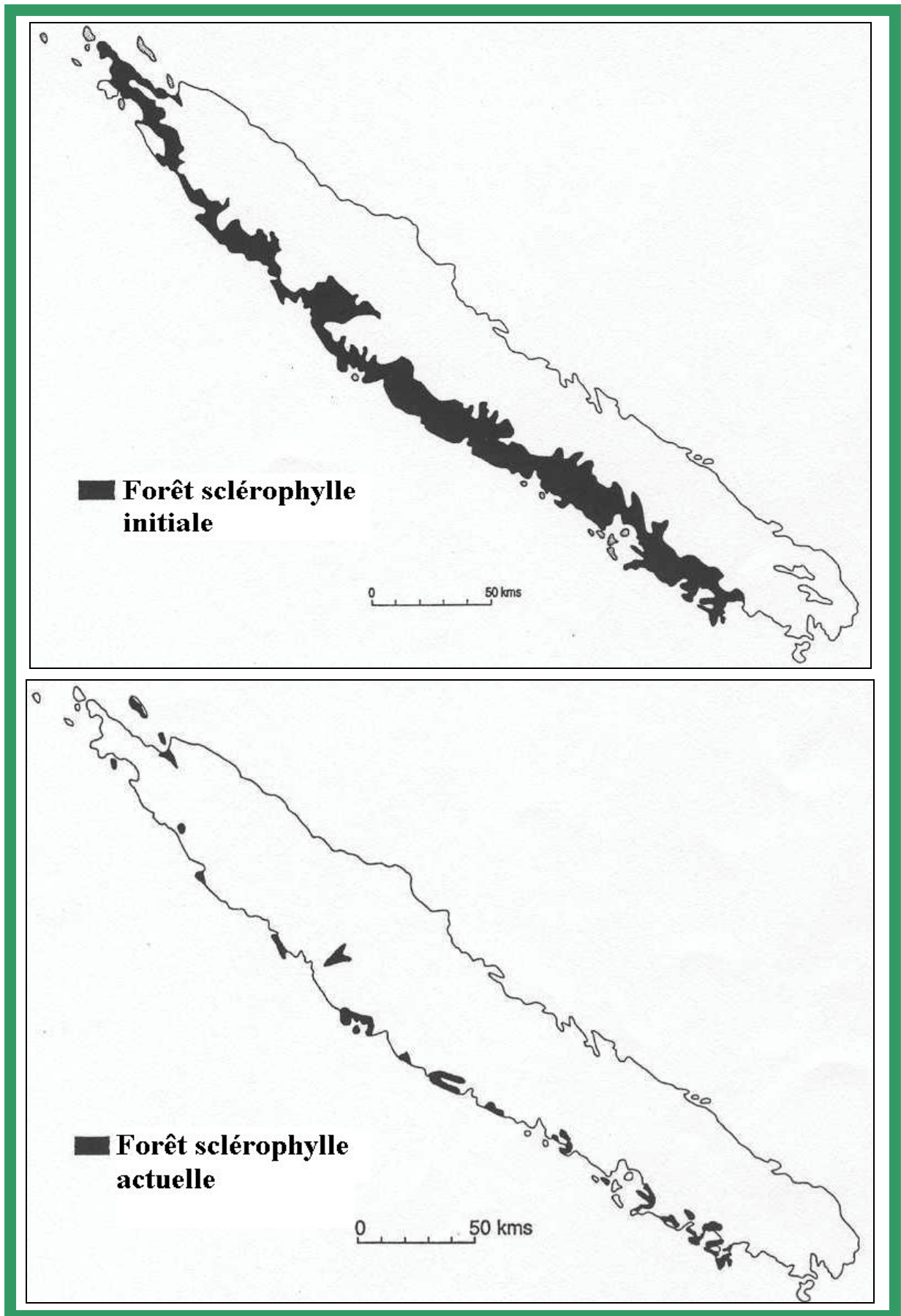


Figure 10 : Régression de la forêt sclérophylle depuis l'arrivée de l'homme (d'après Morat *et al.*, 1999).

D.1.3/ Les maquis

Les maquis sont des formations sclérophylles sempervirentes présentant des structures floristiques variables en fonction du type de sol. Il en existe deux types :

- les maquis sur roches ultrabasiques
- les maquis sur roches acides.

Ces deux types de maquis sont arrosés par 900 à 4000 mm de pluie par an et subissent un fort ensoleillement. Ils se retrouvent tant en bord de mer que sur des sommets (Kouakoué, Humboldt), sur les deux versants de la Grande Terre et sur certaines îles (îles Belep, île des Pins) (Morat *et al.*, 1981). On considère que les maquis miniers sont des formations secondaires apparues après la destruction de forêts denses humides.

D.1.3.1/ Les maquis sur roches ultrabasiques

Ces maquis appelés communément « maquis miniers » recouvrent environ 4500 km². Ce sont des formations sclérophylles sempervirentes héliophiles, arbustives plus ou moins buissonnantes ou ligno-herbacées à strate cypéracéenne dense. Elles peuvent être dominées localement par une strate lâche d'*Araucaria spp.* ou d'*Agathis ovata* (Morat *et al.*, 1986).

La composition chimique de ces sols est caractérisée par une pauvreté en calcium, aluminium, phosphate, potassium, par une richesse en fer et magnésium, ainsi que par des teneurs élevées en certains métaux lourds comme le chrome, le nickel, le cobalt et le manganèse (Brooks, 1987). Ceci rend incompatible le développement de nombreuses espèces végétales mal adaptées à ces milieux particuliers. Ces conditions extrêmes défavorables à la nutrition minérale (Jaffré, 1976) participent au faible dynamisme des maquis miniers ce qui se traduit par une croissance lente des plantes.

Leur flore est constituée de 944 espèces (soit 30% des espèces autochtones) réparties en 282 genres (soit 36% des genres autochtones) et 77 familles. Le taux d'endémicité y est estimé à 93% ce qui reflète de manière nette la richesse de ces milieux (Morat *et al.*, 1986).

Il est à noter qu'à la grande diversité florale de ces milieux, s'ajouterait une grande diversité microbienne (Amir & Pineau, 2001). En effet, Saintpierre (2001) a pu montrer l'originalité d'une vingtaine de souches d'actinomycètes considérées comme nouvelles, (Saintpierre *et al.*, 2001).

On distingue deux types de maquis sur roches ultrabasiques, ceux de basse et moyenne altitude et ceux d'altitude.

- Les maquis de basse et moyenne altitude (Figure 11 a,b) sont constitués généralement de plantes de petite taille (moins de 2.50 mètres). La strate ligneuse est dominée par certaines familles (Myrtaceae, **Cunoniaceae**, Dilleniaceae, Epacridaceae, Proteaceae, Casuarinaceae) dont les espèces possèdent des feuilles coriaces vernissées fréquemment groupées en rosette à l'extrémité des rameaux. Ces espèces sont le plus souvent endémiques à ces terrains. La strate herbacée est essentiellement constituée de Cyperaceae mais l'on y trouve également des fougères, des orchidées et des plantes carnivores (*Drosera spp.*, *Nepenthes spp.*). La strate du sol est quant à elle composée de lichen et de champignons. Différentes structures sont observées sur ces milieux en fonction de la nature du sol. Les groupements arbustifs sont des fourrées plus ou moins denses où la strate cypéracéenne est peu fournie ; les sols sont bruns hypermagnésiens ou ferrallitiques

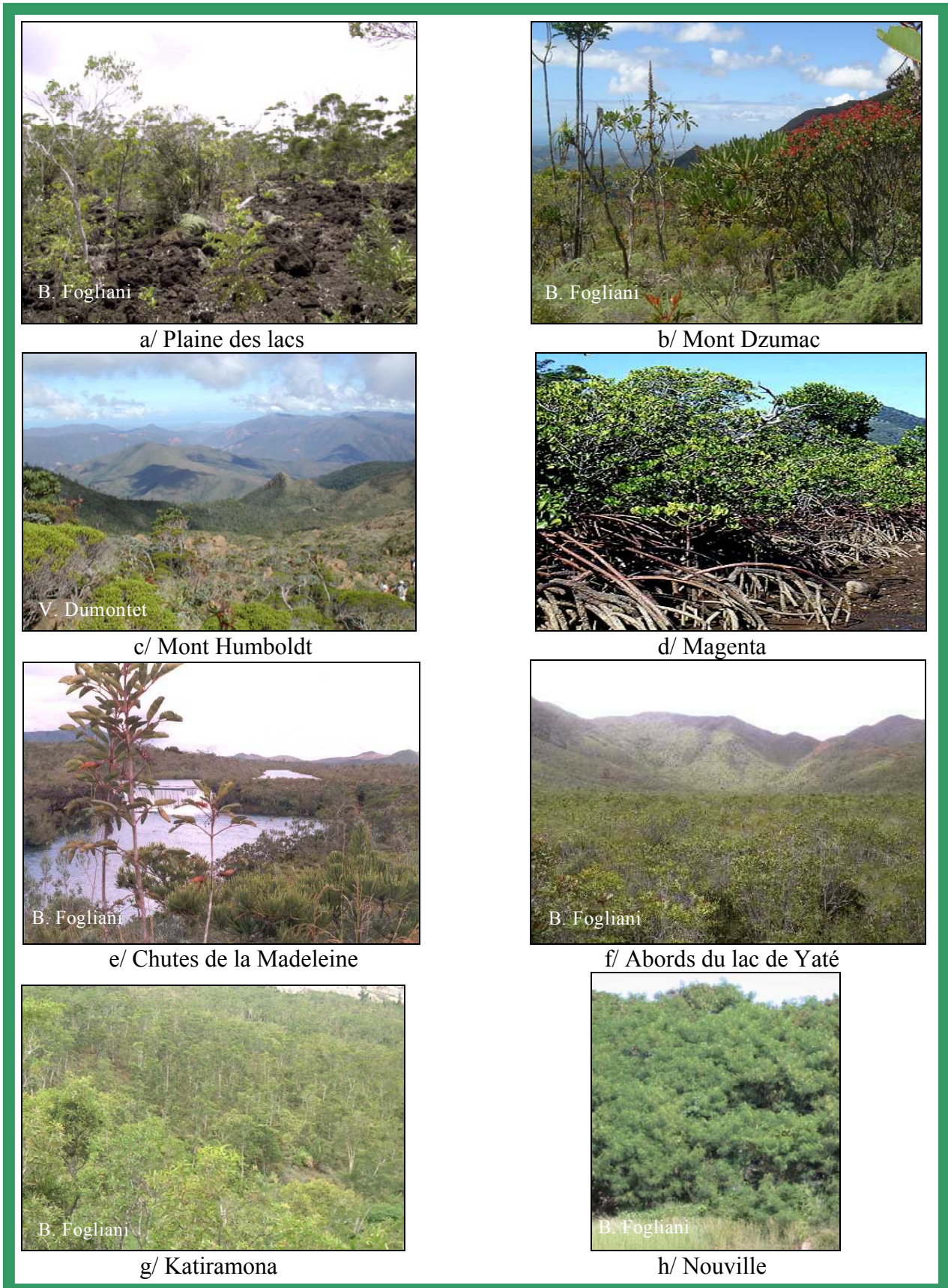


Figure 11 : Exemple de végétations de la Nouvelle-Calédonie. a, b. Maquis de basse et moyenne altitude ; c. Maquis d'altitude ; d. Mangrove ; e,f. Zone palustre ou marécageuse ; g. Savane à Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) ; h. Fourrés de faux mimosa (*Leucaena leucocephala*).

oxydiques très érodés en pente et se retrouvent à la base des massifs. Les groupements buissonnants dont la strate est discontinue sont constitués d'arbrisseaux et de buissons qui se développent sur les sols ferrallitiques gravillonnaires ou sur des plateaux de cuirasses. Les groupements ligno-herbacés possèdent une strate cypéracéenne très abondante et croissent sur des sols ferrallitiques remaniés par l'érosion ou le colluvionnement en situation de piedmont. Enfin, dans des conditions particulières, d'autres structures apparaissent comme des strates lâches d'*Araucaria* (*Araucaria montana* sur le Koniambo) ou encore le développement en taille d'une espèce par ailleurs arbustive (*Dacrydium araucarioides* dans le massif du Sud).

- Les maquis d'altitude situés à des altitudes de plus de 1200 mètres sont représentés par le sommet du mont Humboldt et du Kouakoué situés dans le massif du sud (Figure 11c). Leur physionomie est proche de celle des maquis de basse et moyenne altitude à ceci près que les espèces possèdent des feuilles, petites, velues imbriquées de façon très serrée adaptées aux conditions altimontaines. On y retrouve des espèces particulières comme *Cunonia bullata*, *Cunonia rotundifolia*, *Pancheria engleriana*, *Metrosideros humboltdiensis*, *Quintinia oreophila*, etc. La strate herbacée est là encore constituée essentiellement de *Cyperaceae* avec quelques orchidées.

D.1.3.2/ Les maquis sur roches acides

Ces maquis sont surtout localisés dans le nord de la grande terre, ils possèdent une architecture proche des maquis miniers (strate arbustive de 1.5 mètres) mais leur diversité floristique est moindre. On y trouve essentiellement deux espèces ligneuses : le niaouli ou *Melaleuca quinquenervia* et *Codia montana*. La strate herbacée est composée de *Costularia arundinacea*, de quelques fougères.

D.1.4/ La mangrove (Figure 11d)

Celle-ci couvre une superficie totale de 200 km² soit 1.6% du territoire. Elle est plus développée sur la côte Ouest de la Grande Terre où les conditions lui sont plus favorables, mais on la retrouve néanmoins sur la côte Est ainsi qu'à l'île des Pins, aux Loyautés et aux Beleps. Elle est constituée d'une vingtaine d'espèces non endémiques (*Rhizophora spp.*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Ceriops tagal*, etc.). Leur répartition de la mer à la terre est étagée en fonction de leur tolérance au sel. Des graminées halophiles constituent l'intermédiaire entre la forêt de palétuviers et la terre.

D.1.5/ La végétation palustre ou marécageuse

On estime qu'il existe peu d'eaux dormantes en Nouvelle-Calédonie, malgré tout on retrouve sur la côte Ouest et en particulier dans la région de Bourail quelques marais dont l'organisation végétale est classique des régions tropicales. Au niveau de la Plaine des lacs dans le Grand Sud, des formations marécageuses sur roches ultrabasiqes apparaissent pendant la saison des pluies et persistent une bonne partie de l'année, la végétation qui s'y développe est constituée d'une strate herbacée formée essentiellement de *Cyperaceae* et de *Xyridaceae* et d'une strate arbustive formée d'espèces de type rupicole comme *Pancheria communis*, *Cunonia deplanchei*, *Baekkea ericoides*, etc. En bordure de cours d'eau (Creek Pernod, Cascade de Goro, etc.) des espèces comme *Cunonia purpurea*, *Melaleuca brongniartii*, *Decussocarpus minor*, etc. colonisent le milieu (Figure 11 e,f).

D.2/ La végétation modifiée

La pression anthropique, par l'exploitation agricole (défrichage, feu etc.), minière et forestière, a conduit à l'apparition d'une végétation secondaire essentiellement dans les zones dont l'altitude ne dépasse pas 1000 mètres. Les forêts et maquis d'altitude sont donc encore épargnés. Au contraire les forêts humides ou sèches de basse et moyenne altitude ont été dégradées et ont laissé place à des forêts secondaires, à des savanes ou encore à des fourrés.

- Les forêts secondaires sont caractérisées par le développement d'une ou plusieurs espèces dominantes, on retrouve par exemple des forêts de Kaoris (*Agathis lanceolata*), de fougères arborescentes (*Cyathea spp.* et *Dicksonia spp.*) et des invasions d'espèces très colonisatrices comme *Duboisia myoporoides*, le goyavier (*Psidium guajava*), le lantana (*Lantana camara*), le faux mimosa (*Leucaena leucocephala*), le cassis (*Acacia larnesiana*).
- Les savanes ne se retrouvent qu'en dehors des massifs ultrabasiques et apparaissent après un défrichage et une destruction répétée par les feux. Elles occupent actuellement 40% de la surface du territoire, l'endémisme y est faible (6%) et elles sont composées de près de 129 espèces végétales. Ce sont de grandes étendues herbeuses, dont la strate herbacée est essentiellement constituée de graminées, parsemées d'arbres, arbustes ou buissons qui poussent entre 0 et 700 mètres surtout au niveau de la côte Ouest. L'espèce ligneuse la plus répandue est le niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) (Figure 11g) mais on retrouve également du gaïac (*Acacia spirorbis*) souvent accompagné de *Casuarina collina*.
- Les fourrés apparaissent après la savane et sont caractérisés par une végétation basse dense et fermée, difficilement pénétrable. On distingue les fourrés à goyavier et lantana, les fourrés à «faux mimosa » (Figure 11h) et les fourrés à gaïac.

Les maquis ultrabasiques ont subi la pression de l'exploitation minière et la destruction par les feux, malheureusement ces sols peu favorables au développement des végétaux ont beaucoup de mal à retrouver une végétation florissante. Seules quelques espèces de fougères (fougère aigle : *Pteridium esculentum*) et des *Cyperaceae* s'y réinstallent plus rapidement. De nombreux essais de revégétalisation sont actuellement effectués tant par les organismes de recherche du territoire que par les entreprises minières elles-mêmes.

D.3/ Mesures de protection mises en place pour sauvegarder la biodiversité végétale néo-calédonienne

Diverses mesures ont été prises depuis les années 1950, à commencer par l'établissement d'une réserve naturelle intégrale à la Montagne des Sources ainsi que de réserves spéciales de flore au Mont Mou, Mont Humboldt et Mont Panié. Mais la prise de conscience réelle date des années 1990 qui ont vu la création de zones terrestres de protection de faune ou de flore au nombre de 26 (Morat *et al.*, 1999). En parallèle, de nombreuses expérimentations sont en cours de réalisation au sein de différents organismes publics et privés du territoire, pour multiplier des espèces endémiques à la Nouvelle-Calédonie et candidates à la revégétalisation, par diverses voies et moyens : germination de graines, bouturage classique mais aussi microbouturage. De nombreux projets ont d'ores et déjà pris forme et de nombreux essais de revégétalisation ont été et sont effectués (Figure 12).

La culture *in vitro*, mise en place à l'Université de la Nouvelle-Calédonie (anciennement Université Française du Pacifique) depuis 1993, devrait permettre la sauvegarde d'espèces en voie de disparition. Des programmes ont été engagés en 2001 sur deux espèces de palmiers, *Pritchardiopsis jeanneneyi* et *Lavoixia macrocarpa*, mais également sur la multiplication d'autres espèces endémiques (Cunoniaceae, fougères).

Malgré tout, il apparaît clairement que d'autres moyens préventifs et curatifs sont à mettre en place pour la conservation de la richesse tant végétale qu'animale de la Nouvelle-Calédonie. Ceci passe par une poursuite de campagnes d'inventaires, de collectes des espèces et d'acquisition de données nécessaires à la compréhension du développement de ces individus dans leur milieu d'origine. La sensibilisation de la population semble être un point fondamental à la réduction des risques de destruction par l'action de l'homme. Enfin, il paraît indispensable de créer de nouvelles zones protégées (Morat *et al.*, 1999).



Figure 12 : Maquis miniers et essais de revégétalisation en Nouvelle-Calédonie

II/ La famille des Cunoniaceae

A/ Présentation générale

La famille des Cunoniaceae constituée de 26 genres regroupant environ 300 espèces est essentiellement localisée dans l'hémisphère sud avec une aire de répartition importante en Australie, Nouvelle-Guinée et Nouvelle-Calédonie (Tableau I, figure 13). La moitié d'entre elles appartiennent au genre *Weinmannia* représenté par 155 espèces et trois autres genres sont constitués de plus de 20 espèces à savoir : *Pancheria* avec 30 espèces (endémiques à la Nouvelle-Calédonie), *Cunonia* avec 24 espèces (dont 23 en Nouvelle-Calédonie et une en Afrique du Sud) et *Geissois* avec 20 espèces (dont près de la moitié en Nouvelle-Calédonie). La plupart de ces espèces se développent en forêt tropicale humide ou en forêt tempérée avec une particularité pour celles de Nouvelle-Calédonie qui se développent également sur des maquis ouverts.

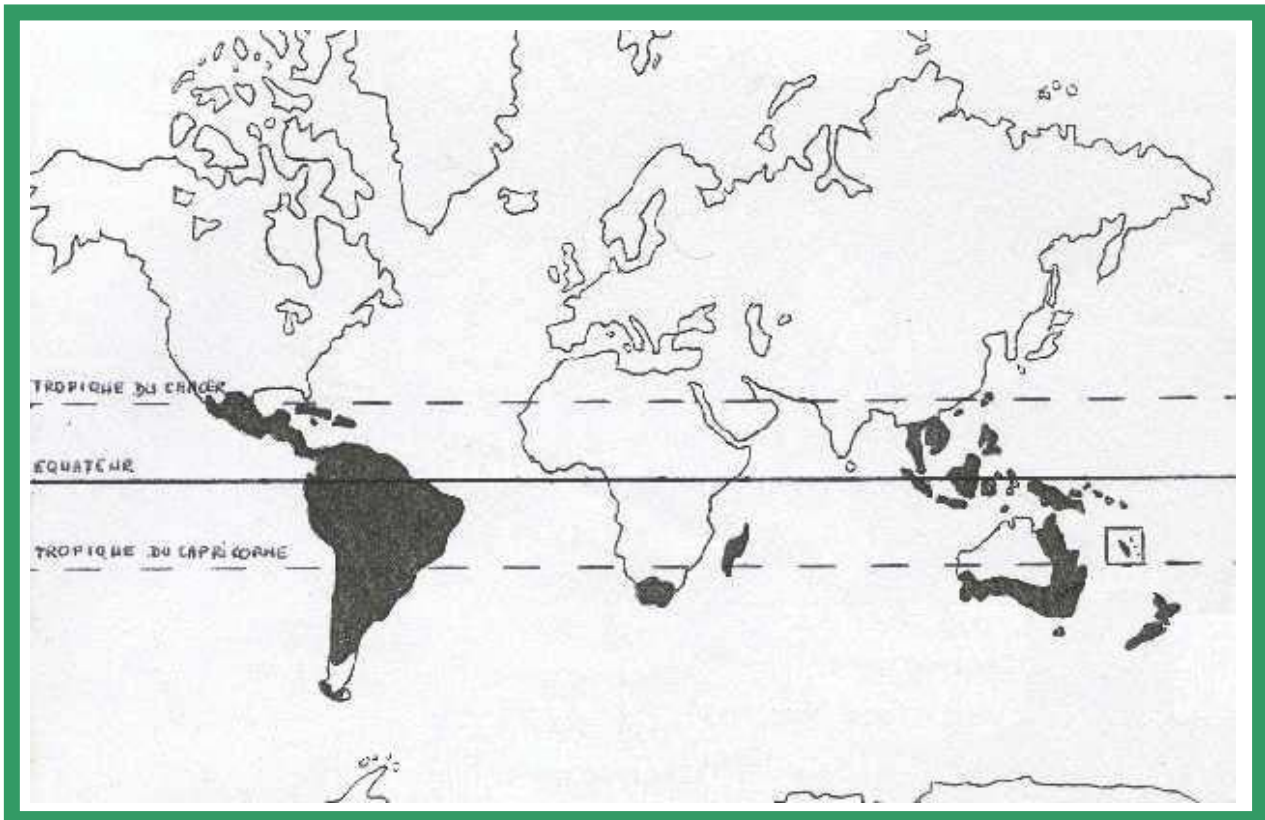


Figure 13 : Carte de répartition mondiale de la famille des Cunoniaceae (d'après Heywood, 1985)

Tableau I : Liste des différents genres de la famille des Cunoniaceae , nombre d'espèces (spp.), localisation mondiale et références bibliographiques s'y rattachant.

GENRES	spp.	DISTRIBUTION	REFERENCES
<i>Ackama</i> A. Cunn.	3	Nouvelle-Zélande (1), Australie (2)	Harden, 1990
<i>Acrophyllum</i> Benth.	1	Australie (1)	Hoogland, 1981
<i>Acsmithia</i> Hoogl.	14	Malaisie (4), Australie (1), Iles Fidji (1), <u>Nouvelle-Calédonie (8)</u>	Hoogland, 1979 ; Hoogland, 1987
<i>Aistopetalum</i> Schltr.	2	Nouvelle Guinée (2)	Hoogland, 1960
<i>Anodopetalum</i> A. Cunn. Ex Endl.	1	Tasmanie (1)	Barnes & Rozefelds, 2000
<i>Bauera</i> Banks ex Andrews	4	Australie et Tasmanie (4)	Harden, 1990
<i>Caldcluvia</i> D. Don	1	Chili, Argentine (1)	Rodríguez <i>et al.</i> , 1983
<i>Callicoma</i> Andrews	1	Australie (1)	Harden, 1990
<i>Ceratopetalum</i> Sm.	9	Australie, Nouvelle Guinée	Hoogland, 1960 ; Hoogland, 1981 ; Harden, 1990
<i>Codia</i> J.R. & G. Forst	12	<u>Nouvelle-Calédonie (12)</u>	Guillaumin, 1948
<i>Cunonia</i> L.	24	Afrique du Sud (1) <u>Nouvelle-Calédonie (23)</u>	Hoogland <i>et al.</i> , 1997
<i>Davidsonia</i> F. Muell.	4	Australie (4)	Harden, 1990
<i>Eucryphia</i> Cav.	7	Australie (3), Tasmanie (2), Amérique du Sud (2)	Rodríguez <i>et al.</i> , 1983 ; Harden, 1990
<i>Geissois</i> Labill.	20	Australie, Iles Fidji, Vanuatu, Iles Salomons, <u>Nouvelle-Calédonie (~10)</u>	Guillaumin, 1948 ; Harden, 1990
<i>Gillbeea</i> F. Muell.	2	Nouvelle-Guinée (1), Australie (2)	Hoogland, 1960
<i>Lamanonia</i> Vell.	5	Brésil, Argentine, Paraguay	Zickel & Leitao Filho, 1993
<i>Opocunonia</i> Schltr.	1	Nouvelle-Guinée (1)	Hoogland, 1979
<i>Pancheria</i> Brongniart & Gris	30	<u>Nouvelle-Calédonie (30)</u>	Guillaumin, 1948
<i>Platylophus</i> D. Don	1	Afrique du Sud (1)	Coates Palgrave, 1983
<i>Pseudoweinmannia</i> Engl	2	Australie (2)	Harden, 1990
<i>Pullea</i> Schltr.	3	Australie (1), Malaisie & Iles Fidji (1), Nouvelle-Guinée (1)	Hoogland, 1979
<i>Spiraeanthemum</i> A. Gray	6	Bismarck, Vanuatu, Bougainville, Iles Salomons, Iles Fidji, Samoa	Hoogland, 1979
<i>Spiraeopsis</i> Miq.	6	Malaisie, Salomons	Hoogland, 1979
<i>Schizomeria</i> D. Don	10	Nouvelle-Guinée, Iles Salomons, Australie, Moluques.	Harden, 1990
<i>Vesselowskyia</i> Pamp.	2	Australie (2)	Harden, 1990
<i>Weinmannia</i> L.	155	Amérique (75), Océan Indien (Madagascar, Comores, Mascareignes) (40), Malaisie et Pacifique (40) dont la <u>Nouvelle-Calédonie (4)</u>	Hoopkins, 1998 a,b,c ; Hoopkins & Florence, 1998 ; Bradford, 1998

Leur morphologie peut être très variable, allant d'arbrisseaux à des arbres de plus de 10 mètres de haut, certaines *Weinmannia* peuvent être semi-épiphytes voire étrangleuses. L'écorce externe est généralement grise à marron clair avec des fissures longitudinales. Les tiges possèdent souvent des lenticelles. On dénote la présence d'une stipule plus ou moins prononcée, caduque ou pas, au nombre de 1 ou 2. Les feuilles rarement caduques peuvent être simples opposées en paires ou verticillées à 3 ou 4 par nœuds, composées pennées, palmées, trifoliolées, velues ou pas, etc. L'inflorescence peut être axillaire, terminale ou cauliflore et présenter différentes structures, en panicule, en grappe, en têtes sphériques, etc... Les fruits peuvent être déhiscents ou pas, velus ou pas, de même que les graines qui sont ailées ou pas (Cronquist, 1982 ; Heywood, 1985 ; figure 15).

L'étude détaillée de la famille des Cunoniaceae a conduit les botanistes à la rapprocher des Saxifragaceae. Toutes deux appartiennent à l'ordre des Rosales, sous-classe des Rosidae, classe des Magnoliopsida (Cronquist, 1982 ; figure 14).

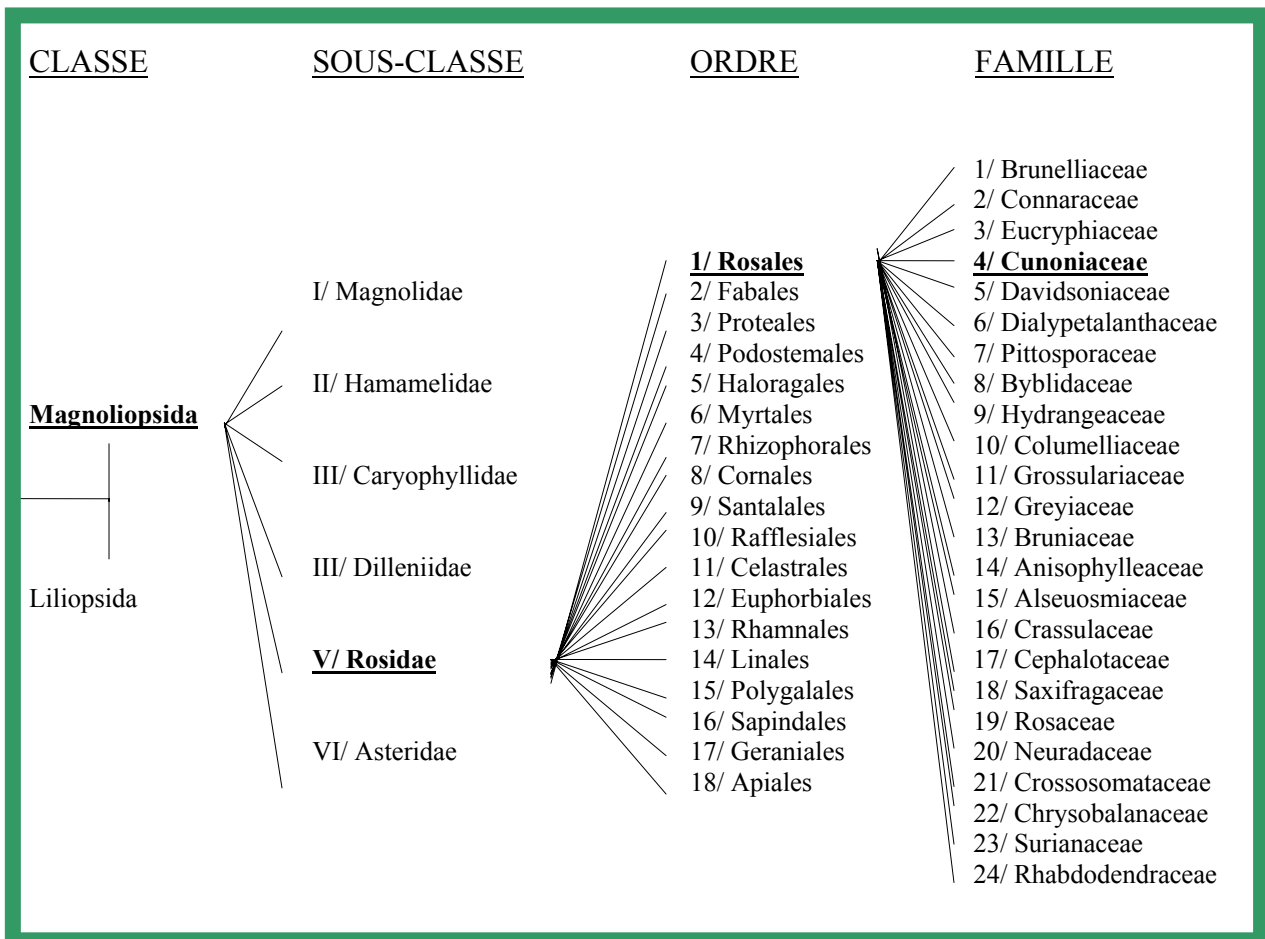


Figure 14 : Phylogénie de la famille des Cunoniaceae (d'après Cronquist, 1982).



Figure 15 : Quelques exemples de morphologie de Cunoniaceae. I/ 1/ *Pancheria elegans*, a. tige à feuilles simples, b. fleur femelle, c. fleur male, d. fleur male épanouie, e. fruit, 2/ *Cunonia capensis*, tige à feuille pennée et inflorescence en panicule, 3/ *Weinmannia hildebrandtii*, a. tige à feuilles trifoliolées, b. fleur, c. ½ fleur, 4/ Fleur de *Geissois imthurnii*, 5/ Fruit de *Davidsonia prunens* (d'après Heywood, 1985). II/ *Callicoma serratifolia*, a. tige stérile, b. tige avec inflorescence, c. fleur vue de dessus, d. fleur vue de profil, e. anthère, f. coupe schématique de l'ovaire, g. pistil, h. fruit vu de profil, i. fruit vu de dessus (d'après Cronquist, 1982).

B/ La famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie

La famille des Cunoniaceae est très bien représentée en Nouvelle-Calédonie par 6 genres regroupant près de 80 à 90 espèces (environ ¼ des espèces mondiales). Ce chiffre total varie du fait de la non-révision de 3 des genres, ainsi Jaffré *et al.* (1987) l'estimaient à 90 alors que les travaux les plus récents (Jaffré *et al.* 2001) l'estiment à 91 (Tableau III). Deux genres lui sont endémiques, les genres *Codia* et *Pancheria* avec une quantité d'espèces évaluée à 11 et 20 respectivement. Le genre *Cunonia* avec 24 espèces est riche sur ce territoire puisque 23 d'entre-elles y sont présentes, seul le taxon *Cunonia capensis* se retrouve en Afrique du Sud. Les trois autres genres sont : *Geissois*, *Acsmithia*, dont plus de la moitié des espèces se trouvent en Nouvelle-Calédonie, et *Weinmannia*, avec seulement 4 espèces contre 155 au niveau mondial. Quel que soit le genre considéré, chacune des espèces est endémique à ce seul territoire. Diverses études ont montré une affinité floristique importante entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie au travers de recensements d'espèces, genres et familles existantes (Morat *et al.*, 1986). Des recherches de type paléobotanique réalisées sur la famille des Cunoniaceae par Barnes (1999) et Barnes *et al.* (1999 ; 2000) confirme cette parenté.

La répartition géographique des espèces de la famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie est limitée à la Grande Terre. Elles se retrouvent tant en forêts humides, que sur maquis, du nord au sud et sur sols ultrabasiques ou sur schistes. Cependant, il est intéressant de noter que près de 75% des espèces (67 espèces) se développent sur roches ultrabasiques contre 45% (41 espèces) sur les autres types de sols, certaines étant communes au deux (Jaffré *et al.*, 1987). Si l'on considère les genres, on constate que cette différence est encore plus marquée pour le genre *Cunonia* dont 87% des espèces poussent sur roches ultrabasiques contre 26% sur les autres sols. Il est suivi des genres *Pancheria* puis *Codia* avec 77% et 69% des espèces sur sols ultrabasiques contre 33% et 39% sur les autres types de sols respectivement. Par contre, pour les genres *Geissois*, *Acsmithia* et *Weinmannia* cela tend à s'équilibrer puisque autant d'espèces se retrouvent sur roches ultrabasiques que sur tous autres types de sol (Jaffré *et al.*, 1987). Enfin, 55 espèces de Cunoniaceae sont strictement inféodées aux sols ultrabasiques et certaines possèdent même une distribution restreinte (Tableau II).

Tableau II : Espèces de Cunoniaceae à distribution restreinte sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie (d'après Jaffré *et al.*, 1987)

Genre/Espèce	Localités
<i>Cunonia alticola</i> Guillaumin	Mont Mou
<i>Cunonia pseudovercillata</i> Guillaumin	Montagne des sources
<i>Cunonia rotundifolia</i> Däniker	Humboldt, Kouakoué
<i>Cunonia schinziana</i> Däniker	Humboldt, Sindoa
<i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard es Pampanini	Extrême Sud
<i>Pancheria multijuga</i> Guillaumin	Sud (altitude)
<i>Pancheria robusta</i> Guillaumin	Sud (altitude)

Les connaissances autres que botaniques sur les espèces de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie sont faibles et s'ajoutent à une liste encore restreinte de connaissances mondiales sur l'ensemble de la famille.

Tableau III : Genres et espèces de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie (d'après Jaffré *et al.*, 2001)

<i>Genres/ Espèces</i>	<i>Genres/Espèces</i>
<i>Acsmithia austrocaledonica</i> (Brongniart & Gris) Hoogland	<i>Cunonia alticola</i> Guillaumin
<i>Acsmithia brongniartiana</i> (Schlechter) Hoogland	<i>Cunonia aoupiniensis</i> Hoogland
<i>Acsmithia collina</i> Hoogland inédit	<i>Cunonia atrorubens</i> Schlechter
<i>Acsmithia densiflora</i> (Brongniart & Gris) Hoogland	<i>Cunonia austrocaledonica</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin
<i>Acsmithia elliptica</i> (Vieillard ex Pampanini) Hoogland	<i>Cunonia balansae</i> Brongniart & Gris
<i>Acsmithia laxiflora</i> Hoogland	<i>Cunonia bernieri</i> Guillaumin
<i>Acsmithia meridionalis</i> Hoogland inédit	<i>Cunonia bullata</i> Brongniart & Gris
<i>Acsmithia pedunculata</i> (Schlechter) Hoogland	<i>Cunonia cerifera</i> Hoogland
<i>Acsmithia pubescens</i> (Pampanini) Hoogland	<i>Cunonia deplanchei</i> Brongniart & Gris
<i>Acsmithia undulata</i> (Vieillard) Hoogland	<i>Cunonia lenormandii</i> Vieillard ex Brongniart & Gris
<i>Codia albicans</i> Vieillard	<i>Cunonia linearisepala</i> (Guillaumin) Bernardi
<i>Codia albifrons ou albiflora</i> Vieillard ex Guillaumin	<i>Cunonia macrophylla</i> Brongniart & Gris
<i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin	<i>Cunonia montana</i> Schlechter
<i>Codia discolor</i> Brongniart & Gris	<i>Cunonia nervosa</i> Hoogland
<i>Codia ferruginea</i> Brongniart et Gris	<i>Cunonia pseudoverticillata</i> Guillaumin
<i>Codia incrassata</i> Pampanini	<i>Cunonia pterophylla</i> Schlechter
<i>Codia microcephala ou microphylla</i> Pampanini	<i>Cunonia pulchella</i> Brongniart & Gris
<i>Codia montana</i> Forster et G. Forster	<i>Cunonia purpurea</i> Brongniart & Gris
<i>Codia nitida</i> Schlechter	<i>Cunonia rotundifolia</i> Däniker
<i>Codia obcordata</i> Brongniart	<i>Cunonia rupicola</i> Hoogland
<i>Codia spathulata</i> Brongniart	<i>Cunonia schinziana</i> Däniker
<i>Codia tinifolia</i> Baker	<i>Cunonia varijuga</i> Hoogland
	<i>Cunonia vieillardii</i> Brongniart & Gris

Tableau III suite :

<i>Genres/ Espèces</i>	<i>Genres/Espèces</i>
<i>Geissois balansae</i> Brongniart	<i>Pancheria fusca</i> Schlechter
<i>Geissois hippocastaneifolia</i> Guillaumin	<i>Pancheria gatopensis</i> Vieillard ex Guillaumin
<i>Geissois hirsuta</i> Brongniart et Gris	<i>Pancheria heterophylla</i> Vieillard ex Guillaumin
<i>Geissois intermedia</i> Vieillard	<i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard ex Pampanini
<i>Geissois magnifica</i> Baker	<i>Pancheria humboldtiana</i> Guillaumin
<i>Geissois montana</i> Vieillard ex Brongniart et Gris	<i>Pancheria multijuga</i> Guillaumin
<i>Geissois polyphylla</i> Lecard ex Guillaumin	<i>Pancheria obovata</i> Brongniart et Gris
<i>Geissois pruinosa</i> Brongniart & Gris	<i>Pancheria phylliraeoides</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin
<i>Geissois racemosa</i> Labill.	<i>Pancheria pinnata</i> Pampanini
<i>Geissois trifoliata</i> Guillaumin	<i>Pancheria pirifolia</i> Brongniart
<i>Geissois velutina</i> Guillaumin	<i>Pancheria pulchella</i> Pampanini
<i>Pancheria aemula</i> Schlechter	<i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin
<i>Pancheria alaternoides</i> Brongniart et Gris	<i>Pancheria rivularis</i> Schlechter
<i>Pancheria beauverdiana</i> Pampanini	<i>Pancheria robusta</i> Guillaumin
<i>Pancheria billardieri</i> Pampanini	<i>Pancheria rubrivenia</i> Baker
<i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini	<i>Pancheria sebertii</i> Guillaumin
<i>Pancheria calophylla</i> Guillaumin	<i>Pancheria ternata</i> Brongniart
<i>Pancheria communis</i> Baker	<i>Pancheria vieillardii</i> Brongniart et Gris
<i>Pancheria confusa</i> Guillaumin	<i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart & Gris
<i>Pancheria elegans</i> Brongniart et Gris	<i>Weinmannia ouaiemensis</i> (Guillaumin & Virot) Hoogland
<i>Pancheria elliptica</i> Pampanini	<i>Weinmannia paitensis</i> Schlechter
<i>Pancheria engleriana</i> Schlechter	<i>Weinmannia serrata</i> Brongniart & Gris
<i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart et Gris	

C/ Phytochimie des Cunoniaceae

A ce jour très peu d'études phytochimiques ont été réalisées sur les différentes espèces de la famille des Cunoniaceae. La première ébauche date de 1964 et mentionne la présence de flavonols dans les feuilles, de proanthocyanidines et de tanins dans les feuilles et les écorces ainsi qu'un taux élevé d'aluminium dans les feuilles (Hegnauer, 1964). L'étude plus complète de Bate-Smith (1977) basée sur les phénols présents dans les feuilles de 50 Cunoniaceae révèle que de nombreuses espèces contiennent une forte quantité de tanins associés à de la quercétine et du kaemferol. L'acide ellagique en particulier se retrouve dans de nombreux cas, au contraire la prodelphinidine, composé tri-hydroxylé, est absente excepté chez une espèce de *Weinmannia*. Ces résultats ont conduit Bate-Smith à positionner la famille des Cunoniaceae dans l'ordre des Rosales et à émettre différentes hypothèses sur son rapprochement avec d'autres familles de cet ordre.

L'étude la plus récente a été menée sur les feuilles et les exsudats d'espèces du genre *Eucryphia* (anciennement répertorié au sein de la famille des Cunoniaceae) en se basant sur la présence de 28 flavonoïdes différents (Wollenweber *et al.*, 2000).

D/ Utilisation des Cunoniaceae en médecine traditionnelle

L'utilisation par les populations autochtones en médecine traditionnelle de végétaux a de tout temps apporté des renseignements fondamentaux à la découverte de molécules bioactives (Burapadaja & Bunchoo, 1995 ; Adenisa *et al.*, 2000). En ce qui concerne la famille des Cunoniaceae, une étude a été menée au Costa Rica sur une espèce du genre *Weinmannia* utilisée contre une infection des voies génito-urinaires. Cet effet serait lié à la présence de tanins, au sein de son écorce, doués d'une activité bactéricide et dont l'ingestion provoquerait une modification du pH de l'urine vraisemblablement à l'origine du contrôle des infections mineures (Luis Diego Gomez, 1995). D'autres connaissances obtenues essentiellement dans la zone pacifique ont servi de base à l'ensemble de nos recherches (Tableau IV).

E/ Intérêt économique des espèces de la famille des Cunoniaceae

Le bois des espèces de Cunoniaceae est généralement utilisé pour la réalisation de poteaux, de panneaux muraux, de contreplaqués, de meubles, d'armoires, d'outils, de quilles de bateau, de canoës, d'emballages, d'instruments de musique,.. (Bradford *et al.*, in prep.). Historiquement, il était également employé dans la construction de wagons et de voitures en particulier le bois de *Cunonia capensis* et de *Ceratopetalum apetalum* (Palmer & Pitman, 1961 ; Crib & Crib, 1981 ; Harden, 1990). Actuellement sa zone d'exploitation la plus importante se trouve en Malaisie, Australie et dans l'ouest Pacifique (Hoogland, 1960 ; Timber Research & Development Association, 1979 ; Lazarides & Hinces, 1993 ; Dickinson, 1998). Enfin, dans les Andes et à Madagascar, ce bois est utilisé comme combustible (Naturales, 1991).

La présence non négligeable de tanins chez certaines espèces comme *Weinmannia tinctoria* a conduit à leur utilisation pour le tannage des peaux (Rodriguez *et al.*, 1983 ; Romero, 1983 ; Cooper & Cambie, 1991).

Tableau IV: Données recueillies concernant l'utilisation en médecine traditionnelle d'espèces de la famille des Cunoniaceae dans le monde et en Nouvelle-Calédonie.

Nom botanique	Nom vernaculaire	Partie utilisée	Utilisation traditionnelle	Pays	Références
<i>Weinmannia spp.</i>		Ecorce	Antiseptique génito-urinaire	Costa-Rica	Luiz Diego Gomez, 1995
<i>Weinmannia richii</i>	Manawi	Ecorce râpée puis bouillie	Contre des douleurs pulmonaires et la toux	Iles Fidji	Cambie & Ash, 1994
<i>Weinmannia vitiensis</i>	Molaudamu	Feuilles mâchées et jus instillé	Instillation dans les oreilles et les narines contre le mal de tête causé par un coup de soleil ou un travail intensif et stressant.	Iles Fidji	Cambie & Ash, 1994
<i>W. racemosa/silvicola</i>	Kamaha/ Tawhero or Towhai		Traitement des douleurs abdominales et thoraciques, de la constipation. Traitement des plaies ouvertes, des brûlures et des coupures. Effet tonifiant.	Nouvelle-Zélande	Brooker <i>et al.</i> , 1987 Riley, 1994
<i>Caldcluvia paniculata</i>			Contre des infections intestinales et bronchiques	Argentine	Biloni, 1965
<i>Spiraeanthemum macgillivrayi</i>	Sasahe	Ecorce	Traitement de la fièvre et de douleurs localisées au niveau de la rate, symptômes du paludisme.	Vanuatu	Cabalion* ¹
<i>Spiraeanthemum katakata</i>	Haondessi ou Nakaimal	Ecorce	Traitement de la fièvre et de douleurs localisées au niveau de la rate, symptômes du paludisme.	Vanuatu	Cabalion* ¹
<i>Geissois denhamii</i>	Hokara	Ecorce	Traitement de blessures infectées.	Vanuatu	Cabalion* ¹
<i>Codia sp</i>	Mwêšô	Ecorce râpée et bouillie	Traitement des symptômes de la gratte ou ciguatera.	Nouvelle-Calédonie	Cortadellas * ²
<i>Cunonia sp</i>	Mwîšô	Ecorce mâchée	Trompe la faim.	Nouvelle-Calédonie	Cortadellas * ²
<i>Geissois trifoliata</i>	Pèjalë	Ecorce séchée, mâchée	Traitement de la fatigue et des maux de tête.	Nouvelle-Calédonie	Cortadellas * ²
<i>Weinmannia linearisepala</i>		Ecorce	Effet fébrifuge	Nouvelle-Calédonie	Rageau, 1957

* données obtenues lors d'enquêtes menées par (1) le Dr P. Cabalion et (2) le Dr D. Cortadellas du Laboratoire des Substances Naturelles Végétales. I.R.D. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

De nombreuses espèces sont utilisées pour la production de miel à Madagascar, en Nouvelle-Zélande, en Tasmanie, au Chili et en Afrique du sud (Palmer & Pitman, 1961 ; Crib & Crib, 1981 ; Rodriguez *et al.*, 1983 ; Lazarides & Hinces, 1993). Leur fruit est également consommé en Australie et utilisé pour la réalisation de confiture, de tarte et de vin (Lazarides & Hinces, 1993). Il est à noter qu'en Nouvelle-Zélande, une étude chimique menée sur le miel de *Weinmannia racemosa* a mis en évidence la présence de molécules originales (Broom *et al.*, 1992 ; Ede *et al.*, 1993).

En ce qui concerne l'horticulture, il est possible de se fournir des graines de Cunoniaceae via Internet et l'on retrouve également certaines espèces dans les jardins botaniques de Californie et de l'Australie. L'espèce *Ceratopetalum gummiferum* est exploitée en Australie comme fleur coupée (Armstrong & Johnson, 2001) et de nombreuses autres pourraient être utilisées à des fins commerciales en particulier les espèces du genre *Geissois* dont les feuilles palmées et les inflorescences de couleurs vives sont très attrayantes. Malgré tout, cette exploitation ne se ferait qu'en mesurant les risques d'exportation d'individus dans des milieux où ils ne se développent pas naturellement.

F/ Connaissances physiologiques et écologiques de la famille des Cunoniaceae

De nombreuses études écologiques ont été menées en Nouvelle-Zélande, Australie, Colombie et en Nouvelle-Calédonie, afin de déterminer les relations entre les espèces de la famille des Cunoniaceae et le milieu qui les entoure. Ainsi des relevés de densité ou de taille au sein de grandes forêts humides ont été effectués et les interactions avec les espèces avoisinantes ont été notées (Duncan, 1993 ; Jaffré & Veillon, 1991 ; Jaffré & Veillon, 1995 ; Restrepo Uribe & Bellefleur, 1996).

Certaines d'entre-elles ont fait l'objet de recherches ponctuelles de type éco-physiologique. C'est le cas de *Ceratopetalum apetalum* (Australie) cultivée en serre dans des conditions de luminosité, d'arrosage, et d'apport de nutriments variables qui montre un accroissement de sa biomasse totale ainsi que de sa surface foliaire pour un éclaircissement important (Barrett & Ash, 1992). Jane & Green (1985) ont montré que l'espèce *Weinmannia racemosa*, se développant en Nouvelle-Zélande dans des forêts souvent embrumées où la température est basse et la photosynthèse réduite, serait plus sensible à la sécheresse du fait de la faiblesse de son système racinaire.

En ce qui concerne les voies et moyens de multiplier les espèces de la famille des Cunoniaceae, ils semblent n'avoir été qu'effleurés. En effet, qu'il s'agisse de la multiplication sexuée, faisant intervenir les semences, ou de la multiplication asexuée, par bouturage, peu d'articles s'y rapportent.

F.1/ La reproduction sexuée

Il est vrai que la germination reste un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux processus. La plupart des travaux réalisés à ce jour sur les espèces de la famille des Cunoniaceae consistaient à collecter les semences et à observer leur développement *in situ* après les avoir semées. Ces dernières années, des études plus approfondies ont été engagées. Burrows (1999) a en effet travaillé sur différentes semences de plantes ligneuses de Nouvelle-Zélande dont une Cunoniaceae, *Weinmannia racemosa*. Il a en outre réalisé des manipulations

en conditions de laboratoire sur boîtes de Pétri mais également sur sol. Il a cherché à améliorer le taux de germination de ces semences en les débarrassant de leur péricarpe (cas des fruits indéhiscents) et en leur appliquant une humidité constante, les expériences étant menées à température ambiante.

Ainsi, pour *Weinmannia racemosa*, il constate une germination effective durant les mois de mai à juillet, avec un taux de 82%, taux plus faible que les autres espèces étudiées. Plus encore, la germination se trouve être très faible sur sol avec seulement 8% de germination. Enfin, des semences du même lot placées à l'obscurité ne donnent qu'un taux de germination de 4%, cependant ces mêmes semences placées de nouveau à la lumière donnent un taux de 68%. Ces résultats expérimentaux prouvent, s'il en est, que la maîtrise du phénomène de germination d'une espèce de la famille des Cunoniaceae, à l'instar de nombreuses autres, reste difficile (Figure 16).

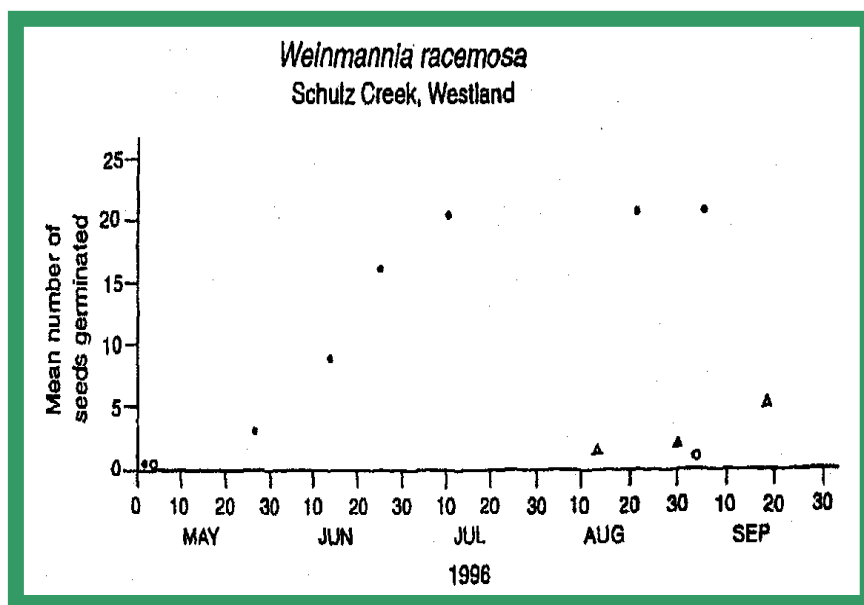


Figure 16 : Germination des semences de *Weinmannia racemosa*. • lot témoin, ◦ lot à l'obscurité, ▲ lot sur sol. (d'après Burrows, 1999)

De nombreux processus régulent la germination telle qu'elle est définie par Evenari (1957) puis par Côme (1975) : « La première phase correspond vraisemblablement à l'imbibition. La seconde phase s'achève peu de temps avant que la radicule soit visiblement allongée et constitue la germination *sensu stricto* ». Chaque type de semences ne germe que dans certaines conditions qui dépendent de nombreux facteurs. La température, l'humidité, l'approvisionnement en oxygène et la lumière sont quatre éléments fondamentaux interdépendants (Figures 17 et 18). En effet, si l'un de ces quatre facteurs est défavorable, la germination s'en trouve affectée (Thévenot & Côme, 1973a ; Corbineau & Côme, 1989 ; Corbineau *et al.*, 1995).

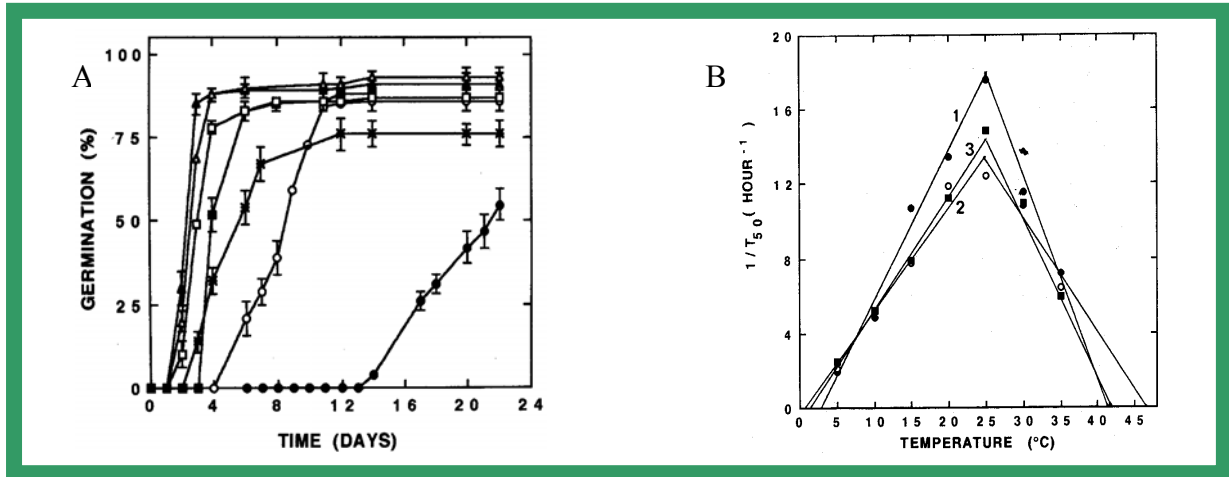


Figure 17 : Effet de la température sur la germination de semences de carotte. A: Pourcentage de germinations cumulées aux températures de 5 (●) , 10 (○), 15 (■), 20 (□), 25 (▲), 30 (△) et 35°C (*) du cultivar Valor ; B: Effet de la température sur la vitesse de germination pour les semences des types de cultivars Valor (1), Major (2) and Carine (3), pour chaque point, la vitesse de germination est exprimée comme la réciproque du temps nécessaire à obtenir 50% de germination ($1/T_{50}$). (d'après Corbineau *et al.*, 1995)

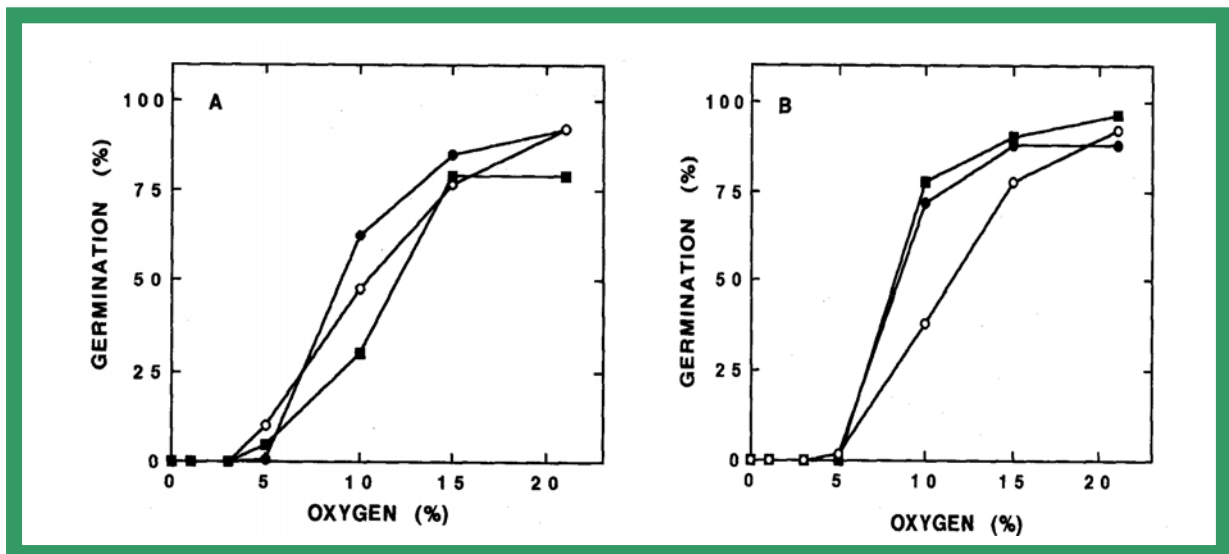


Figure 18 : Effet de l'oxygène sur le pourcentage de germination, obtenu après 7 jours, de semences variées de carotte. A: Semences non mesurées des cultivars Valor (●), Major (○) et Carine (■) ; B: Semences calibrées du cultivar Valor, dont les tailles sont de 1.2-1.4 mm (●), 1.6-1.8 mm (○), 1.8-2.1 mm (■). (d'après Corbineau *et al.*, 1995)

Mais ce ne sont pas là les seuls intervenants. La semence peut être sujette à deux phénomènes rendant la germination délicate, la dormance embryonnaire et les inhibitions de germination. La dormance embryonnaire correspond à une inaptitude de l'embryon à germer. Elle est fréquente chez les Rosacées et est levée par un traitement au froid dont la période agit sur le taux maximal de germination (Thévenot & Côme, 1973b).

En ce qui concerne les inhibitions, elles peuvent être de plusieurs ordres. L'inhibition tégumentaire, caractérisée par la présence d'une enveloppe séminale épaisse et/ou imperméable, rendant l'accès à l'eau difficile pour l'embryon ou l'empêchant de percer, existe chez de nombreuses familles de plantes. Elle est le plus souvent levée par l'élimination d'une partie ou de la totalité de cette enveloppe, par scarification mécanique ou par attaque acide (Figure 19 ; Baskin *et al.*, 1998 ; Burrows, 1999 ; El-Siddig *et al.*, 2001 ; Tibagu & Odén, 2001). L'inhibition chimique quant à elle est caractérisée par la présence de substances capables d'inhiber totalement ou de retarder la germination (Côme, 1967).

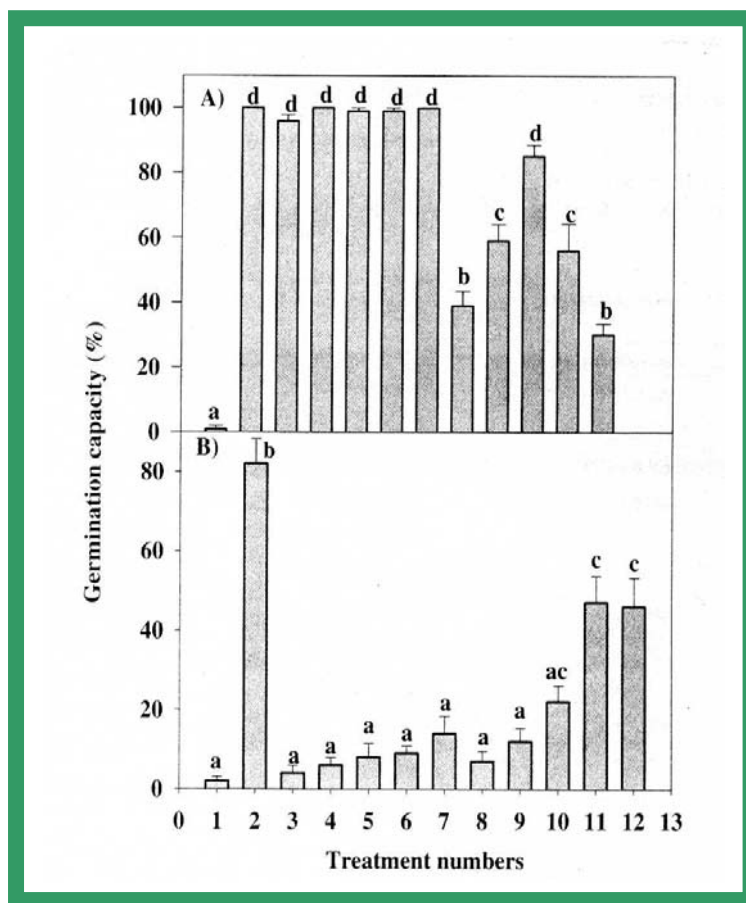


Figure 19 : Capacité de germination de semences d'*Albizia gummifera* (A) et d'*A. grandibracteata* (B) en réponse à différents types de pré-traitements de scarification. Numéro de traitement : 1= témoin, 2= Scarification mécanique, 3= acide sulfurique, 10 min, 4= acide sulfurique, 20 min, 5= acide sulfurique, 30 min, 6= acide sulfurique, 40 min, 7= acide sulfurique, 60 min, 8= eau chaude, 60°C, 9= eau chaude, 70°C, 10= eau chaude, 80°C, 11= eau chaude, 90°C, 12= eau chaude, 100°C. (d'après Tibagu & Oden, 2001).

Les phytohormones semblent également jouer un rôle non négligeable dans la régulation de la germination. De nombreux travaux ont permis de démontrer l'importance de la GA₃ (acide gibbérellique) qui la favorise ou non, en fonction de la semence étudiée et de la concentration appliquée (Figure 20 ; Corbineau *et al.*, 1989 ; Tibagu & Odén, 2001).

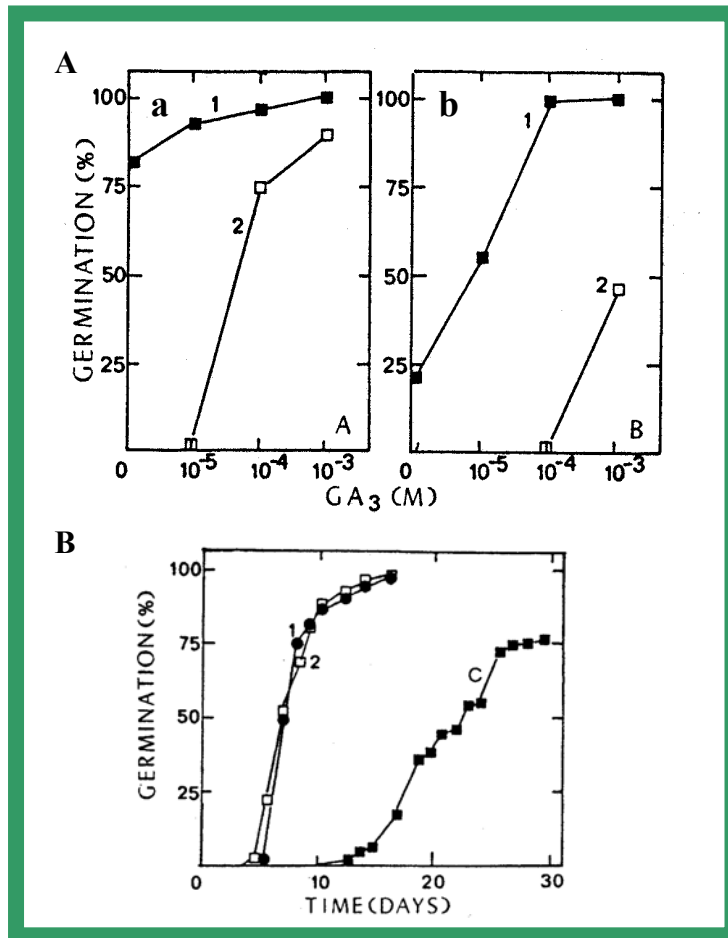


Figure 20 : Effet de la GA₃ sur la germination de semences de *Cyclamen persicum*. A : Pourcentage de germination des semences de *C. persicum* après 15 jours passés à 15°C (a) et 20 °C (b), à l'obscurité (1) ou à la lumière blanche (13 W m⁻²) (2), en fonction de la concentration en GA₃; B : Germination à 20°C à l'obscurité des semences de *C. persicum* traitées ou non par de la GA₃ 10⁻³ M, C= semences témoins placées dans de l'eau seule, 1= semences placées 2 jours en présence de GA₃ puis transférées sur de l'eau, 2= semences placées 2 jours en présence de GA₃ puis mises à sécher. (d'après Corbineau *et al.*, 1989).

La combinaison de tous ces phénomènes peut exister au sein d'une même semence. C'est pourquoi l'étude de la germination est complexe et fait appel à de nombreuses expérimentations. Dans le cadre de semences utilisées en agriculture ou en horticulture, des travaux ont montré qu'un traitement de pré-germination permettait d'améliorer leur qualité germinative. « La pré-germination fait appel aux particularités de la germination *sensu stricto*. Ce traitement consiste à assurer le démarrage de la germination en plaçant les semences en présence d'eau (hydropriming) ou plus généralement d'une solution de polyéthylène glycol (PEG) (osmopriming) dont le potentiel hydrique dépend de l'espèce considérée. Le choix judicieux de la température d'incubation, de la durée du traitement et du potentiel hydrique de la solution de PEG permet d'assurer la germination *stricto sensu* de toutes les semences du lot traité sans que leur radicule ne s'allonge. Les semences peuvent alors être séchées et conservées avant d'être semées. » (Côme *et al.*, 1998). La pré-germination présente de nombreux avantages, le plus important étant une germination plus rapide et plus homogène des semences. Mais plus encore, elle permet de diminuer l'impact d'une mauvaise oxygénation et fournit une plage thermique de germination plus large (Figure 21 ; Corbineau *et al.*, 1994 ; Côme *et al.*, 1998 ; Özbingöl *et al.*, 1998). Cette recherche appliquée à des semences d'intérêt, de type subtropical, apportera à coup sûr des réponses importantes sur le mode de fonctionnement de leur germination *sensu stricto*.

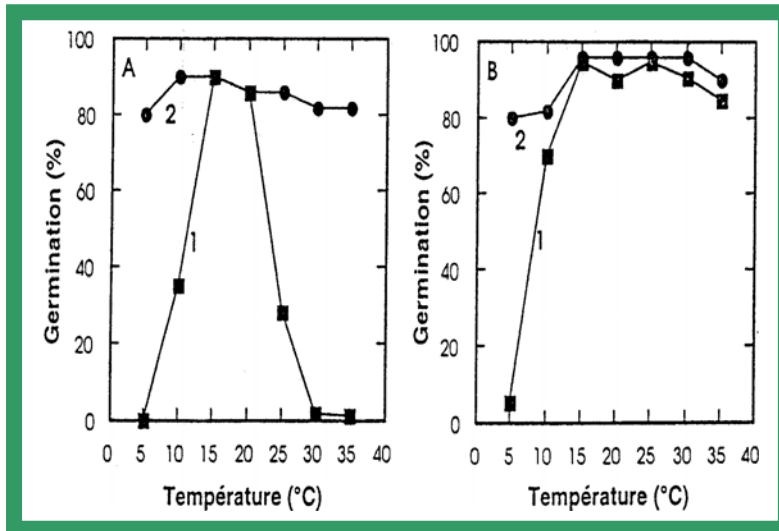


Figure 21 : Influence de la température sur les pourcentages de germination obtenus après 7 jours avec les semences non traitées (1) et les semences prégermées (2) de poireau (A) et de carotte (B). Les semences ont été prégermées pendant 14 jours (poireau) ou 9 jours (carotte) à 15°C sur une solution de PEG 8000 à -1.5 Mpa. (d'après Côme *et al.*, 1998)

La germination reste dépendante de l'approvisionnement en semences de l'espèce considérée et de leur conservation. En effet, certaines espèces de plantes ne fournissent des fruits qu'une fois par an voire une fois tous les deux ou trois ans. Pour pallier cette difficulté, un premier élément de réponse est la conservation des graines et de leur capacité germinative. Plusieurs méthodes peuvent être employées et dépendent là aussi du type de graines considérées. Pour les semences orthodoxes, la solution la plus simple et la plus efficace semble être une déshydratation efficace et le maintien à une température aussi basse que possible (Tableau V ; Corbineau & Côme, 1991 ; Côme, 1991).

Tableau V : Longévité de quelques semences de type orthodoxe de plantes ornementales. (D'après Corbineau & Côme, 1991).

Type de semences*	Longévité	Espèces
Macrobiotiques	> 15 ans	<i>Lupinus, Acacia, Cytisus</i>
Mésobiotiques	3-15 ans	<i>Begonia, Chrysanthemum, Centaurea, Cyclamen, Flax, Pisum, Tropaeolum.</i>
Microbiotiques	2-3 ans	<i>Begonia, Dianthus, Cosmos, Dahlia, Hibiscus, Vernena</i>
	1-2 ans	<i>Anemona, Asparagus, Callistephus chinensis, Calceolaria, Delphinium, Dahlia, Gloxinia, Phlox, Salvia, Viola</i>

*Division établie par Ewart (1908).

Quant aux semences récalcitrantes, leur sensibilité à la dessiccation et à l'abaissement de la température rend leur conservation difficile (Figures 22 et 23). Côme (1991) envisage la méthode de cryoconservation, habituellement appliquée aux organes végétaux, comme une méthode alternative pour ce type de semences.

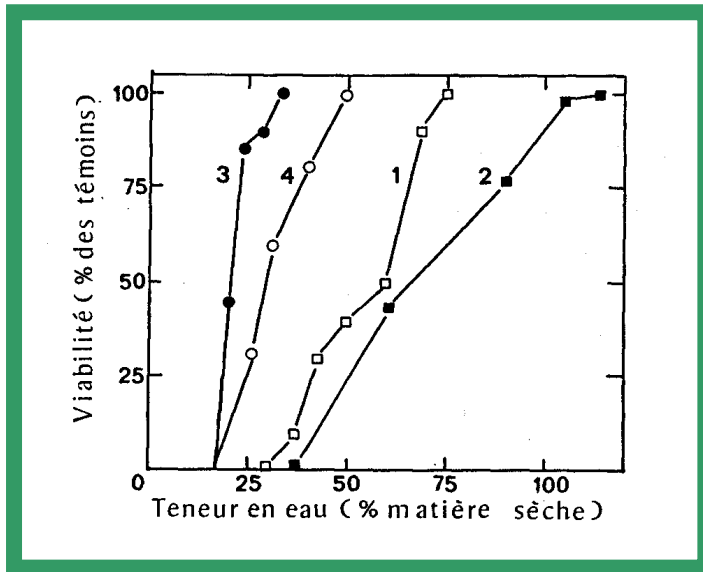


Figure 22 : Relation entre la teneur en eau (en % par rapport à la matière sèche) et la viabilité (en % par rapport aux semences témoins fraîchement récoltées des semences récalcitrantes de 4 espèces tropicales conservées au sec, à 20°C. 1, *Mangifera indica* ; 2, *Symphonia globulifera* ; 3, *Shorea roxburghii* ; 4, *Hopea odorata*. (d'après, Côme 1991).

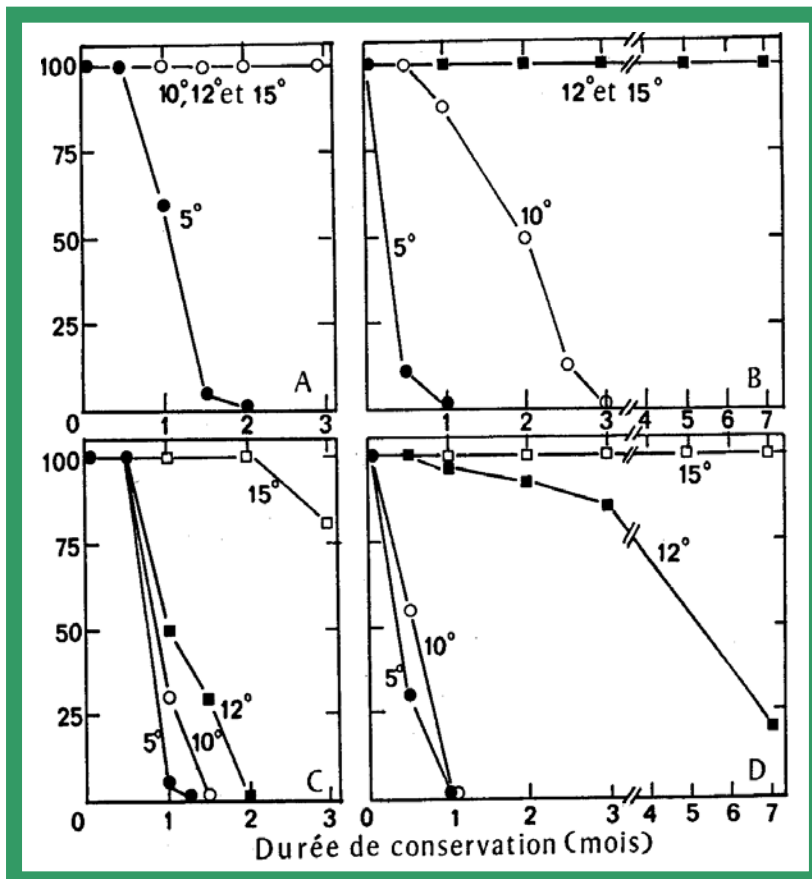


Figure 23 : Evolution, au cours de la conservation en milieu humide, à 5°C, 10°C, 12°C et 15°C, de la viabilité (en % par rapport aux semences témoins fraîchement récoltées) des semences récalcitrantes ou des plantules de 4 espèces tropicales. A, *Shorea roxburghii* ; B, *Mangifera indica* ; C, *Hopea odorata* ; D, *Symphonia globulifera*. (d'après Côme, 1991).

Même si le problème de conservation se trouvait résolu, la disponibilité en semences d'une espèce reste aléatoire et l'expression de certains caractères génétiques peuvent poser des problèmes dans le cadre d'une exploitation économique. C'est le problème auquel se trouvent confrontés des horticulteurs Australiens qui cultivent des plants de *Ceratopetalum gummiferum* (de la famille des Cunoniaceae), obtenus à partir des graines, pour leur inflorescence. Malheureusement, en fonction de la semence, la couleur de la fleur varie et ne correspond plus aux attentes du client (Worrall *et al.*, 1999). Ainsi, l'utilisation de la reproduction asexuée pourrait être une solution idéale pour la pérennisation de l'espèce d'intérêt.

F.2/ La reproduction asexuée

Ce type de reproduction est basé sur la propriété qu'ont les végétaux de redonner à partir de cellules différenciées, des cellules dédifférenciées, elles-mêmes capables de se différencier de nouveau en cellules d'un autre type. Ainsi, on peut à partir de cellules de feuilles obtenir des cellules de racines ou de tiges.

Cette méthode est utilisée de manière usuelle depuis des centaines d'années. Elle a été améliorée au cours du temps, avec une étape importante correspondant à la découverte des hormones végétales. Ainsi, aujourd'hui, dans le cadre du bouturage dit « classique », réalisable par tout un chacun dans son jardin, l'utilisation d'hormones de bouturage est devenue quasi systématique. Ce mode de multiplication a été énormément étudié et est employé tant dans le domaine agricole (Bassil *et al.*, 1991 ; Avery & Beyl, 1991), forestier (Carter & Slee, 1991 ; Carter & Slee, 1992 ; Ritchie *et al.*, 1993 ; Ripetti, 1993) qu'horticole. Ainsi lorsqu'une espèce présente un intérêt économique, comme par exemple dans le cas des essences, de nombreux essais sont effectués pour déterminer les facteurs les plus favorables à l'enracinement des boutures (Trilles, 1999) : « substratum d'enracinement » (Carter & Slee, 1991), origine et type de boutures (Carter & Slee, 1992 ; Ritchie *et al.*, 1993 ; Ripetti, 1993), période de bouturage, température et humidité du sol ou de l'atmosphère (Reuveni *et al.*, 1990), impact des hormones de bouturages (Bassil *et al.*, 1991), etc. En ce qui concerne la famille des Cunoniaceae, peu de travaux relatent ce type d'expérimentations. L'espèce *Ceratopetalum gummiferum*, plus communément dénommée « NSW Christmas Bush » (Arbre de forêt de Noël des Nouvelles Galles du Sud) en Australie, est commercialisée pour son inflorescence. A l'heure actuelle, le mode de multiplication utilisé est le bouturage classique, cependant celui-ci pose des problèmes du fait de la difficulté d'obtention d'un bon enracinement, qui demande de surcroît beaucoup de temps (Dalley, 1997). Pour pallier cette difficulté, la culture *in vitro* a été envisagée (Armstrong & Johnson, 2001).

Depuis ces 50 dernières années, la méthode de culture *in vitro* a pris un essor considérable et est utilisée en biologie végétale comme animale pour la culture tant de cellules que d'organes ou de tissus. Elle est employée non seulement en recherche fondamentale mais aussi et surtout dans des domaines relevant de la biotechnologie (production en masse des végétaux). Elle présente de nombreux avantages :

- Dans le cas d'une culture d'explants, on peut à partir de morceaux bien choisis de quelques centimètres produire de nouveaux individus en jouant sur l'équilibre hormonal afin d'en obtenir dans un premier temps une partie aérienne puis par inversion de cet équilibre, dans un second temps, une partie racinaire. Ces plants pourront à leur tour être subdivisés pour redonner de nouveaux pieds. On comprend alors l'intérêt de cette méthode qui permet d'obtenir de manière exponentielle des plants en grande quantité. Elle est extrêmement employée pour la multiplication de végétaux d'intérêt horticole. L'un des exemples le plus connu est celui de la tulipe aux Pays Bas. Cependant, il faut admettre que ce procédé est dans les premiers temps coûteux mais dès lors que les conditions optimales sont réunies, il peut devenir très rentable.
- Dans le cas d'une culture cellulaire, l'intérêt le plus grand est l'obtention de cellules filles identiques aux cellules mères. Ainsi, il est raisonnable d'admettre qu'une plante productrice d'une substance d'intérêt bioactive donnera en culture cellulaire des cellules capables, elles aussi de la produire. Là encore, la difficulté première reste d'établir les conditions permettant une synthèse de cette molécule en quantité plus importante que chez le végétal pour rentabiliser la manipulation.

- Enfin, il est possible d'associer ces deux types de culture, en cultivant des cals en milieux liquides afin d'obtenir une biomasse importante puis à partir de ces cals de régénérer une plante entière (Wang *et al.*, 2001).

Le principe de base de la culture *in vitro* consiste à placer un explant végétal de tous types (racine, feuille, tige, inflorescence, etc.), dans un milieu dépourvu de toute contamination, plus ou moins liquide contenant différents éléments. De nombreux facteurs interviennent dans ce type de bouturage, l'explant lui-même et le milieu dans lequel il est placé :

- En ce qui concerne l'explant, son type, son âge, son origine et sa composition tissulaire agissent directement sur le résultat obtenu. Il est généralement admis que des tissus jeunes dont la différenciation n'est pas très avancée réagissent mieux, des travaux concernent en particulier les bourgeons cotylédonaire (Duhoux & Davies, 1985 ; Rathore *et al.*, 1993). Il est malgré tout possible de travailler sur des plants âgés en collectant les extrémités des rameaux (Jaiswal & Amin, 1987).
- Le milieu quant à lui joue un rôle essentiel. Il est constitué le plus souvent d'un milieu minéral de base contenant des macro-éléments et des micro-éléments indispensables au développement du végétal, des vitamines, du sucre (saccharose) et des hormones de croissance. Chacun de ces éléments a un impact sur la croissance de l'explant. Il existe plusieurs types de milieu minéral de base, Murashige et Skoog (1962), Gamborg (1970), Nitsch (Bourgin & Nitsch, 1967), dont la concentration en éléments peut varier créant une différence considérable sur l'évolution de l'explant. Il existe également différents types de mélanges vitaminés, Morel (Morel & Wetmore, 1951), Fujii (Fujii & Nito, 1972). L'impact de la concentration en sucre est chez certaines espèces très marqué (Goyal & Arya, 1984). Les hormones quant à elles, sont de loin les plus importantes. Chaque espèce va réagir plus ou moins bien à la présence de telle ou telle hormone donnant dans certains cas des formes anarchiques. L'équilibre établi entre les auxines et les cytokinines permet d'orienter la différenciation vers la partie aérienne ou vers la partie racinaire avec un intermédiaire qu'est le cal. C'est la recherche de l'équilibre le plus parfait qui demande le plus d'énergie dans une expérimentation de culture *in vitro* (Diallo & Duhoux, 1984 ; Flygh *et al.*, 1993 ; Armstrong & Johnson, 2001). Enfin, le pH du milieu classiquement fixé entre 5.5 et 5.8 peut être à l'origine d'une croissance et d'un enracinement plus ou moins efficace (Leifert *et al.*, 1992).
- D'autres éléments, tout aussi importants, peuvent apporter une amélioration considérable au processus. C'est le cas de l'éclairage, de la température ou encore du contenant. Dans le cas de culture cellulaire, l'oxygénation est fondamentale.

Les applications de la culture *in vitro* sont multiples. Elle peut être employée pour la production de plants végétaux d'intérêt forestier (Flygh *et al.*, 1993 ; Fenning *et al.* 1993), horticole (Armstrong & Johnson, 2001), agricole (Malamug *et al.*, 1992), médicinal (Misra & Chaturvedi, 1984 ; Hannweg *et al.*, 1996 ; Ferreira & Janick, 1996). Elle est très utile pour la sauvegarde d'espèces en danger ou en voie de disparition (Krogstrup & Nørgaard, 1991). La culture en milieu liquide de cellules végétales permet de remédier dans certains cas à la production de molécules bioactives pharmaceutiques (Zhao *et al.*, 2001) ou de colorants industriels. Quel que soit le besoin considéré, la culture *in vitro* est aujourd'hui devenue une alternative incontournable dans le cadre de la valorisation de végétaux d'intérêt.

III/ Les substances naturelles végétales et leur valorisation

De nos jours, les substances naturelles représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons. Les 40% restants étant des molécules de synthèse ou d'hémi-synthèse qui prennent exemple sur des molécules naturelles telles qu'elles existent ou qui sont légèrement modifiées pour en augmenter l'efficacité. Les animaux et les végétaux en sont les producteurs avec une prépondérance pour les plantes qui fournissent 70% des substances naturelles exploitées.

Divers types de métabolites sont synthétisés par les végétaux. On y retrouve des composés du métabolisme primaire (glucides, lipides, acides aminés, peptides et protéines) ainsi que des composés du métabolisme secondaire (composés phénoliques, terpènes stéroïdes et alcaloïdes). C'est ce second groupe qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette recherche.

Nombre de composés du métabolisme secondaire, ont été et sont encore aujourd'hui découverts ; soit dans le cadre d'investigations purement chimiques, soit au cours de recherches de substances potentiellement bioactives. Ce dernier domaine fait la place belle aux principes actifs d'origine végétale. Quelques exemples marquant suffisent à le confirmer. Les alcaloïdes, dont l'étude a été très active ces dernières années, ont fourni plusieurs molécules utilisées dans la lutte contre le cancer. La vinblastine, la vincristine, issues toutes deux de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* G. Don), le taxol de l'if européen (*Taxus baccata* L.), son dérivé le taxotère, ainsi que l'ellipticine d'*Ochrosia elliptica* Labill., en sont des représentants vivants. Cependant, les conclusions de Bate-Smith (1977) indiquent que la famille des Cunoniaceae semble dépourvue de ce type de substances. Au contraire, les polyphénols apparaissent comme des constituants majeurs dans la composition en métabolites secondaires chez les espèces de cette famille. Les tanins, en particulier, sont présents chez certaines d'entre elles dans des proportions voisines ou supérieures à 30% du poids de matière sèche. C'est pourquoi, il nous semblait essentiel d'apporter des informations concernant l'origine de ces substances, leur structure et leur type. Deux grands groupes de polyphénols feront l'objet des prochains paragraphes, les tanins et les flavonoïdes.

A/ Les Tanins

Les tanins sont connus depuis plusieurs millénaires mais ils l'étaient essentiellement pour leurs propriétés tannantes (propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible). C'était le cas du tanin de châtaignier (*Castanea sp.*), de chêne (*Quercus sp.*), d'*Anacardiaceae* ou de légumineuses (*Acacias*). Aujourd'hui encore, ils sont recherchés pour l'obtention de cuirs destinés à la maroquinerie (Bruneton, 1993). Historiquement, les premières caractérisations structurales concernaient ceux connus pour ces propriétés, essentiellement les tanins galliques. La seconde classe de tanins hydrolysables, les ellagitannins, n'a connu son essor que vers les années 1950 avec les travaux d'élucidation de Schmidt et Mayer (1956). Cependant, il ne s'agissait là que d'une toute petite partie lorsque l'on considère les connaissances actuelles les concernant. La découverte récente d'activités anticancéreuses et antivirales prometteuses, a engendré un renouveau de l'intérêt porté à cette classe de produits naturels (Vlietinck *et al.*, 1997 ; Chen Liu *et al.*, 1999).

A.1/ Classification des tanins

Ces composés sont par définition « des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines » (Bruneton, 1993).

On distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont des esters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol. Le sucre est très généralement le glucose, l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques* soit l'acide hexahydroxydiphényldicarboxylique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydro hexahydroxydiphényldicarboxylique = **DHHDP** ; acide chébulique...) dans le cas des *tanins ellagiques*. Depuis 1985, plusieurs représentants d'une nouvelle catégorie de tanins ont été isolés. Ces tanins, les *tanins complexes*, sont des ellagitanins modifiés résultant de l'addition d'un dérivé phényl-chromanique sur une molécule d'ester **HHDP** du glucose : flavanol (flavano-ellagitanin), procyanidol (procyanidino-ellagitanin), flavonol (flavono-ellagitanin). Tanins galliques et ellagiques (simples ou complexes) sont caractéristiques des angiospermes dicotylédones, en particulier de la sous classe des Rosidae dont font partie les espèces de la famille des Cunoniaceae.

Les tanins condensés ou *proanthocyanidols* sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent $4 \rightarrow 8$ ou $4 \rightarrow 6$. L'unité de base peut être: le catéchol ou l'épicatéchol (constitutifs des procyanidols), le gallocatéchol ou l'épigallocatéchol (constitutifs des prodelfinidols), ou plus rarement l'afzéléchol ou l'épiafzéléchol (constitutifs des propélargonidols). Les tanins condensés à la différence des galliques et ellagiques ne s'hydrolysent pas, mais forment à ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouges de tanin (Guignard, 1996). Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, gymnospermes et fougères compris.

A.2/ Biosynthèse et structure des tanins hydrolysables

Les gallotanins et les ellagitanins sont les produits ultimes du métabolisme de l'acide gallique et dérivent de la galloylation d'un D-glucopyranose. Le composé commun à ces deux types de tanins est le β -PGG, ou β -penta-galloylglucose, dont le processus enzymatique de formation est maintenant bien connu (Figure 24 ; Quideau & Feldman, 1996).

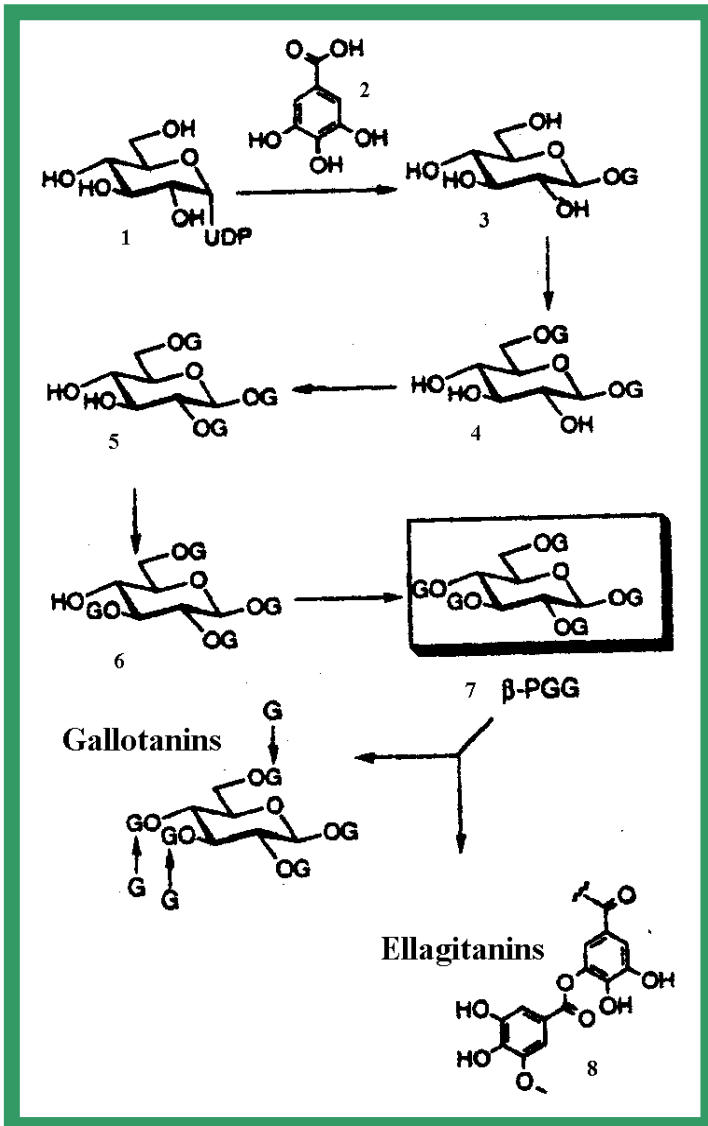


Figure 24 : Schéma général de la biosynthèse des gallotanins et des ellagitanins. (1) : UDP glucose ; (2) : acide gallique ; (3) β -1-O-galloyl-D-glucose ; (4) β -1,6-di-galloyl-D-glucose ; (5) β -1,2,6-tri-galloyl-D-glucose ; (6) β -1,2,3,6-tetra-galloyl-D-glucose ; (7) β -1,2,3,4,6-penta-galloyl-D-glucose (β -PGG) ; (8) : acide hexahydroxy-diphényldicarboxylique (HHDP) (d'après Quideau & Feldman, 1996).

A.2.1/ Les gallotanins

Les gallotanins résulteraient de l'addition supplémentaire de groupes galloyls sur les groupements galloyls présents sur la molécule de β -PGG (Figure 24). Ainsi, en fonction du nombre d'attaches, de leur positionnement et de la longueur des chaînes de galloyls, on retrouve l'ensemble des gallotanins. Ceux-ci sont caractéristiques d'un petit groupe de familles : *Ericaceae*, *Combretaceae*, *Anacardiaceae*, *Geraniaceae*...

A.2.2/ Les ellagitanins

En ce qui concerne les ellagitanins, l'hypothèse émise par Schmidt et Mayer (1956) serait la formation de l'HHDP (Figure 24) par établissement d'une liaison C-C intramoléculaire, entre deux résidus galloyls fixés sur la molécule de β -PGG. Ils supposent que ce couplage existe naturellement *in vivo* entre deux molécules de galloyls et conduit à la formation du 6,6'-dicarbonyl-2,2',3,3',4,4'-hexahydroxybiphényl plus communément désigné sous le nom de hexahydroxydiphényl (HHDP). La libération par hydrolyse des groupes

esters HHDP conduit à leur conversion facile et irréversible en acide ellagique, à l'origine de la dénomination de ce groupe de produits naturels, les tanins ellagiques (Figure 25).

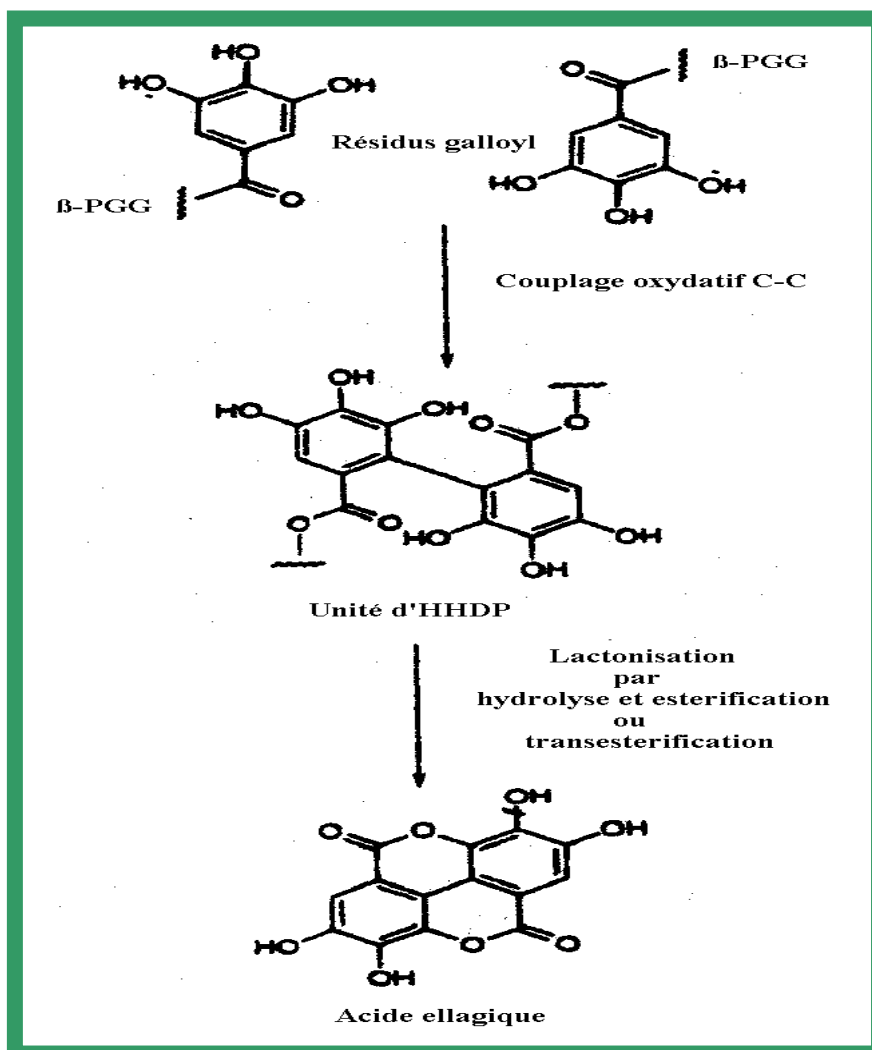


Figure 25 : Origine nominative des tanins ellagiques, hypothèse de Schmidt et Mayer (1956) sur la formation de l'acide ellagique (d'après, Quideau & Feldman, 1996).

La sous classe d'ellagitanins la plus importante résulte des couplages oxydatifs les plus fréquents, impliquant les résidus galloyls en C-2/C-3 et C-4/C-6 du glucopyranose. Ils conduisent à un niveau de diversité structurale remarquable, par la variété des positions, des fréquences et de la stéréochimie des unités d'HHDP. On retrouve en particulier des exemples de molécules notables tant par leur abondance naturelle que par leur implication dans l'assemblage d'ellagitanins plus complexes (Figure 26).

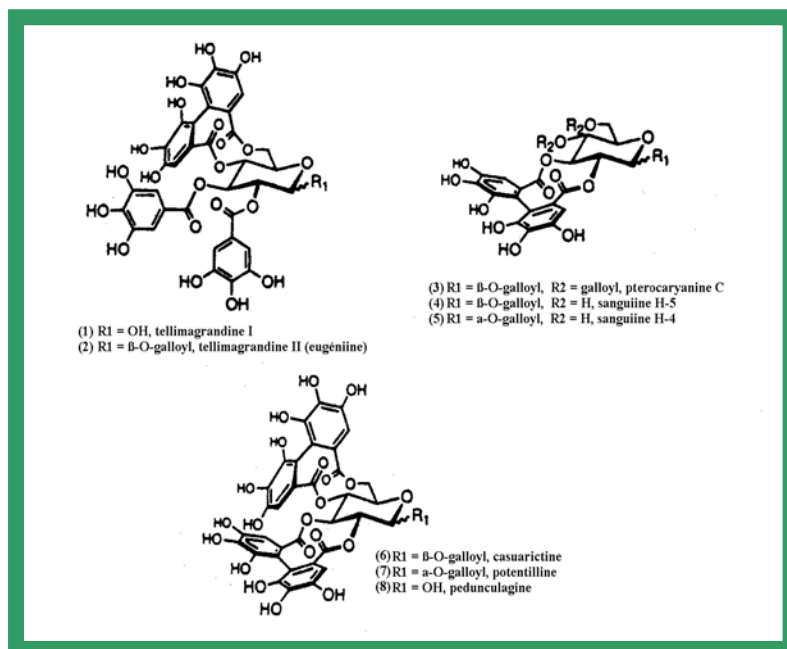


Figure 26 : Exemples de la 1^{ère} sous classe d'ellagitanins.
 (1) : tellimagrandine I ;
 (2) : tellimagrandine II ;
 (3) : pterocaryanine C ;
 (4) : sanguine H5 ;
 (5) : sanguine H4 ;
 (6) : casuarictine ;
 (7) : potentilline ;
 (8) : pedunculagine (d'après, Quideau & Feldman, 1996).

Une autre sous classe d'ellagitanins provient de couplages oxydatifs plus rares faisant intervenir les résidus galloyles en C-2/C-4 ou C-3/C-6 du glucose. Ces couplages constituent un défi synthétique plus important puisqu'ils imposent une conformation moins favorable du glucose en ¹C₄ (Figure 27).

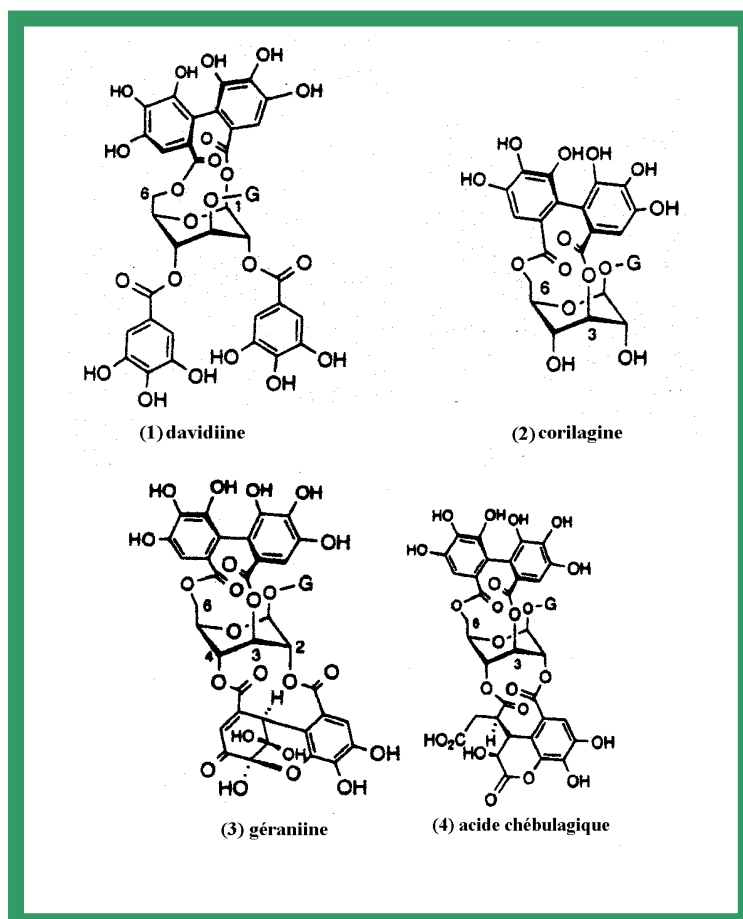


Figure 27 : Exemples de la 2^{nde} sous classe d'ellagitanins.
 (1) : davidiine ; (2) : corilagine ;
 (3) : géraniine ; (4) : acide chébulagique (d'après, Quideau & Feldman, 1996).

Les molécules d'ellagitanins fournies comme exemples dans la figure 27 sont toutes monomériques comme celles de la figure 26. Cependant, la géraniiine et l'acide chébulagique sont obtenues par des modifications du groupement HHDP dont le métabolisme peut se poursuivre. Elles sont le résultat de deux types de modifications. La géraniiine découlerait selon Schmidt d'une déshydrogénation de l'HHDP fournissant une cyclohexenetrione qui est ensuite stabilisée par hydratation, conduisant à une unité de DHHDP (déhydroHHDP) (Figure 28A). Quant à l'acide chébulagique, sa voie de biosynthèse n'est pas encore totalement déterminée mais la relation structurale entre le groupement déhydrochébuloyl, le composant et le groupement HHDP, a conduit Schmidt à suggérer leur lien via une ouverture du cycle DHHDP (Figure 28B).

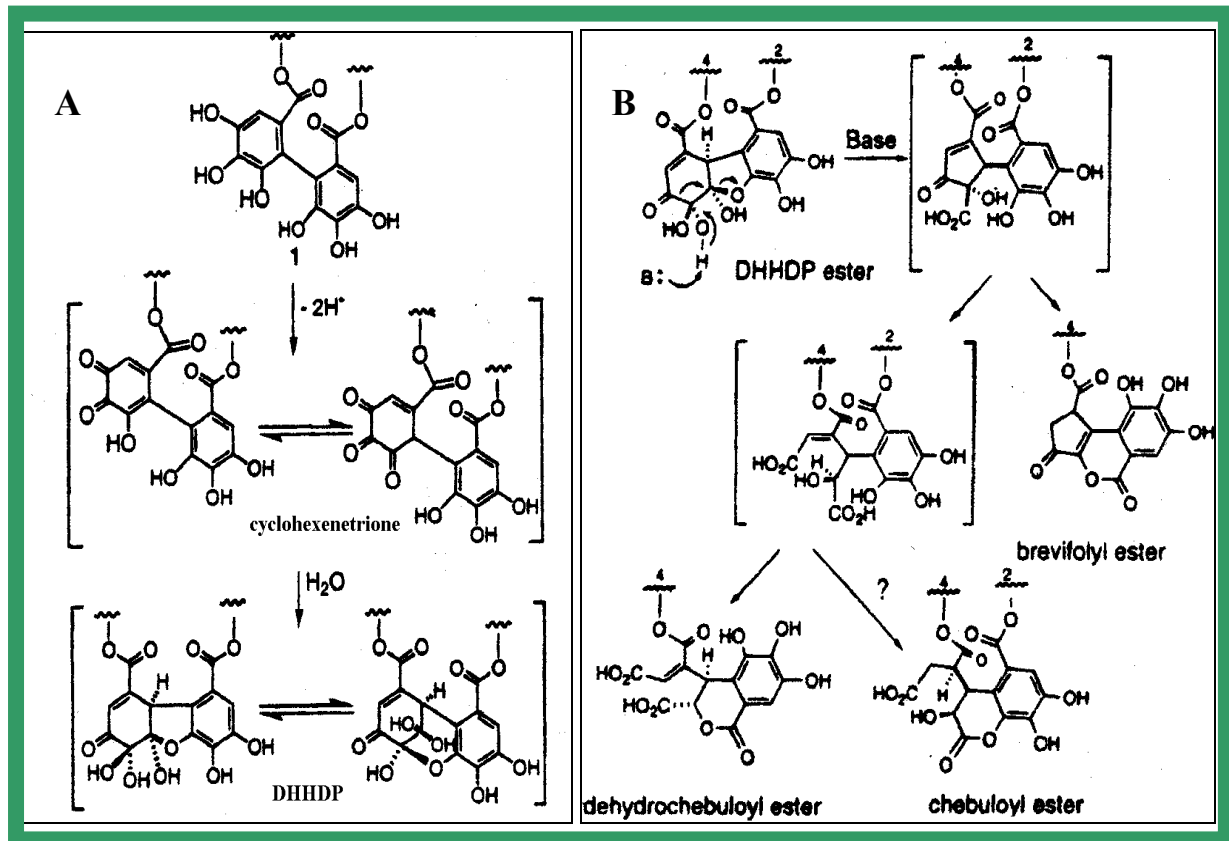


Figure 28 : Hypothèses de Schmidt sur les modifications des ellagitanins monomériques.
 A/ Hypothèse sur la voie de biosynthèse de la géraniiine ; B : Hypothèse sur les voies de biosynthèse des ellagitanins porteurs de groupements chebuloyls (cas de l'acide chébulagique), déhydrochébuloyls ou brevifoloyls (d'après, Quideau & Feldman, 1996).

Les ellagitanins peuvent exister également sous forme d'oligomères. Cette polymérisation correspondrait au couplage oxydatif de type C-O entre deux ou plus, ellagitanins monomériques au niveau de leurs résidus galloyls. Plus de 150 structures dimériques à tétramériques ont été caractérisées et classées en fonction du type d'ellagitanin monomérique impliqué et du type de liaison (Figure 29).

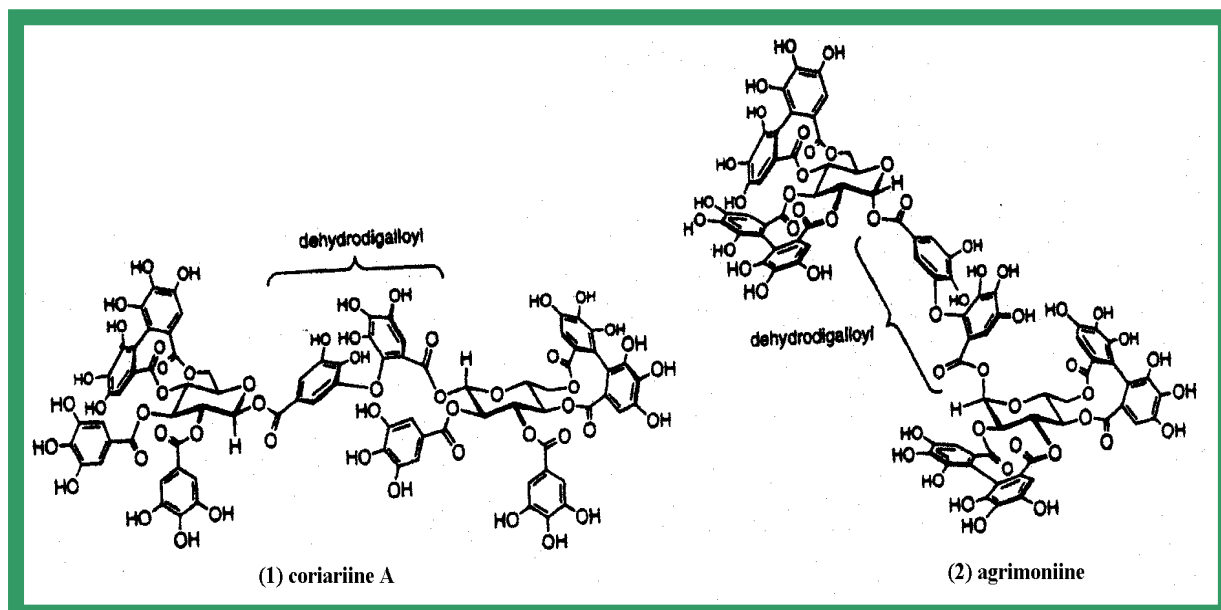


Figure 29 : Ellagitanins oligomères. (1) coriariine (dimère de la tellimagrandine II) ; (2) agrimoniine (dimère de la potentilline) (d'après Quideau & Feldman, 1996).

A.3/ Activités biologiques répertoriées des tanins

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec des macromolécules, en particulier avec les protéines. Cette propriété semble être essentielle dans leurs activités à l'encontre des virus. Ainsi, leur association avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale. De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'Herpès (Takechi *et al.*, 1985) et en particulier contre le VIH ou SIDA (Vlietinck *et al.*, 1997). L'acide chébulagique extrait de *Terminalia chebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le VIH. Cependant, il apparaît également que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la VIH transcriptase reverse ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de *Phyllanthus*, inhibiteurs de la DNA polymérase du virus Epstein-Barr (Chen Liu *et al.*, 1999). De façon plus générale, les tanins sont des inhibiteurs enzymatiques de l'élastase, de l'histidine décarboxylase, de l'enzyme de conversion de l'angiotensine... (Bruneton, 1993). L'acide chébulagique est réputé comme inhibiteur de la topoisomérase I et surtout II de l'ADN humain (Quideau & Feldman, 1996). Ce dernier possède également la propriété qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses (Quideau & Feldman, 1996). Plus récemment, des propriétés antiplasmodiales ont pu être trouvées ; l'extrait méthanolique d'écorce de *Tristanopsis calobuxus* de Nouvelle-Calédonie, contenant de nombreux tanins, a donné des résultats prometteurs. L'acide ellagique est l'un des composés actifs (Verotta *et al.*, 2001).

Plusieurs drogues à tanins existent mais leurs applications restent restreintes. « Elles sont utilisées par voie interne pour leur effet anti-diarrhéique et par voie externe pour imperméabiliser les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatoses...) » (Bruneton, 1993). Ainsi de nombreux tanins sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'acide chébulagique ou la corilagine extraits de *Terminalia citrina* (plante utilisée dans la médecine traditionnelle thaïlandaise) présentent de nombreuses activités à l'encontre de souches pathogènes de l'homme ; comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* ou encore *Enterococcus spp.* (Burapadaja & Bunchoo, 1995).

Enfin, leurs potentialités dans l'inhibition de la peroxydation des lipides ont mis en évidence leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (inhibiteurs de la xanthine oxydase).

B/ Les Flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes sont aujourd'hui caractérisés. Ce sont *lato sensu* des pigments universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas par exemple des flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Certains ne sont pas directement visibles mais ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments (flavones, flavonols). D'autres encore absorbent dans le proche ultraviolet, seuls les insectes sont aptes à les percevoir et sont attirés et guidés vers le nectar, assurant ainsi la pollinisation. Leur présence, au sein de la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de la feuille, permet une protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet.

B.1/ Biosynthèse et structure des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, la phénylalanine. C'est la condensation de trois molécules de malonyl-coenzymeA, provenant du métabolisme du glucose, catalysée par la chalcone synthase qui donne le cycle A (Figure 30 ; Merken & Beecher, 2000). Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais via la voie du shikimate en passant par la phénylalanine, qui est convertie en acide cinnamique puis en acide coumarique. L'acide coumarique-coenzymeA et les trois malonyl-coenzymeA se condensent pour former le naringétol à l'origine des différentes classes de flavonoïdes.

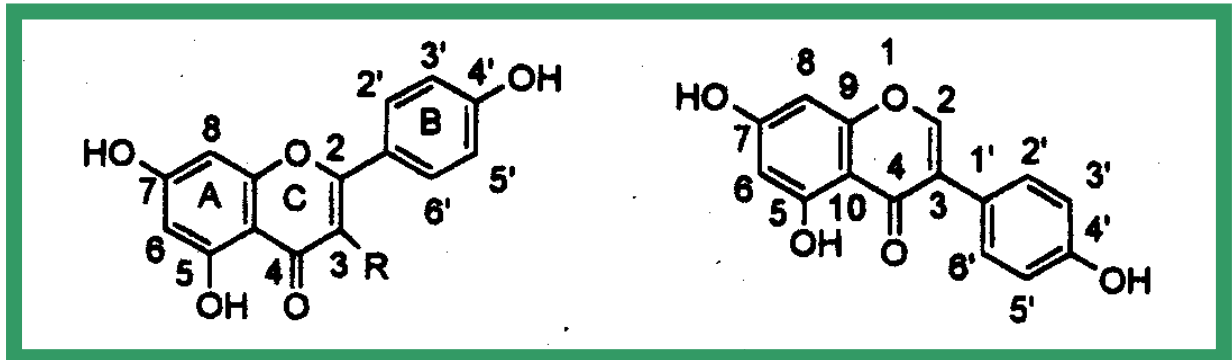


Figure 30 : Structure générale des flavonoïdes. A gauche : R=OH pour les flavonols, R=H pour les flavones ; à droite : isoflavone.

Les flavonoïdes se subdivisent en douze sous classes (Figure 31 ; Bruneton, 1993):

- les anthocyanes
- les flavonols et leurs dimères
- les dihydroflavonols
- les isoflavanones
- les flavan-3-ols
- les chalcones et dihydrochalcones
- les flavones
- les flavanones
- les isoflavones
- les flavanes
- les flavan-3,4-diols
- les auronnes

Excepté chez les algues, où la présence de flavonoïdes n'a pas été détectée à ce jour, tous les autres végétaux en sont pourvus. Cependant la classe de flavonoïdes varie en fonction de l'évolution des espèces. De nombreux auteurs se sont attachés à relier leur distribution aux différents systèmes taxonomiques y compris pour les Cunoniaceae (Bate-Smith, 1977). En particulier chez les dicotylédones, où la diversité structurale est maximale, un phylogramme à pu être dressé entre les groupes qui ont conservé une forte proportion de caractères ancestraux et ceux qui ont le plus évolué.

La grande variété de flavonoïdes identifiés à ce jour a induit la découverte de nombreuses activités biologiques de ces molécules.

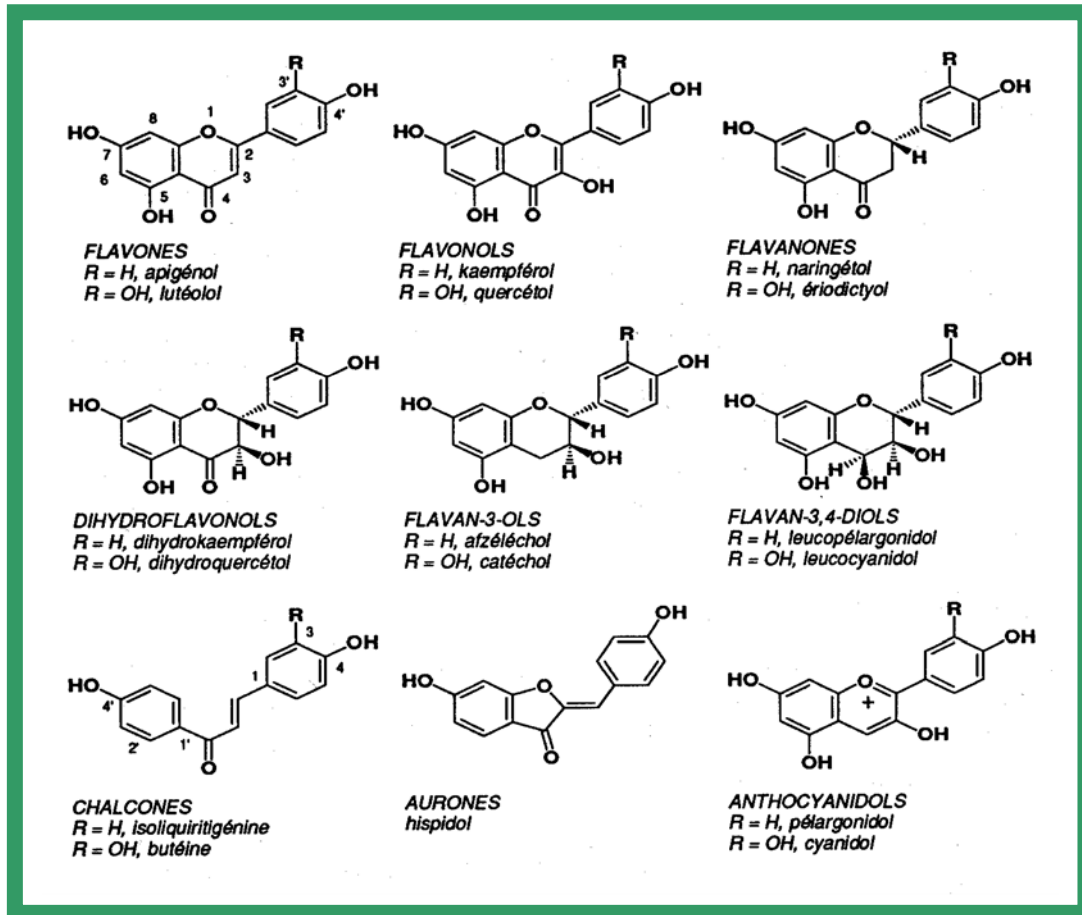


Figure 31 : Différentes classes de flavonoïdes et exemples

B.2/ Activités biologiques répertoriées des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont connus pour être potentiellement veino-actifs, ils diminueraient la perméabilité des capillaires sanguins et renforceraient leur résistance. Ils sont souvent anti-inflammatoires, ils peuvent être anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques (flavonoïdes du thym), hypercholestérolémiants, diurétiques (Bruneton, 1993).

Ils sont également reconnus comme antibactériens, pour exemple une étude effectuée sur 38 flavonoïdes issus de végétaux a montré que 4 flavonols (myricétine, datistécine, kaempférol, quercétine) et 2 flavones présentaient des activités antibiotiques à l'encontre d'un *Staphylococcus aureus* résistant (Xu & Lee, 2001).

Des propriétés antivirales leur sont également attribuées, les flavanes en particulier présentent une activité anti-VIH importante. Des flavonols tels que la quercétine, la myricétine et la quercétagine ont montré une capacité à inhiber certains rétrovirus (Vlietinck *et al.*, 1997). Des travaux récents ont permis d'isoler des flavonoïdes à partir de racines de *Limonium sinense*, actifs contre le virus de l'herpès (Lin *et al.*, 2000).

Quelques effets cytotoxiques *in vitro* ont pu également être détectés (Ismail & Alam, 2001). L'activité la mieux connue des flavonoïdes reste leur rôle d'inhibiteurs enzymatiques. Il est à noter que nombre d'entre eux ont montré *in vitro* des effets inhibiteurs sur l'élastase, la lipoxygénase et/ou la cyclo-oxygénase, ce qui expliquerait leurs effets anti-inflammatoires et anti-allergiques, mais aussi sur la xanthine oxydase (myricétine, quercétine, kaempférol), etc. (Cos *et al.*, 1998). Ces mêmes molécules sont également des piègeurs de radicaux libres (Robak & Gryglewsky, 1988).

C/ Activités biologiques d'autres métabolites secondaires

C.1/ Autres polyphénols, les quinones

Les benzoquinones constituées d'un noyau benzénique ne donnent lieu à aucune application thérapeutique, cependant leur forme réduite ou hydroquinone est douée d'un fort pouvoir antiseptique urinaire. Le produit de synthèse de cette hydroquinone est utilisé dans des applications dermatologiques et industrielles.

Certaines naphthoquinones constituées d'un système aromatique polycyclique, le naphthalène, sont antibactériennes et fongicides. Elles expliqueraient la résistance de certains bois comme le teck à l'agression de champignons et d'insectes. D'autres présentent des activités antiprotozoaires et antivirales.

Les drogues à quinones sont essentiellement connues pour leur propriété tinctoriale. Actuellement la R-Shikonine présente chez *Lithospermum erythrorhizon* est produite par culture de tissu et commercialisée comme colorant en cosmétique. (Bruneton, 1993)

C.2/ Terpénoïdes

Les terpénoïdes présentent un intérêt thérapeutique certain et un emploi industriel de première importance :

- aucun produit synthétique n'a pu encore se substituer complètement aux hétérosides cardiotoniques naturels
- les médicaments stéroïdiques (contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoires) demeurent indispensables pour couvrir les besoins de l'industrie pharmaceutique.
- de nombreuses drogues à saponosides sont utilisées sous formes galéniques simples.
- les propriétés thérapeutiques des terpénoïdes sont utilisées dans de nombreux domaines, comme cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires, analgésiques, antiviraux, antibiotiques etc.

Les saponosides en particulier sont connus pour assurer la défense du végétal contre une agression microbienne ou fongique. Les saponosides de la luzerne sont actifs à l'encontre d'espèces phytopathogènes ou encore ceux du lierre actifs contre *Candida albicans*.

Beaucoup d'autres activités leur sont attribuées :

- des propriétés hémolytiques
- des propriétés spermicides
- une toxicité contre les animaux à sang froid
- des propriétés anti-inflammatoires et anti-oedémateuses
- des propriétés antitussives et/ou expectorantes. (Bruneton, 1993)

A close-up photograph of the Cunonia atrorubens plant. The image shows several upright, cylindrical flower spikes that are a vibrant pinkish-red color. The flowers are densely packed and have a brush-like appearance. The leaves are green, elongated, and have a slightly waxy texture. The background is a soft-focus view of more of the plant's foliage and branches.

PARTIE I

Récolte et identification
d'espèces de la famille
des Cunoniaceae
de Nouvelle-Calédonie

Photo de *Cunonia atrorubens* (Mont Mou, 1999)

PARTIE I

CHAPITRE 1

La récolte



Récolte au Mont Aoupinié (1997)

CHAPITRE 1 : LA RECOLTE

Introduction

Le mode de récolte est l'élément clé de l'ensemble du travail réalisé au cours de l'étude d'un végétal. En effet, il doit permettre à celui qui l'effectue de revenir ultérieurement au même endroit, de retrouver l'espèce d'intérêt, mais surtout d'identifier cette espèce. C'est pourquoi des règles ont été établies et se doivent d'être respectées pour que tout un chacun puisse plusieurs années après revenir au lieu-dit et de nouveau effectuer une collecte.

Dans le cadre de notre étude, le but premier était de prélever toutes les parties de plantes accessibles afin d'en extraire des molécules potentiellement bio actives. Le travail se décomposait donc en deux étapes, à savoir la récolte des différents organes du végétal et la réalisation d'un échantillon botanique à des fins d'identification.

I/ Matériel et Méthodes

A/ Equipement de base

Il est évident que le matériel à utiliser reste à la discrétion du collecteur. Malgré tout, Letouzey (1969) établit une liste de base qui permet de ne pas se trouver démuni sur le terrain. Il faut rappeler que les distances effectuées isolent souvent le collecteur des zones habitées en particulier dans les pays tropicaux. La Nouvelle-Calédonie n'échappe pas à cette règle puisque la densité moyenne d'habitants n'y est que de 7 au km². Ce chiffre n'atteint plus que 4 habitants au km², si l'on retire le déséquilibre créé par la ville de Nouméa. Ceci place la Nouvelle-Calédonie au niveau des grands espaces sous peuplés d'Afrique ou d'Amérique tropicale (Dupont, 1981).

Il nous paraît donc essentiel de citer de manière succincte cette liste non exhaustive :

- Une hache et/ou un coupe-coupe
- Un sécateur
- Un canif et une lame de rasoir
- Des étiquettes de papier
- Un crayon indélébile, un crayon à papier
- Une presse munie de deux sangles et de papiers journaux
- Des sacs en toile de dimensions différentes
- Une paire de jumelles, une loupe de poche, un mètre ruban de couleur
- Un cahier de note ou cahier botanique protégé des intempéries
- Un altimètre, une boussole
- Un appareil photo

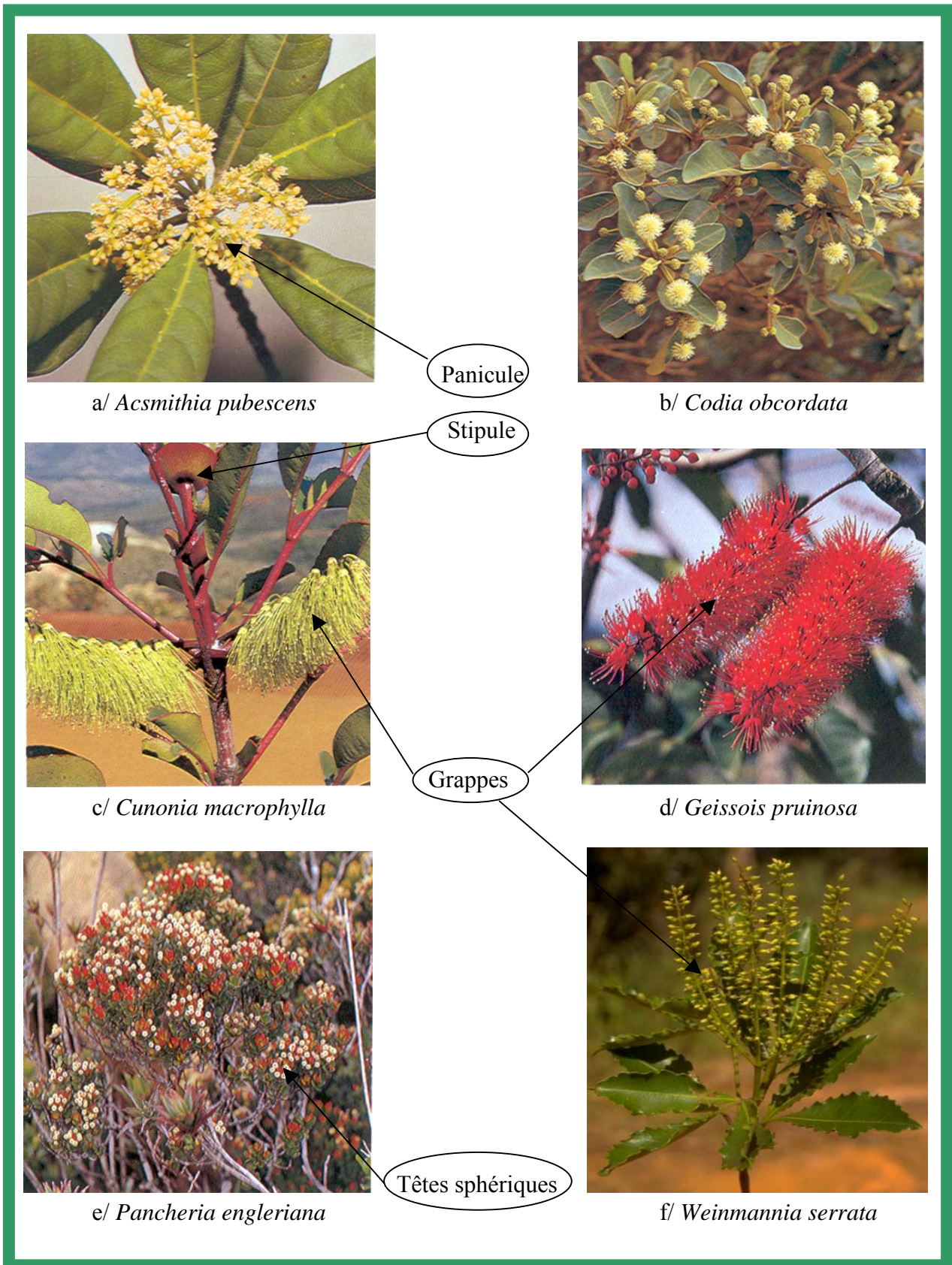


Figure 32: Inflorescences types des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie (les photos de a à e sont extraites de Schmid, 2000)

L'ensemble de ce matériel se justifie à plusieurs niveaux. Tout d'abord des éléments de coupe adaptés à la morphologie des différentes espèces. Ensuite, un matériel de repérage indispensable à la localisation de la plante. Enfin pour la collecte de l'échantillon botanique, le moyen de le conserver dans un bon état.

B/ Reconnaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae

La reconnaissance sur le terrain des espèces de la famille des Cunoniaceae se base sur des caractéristiques clés décrites par différents botanistes (Guillaumin, 1948 ; Hoogland, 1960 ; Hoogland , 1979 ; Hoogland, 1981 ; Hoogland 1987 ; Hoogland *et al.*, 1997).

Tout d'abord la présence d'un stipule plus ou moins important qui protège les nouvelles feuilles (Figure 32c).

Ensuite, le type d'inflorescence qui permet de caractériser le genre. Il en existe trois :

- l'inflorescence en panicule pour le genre *Acsmithia* (Figure 32a)
- l'inflorescence en grappe pour les genres *Geissois*, *Cunonia* et *Weinmannia* (Figure 32 c,d,f)
- l'inflorescence en têtes sphériques pour les genres *Codia* et *Pancheria* (Figure 32 b,e)

C/ Collecte des différentes parties de plante

Cette collecte a consisté en un prélèvement systématique de toutes les parties de plantes disponibles à savoir : les feuilles, l'écorce, les racines, les fleurs et/ou les fruits. Chacune de ces parties a été conditionnée séparément afin de déterminer de manière différentielle, celles contenant d'éventuelles activités biologiques pour une exploitation ultérieure.

Les quantités de matière fraîche prélevées étaient de l'ordre de 2 kg de feuilles, 3 kg de tiges et variaient pour les écorces, les racines, les fleurs et les fruits en fonction de la disponibilité, elle-même dépendante de la taille de l'arbre et de la saison de récolte. Dans tous les cas, ces éléments sont prélevés de telle manière que la plante puisse poursuivre son développement, en laissant des branches et en récoltant l'écorce de façon diffuse (Figure 33 a,b).

D/ Prélèvement de l'échantillon botanique

L'échantillon botanique prélevé doit si possible contenir le maximum d'informations sur la morphologie de l'individu, autrement dit un rameau contenant des feuilles, des fleurs, des fruits voire des graines. Il est placé de suite après la récolte au sein de la presse afin d'en assurer une bonne conservation.

Il convient de respecter de manière absolue le principe suivant :
« Toute plante sur laquelle on prélève des échantillons est affectée d'un numéro et ce même numéro s'applique à tous les fragments prélevés sur cette plante » (Letouzey, 1969).

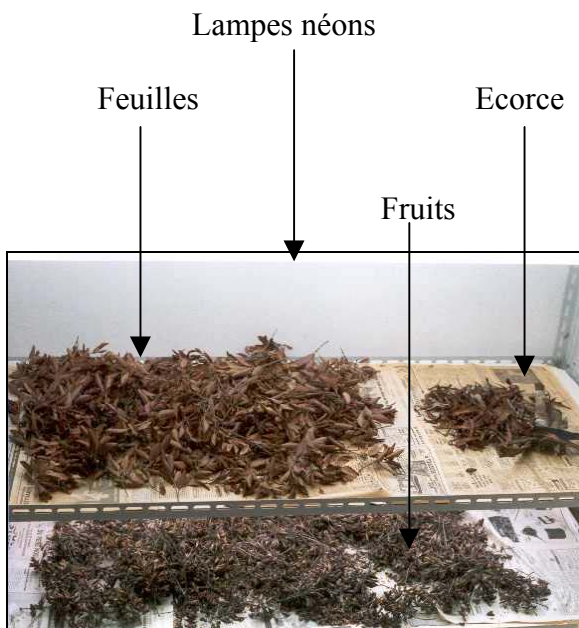


a/ Récolte de feuilles



Ecorce récoltée sur une face du tronc de l'arbuste

b/ Récolte diffuse de l'écorce (*Pancheria elliptica* BF 020)



c/ Séchage des collectes sous lampes néons (Mazdafluor, 30W) à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$



d/ Séchage des collectes en four ventilé à $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (C.N.R.S)

Figure 33 : La récolte proprement dite et le traitement des collectes.

E/ Réalisation d'une fiche type descriptive de l'espèce

En même temps que la récolte proprement dite, il paraît essentiel de prendre le maximum de notes concernant l'individu sur le terrain. C'est pourquoi, une fiche descriptive type a été mise en place (Tableau VI) permettant ainsi de n'omettre aucun détail. Cette fiche est par la suite associée à l'herbier définitif.

Tableau VI : Fiche descriptive type utilisée lors des récoltes (exemple de l'espèce référencée BF 053)

ECHANTILLON N° :		BF 053
<u>Famille :</u>	Cunoniaceae	
<u>Espèce:</u>	A identifier	
<u>Date de récolte :</u>	01 février 1999	
<u>Lieu de récolte :</u>	Mont Mou, altitude 600 mètres	
<u>Caractéristiques :</u>		
- <u>taille :</u>	Arbre de 3-4 mètres.	
- <u>inflorescence :</u>	En grappe de couleur verte à jaune.	
- <u>fruit :</u>	En grappe, brun ovoïde.	
- <u>feuillage :</u>	Feuilles trifoliolées pétiolées. Jeunes feuilles et pousses de couleur rouge. Stipule ovale de près de 2 cm	

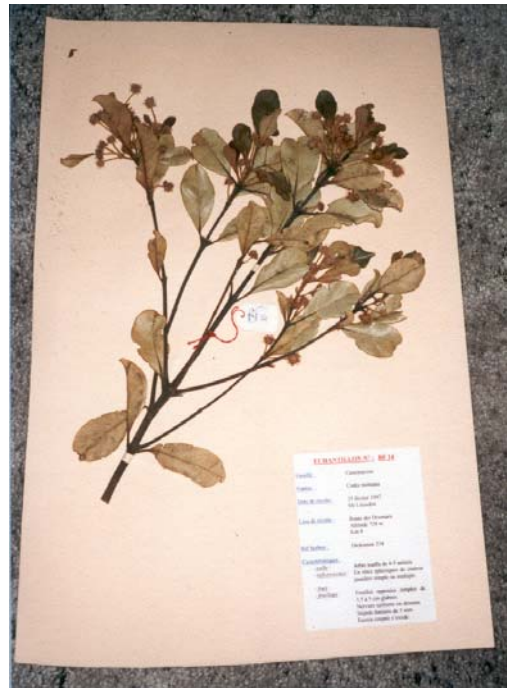
F/ Traitement des collectes

L'ensemble du matériel végétal récolté est rapporté au laboratoire puis étalé sur des feuilles de papier journal, sur un bâti de culture illuminé par 3 rangs de lampes néons de type Mazdafluor, blanc industrie (30W, 4A), dans une pièce aérée ($t^{\circ}=30^{\circ}\text{C}$), pour y sécher pendant une période allant de 1 à 2 semaines (Figure 33 c). Chaque jour, les tas formés sont remués afin d'éviter l'apparition de moisissures.

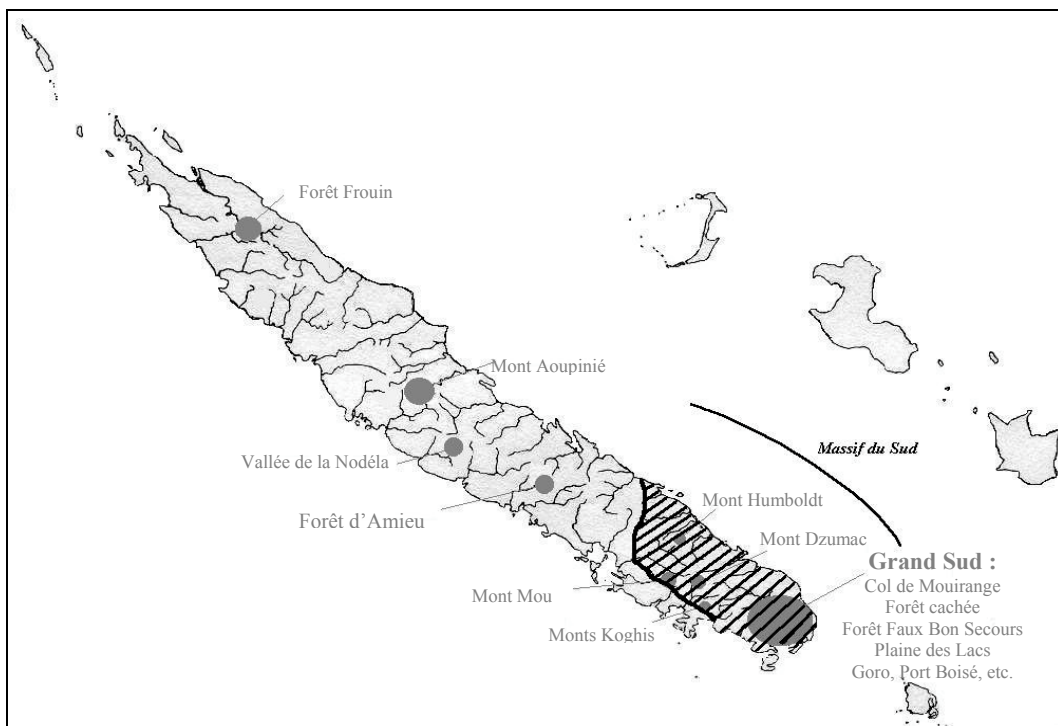
Les échantillons fournis pour cette étude par le C.N.R.S. de Nouméa ont pour leur part été séchés dans un four ventilé, après étalement dans des compartiments aérés, à une température de 45°C (Figure 33 d).



a/ Herbarium de *Cunonia deplanchei* BF 017



b/ Herbarium de *Codia arborea* BF 020



c/ Aire de répartition des collectes sur l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie

Figure 34 : Exemples d'herbiers obtenus et carte de répartition des lieux de collecte sur la Nouvelle-Calédonie.

G/ Séchage et réalisation de l'herbier

La presse contenant les échantillons botaniques est disposée dans un four Pasteur à une température de 45°C. Le four est ouvert de façon régulière pour permettre l'évacuation de l'humidité.

Une fois séché, l'échantillon botanique est monté en herbier selon des règles très strictes (Schnell, 1960). L'herbier est constitué de deux éléments :

- l'échantillon proprement dit, fixé à l'aide de bandelettes de papier collées, est disposé sur une feuille de bristol rigide de 43 x 27.5 cm, de manière à ce que toutes les caractéristiques morphologiques soient visibles (face supérieure et inférieure de la feuille, stipule et inflorescence en évidence, fruits et graines généralement mis en sachet).
- la fiche descriptive qui consigne l'ensemble des données concernant l'échantillon.

III/ Résultats et Discussion

Au cours de ces trois années de thèse, une centaine de plantes ont pu être herborisées, répertoriées et associées à une fiche descriptive (Figure 34 a,b). Leur collecte a été effectuée sur l'ensemble de la Grande Terre et en particulier dans le Massif du Sud, lieu privilégié du développement de nombreuses espèces de Cunoniaceae (Figure 34c). Le tableau VII montre que 80% des plantes en proviennent.

Tableau VII : Différents lieux de collecte des espèces de la famille des Cunoniaceae et pourcentage de plantes par lieu de collecte

Lieux de collecte	Zones	Nombre de plantes collectées	Pourcentage de plantes par lieu de collecte
Massif Du Sud	Région du Lac de Yaté	14	15,7 %
	Région de la Plaine des Lacs	11	12,4 %
	Région de Goro / Port Boisé	9	10 %
	Mont Humboldt	2	2,2 %
	Monts Koghis / Forêt de la Thy	5	5,5 %
	Mont Dzumac	18	20%
	Mont Mou	13	14,4 %
Amieu	Forêt du col d'Amieu	1	1,1 %
Canala	Mine Boakaine	3	3,3 %
Massif Me Maoya	Forêt de la Nodéla	3	3,3 %
Ponérihouen	Forêt de l'Aoupinié	3	3,3 %
Pouembout	Plateau de Tiéa	1	1,1 %
Koumac	Forêt Frouin	7	7,7 %

Ces chiffres ne reflètent cependant pas l'absolue réalité des choses puisque les lieux de récolte ont été sélectionnés pour leurs proximités par rapport à Nouméa et leur facilité d'accès. L'analyse de ces résultats reste donc dépendante de nos choix, le but premier n'étant pas une prospection de l'ensemble des espèces de la famille sur tout le territoire mais bien la collecte d'un maximum d'espèces différentes, par leur morphologie et leur origine géographique, pour un criblage biologique.

On peut néanmoins constater qu'il est possible de trouver une très grande partie des espèces de la famille dans le Massif du Sud et ceci quel que soit le genre considéré.

Si l'on s'attache au faciès des lieux de récolte, on observe deux grands types de milieux :

- les forêts denses et humides (Aoupinié, Frouin, Amieu, La Nodéla, La Thy, Humboldt) dont l'altitude est moyenne, comprise entre 500 et 1500 mètres.
- les maquis dit miniers qui peuvent être à faible altitude entre 20 et 200 mètres (Lac de Yaté, Port Boisé, Goro, Plaine des lacs) ou à altitude moyenne entre 200 et 1000 mètres (Mont Dzumac, Monts Koghis, Mont Mou, Plateau de Tiéa, Mine Boakaine).

Il semble enfin, que les mois les plus propices à la récolte d'une grande partie des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie soient ceux de février et mars comme le montre le tableau VIII. En effet, plus de la moitié des espèces herborisées l'ont été pendant ces deux mois. Malgré tout, certaines espèces ne fleurissent qu'à des périodes bien spécifiques comme dans le cas de l'espèce *Cunonia linearisepala* dont la floraison a lieu au mois de juillet et sur un temps court de 2 à 3 semaines. Il paraît donc essentiel d'effectuer des prospections régulières à toutes périodes de l'année.

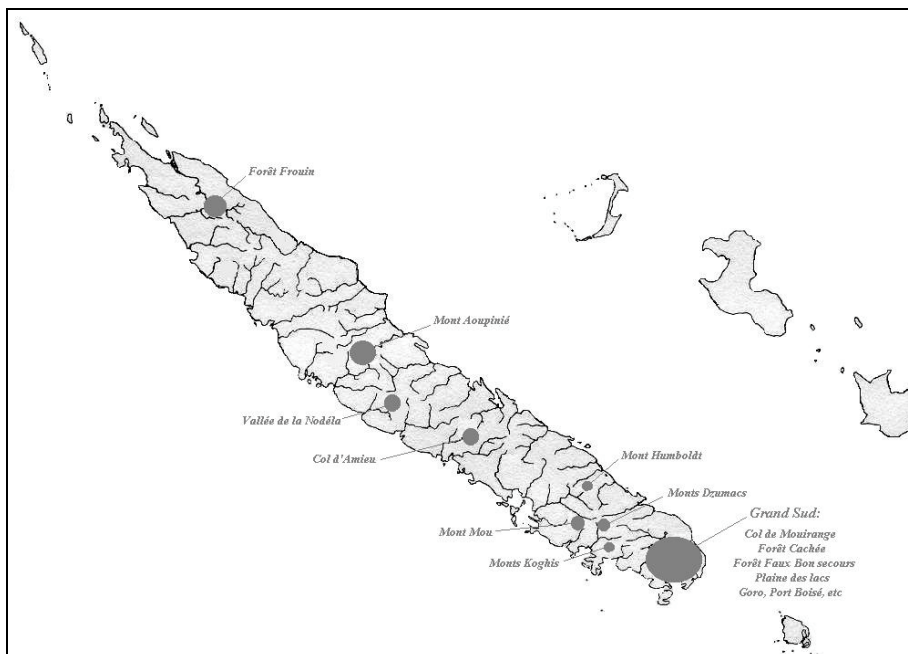
Tableau VIII : Nombre d'espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie en fleurs et en fruits en fonction du mois de l'année.

Mois de l'année	Nombre d'espèces en fleurs	Nombre d'espèces en fruits
Janvier		
Février	20	13
Mars	16	7
Avril	1	
Mai	9	4
Juin	4	3
Juillet	6	3
Août		1
Septembre	3	2
Octobre		
Novembre	3	
Décembre	6	2

PARTIE I

Chapitre 2 :

Identification des échantillons botaniques et contribution à la connaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie



Carte des lieux de récolte des espèces de la famille des Cunoniaceae

CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS BOTANIQUE ET CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES ESPECES DE LA FAMILLE DES CUNONIACEAE EN NOUVELLE-CALEDONIE

Introduction

La description de la flore de Nouvelle-Calédonie a débuté dès sa découverte puisque l'on retrouve dans les carnets de bords de navigateurs, nombre de planches concernant les espèces végétales de l'île, ainsi que des herbiers provenant de ces différentes expéditions. La première trace écrite est celle laissée par Forster (1786), relatant ses découvertes lors de son voyage de 1774 avec le capitaine Cook. Malgré tout, la véritable étude taxonomique effectuée par les taxonomistes du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris ne commence réellement qu'après l'annexion par la France de ce territoire en 1853. La famille des Cunoniaceae n'échappe pas à cette règle et c'est dès le début des années 1860 que les premières espèces sont décrites (Brongniart & Gris, 1862 ; 1869). Plusieurs d'entre-elles seront révisées, confirmées, infirmées voire subdivisées. A ce jour, on reconnaît la présence des six genres, *Acsmithia*, *Codia*, *Cunonia*, *Geissois*, *Pancheria* et *Weinmannia* (Guillaumin, 1948). Trois d'entre eux ont fait l'objet de révisions récentes, le genre *Acsmithia* (Hoogland, 1979 ; Hoogland, 1987), le genre *Cunonia* (Hoogland *et al.*, 1997) et le genre *Weinmannia* (Hopkins, 1998a,b,c ; Hopkins & Florence, 1998). En ce qui concerne les trois autres genres, leur distinction se base sur les clés de Guillaumin (1948).

Dès lors, dans le cadre de la valorisation d'une espèce qui présenterait un intérêt économique, l'identification botanique se révèle être fondamentale. C'est pourquoi, il nous paraît important de rappeler la démarche qui nous a permis d'aboutir à l'identification botanique définitive des espèces collectées.

I/ Matériel et Méthodes

L'identification botanique de l'espèce se réalise en deux étapes.

- La première consiste en une observation minutieuse et détaillée de l'individu collecté. Dans un premier temps sur le terrain par relevé des odeurs, des couleurs, de la morphologie (arbre, arbuste), caractéristiques qui n'apparaîtront plus sur l'herbier séché. Toutes ces données sont consignées sur la fiche descriptive (cf. chapitre 1). Dans un second temps au laboratoire, l'usage de la loupe binoculaire permet de définir la présence de caractéristiques morphologiques invisibles à l'œil nu comme la présence de poils sur la face inférieure des feuilles ou encore sur les valves des fruits etc. La totalité de ces données permet, à l'aide des clés botaniques préétablies, d'identifier de manière quasi définitive l'espèce en présence.
- La seconde étape est en fait une vérification de notre identification par comparaison avec des herbiers déjà référencés et classés. Dans notre cas, cette partie a été réalisée grâce à l'herbier de l'I.R.D. et s'est effectuée avec l'aide de Tanguy Jaffré et de Jean-Marie Veillon, tous deux botanistes au sein de cet organisme.

Enfin, tous nos herbiers ont été vérifiés par Helen Fortune Hopkins de l'Université de Lancaster et par Jason Bradford du Missouri Botanical Garden lors de leur passage en Nouvelle-Calédonie au mois de décembre 2000. Ces deux chercheurs révisent actuellement plusieurs genres de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie et du monde (Hopkins, 1998a,b,c ; Bradford, 1998).

II/ Résultats et Discussion

Comme développé dans le chapitre 1, une centaine de plantes ont été herborisées au cours de ce travail de thèse. Toutes ont fait l'objet d'une identification botanique et ont été classées au sein de leur genre en fonction des clés établies par Guillaumin (1948) :

« Arbres ou arbustes. Feuilles opposées ou verticillées, des stipules. Fleurs hermaphrodites ou unisexuées, sépales 3-5, pétales 3-5 ou 0 (*Geissois*, *Spiraeanthemum*, certains *Codia*), étamines 4-10 ou ∞ , à anthères à 2 loges s'ouvrant par des fentes longitudinales, ovaire généralement libre (infère chez *Codia*), à 2 loges, styles 2 ou 2-5, carpelles libres, ovules anatropes, 2 collatéraux ou ∞ sur 2 rangs, insérés sur la cloison ou la suture des carpelles. Fruit en capsule s'ouvrant par 2 valves, en follicule (*Pancheria*, *Spiraeanthemum*) ou indéhiscent (*Codia*). Embryon droit dans un albumen charnu.

- Etamines ∞ , pétales 0 ; feuilles composées palmées ; inflorescence en grappe.....**GEISSOIS**
Etamines en nombre égal ou double à celui des sépales.....1
1. Inflorescence en grappe simple fourchue ou en panicule.....2
Inflorescence en tête sphérique ; des pétales ou non ; feuilles simples ou composées.....5
 2. Pétales 0 ; carpelles 5-3 (exceptionnellement 2) ; feuilles simples ; inflorescence en panicule.....**SPIRAEANTHEMUM** devenu **ACSMITHIA**
Des pétales ; ovaires à 2 loges ; feuilles simples ou composées palmées ou pennées ; inflorescence en grappe simple ou fourchue.....3
 3. Sépales et pétales 3-4 ; graines longuement ailées aux 2 extrémités et sur 1 bord ; feuilles simples ou composées palmées.....**VESSELOWSKYA** genre éliminé
Sépales et pétales 4-5 ; graines courtement ailées ou sans ailes ; feuilles simples ou composées pennées.....4
 4. Graine anguleuse ou courtement ailée, non velue.....**CUNONIA**
Graine arrondie, non ailée, velue.....**WEINMANNIA**
 5. Ovaire supère, sans longs poils laineux, carpelles 2, libres atténués en style conique ; des pétales ; fruit à 2 carpelles déhiscent, à 1 graine chacun.....**PANCHERIA**
Ovaire infère, couvert de longs poils laineux, à 2 loges, styles filiformes ; des pétales ou non ; fruit indéhiscent, à 1 seule graine.....**CODIA** »

L'analyse des résultats sera donc effectuée genre par genre et ceci afin de la rendre plus claire. Pour chacune des espèces, nous rappellerons les caractéristiques qui nous ont permis d'établir son identification, observées tant sur le terrain que sur l'herbier. Enfin, nous établirons sa répartition géographique en fonction de nos lieux de récolte et de ceux déjà connus dans la littérature ou obtenus dans l'herbier de l'IRD et auprès des botanistes du même organisme.

A/ Les espèces du genre *Acsmithia*

Les clés du genre ont été établies par Hoogland en 1979, date à laquelle il précise la présence de 8 espèces :

- *Acsmithia pubescens*
- *Acsmithia elliptica*
- *Acsmithia pedunculata*
- *Acsmithia densiflora*
- *Acsmithia brongniartiana*
- *Acsmithia austrocaledonica*
- *Acsmithia undulata*
- *Acsmithia laxiflora*

En 1987, il apporte une modification concernant l'espèce *Acsmithia densiflora*, qu'il subdivise en trois espèces à savoir :

- *Acsmithia densiflora*
- *Acsmithia collina*
- *Acsmithia meridionalis*

Ce qui porte le nombre total d'espèces à 10 pour ce genre.

Pour notre part, nous avons pu récolter 5 espèces :

A.1/ *Acsmithia meridionalis* Hoogland inédit

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles unifoliolées coriaces, glabres, pétiolées, verticillées par 3, 4 ou 5, elliptiques à marge entière décurrense à la base sur une courte distance, 3 fois plus longues que larges, avec 6 à 8 nervures saillantes sur la face inférieure. Bourgeon terminal glabre à aspect résineux. Inflorescence glabre, en panicule de couleur jaune. Fruits glabres de couleur verte.

- Dates et lieux de récolte (Figure 35c)

BF 030, 02/1998, Pont Gaüzère, Route du Sud, en fruits

BF 044, 05/1998, Forêt Faux Bon Secours, en fleurs

BF 070, 03/2000, Pont Gaüzère, Route du Sud, en fleurs (Figure 35a)

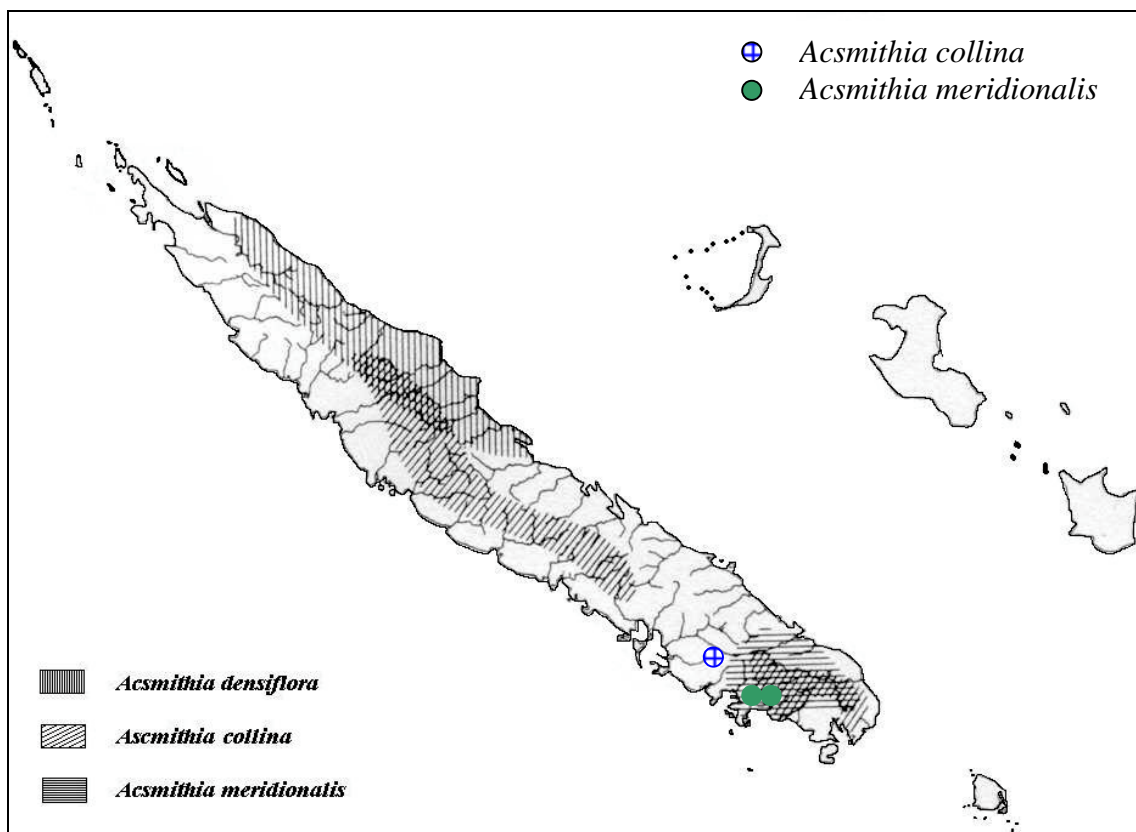
Les lieux de récolte correspondent aux données établies par Hoogland (1987). On retrouve cette espèce sur des maquis ultrabasiques de pente, en général, mais aussi en forêt humide sur le même type de sol.



a/ *Acsmithia meridionalis*



b/ *Acsmithia collina*



c/ Répartition géographique selon Hoogland (1987)
et lieux de récolte d'*A. meridionalis* et d'*A. collina* ○

Figure 35 : Photos d'*A. meridionalis*, d'*A. collina* ; lieux de récolte de ces deux espèces

A.2/ *Acsmithia collina* Hoogland inédit

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles unifoliolées coriaces, glabres, pétiolées, verticillées par 4, elliptiques, arrondies au sommet, à marge entière décurrente à la base sur une courte distance, 2 fois plus longues que larges. 7 à 8 nervures rougeâtres, saillantes sur la face inférieure. Bourgeon terminal glabre à aspect résineux. Fruits glabres de couleur verte.

- Dates et lieux de récolte (Figure 35c)

BF 033, 02/1998, Mont Dzumac, en fruits (Figure 35b)

Le lieu de récolte est situé légèrement au-delà de la limite supérieure établie par Hoogland (1987), ce qui constitue un argument en faveur de l'élargissement de cette limite. On retrouve cette espèce sur des maquis ultrabasiques de pente.

A.3/ *Acsmithia elliptica* (Vieillard ex Pampanini) Hoogland

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles unifoliolées coriaces, glabres, à pétiole court, verticillées par 4, elliptiques, arrondies au sommet, obtuses à la base, à marge entière, 2 ½ fois plus longues que larges. Nervure principale saillante en dessous. Bourgeon terminal glabre à aspect résineux. Inflorescence glabre, en panicule de couleur jaune pâle.

- Dates et lieux de récolte (Figure 36d)

BF 058, 02/1999, Mont Mou, en fleurs (Figure 36a)

La plante sur laquelle nous avons effectué notre collecte se trouve en lisière de la forêt sur roche ultrabasique ; ceci est confirmé pour la plupart des échantillons déposés à l'Herbier de l'I.R.D.

A.4/ *Acsmithia pubescens* (Pampanini) Hoogland

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 6 à 7 mètres. Feuilles unifoliolées coriaces, glabres à l'état adulte mais pubescentes sur la face inférieure à l'état jeune. Nettement pétiolées, verticillées par 4, elliptiques, à sommet aigu, à marge entière, 2 fois plus longues que larges. Bourgeon terminal pubescent non résineux. Pubescence blanchâtre visible sur les jeunes rameaux. Inflorescence hirsute, en panicule de couleur blanche. Fruits à valve hirsute de couleur verte.

- Dates et lieux de récolte (Figure 36d)

BF 034, 03/1998, Forêt Frouin, en fleurs (Figure 36b)

Cette espèce se retrouve dans des forêts denses et humides, dans des forêts galeries et plus rarement sur maquis.



B. Fogliani

a/ *Acsmithia elliptica*



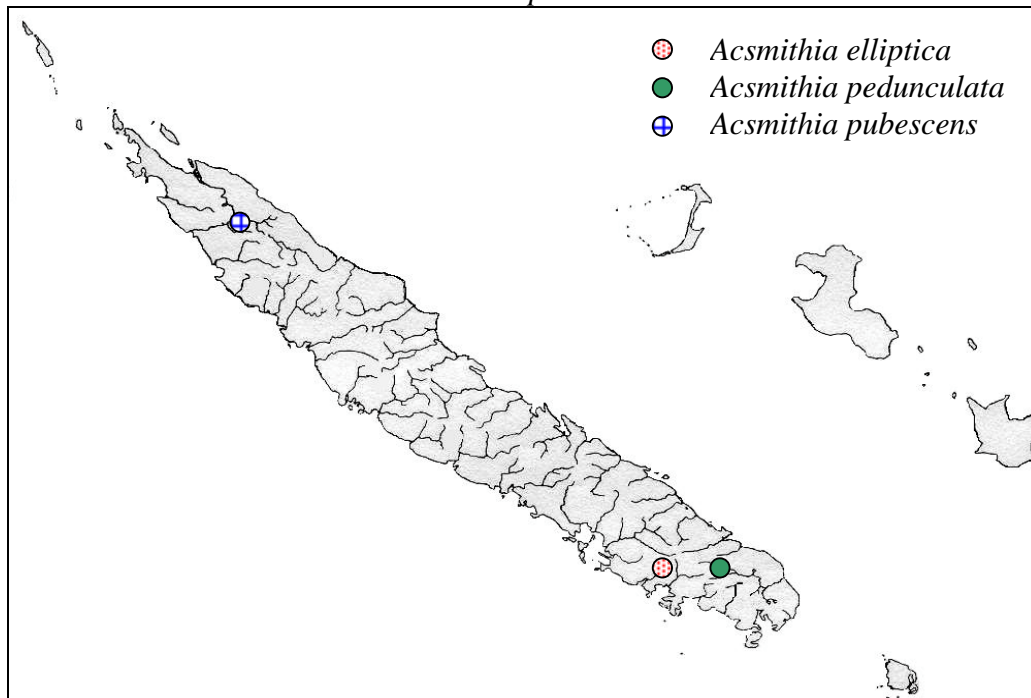
M. Schmid

b/ *Acsmithia pubescens*



J. C. Bradford

c/ *Acsmithia pedunculata*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte d'*A. elliptica*,
A. pubescens et d' *A. pedunculata*

Figure 36 : Photos d'*A. elliptica*, *A. pubescens*, *A. pedunculata* ; lieux de récolte de ces espèces

A.5/ *Acsmithia pedunculata* (Schlechter) Hoogland

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles unifoliolées, peu coriaces, glabres, à pétiole peu distinct, verticillées par 4, elliptiques, à sommet aigu, à marge entière, à limbe en coin à la base et décurrent sur une longue distance allant jusqu'à la tige, 3 fois plus longues que larges. Bourgeon terminal glabre à aspect résineux. Inflorescence glabre, en panicule de couleur blanche présentant de petites feuilles verticillées par 4 à chaque étage d'où partent des sous inflorescences.

- Dates et lieux de récolte (Figure 36d)

BF 069, 03/2000, Bois du Sud, Ouénarou, en bord de rivière, en fleurs (Figure 36c)

Cette espèce est généralement trouvée en lisière de forêt dense sur roche ultrabasique.

Conclusion sur le genre : Les espèces de ce genre se retrouvent tant en forêt dense et humide où elles atteignent de grandes tailles, que sur maquis minier où elles ne dépassent guère les 3-4 mètres. Leur répartition est dépendante de l'espèce, nous avons pu récolter toutes les espèces présentes dans le sud puisque les 5 autres se développent de la région centrale ou au nord de la Nouvelle-Calédonie (Hoogland, 1979 ; Hoogland 1987).

B/ Les espèces du genre *Cunonia*

Ce genre révisé par Hoogland *et al.* (1997) présente une particularité. En effet, toutes les espèces de ce genre, à l'exception de l'une d'entre elle, *C. capensis* (taxon d'Afrique du Sud), n'existent qu'en Nouvelle-Calédonie. Leur révision a permis de passer de 16 (Guillaumin, 1948) à 23 espèces en Nouvelle-Calédonie, ce qui dote le genre de 24 espèces au total à ce jour.

Le premier signe de distinction des espèces entre elles se trouve être leurs feuilles qui peuvent être soit simples, soit composées trifoliolées ou pennées. Le second signe est basé sur leurs inflorescences en grappes qui présentent des morphologies différentes. Hoogland *et al.* (1997) en distinguent six. Enfin, la présence ou l'absence de poils sur le pistil, la valve du fruit et la face inférieure de la stipule est un caractère essentiel à la reconnaissance des différentes espèces.

Nous avons pu pour ce genre récolter 17 des 23 espèces connues regroupées ici en fonction de 4 critères morphologiques distincts.

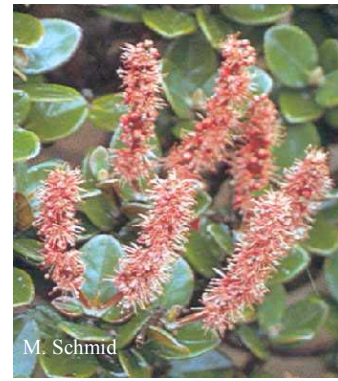
B.1/ Espèces à feuilles simples

Elles sont répertoriées au nombre de 6 :

- *C. bullata*
- *C. rotundifolia*
- *C. balansae*
- *C. alticola*
- *C. atrorubens*
- *C. purpurea*



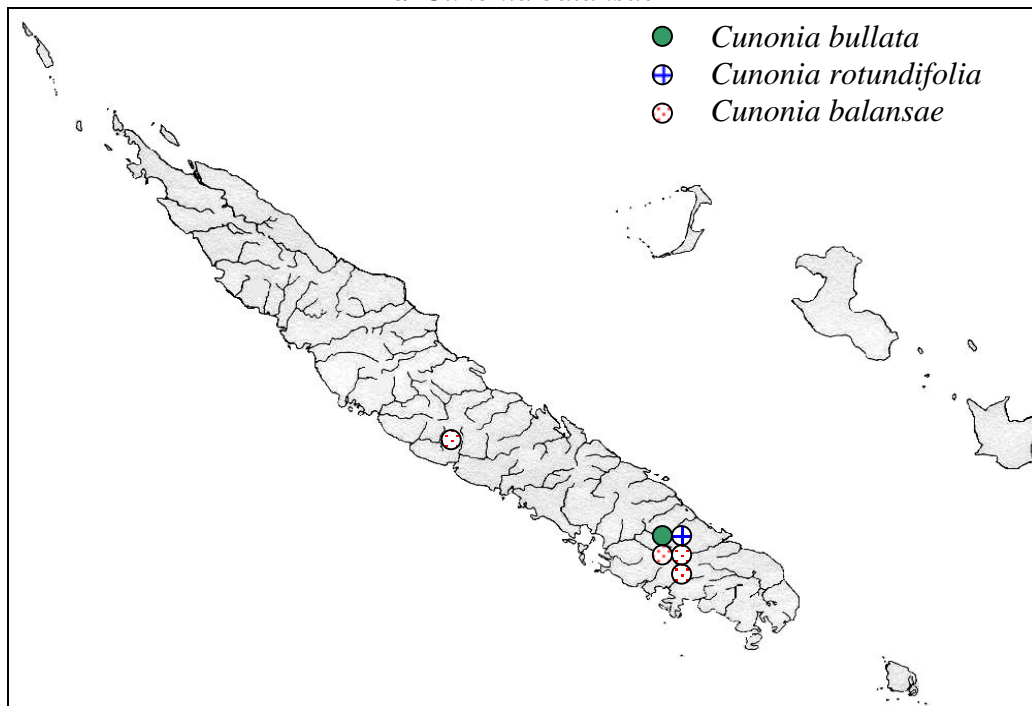
a/ *Cunonia bullata*



b/ *Cunonia rotundifolia*



c/ *Cunonia balansae*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. bullata*,
C. rotundifolia, et de *C. balansae*

Figure 37: Photos de *C. bullata*, *C. rotundifolia*, *C. balansae* ; lieux de récolte de ces espèces

Les trois dernières existent également sous forme de feuilles composées pennées, forme sous laquelle nous les avons collectées, elles feront donc l'objet d'un prochain paragraphe.

Les trois premières ont pour leur part toutes été collectées et font l'objet des trois points suivants.

B.1.1/ *Cunonia bullata* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 5 mètres à feuillage dense. Feuilles quasi-circulaires de 5-6 x 5-6 cm, simples, opposées, bullées, à revêtement soyeux de couleur rouille sur la face inférieure, pétiolées. Nervures principales et secondaires saillantes sur la face inférieure. Stipule à face inférieure velue. Inflorescence en pseudo-grappes axillaires, en paires opposées. Fleurs sessiles de couleur blanche.

- Dates et lieux de récolte (Figure 37d)

BF 067, 02/2000, Mont Humboldt, altitude 1400 mètres, en fleurs (Figure 37a)

On retrouve cette espèce en altitude dans les hautes montagnes du Massif du Sud (Sindao, Humboldt, Kouakoué, Montagne des Sources, Monts Koghis), au-dessus de 1000 mètres sur roches ultrabasiques.

B.1.2/ *Cunonia rotundifolia* Däniker

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste buissonnant de 1 à 1,5 mètres à feuillage en bouquet terminal. Feuilles ovales de 1.5-2 x 1.3-1.8 cm, simples, opposées, à revêtement dense apprimé soyeux couvrant complètement la face inférieure, presque sessiles (pétiole de 1 mm au plus). Pas d'inflorescence sur l'échantillon collecté. D'après Hoogland *et al.* (1997) : inflorescence en pseudo-grappes axillaires, en paire opposées, fleurs à pédicelles nettement recourbés.

- Dates et lieux de récolte (Figure 37d)

BF 068, 02/2000, Mont Humboldt, altitude 1500 mètres, échantillon stérile (Figure 37b)

Cette espèce est connue uniquement au Mont Humboldt et au Mont Kouakoué au-dessus de 1000 mètres sur maquis ultrabasique d'altitude.



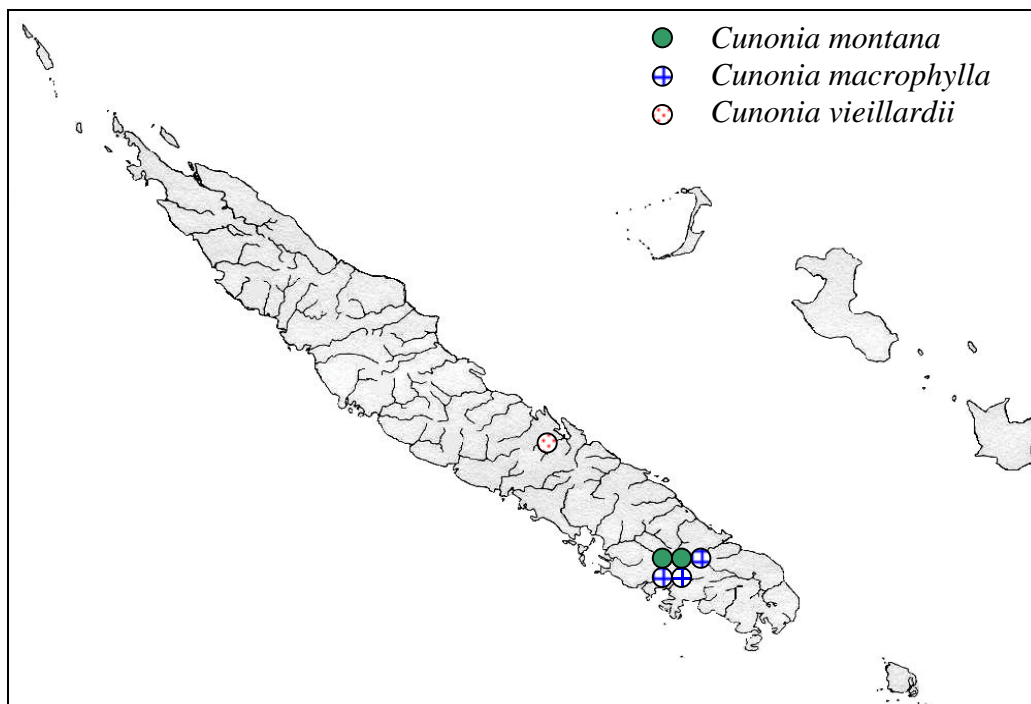
a/ *Cunonia montana*



b/ *Cunonia macrophylla*



c/ *Cunonia vieillardii*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. montana*,
C. macrophylla et de *C. vieillardii*

Figure 38: Photos de *C. montana*, *C. macrophylla*, *C. vieillardii* ; lieux de récolte de ces espèces

B.1.3/ *Cunonia balansae* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 5 mètres. Feuilles entières de 7-9 x 4-4.5 cm, simples, opposées, alternes, glabres, à aspect gaufré, à marge révoluée, oblongues, 3 fois plus longues que larges, nettement pétiolées. Nervure primaire saillante sur la face inférieure. Nervures secondaires creusant un léger sillon sur la face supérieure donnant son aspect gaufré à la feuille. Existence d'un réseau de nervures tertiaires visibles sur la face inférieure. Stipule terminale elliptique de 0.6-0.7 cm à pubescence blanche sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes simples, axillaires, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Fleurs de couleur blanche. Fruits en grappes de couleur verte.

- Dates et lieux de récolte (Figure 37d)

BF 011, 02/1997, Route des Mont Dzumac, altitude 900 mètres en fruits

BF 026, 10/1997, Vallée de la Nodéla, altitude 500 mètres, en boutons floraux

BF 054, 02/1999, Mont Mou, altitude 600 mètres, en fruits

BF 064, 12/1999, Mont Dzumac, altitude 600 mètres, en fleurs (Figure 37c)

BF 076, 03/2000, Mont Mou, altitude 600 mètres, en fruits

JCB 1108, 12/2000, Forêt des Monts Koghis, en fleurs, récolte effectuée avec J.C. Bradford

Cette espèce peut se trouver à la fois sur du maquis ultrabasique de pente (BF 026), comme en bordure de forêt humide (BF 011, BF 054, BF 064, BF 076) en général à des altitudes moyennes comprises entre 500 et 1000 mètres. Il est malgré tout possible d'en trouver à faible altitude, comme au Parc Provincial de la Rivière Bleue.

B.2/ Espèces à feuilles composées, à pistil glabre ou valve du fruit glabre, à stipule glabre en dessous

Sur 9 espèces recensées comme tel, l'espèce *C. deplanchei* peut également posséder une stipule velue en dessous et c'est sous cette forme que nous l'avons collectée, elle sera donc développée au paragraphe B.3, p. 74. Sur les 8 autres, 3 ont été collectées et font l'objet des points suivants.

B.2.1/ *Cunonia montana* Schlechter

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, composées pennées à 2-3 paires de folioles latérales et une foliole terminale, à rachis ailé, à pétiole net de moins de 2 cm. Folioles dentelées sessiles de 1-2 x 0.5-0.7 cm. Stipule glabre sur la face inférieure. Infrutescence en pseudo-grappes, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Rachis de la partie fructifère plus long que le pédoncule. Infrutescence de 5 cm de long. Fruits de couleur rouge à l'état jeune virant au brun. Valve du fruit glabre.

Dates et lieux de récolte (Figure 38d)

BF 032, 02/1998, Route du Mont Dzumac, altitude 600 mètres, en fruits secs

BF 057, 02/2000, Mont Mou, altitude 1000 mètres, en fruits (Figure 38a)

On retrouve cette espèce à une altitude comprise entre 600 et 1300 mètres dans le centre et le sud de la Grande Terre.

B.2.2/ *Cunonia macrophylla* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres le plus souvent monocaule. Feuilles opposées, composées pennées à 2-3 paires de folioles latérales et une foliole terminale, parfois trifoliolées, à pétiole net long de 3-5 cm. Folioles coriaces légèrement dentelées, de 5-15 x 2-6 cm, pétiolulées. Stipule cordiforme de 1-3 cm, glabre sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Rachis de la partie florifère plus long que le pédoncule. Fleurs de couleur verte à jaune, grandes pour le genre (5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère, style à deux branches). Fruits déhiscents de couleur verte à l'état jeune virant au brun. Valve du fruit glabre.

- Dates et lieux de récolte (Figure 38d)

BF 008, 02/1997, Route du Mont Dzumac, altitude 980 mètres, en fleurs

BF 053, 02/1999, Mont Mou, altitude 600 mètres, en fleurs

BF 073, 03/2000, Route du Mont Dzumac, altitude 600 mètres, en fleurs

BF 075, 03/2000, Mont Mou, altitude 600 mètres, en fleurs (Figure 38b)

BF 080, 06/2000, Monts Koghis, altitude 600 mètres, en fruits

Cette espèce est bien répandue dans tout le sud de la Grande Terre dès le Mont Sindoa et se retrouve tant à faible altitude qu'à des altitudes allant jusqu'à 1200 mètres sur roches ultrabasiques.

B.2.3/ *Cunonia vieillardii* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 2 à 3 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées, à pétiole net de plus de 1.5 cm. Folioles de 2 x 5 cm, à sommet nettement arrondi, glabres, dentées, en coin à la base. Les folioles latérales sont sessiles et la foliole terminale est décurrente sur le pétiole. Nervures peu saillantes. Stipule ovale à base subcordée, glabre sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes, de couleur rouge-pourpre. Valve du fruit glabre.

- Dates et lieux de récolte (Figure 38d)

BF 089, 09/2000, Mine Boakaine, Canala, altitude 700 mètres, en fleurs (Figure 38c)

Cette espèce est bien répandue dans tout le Massif du sud de la Grande Terre et se retrouve à des altitudes comprises entre 500 et 800 mètres sur des maquis ouverts.

B.3/ Espèces à feuilles composées, à pistil glabre ou valve du fruit glabre, à stipule poilue en dessous

Cinq espèces de *Cunonia* sont connues pour présenter ces caractéristiques. Nous avons pu toutes les collecter. L'une d'entre-elles, *C. purpurea* peut avoir soit un fruit à valve glabre et un pistil glabre, soit un fruit à valve poilue et à pistil poilu. Nos échantillons concernant cette espèce se trouvent être des deux types, nous ne les traiterons qu'en un seul point qui fera l'objet des paragraphes suivants.

B.3.1/ *Cunonia atrorubens* Schlechter

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 2 à 3 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées, sessiles ou presque. Folioles de 1-2 x 3-4 cm, dentées dans la moitié supérieure et en pointe à la base, glabres. Nervures bien visibles sur la face supérieure. Jeunes rameaux hirsutes. Stipule hirsute sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 3-4 cm, de couleur rose. Pistil glabre.

- Dates et lieux de récolte (Figure 39e)

BF 009, 02/1997, Route du Mont Dzumac, altitude 600 mètres, en fleurs

BF 052, 02/1999, Mont Mou, altitude 500 mètres, en fleurs

BF 065, 12/1999, Route du Mont Dzumac, altitude 700 mètres, en fleurs (Figure 39a)

Cette espèce est bien répandue dans le sud de la Grande Terre dès le col d'Amieu et se retrouve à des altitudes comprises entre 500 et 800 mètres sur sols ultrabasiques.

B.3.2/ *Cunonia deplanchei* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 2 à 4 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées, nettement pétiolées (1.5-3 cm). Folioles sessiles de 3-10 x 2-4 cm, légèrement dentelées dans la moitié supérieure et en coin à la base, de forme ellipsoïde, glabres. Nervures saillantes sur la face inférieure. Stipule à pubescence éparses sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 4-6 cm, de couleur rose vif. Fleurs à 5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère, pistil glabre à style à deux branches. Valve du fruit glabre.

- Dates et lieux de récolte (Figure 39e)

BF 017, 03/1997, Bordure du Lac de Yaté, en fleurs et en fruits

BF 043, 12/1999, Forêt Faux bon secours, en fleurs (Figure 39b)

Cette espèce, bien répandue dans le sud de la Grande Terre dès Dumbéa, est rupicole puisqu'elle se trouve dans des zones dont le sol est gorgé d'eau.



B. Fogliani

a/ *Cunonia atrorubens*



B. Fogliani

b/ *Cunonia deplanchei*



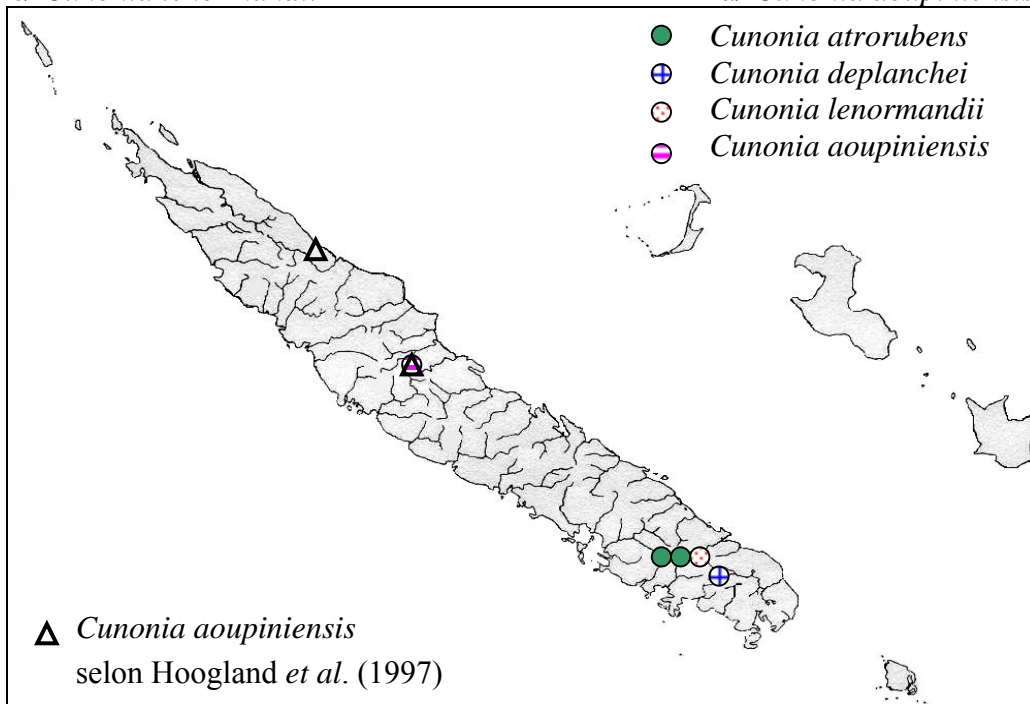
J.C. Bradford

c/ *Cunonia lenormandii*



M. L'Herminier

d/ *Cunonia aoupiniensis*



e/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. atrorubens*,
C. deplanchei, *C. lenormandii* et de *C. aoupiniensis*

Figure 39: Photos de *C. atrorubens*, *C. deplanchei*, *C. lenormandii*, *C. aoupiniensis* ; lieux de récolte de ces espèces

B.3.3/ *Cunonia lenormandii* Vieillard ex Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées, pétiole net de 0.5-0.8 cm. Folioles de 1.5-3.5 x 1-2 cm, dentées dans la moitié supérieure et en pointe à la base, glabres. Nervures bien visibles sur la face supérieure. Stipule à pubescence dense sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 3-4 cm, de couleur rose. Pistil et valve du fruit glabre.

- Dates et lieux de récolte (Figure 39e)

BF 066, 12/1999, Route du Mont Dzumac, altitude 1000 mètres, en fleurs (Figure 39c)

Cette espèce est plus ou moins bien répandue sur toute la Grande Terre.

B.3.4/ *Cunonia aoupiniensis* Hoogland

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1.5 à 2 mètres. Feuilles opposées, tri ou pentafoliolées, pétiole net de 1-2 cm, à rachis ailé. Folioles sessiles de 1.8-3.5 x 0.8-1.5 cm, à bord denté dans les 2/3 supérieures, glabres. Nervure principale saillante. Stipule à pubescence dense sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 4-6 cm, de couleur blanche. Pistil et valve du fruit glabre. Fleurs à 5 sépales verdâtres, 5 pétales blancs, 10 étamines de couleur rouge vif.

- Dates et lieux de récolte (Figure 39e)

Lit 048, , Mont Aoupinié, altitude 900 mètres, en fleurs (Figure 39d)

Cette espèce est uniquement connue aux Monts Aoupinié et Panié.

B.4/ *Espèces à feuilles composées, trifoliolées ou pennées, 2-4 paires de folioles latérales, à pistil poilu ou valve du fruit poilue*

Sur les 6 espèces présentant ces caractéristiques, l'une d'entre-elles, *C. varijuga*, est également décrite comme possédant des feuilles pennées à plus de 5 paires de folioles, forme sous laquelle nous l'avons collectée, elle fera donc l'objet d'un paragraphe suivant. Les 4 autres espèces sont décrites ci-dessous :

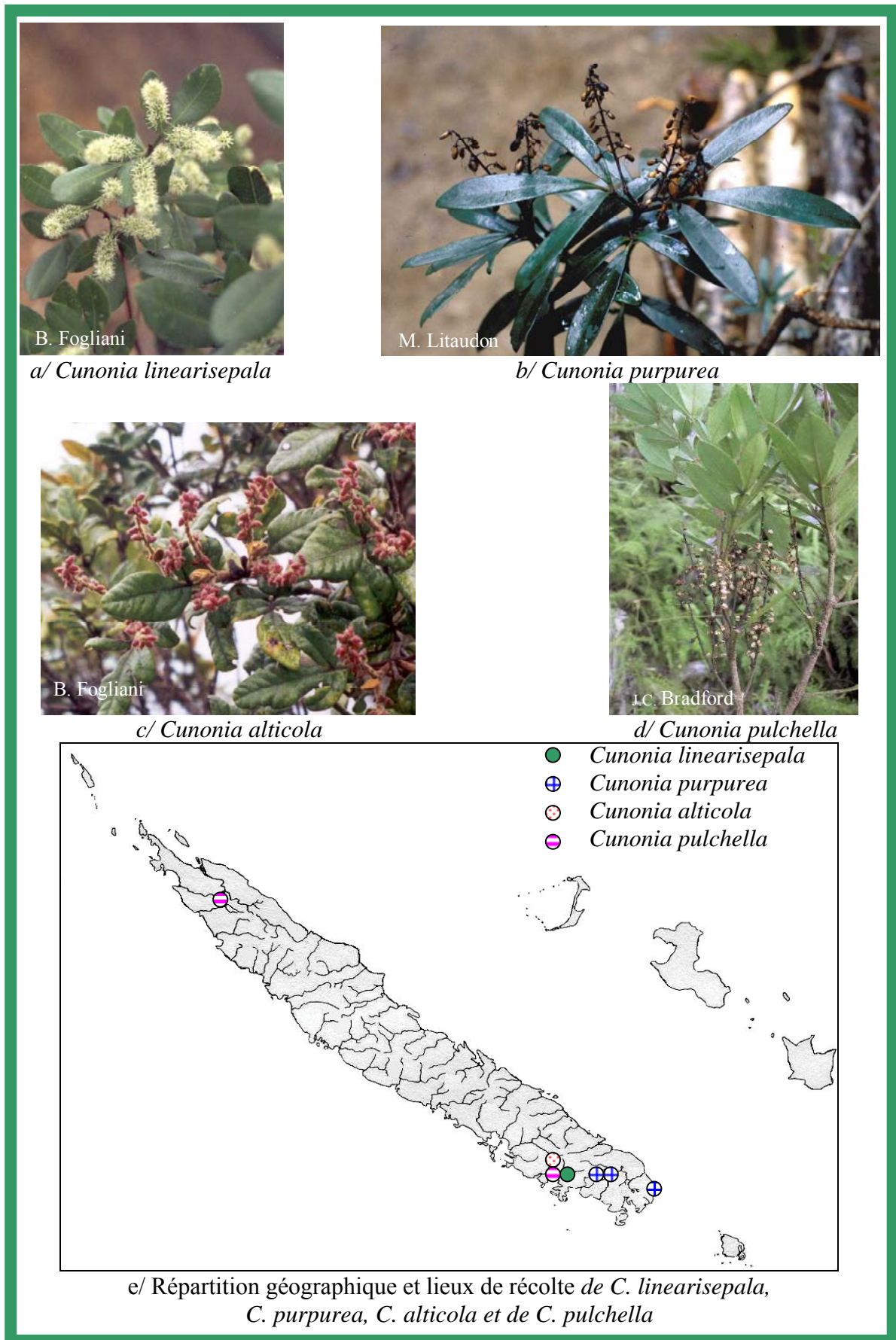


Figure 40: Photos de *C. linearisepala*, *C. purpurea*, *C. alticola*, *C. pulchella* ; lieux de récolte de ces espèces

B.4.1/ *Cunonia linearisepala* (Guillaumin) Bernardi

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 5 à 6 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées, pétiole net de 1-1.5 cm, à rachis ailé. Folioles sessiles de 5-6 x 2-4 cm, dentelées, glabres, à limbe décurrent pour les latérales et pétiolulée pour la terminale. Stipule hirsute sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 5-6 cm, de couleur blanche. Fleurs isostémones, non sessiles à pédicelles de 2 mm, possédant 5 sépales linéaires oblongs, 5 pétales, 5-7 étamines (anthères rouges), ovaire duveteux à style à deux branches.

- Dates et lieux de récolte (Figure 40e)

BF 081, 07/2000, Monts Koghis, altitude 600 mètres, en fleurs (Figure 40a)

Cette espèce se trouve dans le sud de la Grande Terre, dans des zones d'altitude moyenne comprise entre 500 et 800 mètres (Mont Mou, Mont Dzumac, Forêt de la Thy, Monts Koghis). Elle pousse en bordure et dans des forêt humides.

B.4.2/ *Cunonia purpurea* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 5 mètres. Feuilles opposées, trifoliolées ou pennées à 2 paires de folioles latérales, pétiole net de 1.5-2 cm. Folioles sessiles de 5-10 x 1.5-3 cm, dentées, à revêtement soyeux sur la face inférieure, à limbe décurrent à la base, présentant une anisophylie marquée vers le bas. Stipule à pubescence dense sur la face inférieure, arrondie au sommet. Inflorescence en pseudo-grappes de 5-6 cm, de couleur rouge pourpre. Fleurs diplostémones, non sessiles à pédicelle de 5 mm, possédant 5 sépales triangulaires-ovés, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère duveteux (BF 050) ou glabre (BF 001 et BF 048) à style à deux branches.

- Dates et lieux de récolte (Figure 40e)

BF 001, 02/1997, Cascade de Goro, altitude 30-50 mètres, en fleurs (Figure 40b)

BF 048, 06/1998, Forêt Faux bon secours, en fruits

BF 050, 07/1998, Forêt cachée, stérile

JCB 1124, 12/2000, Bois du Sud, Ouénarou, en bordure de rivière, en fleurs, récolte effectuée avec J.C. Bradford.

Cette espèce se trouve dans le sud de la Grande Terre, elle est rupicole puisque tous les échantillons collectés à ce jour l'ont été en bord de rivière.

B.4.3/ *Cunonia alticola* Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, composées pennées à 1-2 paires de folioles latérales, pétiole net de 1-1.5 cm, hirsutes avec des poils plus ou moins dressés. Folioles de 2-4 x 1-1.5 cm, plus ou moins bullées. Stipule à face inférieure hirsute. Infrutescence en pseudo-grappes de 4-5 cm, de couleur rouge pourpre, hirsute. Fruits à valve hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 40e)

BF 059, 02/1999, Mont Mou, altitude 700 mètres, en fruits (Figure 40c)

Cette espèce n'a été localisée qu'au Mont Mou sur sol ultrabasique.

B.4.4/ *Cunonia pulchella* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, composées imparipennées à 2-3 paires de folioles latérales, pétiole net de 0.8-1.2 cm, à rachis ailé, à poils apprimés. Folioles sessiles de 20-25 x 4-6 mm, dentées dans les 2/3 supérieurs. Stipule elliptique hirsute. Infrutescence en pseudo-grappes de 4 cm à poils apprimés. Fruits secs déhiscent possédant un pédicelle de 5 mm, valve à poils apprimés.

- Dates et lieux de récolte (Figure 40e)

BF 035, 03/1998, Forêt Frouin, en fruits secs (Figure 40d)

JCB 1107, 12/2000, Forêt des Monts Koghis, récolte effectuée avec J.C. Bradford.

Cette espèce est répandue dès les Monts Koghis au sud et jusqu'au massif du Mandjelia au Nord.

B.5/ Espèces à feuilles composées, pennées à plus de 5 paires de folioles latérales, à pistil poilu ou valve du fruit poilue

Trois espèces de *Cunonia* possèdent ces caractéristiques et nous les avons toutes collectées.

B.5.1/ *Cunonia austrocaledonica* Brongniart et Gris ex Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 10 mètres. Feuilles opposées, composées imparipennées à 9-13 paires de folioles latérales, pétiole pubescent de 0.5 cm, à rachis ailé. Jeunes feuilles à poils apprimés courts. Folioles sessiles de 15-20 x 4-7 mm, à marge dentelée mais non ondulée, à base aiguë, à sommet obtus. Stipule pubescente sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes de 10-12 cm. Fleurs de couleur blanche possédant 5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, à pistil poilu, style à deux branches.

- Dates et lieux de récolte (Figure 41d)

BF 079, 10/1997, Forêt de la Thy, échantillon stérile
JCB 1105, 12/2000, Forêt des Monts Koghis, en fleurs (Figure 41a), récolte effectuée avec J.C. Bradford.

Cette espèce est bien représentée du Nord au Sud, jusqu'à la rivière de la Thy et les Monts Koghis sur sols ultrabasiques.

B.5.2/ *Cunonia pterophylla* Schlechter

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 6 mètres. Feuilles opposées, composées imparipennées à 6 paires de folioles latérales, pétiole net de 0.5 cm, à rachis ailé. Jeunes feuilles et rameaux hirsutes à poils dressés. Folioles sessiles de 8-12 x 2-3 mm, à marge dentelée mais non ondulée, à base aiguë, à sommet arrondi. Stipule elliptique de 4-5 x 4-5 mm. Inflorescence en pseudo-grappes de 4-5 cm. Fleurs de couleur blanche possédant 5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, à pistil hirsute, style à deux branches.

- Dates et lieux de récolte (Figure 41d)

BF 013, 02/1997, Route du Mont Dzumac, Mont Ouin, altitude 1200 mètres
BF 063, 12/1999, Route du Mont Dzumac, altitude 600 mètres (Figure 41b)

Cette espèce est bien répandue dans le sud dès le Mont Sindoa à des altitudes moyennes de 500 à 1500 mètres en forêt humide sur sol ultrabasique.



J.C. Bradford

a/ *Cunonia austrocaledonica*



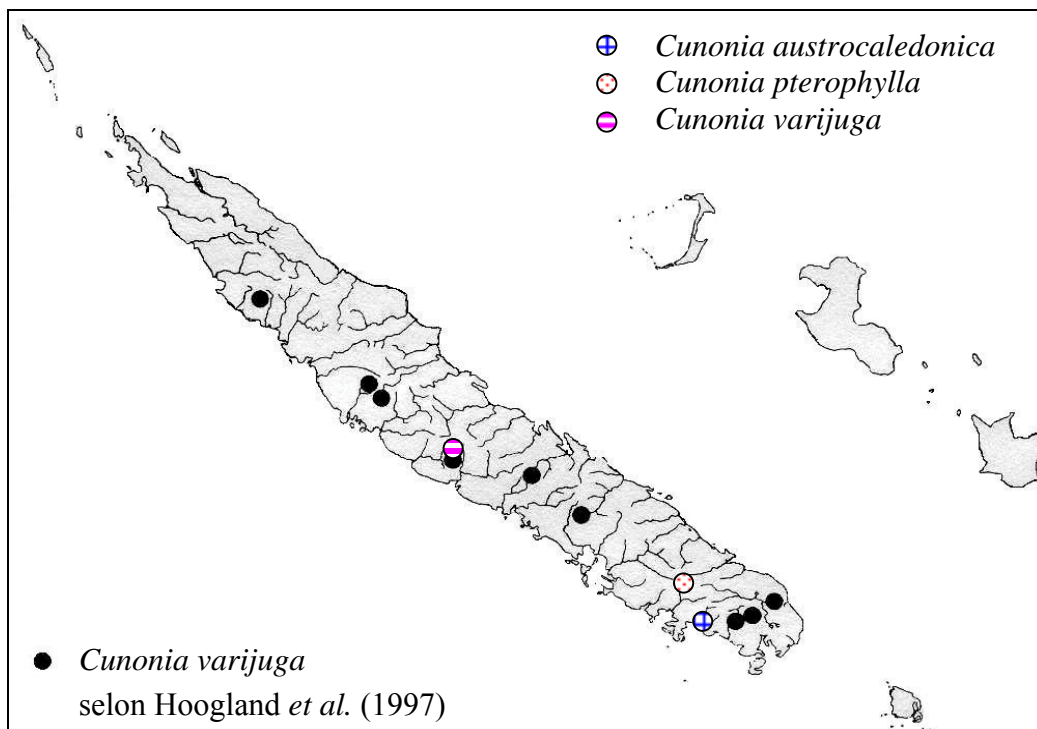
B. Fogliani

b/ *Cunonia pterophylla*



M. Litaudon

c/ *Cunonia varijuga*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. austrocaledonica*, *C. pterophylla* et de *C. varijuga*

Figure 41: Photos de *C. austrocaledonica*, *C. pterophylla*, *C. varijuga* ; lieux de récolte de ces espèces

B.5.3/ *Cunonia varijuga* Hoogland

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres à tronc foncé, à écorce interne de couleur rouge. Feuilles opposées, composées imparipennées à 5-7 paires de folioles latérales, pétiole net de 0.5 cm, à rachis ailé. Jeunes feuilles à poils apprimés. Folioles sessiles de 15-20 x 4-7 mm, à marge dentelée mais non ondulée, à base aiguë, à sommet obtus. Stipule elliptique. Inflorescence en pseudo-grappes de 3-4 cm. Fleurs de couleur blanche possédant 5 sépales triangulaires, 5 pétales, 10 étamines, à pistil strigieux hirsute, style à deux branches.

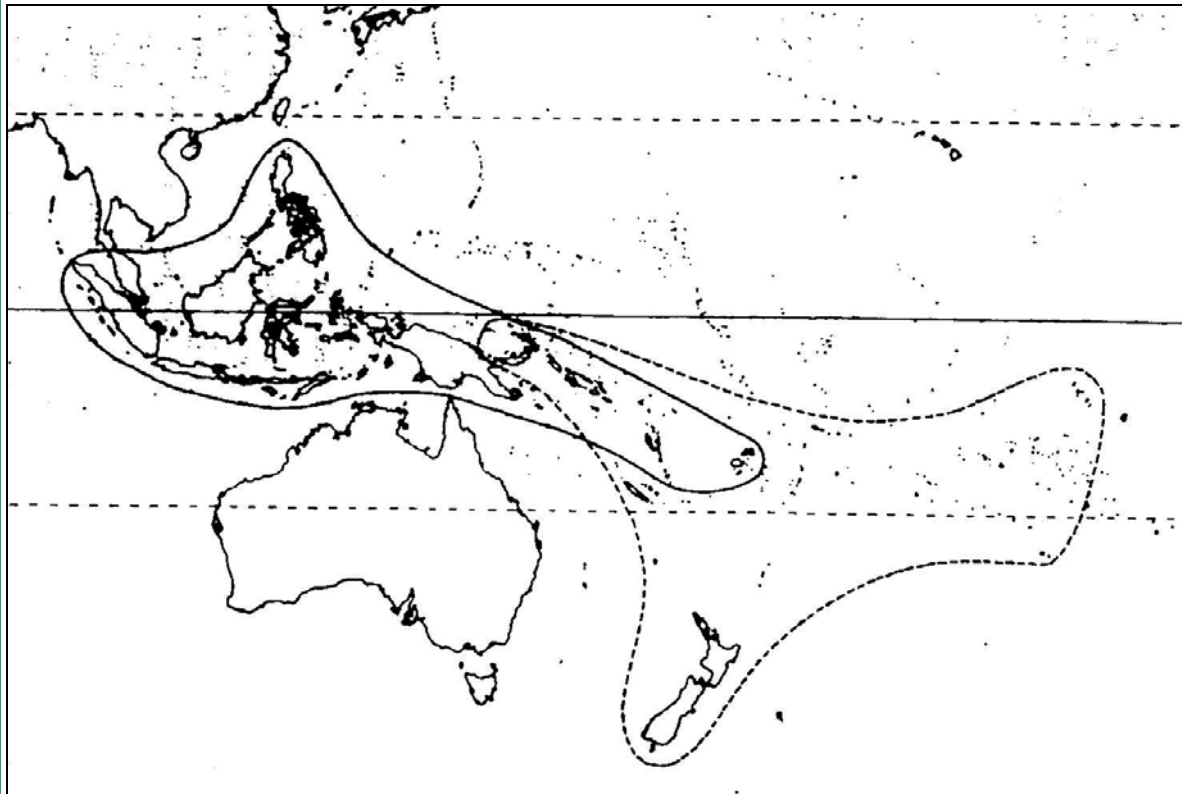
- Dates et lieux de récoltes (Figure 41d)

BF 028, 10/1997, Forêt de la Nodéla, en fleurs (Figure 41c)

Cette espèce nouvelle est décrite par Hoogland en 1997 et l'échantillon de référence provient de Table Unio près de la forêt de Col d'Amieu. Notre échantillon complète donc la répartition géographique de cette espèce qui semble se développer sur sol ultrabasique.

Conclusion sur le genre : Les espèces de ce genre sont localisées sur l'ensemble de la Grande Terre, tant en forêts humides que sur maquis, à des altitudes variables, des plaines jusqu'aux sommets. Certaines espèces poussent en zones très humides et peuvent être considérées comme rupicole, c'est le cas de *Cunonia deplanchei* et de *Cunonia purpurea*.

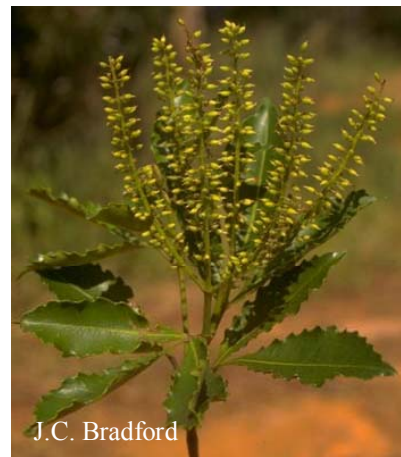
On constate de nouveau que la plupart des espèces peuvent être collectées dans le sud de la Grande Terre, puisque sur 17 espèces récoltées, seul *Cunonia aoupiniensis* localisée spécifiquement au Mont Aoupinié et au Mont Panié, est présente dans le nord.



Distribution des espèces du genre *Weinmannia* section *Fasciculata* (—) et section *Leiospermum* (---) en Malaisie et dans le Pacifique selon Hopkins (1998a)



Weinmannia clemensiae (sect. *Fasciculata*)
Borneo, Malaisie



Weinmannia serrata (sect. *Leiospermum*)
Nouvelle-Calédonie

Figure 42 : Distribution des espèces du genre *Weinmannia* section *Fasciculata* (—) et section *Leiospermum* (- -) en Malaisie et dans le Pacifique ; photos d'une espèce de chaque section : *W. clemensiae* (sect. *Fasciculata*) et *W. serrata* (sect. *Leiospermum*).

C/ Les espèces du genre *Weinmannia*

La révision de ce genre a été effectuée depuis peu par Helen Hopkins, en collaboration avec Jason Bradford et ce pour toutes les espèces de Malaisie et du Pacifique (Hopkins, 1988,a,b,c ; Hopkins & Florence 1998). Ils dénombrent pour toutes ces régions près de 40 espèces réparties en deux sections : section *Fasciculata*, présente surtout en Malaisie et répandue à l'est jusqu'à Fidji ; section *Leiospermum*, surtout dans le Pacifique, s'étendant à l'ouest jusqu'en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Figure 42).

La Nouvelle-Calédonie détient 4 de ces espèces. Dans le cas de nos récoltes, selon la classification d'Hopkins, seule l'espèce *Weinmannia dichotoma* a pu être collectée. Cependant, deux échantillons de cette espèce, collectés sur le même massif mais à des altitudes très différentes, présentent des caractéristiques laissant à penser que nous sommes en présence de deux espèces. En effet, Bernardi (1964) distinguait l'espèce *Weinmannia monticola* de l'espèce *Weinmannia dichotoma* par la taille de leurs feuilles et de leurs inflorescences (Guillaumin, 1948). Au cours d'un stage effectué à l'Université de Polynésie Française, l'échantillon botanique de l'espèce *Weinmannia parviflora* endémique à ce territoire a pu être collecté.

C.1/ *Weinmannia dichotoma* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles coriaces opposées, composées trifoliolées, pétiole net de 2 cm. Folioles sessiles de 5-6 x 1.8-2 cm, à marge dentelée, décurrente à la base et à sommet arrondi. Stipules terminales par deux, de moins de 5 mm. Inflorescence en grappes de 6-7 cm. Fleurs de couleur blanche.

- Dates et lieux de récolte (Figure 43d)

BF 040, 03/1998, Forêt Frouin, altitude 600 mètres (Figure 43a)

C.2/ *Weinmannia monticola* Däniker

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles coriaces opposées, composées trifoliolées, pétiole net de 2 cm. Folioles sessiles de 8-8.5 x 3-3.5 cm, à marge dentelée, décurrente à la base et à sommet plus en pointe que chez *W. dichotoma*. Jeunes rameaux et pétioles des jeunes feuilles de couleur rouge. Stipules terminales par deux, de moins de 5 mm. Inflorescence en grappes de 7-8 cm. Fleurs de couleur blanche.

- Dates et lieux de récolte (Figure 43d)

BF 039, 03/1998, Forêt Frouin, altitude 1000 mètres (Figure 43b)



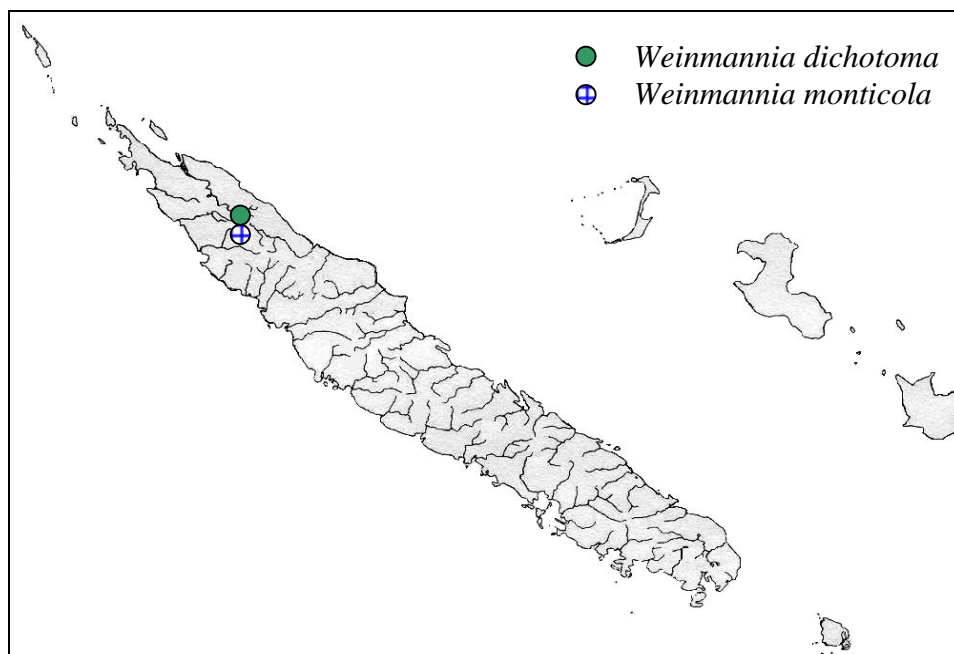
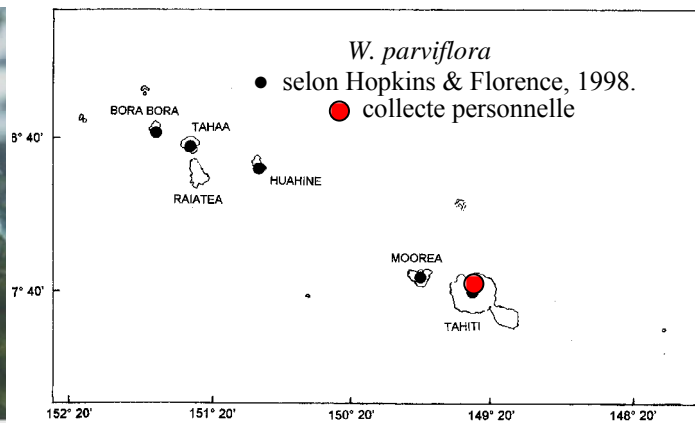
a/ *Weinmannia dichotoma*



b/ *Weinmannia monticola*



c/ *Weinmannia parviflora* (Iles de la Société, Tahiti, Polynésie Française)



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *W. dichotoma* et de *W. monticola* (Nouvelle-Calédonie)

Figure 43: Photos de *W. dichotoma*, *W. monticola*, *W. parviflora* ; lieux de récolte de ces espèces.

C.3/ Weinmannia parviflora Forster

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, simples ou composées trifoliolées, pétiole pubescent net de 0.5-1 cm. Folioles sessiles de 2-8 x 0.8-2.5 cm, à marge dentée, décurrente à la base, face inférieure à pubescence éparse, nervure principale pubescente saillante sur la face inférieure. Folioles latérales environ deux fois plus petites que la terminale. Jeunes rameaux pubescents. Stipules pubescentes sur les deux faces, elliptiques de 0.5-0.8 cm. Infrutescences pubescentes de 2-4 cm, en grappes simples ou par trois portées par un pédoncule de 1 cm. Fruit à valve pubescente de couleur verte à l'état jeune.

- Dates et lieux de récolte

BF 095, 04/2001, Mont Marau, Tahiti, Iles de la Société, Polynésie Française, altitude 600 mètres (Figure 43c)

Conclusion sur le genre : Même s'il ne nous a pas été donné de récolter toutes les espèces de ce genre, on peut malgré tout constater qu'elles se développent toutes en forêt humide et à des altitudes comprises entre 500 et 1500 mètres.

D/ Les espèces du genre Geissois

Ce genre n'est pas révisé à ce jour et la classification la plus récente, établie par Guillaumin, date de 1948. Celui-ci dénombre 10 espèces en Nouvelle-Calédonie. Sept d'entre-elles ont pu être herborisées dont 5 ont été récoltées.

D.1/ Espèces à inflorescence glabre ou presque, feuilles glabres

D.1.1/ Geissois racemosa Labillardieri

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 2 à 3 mètres. Feuilles opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 8 cm. Deux folioles sessiles de 16-18 x 4-5 cm, à marge entière et 3 folioles non sessiles de 25-30 x 5-6 cm, à marge entière, à pétiolule de 4 cm. Stipule terminale de 2 x 1.5 cm, atteignant 6 x 3 cm une fois développée, velue sur la face inférieure.

- Dates et lieux de récolte (Figure 44e)

BF 025, 05/1997, Mont Aoupinié, altitude 350 mètres, échantillon stérile (Figure 44a)



M. Litaudon

a/ *Geissois racemosa*



J.C. Bradford

b/ *Geissois montana*



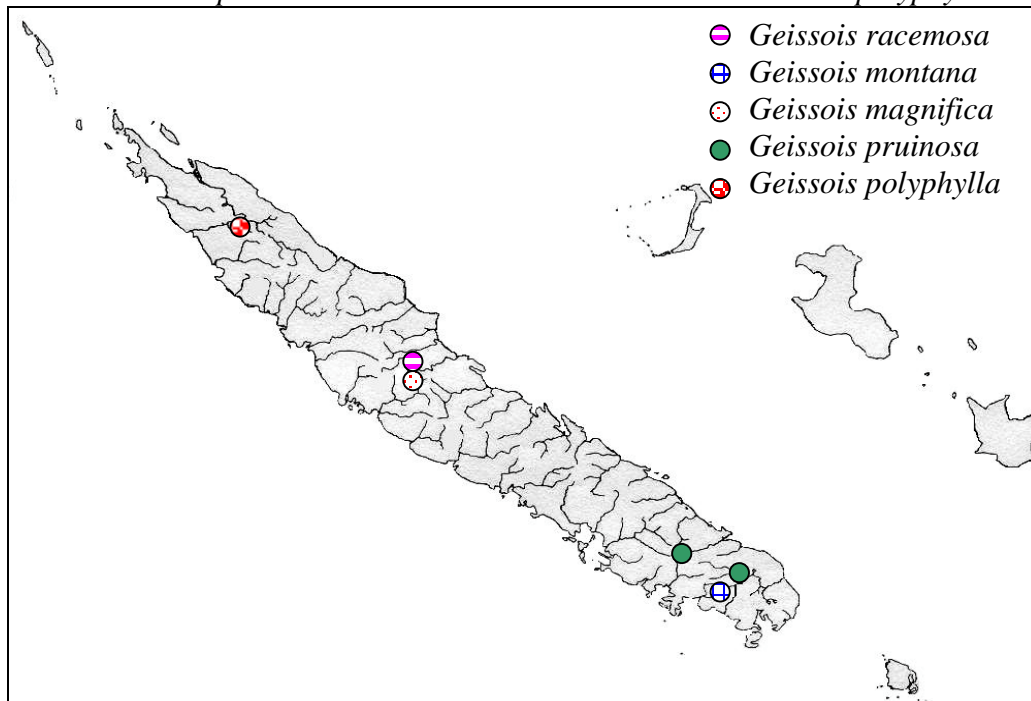
B. Fogliani

c/ *Geissois pruinosa*



M. Litaudon

d/ *Geissois polyphylla*



e/ Répartition géographique et lieux de récolte de *G. racemosa*, *G. montana*, *G. magnifica*, *G. pruinosa* et de *G. polyphylla*

Figure 44: Photos de *G. racemosa*, *G. montana*, *G. pruinosa*, *G. polyphylla* ; lieux de récolte de ces espèces et de *G. magnifica*

D.1.2/ *Geissois montana* Vieillard ex Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 5 mètres. Feuilles opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 7-9 cm. Deux folioles de 9-10 x 5-6 cm à pétiolule de 1-15 cm et 3 folioles de 13-15 x 7-8 cm à pétiolule de 2-3 cm, à marge entière, en coin à la base, à sommet en pointe. Stipule de 2 x 1.5 cm, à poils épars sur la face inférieure. Inflorescence de 8-9 cm en grappe rouge. Fleurs à 4 sépales glabres sur la face extérieure et velus sur la face intérieure, pas de pétales, 12 étamines, à ovaire glabre à style à deux branches.

- Dates et lieux de récolte (Figure 44e)

BF 071, 03/2000, Col de Mouirange, en fleurs (Figure 44b)

D.1.3/ *Geissois magnifica* Baker

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, composées palmées à 3 folioles, pétiole net de 5 cm. Folioles pétiolulées de 12-15 x 4-5 cm, à marge entière, à pétiolule de 2 cm. Stipule terminale de 2.5 x 2.5 cm, glabre. Inflorescence de 18-20 cm, de couleur rouge, cauliflore, à pédoncule de 4 cm. Fleurs à 4 sépales rouges, pas de pétales, 12 étamines, ovaire glabre à style à deux branches. Jeunes fruits rouges, devenant bruns à maturité.

- Dates et lieux de récolte (Figure 44e)

BF 024, 05/1997, Mont Aoupinié, altitude 800 mètres en fleurs et fruits

D.1.4/ *Geissois pruinosa* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 6 mètres. Feuilles opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 4-5 cm. Folioles pétiolulées de 6-7 x 3-5 cm, à marge entière, à pétiolule de 4 cm. Stipule velue de 0.5 cm. Inflorescence en grappe de couleur rouge de 10-15 cm, cauliflore. Fleurs pédicellées (0.5-1 cm), à 4 sépales, pas de pétales, 10 étamines, à ovaire garni de poils épars à style à deux branches. Fruits verts à l'état jeune puis rouges et enfin bruns à maturité.

- Dates et lieux de récolte (Figure 44e)

BF 010, 02/1997, Route du Dzumac, altitude 1000 mètres, échantillon stérile

BF 015, 02/1997, Route du Dzumac, altitude 700 mètres, en fleurs et en fruits

BF 018, 03/1997, Lac de Yaté, en fleurs et en fruits

BF 074, 05/1997, Route du Dzumac, altitude 500 mètres, en fleurs et fruits (Figure 44c)

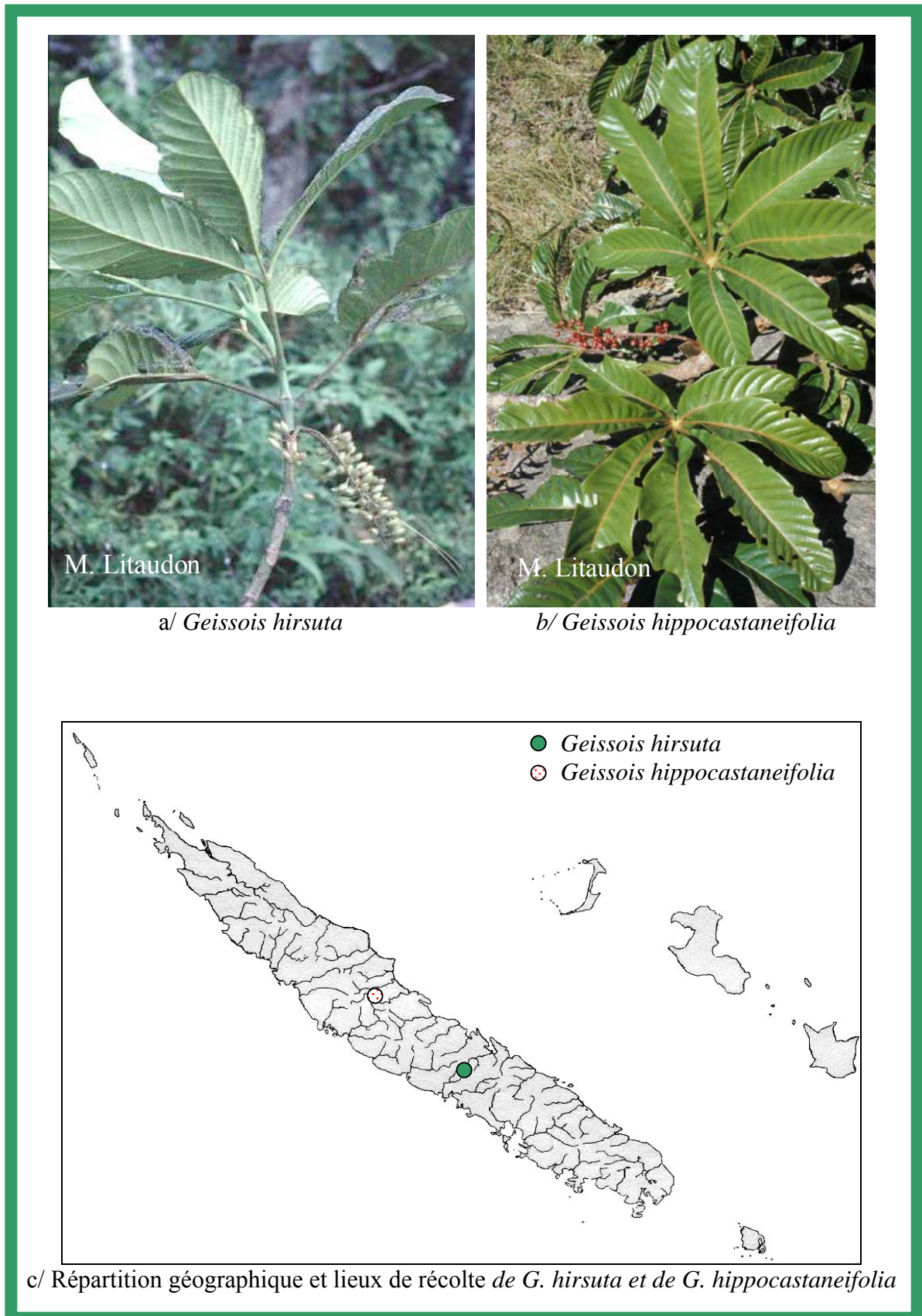


Figure 45: Photos de *G. hirsuta* , *G. hippocastaneifolia* ; lieux de récolte de ces espèces

D.1.5/ *Geissois polyphylla* Lecard ex Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 5 à 6 mètres. Feuilles opposées, composées palmées, à 7 folioles, pétiole net de 4-5 cm. Folioles pétiolulées de 6-7 x 3-5 cm, à marge entière, à pétiolule de 4 cm. Stipule velue de 0.5 cm. Inflorescence en grappe de couleur rouge de 10-15 cm, cauliflore. Fleurs pédicellées (0.5-1 cm), à 4 sépales, pas de pétales, 10 étamines, à ovaire garni de poils épars à style à deux branches. Fruits verts à l'état jeune puis rouges et enfin bruns à maturité.

- Dates et lieux de récolte (Figure 44e)

BF 038, 03/1998, Forêt Frouin, altitude 800 mètres en fleurs (Figure 44d)

D.2/ *Espèces à inflorescence abondamment velue, feuilles velues au moins sur la face inférieure*

D.2.1/ *Geissois hirsuta* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 8 à 10 mètres. Feuilles épaisses, opposées, composées palmées, trifoliolées, pétiole net de 12-14 cm. Folioles duveteuses pétiolulées de 32-35 x 14-16 cm, à marge dentée, à pétiolule de 2 cm pour les latérales et de 3-4 cm pour la terminale. Folioles latérales à anisophylie marquée. Stipule épaisse hirsute fauve de 3 x 4 cm. Inflorescence en grappe de couleur rouge de 15-20 cm, cauliflore, totalement hirsute. Fleurs pédicellées (0.5-0.7 cm), à 4 sépales, pas de pétales, à ovaire supère hirsute à style à deux branches. Fruit vert à l'état jeune puis rouge et enfin brun à maturité, duveteux à tous les stades.

- Dates et lieux de récolte (Figure 45c)

BF 029, 12/1997, Forêt d'Amieu, altitude 700 mètres en fleurs et fruits (Figure 45a)

D.2.2/ *Geissois hippocastaneifolia* Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbre de 3 à 4 mètres. Feuilles épaisses, opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 10-12 cm. Folioles sessiles à poils apprimés en dessous, surtout sur les nervures, à marge entière, à anisophylie marquée pour deux folioles de 12 x 6 cm et décourbées à la base pour les 3 autres de 19-21 x 8-9 cm. Stipule épaisse hirsute fauve de 5-8 x 2-3 cm. Inflorescence en grappe de couleur rouge de 15-20 cm, cauliflore. Fleurs pédicellées (1-1.2 cm), à 4 sépales, pas de pétales, à ovaire supère hirsute à style à deux branches. Fruits beiges à l'état jeune puis bruns à maturité, à valve abondamment hirsute jeune puis à revêtement plus épars à maturité.

- Dates et lieux de récolte (Figure 45c)

BF 023, 05/1997, Mont Aoupinié, altitude 700 mètres en fleurs et fruits (Figure 45b)



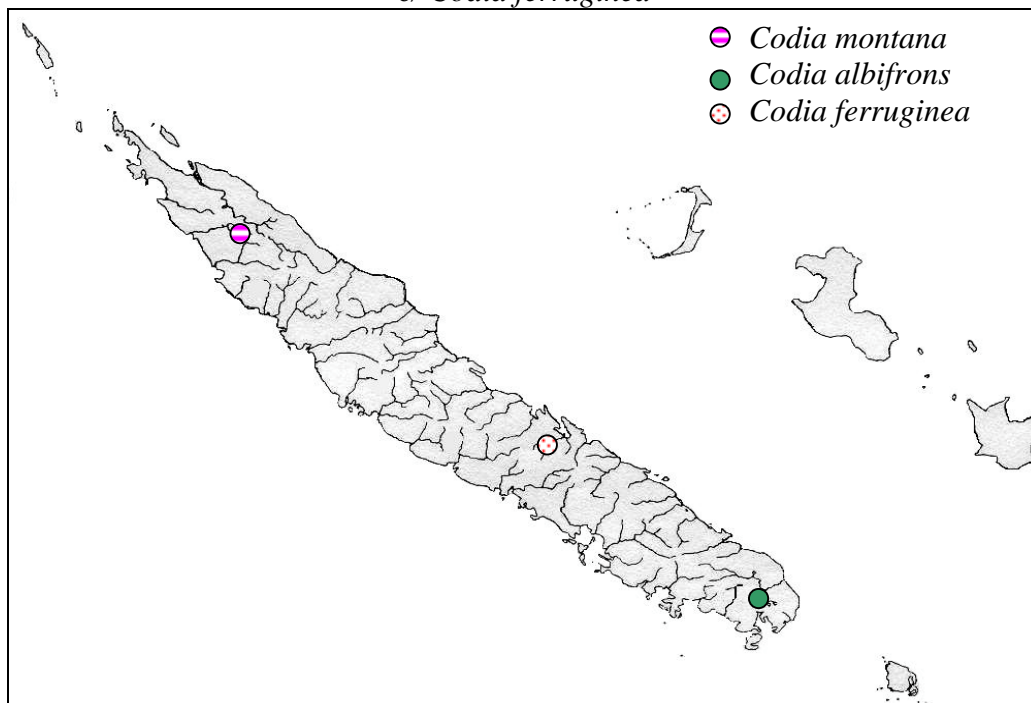
a/ *Codia montana*



b/ *Codia albifrons*



c/ *Codia ferruginea*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. montana*
C. albifrons et de *C. ferruginea*

Figure 46: Photos de *C. montana*, *C. albifrons*, *C. ferruginea* ; lieux de récolte de ces espèces

Conclusion sur le genre : Contrairement aux précédents genres, la récolte des espèces du genre *Geissois* nécessite une prospection sur l'ensemble de la Grande-Terre. Ceci est dû au fait que la plupart des espèces sont de grands arbres de forêts denses et humides d'altitudes localisées dans le centre et le nord de la Grande-Terre. Seules les espèces de maquis sont facilement accessibles dans le sud et en particulier *Geissois pruinosa*, très abondante dans cette région.

E/ Les espèces du genre *Codia*

Le genre *Codia* est endémique à la Nouvelle-Calédonie et il n'a fait l'objet d'aucune révision à ce jour, la classification de référence reste donc celle établie par Guillaumin (1948). Celui-ci dénombre 11 espèces séparées en deux groupes du fait de la présence ou de l'absence de pétales sur leurs fleurs. Ainsi, on trouve le groupe *Eu-Codia* avec trois espèces pourvues de pétales et le groupe *Codiopsis* avec 8 espèces sans pétales. Nous avons pu herboriser de manière quasi-certaine 8 espèces appartenant aux deux groupes dont une nouvelle non citée par Guillaumin.

E.1/ Espèces du groupe *Eu-Codia*

E.1.1/ *Codia montana* Forster et G. Forster

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1 mètre à 1.50 mètres. Feuilles glabres, ovales, épaisses de 4.5-7 x 2.5-4 cm, opposées, simples, pétiole net de 1-1.5 cm, à nervures saillantes sur la face inférieure, de couleur vert luisant sur la face supérieure. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux de couleur beige à la base des feuilles, pédoncule de 1 cm. Fleurs à 4 sépales, 4 pétales, 8 étamines, pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 46d)

BF 037, 03/1998, Forêt Frouin, altitude 600 mètres en fleurs (Figure 46a)

E.1.2/ *Codia albifrons* ou *albiflora* Vieillard ex Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 0.50 mètre à 1.50 mètres. Feuilles ovales épaisses de 3.5-5.5 x 2-4 cm à sommet arrondi ou peu, opposées, simples, pétiole court de 0.3-0.5 cm, à pubescence blanche roussâtre sur la face inférieure, à cire blanche sur la face supérieure de couleur vert pâle. Rameau à pubescence blanchâtre. Stipule à pubescence dense blanchâtre sur la face inférieure de 0.5-0.7 x 0.1-0.3 cm. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux de couleur jaune et blanche à la base des feuilles constituée de 4 têtes sphériques portées par un pédoncule de 2 cm. Fleurs à 4 sépales, 4 pétales, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 46d)

BF 005, 02/1997, Trou du tahitien, Plaine des Lacs, en boutons floraux

BF 083, 07/2000, Trou du tahitien, Plaine des Lacs, en fleurs (Figure 46b)



J.C. Bradford

a/ *Codia nitida*



B. Fogliani

b/ *Codia sp. nov.*



B. Fogliani

c/ *Codia discolor*



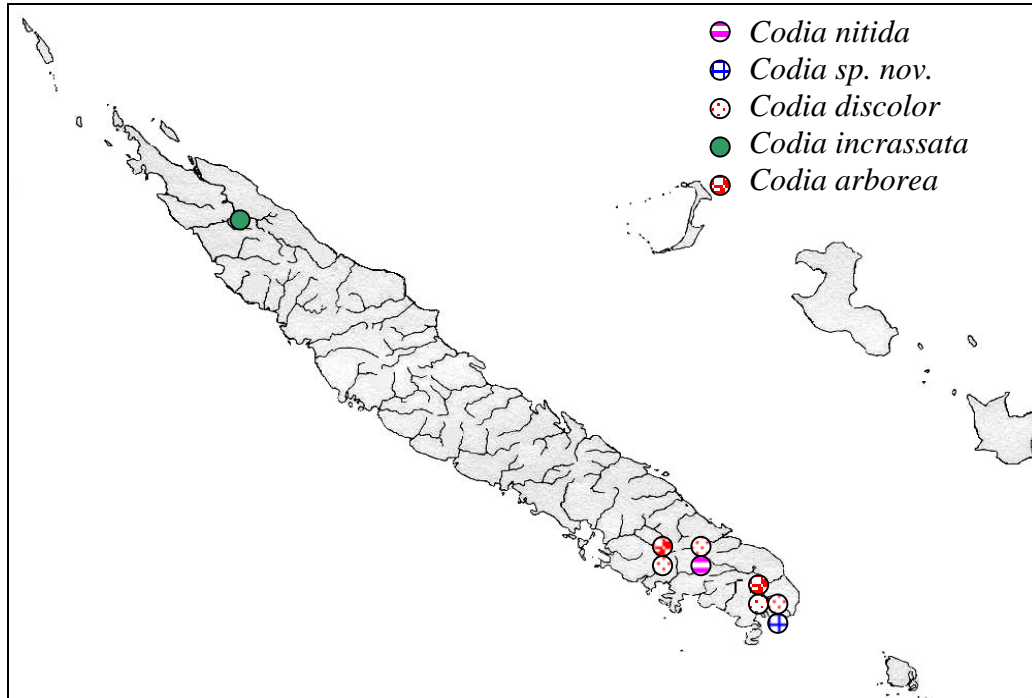
M. Litaudon

d/ *Codia incrassata*



B. Fogliani

e/ *Codia arborea*



f/ Répartition géographique et lieux de récolte de *C. nitida*, *C. sp. nov.*, *C. discolor*, *C. incrassata* et de *C. arborea*

Figure 47: Photos de *C. nitida*, *C. sp. nov.*, *C. discolor*, *C. incrassata*, *C. arborea* ; lieux de récolte de ces espèces

E.1.3/ *Codia ferruginea* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 mètres à arbre de 4 mètres. Feuilles elliptiques à marge dentelée et révoluée, épaisses de 2-6 x 1-4 cm à sommet en pointe, opposées, simples. Pétiole court de 0.3-0.5 cm, à pubescence de couleur rouille et à nervures saillantes sur la face inférieure, à face supérieure de couleur vert luisant. Jeunes rameaux et jeunes feuilles pubescents. Stipule à pubescence dense sur la face inférieure, elliptique à base obcordée de 0.5-0.7 x 0.5-0.7 cm. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux à la base des feuilles portée par un pédoncule de 1 cm. Fleurs à 4 sépales hirsutes, 4 pétales hirsutes, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 46d)

BF 088, 09/2000, Mine Boakaine, Canala, altitude 600 mètres, en fleurs (Figure 46c)

E.2/ *Espèces du groupe Codiopsis*

E.2.1/ *Codia incrassata* Pampanini

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1 mètre à arbre de 5 mètres. Feuilles elliptiques à marge révoluée, épaisses, de 9-11 x 6-8 cm, à sommet arrondi, opposées, simples, sessiles, à pubescence de couleur jaune puis blanc cendré et à nervures saillantes sur la face inférieure, à face supérieure de couleur vert luisant. Jeunes rameaux pubescents. Stipule à pubescence dense sur la face inférieure, elliptique à base obcordée de 1-1.5 x 1-1.2 cm. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux à la base des feuilles. Fleurs à 4 sépales, pas de pétales, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 47f)

BF 036, 09/2000, Forêt Frouin, altitude 600 mètres, en fleurs (Figure 47d)

E.2.2/ *Codia discolor* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1.5 à 2 mètres. Feuilles elliptiques à marge entière décurrente à la base, épaisses, de 5-8 x 3-6 cm, à sommet arrondi ou cordiforme, opposées, simples, pétiole net de 1-1.5 cm, à pubescence de couleur jaune cendré sur la face inférieure, à face supérieure de couleur vert luisant. Jeunes rameaux finement pubescents. Stipule linéaire de 0.5 x 0.1 cm pubescente sur la face inférieure. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux à la base des feuilles porté par un pédoncule de 4 cm, de couleur blanche. Fleurs à 4 sépales, sans pétales, hirsutes, 8 étamines, à pistil hirsute. Fruits secs indéhiscent.

- Dates et lieux de récolte (Figure 47f)

BF 031, 02/1998, Forêt du Mois de Mai, en fruits secs
BF 041, 06/1998, La capture, Plaines des Lacs, en fleurs
BF 047, 06/1998, Port Boisé, en fleurs
BF 055, 02/1999, Mont Mou, en fleurs (Figure 47c)

E.2.3/ *Codia arborea* Brongniart ex Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 mètres à arbre de 4 mètres. Feuilles glabres, à marge entière de 4-7.5 x 2-3.5 cm à sommet arrondi, opposées décussées, simples, à pétiole court de 0.4-0.6 cm, à face inférieure pâle, à face supérieure luisante. Stipule linéaire de 0.5 cm. Inflorescence en têtes sphériques à aspect cotonneux à la base des feuilles, qui peut être à tête sphérique simple, ou double voire quadruple portée par un pédoncule de 0.5-1 cm. Fleurs à 4 sépales hirsutes, pas de pétales, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 47f)

BF 014, 02/1997, Mont Dzumac, altitude 730 mètres, en fleurs
BF 019, 06/1997, Carénage, Plaine des Lacs, en fleurs (Figure 47e)

E.2.4/ *Codia nitida* Schlechter

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles elliptiques, glabres, à marge entière de 2.5-6 x 2-4 cm, 1.5 fois plus longues que larges, à sommet en pointe, opposées, simples, décurrentes sur le pétiole court de 0.5-1 cm, à face inférieure pâle, à face supérieure luisante. Stipule linéaire de 0.5-0.7 cm à face inférieure finement pubescente. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux de couleur blanche à odeur de miel, à la base des feuilles portée par un pédoncule de 3-4 cm, finement pubescent. Fleurs à 4 sépales hirsutes, pas de pétales, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 47f)

BF 062, 03/1999, Entrée du Parc Provincial de la Rivière Bleue, en fleurs
JCB 1121, 12/2000, Plaine des Lacs, en fleurs (Figure 47a) récolte avec J.C. Bradford

E.2.5/ *Codia sp. nov.*

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 0.5 à 1.5 mètres. Feuilles elliptiques, glabres, à marge entière de 1.5-3 x 0.7-1.5 cm, 2 fois plus longues que larges, à sommet arrondi, opposées, simples, à pétiole très court de 0.2 cm, à face inférieure pâle, à face supérieure luisante. La nervure principale présente une structure en zig-zag. Stipule elliptique de 2-5 x 1-2 mm à face inférieure finement pubescente. Inflorescence en tête sphérique à aspect cotonneux de couleur blanche, à la base des feuilles porté par un pédoncule de 2-2.5 cm, finement pubescente. Fleurs à 4 sépales hirsutes, 8 étamines, à pistil hirsute.

- Dates et lieux de récolte (Figure 47f)

BF 046, 06/1998, Port Boisé, en fleurs

BF 084, 07/2000, Port Boisé, en fleurs

JCB 1122, 12/2000, Plaine des Lacs, en fleurs (Figure 47b)

Cette espèce, en se basant sur la classification de Guillaumin (1948), est identifiée comme *Codia nitida*, mais il apparaît clairement que de nombreuses différences existent avec l'échantillon décrit par Schlechter (1906). La réactualisation du genre, en cours, permettra sans aucun doute de dégager de nouvelles espèces.

Conclusion sur le genre : Toutes les espèces de ce genre se retrouvent sur des milieux de type maquis miniers à roches ultrabasiqes si particuliers à la Nouvelle-Calédonie qui leur confèrent certainement cette endémicité. On constate que la plupart des espèces sont localisables dans le sud mais là encore certaines ne peuvent être collectées que dans des régions particulières comme *C. ferruginea*, dans la région de Thio à Canala.

F/ Les espèces du genre *Pancheria*

Ce genre endémique à la Nouvelle-Calédonie n'a pas non plus à ce jour fait l'objet d'une révision, la classification de Guillaumin (1948) reste donc d'actualité même s'il apparaît clairement qu'elle est insuffisante pour établir des identifications certaines. Nous avons donc classé les espèces collectées en nous appuyant à la fois sur cette classification mais également à l'aide des herbiers référencés à l'I.R.D. Guillaumin définit 24 espèces de *Pancheria*, auxquelles il conviendrait d'ajouter les espèces *P. ferruginea*, *P. humboldiana*, *P. multijuga*, espèces décrites et référencées.

Les espèces de ce genre par rapport à celles des cinq précédents, ont la particularité de posséder des fleurs dioïques. Ce fait augmente la difficulté de classification, car on constate sur le terrain une structure différente des pieds mâles et femelles d'une même espèce.

Quatorze espèces du genre ont été collectées sans distinction du « sexe » de la plante.



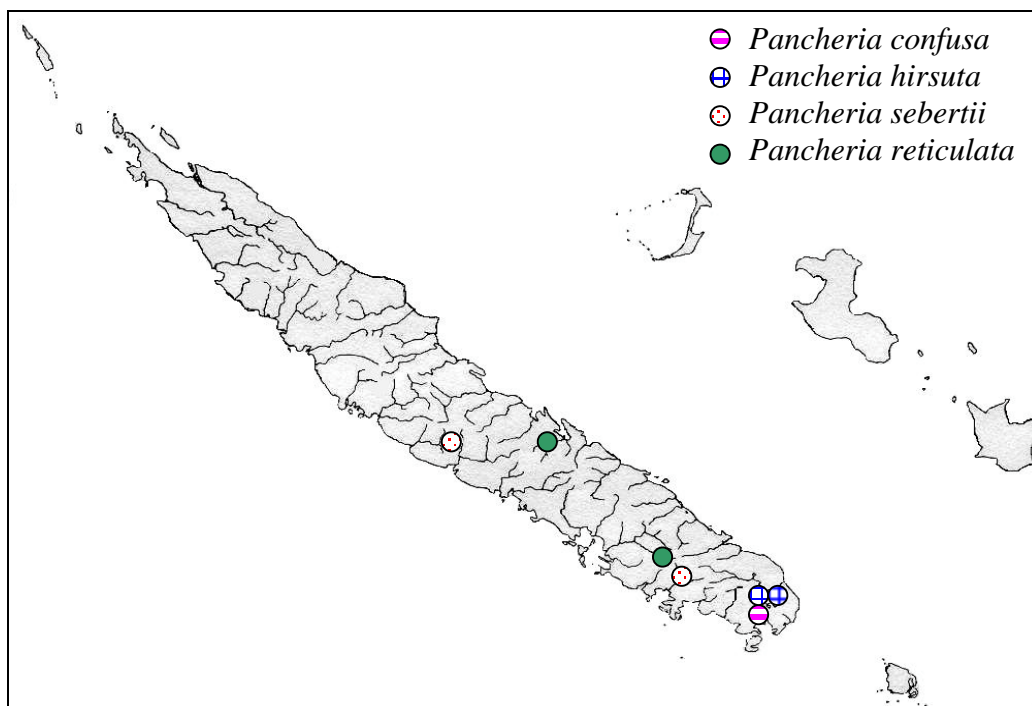
a/ *Pancheria confusa*



c/ *Pancheria sebertii*



b/ *Pancheria hirsuta*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *P. confusa*, *P. hirsuta*, *P. sebertii* et de *P. reticulata*

Figure 48: Photos de *P. confusa*, *P. hirsuta*, *P. sebertii*; lieux de récolte de ces espèces et de *P. reticulata*

F.1/ Espèces à feuilles composées

F.1.1/ *Pancheria confusa* Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 3 à 4 mètres. Feuilles opposées, composées trifoliolées, pétiole net de 4.5-5.5 cm. Foliolles de 4-8 x 2-4 cm, deux fois plus longues que larges, à marge dentée. Foliolles latérales courtement pétiolulées (0.2-0.5 cm) et foliole terminale décurrente sur un pétiolule de 1.8-2 cm. Stipule elliptique de 0.5-1 x 0.2-0.5 cm à face inférieure glabre. Inflorescence en tête sphérique à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule de 2-2.5 cm. Valve des fruits à pubescence rousse. Fruits secs déhiscents.

- Dates et lieux de récolte (Figure 48d)

BF 021, 05/1997, Route du Carénage, Plaine des Lacs, en fruits (Figure 48a)

F.1.2/ *Pancheria hirsuta* Vieillard ex Pampanini

- Caractéristiques morphologiques

Arbre monocaule à peu ramifié de 2 à 6 mètres. Feuilles verticillées par 3, composées à 5-7 folioles. Foliolles hirsutes fauves sur les deux faces, sessiles, à marge légèrement dentée. Foliolles basales (2-2.5 x 1.5-1.8 cm) plus petites que les intermédiaires (4-6 x 2-3 cm) elles mêmes plus petites que les terminales (10-11 x 6-7 cm). Nervures saillantes en dessous. Stipule elliptique de 1-2 x 0.5-1 cm totalement hirsute fauve. Inflorescence en tête sphérique (1-2 cm de diamètre) hirsute à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule de 2-2.5 cm. Fleur mâle de couleur blanche, fleur femelle de couleur jaune.

- Dates et lieux de récolte (Figure 48d)

BF 004, 02/1997, Trou du Tahitien, Plaine des Lacs, en fleurs

BF 022, 05/1997, Chutes de la Madeleine, en fleurs (Figure 48b)

F.1.3/ *Pancheria sebertii* Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste peu ramifié de 2 à 3 mètres. Feuilles verticillées par 3, composées à 3-5 folioles, rarement simples. Folioles courtement velues sur la face inférieure surtout sur les nervures et plus encore à l'état jeune, sessiles, à marge finement dentelée. Folioles de 10-16 x 4.5-6 cm. Nervures saillantes en dessous. Stipules ovales de 1.5-2 x 0.8-1 cm hirsute sur la face inférieure. Jeunes rameaux pubescents. Infrutescence en tête sphérique (0.5-1.5 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule laineux fauve de 1.5-2 cm. Fruits secs déhiscent à valve laineuse fauve.

- Dates et lieux de récolte (Figure 48d)

BF 027, 10/1997, Vallée de la Nodéla, en fruits

BF 086, 07/2000, Monts Koghis, en fruits (Figure 48c)

F.1.4/ *Pancheria reticulata* Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles verticillées par 3, composées trifoliolées rarement simples à pétiole net de 1.5-2 cm. Folioles glabres, sessiles de 3-4 x 1-1.5 cm, à marge dentée. Nervures saillantes en dessous. Jeunes rameaux et jeunes feuilles finement pubescents. Stipule linéaire finement pubescente de 0.2-0.5 cm. Inflorescence en tête sphérique (0.5-0.7 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 1-1.5 cm. Fleur mâle de couleur blanche. Fruits secs déhiscent à valve pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 48d)

BF 060, 02/1999, Mont Mou, en fleurs mâles

BF 090, 09/2000, Mine Boakaine, Canala, en fruits

F.2/ Espèces à feuilles simples

F.2.1/ *Pancheria engleriana* Schlechter

- Caractéristiques morphologiques

Arbrisseau de moins d'un mètre. Feuilles de 2-2.5 x 2-2.5 cm, simples, ovales, glabres, verticillées par trois, à marge dentée, à pétiole très court (2-5 mm). Jeunes rameaux et jeunes feuilles à poils épars très courts. Stipule pubescente sur la face inférieure. Inflorescence en tête sphérique (0.5-0.8 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 2-2.5 cm. Fleur mâle de couleur blanche. Fruits secs déhiscent à valve velue.

- Dates et lieux de récolte (Figure 49e)

BF 056, 02/1999, Mont Mou, en fruits (Figure 49a)

F.2.2/ *Pancheria elegans* Brongniart et Gris

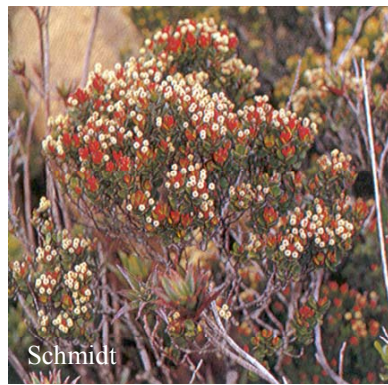
- Caractéristiques morphologiques

Arbrisseau de 1 à 1.5 mètres. Feuilles simples de 2-2.5 x 0.4-0.5 cm, linéaires, glabres, verticillées par cinq, à marge dentée, décurrente sur un pétiole net de 0.5-1 cm. Jeunes feuilles à nervure principale finement pubescente. Stipule linéaire glabre de 0.3-0.5 cm. Inflorescence en tête sphérique (0.5-0.8 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 2-2.5 cm. Fleurs mâles de couleur blanche, fleurs femelles de couleur rouge. Fruits secs déhiscent à valve pubescente rousse.

- Dates et lieux de récolte (Figure 49e)

BF 002, 02/1997, Cascade de Goro, en fruits

BF 078, 04/2000, Cascade de Goro, en fruits (Figure 49b)



a/ *Pancheria engleriana*



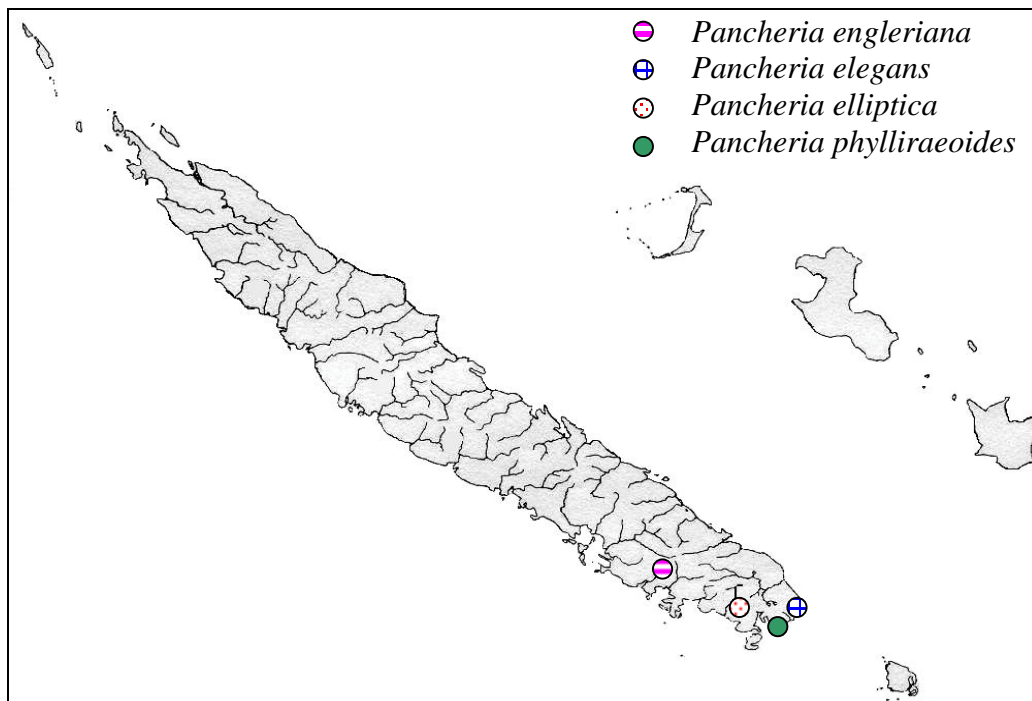
b/ *Pancheria elegans*



c/ *Pancheria elliptica*



d/ *Pancheria phylliraeoides*



e/ Répartition géographique et lieux de récolte de *P. engleriana*, *P. elegans*, *P. elliptica* et de *P. phylliraeoides*

Figure 49: Photos de *P. engleriana*, *P. elegans*, *P. elliptica*, *P. phylliraeoides* ; lieux de récolte de ces espèces

F.2.3/ *Pancheria elliptica* Pampanini

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles simples de 3-7 x 1.5-3.5 cm, elliptiques, glabres, verticillées par trois, à marge finement ondulée dentelée dans les 2/3 supérieurs, à pétiole net de 0.8-1 cm. Rameaux et pétioles totalement glabres. Stipule linéaire de 0.4-0.5 cm, pubescente sur la face inférieure. Infrutescence en tête sphérique (0.5-0.8 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 2-4 cm. Fruits secs déhiscent à valve finement pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 49e)

BF 020, 05/1997, Route du carénage, Plaine des Lacs, en fruits (Figure 49c)

F.2.4/ *Pancheria phylliraeoides* Brongniart et Gris ex Guillaumin

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste d'un mètre. Feuilles simples de 2-2.5 x 1-1.5 cm, ovales, à pubescence fine et éparse, verticillées par trois, à marge légèrement dentée dans les 2/3 supérieurs, à pétiole court (4-5 mm). Jeunes rameaux et pétioles des jeunes feuilles finement pubescents. Stipule pubescente à poils apprimés sur la face inférieure. Inflorescence en tête sphérique (0.8-1 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule pubescent de 1.5-2 cm. Fruits secs déhiscent à valve pubescente cendrée.

- Dates et lieux de récolte (Figure 49e)

BF 085, 07/2000, Port Boisé, en fruits (Figure 49d)

F.2.5/ *Pancheria alaternoides* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1 à 3 mètres. Feuilles simples de 2.5-3.5 x 0.5-0.7 cm, elliptiques, à pubescence fine et très éparse, verticillées par trois ou quatre, à marge dentée, à pétiole court (4-5 mm). Jeunes rameaux, pétioles et jeunes feuilles pubescents. Stipule linéaire de 0.5-1 cm, pubescente sur la face inférieure. Infrutescence en tête sphérique (0.5-1 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 1.5-2 cm. Fruits secs déhiscent à valve pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 50d)

BF 003, 02/1997, Cascade de Goro, en fruits

BF 007, 02/1997, Route du Dzumac, altitude 900 mètres, en fruits

BF 012, 02/1997, Route du Dzumac, altitude 1000 mètres, en fruits (Figure 50a)



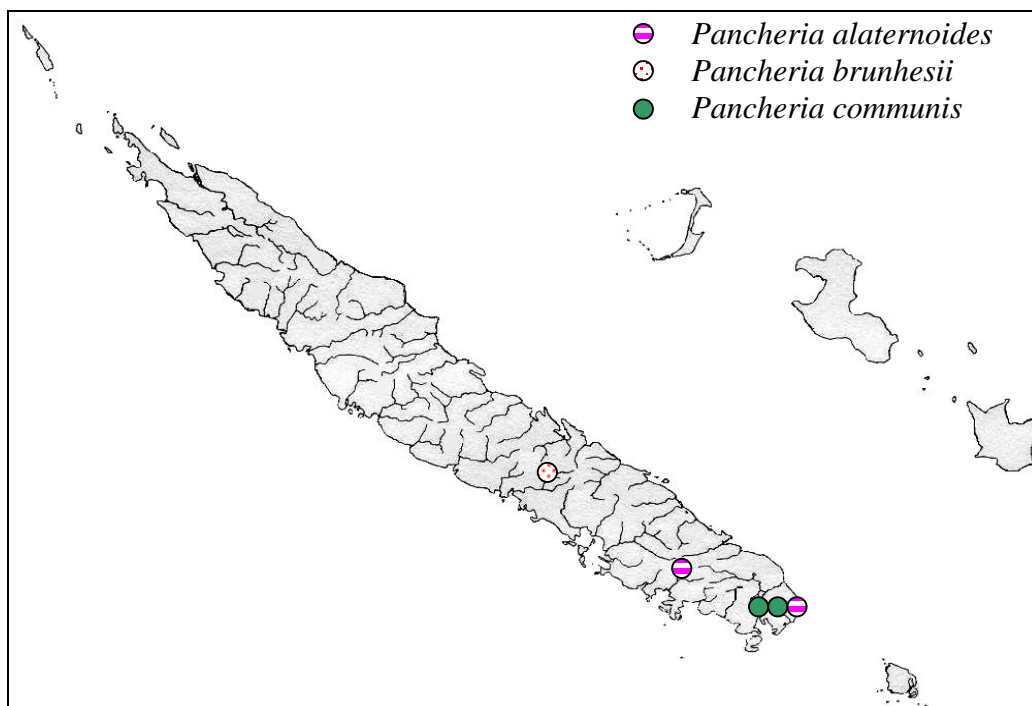
a/ *Pancheria alaternoides*



b/ *Pancheria brunhesii*



c/ *Pancheria communis*



d/ Répartition géographique et lieux de récolte de *P. alaternoides*,
P. brunhesii et de *P. communis*

Figure 50: Photos de *P. alaternoides*, *P. brunhesii*, *P. communis* ; lieux de récolte de ces espèces

F.2.6/ *Pancheria communis* Baker

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 1 à 2 mètres, rupicole. Feuilles simples de 2-3 x 1.5-2 cm, obovales en coin, glabres, verticillées par quatre ou cinq, à limbe nettement élargi au-dessus de sa partie médiane et dentelé uniquement à ce niveau, à pétiole très court (1-2 mm). Jeunes rameaux, pétioles, et jeunes feuilles glabres ou possédant quelques poils très épars. Stipule linéaire de 0.5-0.8 cm, glabre ou avec quelques poils localisés en marge. Inflorescence en tête sphérique (0.8-1.2 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 2-2.5 cm. Fleurs mâles de couleur blanche, fleurs femelles de couleur rouge. Fruits secs déhiscent à valve pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 50d)

BF 006, 02/1997, Lac Xere Wapo, Plaine des Lacs, en fruits

BF 082, 07/2000, Creek Pernod, Plaine des Lacs, en fleurs et en fruits (Figure 50c)

F.2.7/ *Pancheria brunhesii* Pampanini

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 8 à 10 mètres. Feuilles simples rarement trifoliolées de 9-10 x 2-3 cm, elliptiques allongées, verticillées par trois, à marge crénelée-ondulée, à pétiole net de 2.8-3 cm. Stipule linéaire de 0.5-1 cm, glabre sur la face inférieure. Infrutescence en tête sphérique (0.5-1 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule de 1-1.5 cm. Fruits secs déhiscent.

- Dates et lieux de récolte (Figure 50d)

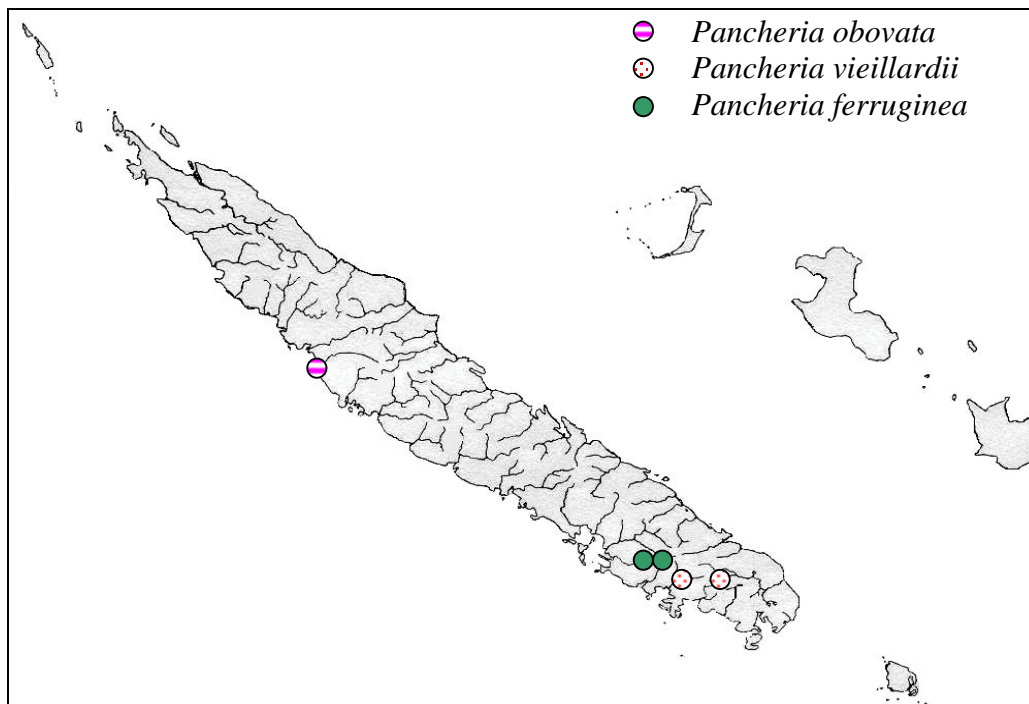
BF 016, 12/1997, Forêt du col d'Amieu, altitude 1000 mètres, en fleurs (Figure 50b)



a/ *Pancheria ferruginea*



b/ *Pancheria vieillardii*



c/ Répartition géographique et lieux de récolte de *P. obovata*,
P. vieillardii et de *P. ferruginea*

Figure 51: Photos de *P. vieillardii*, *P. ferruginea* ; lieux de récolte de ces espèces et *P. obovata*

F.2.8/ *Pancheria obovata* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 3 à 4 mètres en bouquet terminal de feuilles. Feuilles simples de 2-4 x 1-2.5 cm, quasi-ovales, glabres, verticillées par trois, à marge entière ou presque, parfois légèrement dentelée dans la $\frac{1}{2}$ supérieure, à pétiole court (5-7 mm). Stipule linéaire de 0.3-0.5 cm, pubescente sur la face inférieure. Inflorescence en tête sphérique (0.4-0.5 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 1.5-2 cm. Fruits secs déhiscent à valve pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 51c)

BF 051, 12/1998, Plateau de Tiéa, Pouembout, en fleurs et en fruits.

F.2.9/ *Pancheria vieillardii* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles simples, elliptiques de 3-7 x 1.5-3 cm, glabres, verticillées par trois, marge à dents assez larges dans la moitié supérieure et en coin à la base, à pétiole court (4-5 mm). Jeunes rameaux et pétioles très finement pubescents. Stipule elliptique de 0.5-0.9 cm, finement pubescente sur la face inférieure. Infrutescence en tête sphérique (1-1.5 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule finement pubescent de 3-5 cm. Fruits secs déhiscent à valve finement pubescente.

- Dates et lieux de récolte (Figure 51c)

BF 049, 06/1998, Forêt Faux Bon Secours, en fruits

BF 087, 07/2000, Monts Koghis, altitude 400 mètres, en fruits (Figure 51b)

F.2.10/ *Pancheria ferruginea* Brongniart et Gris

- Caractéristiques morphologiques

Arbuste de 2 à 3 mètres. Feuilles simples de 3-9 x 2-5 cm, elliptiques, à pubescence fine rousse à glabre, verticillées par trois, à marge dentée, à pétiole net de 0.5 cm. Jeunes rameaux, pétioles et jeunes feuilles pubescents de couleur rouille. Stipule elliptique de 0.5-1 cm, à pubescence rousse sur la face inférieure et à pubescence cendrée sur la face supérieure. Infrutescence en tête sphérique (0.8-1.5 cm de diamètre) à l'aisselle des feuilles, portée par un pédoncule pubescent roux de 2-3 cm. Fruits secs déhiscent à valve pubescente rousse.

- Dates et lieux de récolte (Figure 51c)

BF 061, 02/1999, Mont Mou, altitude 400 mètres, en fruits

BF 072, 03/2000, Route du Dzumac, altitude 600 mètres, en fruits

BF 077, 03/2000, Mont Mou, altitude 400 mètres, en fruits (Figure 51a)

Conclusion sur le genre : Tout comme le genre *Codia*, les espèces de ce genre se retrouvent sur des milieux de type maquis miniers à roches ultrabasiqes, milieux extrêmes à l'origine de son endémicité . On constate que la plupart des espèces sont localisables dans le sud et surtout dans la région de la Plaine des Lacs.

Conclusion

Les moyens actuels existant pour l'identification des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie, à savoir la révision des trois genres, *Acsmithia* (Hoogland, 1979, Hoogland, 1987), *Cunonia* (Hoogland *et al*, 1997) et *Weinmannia* (Hopkins, 1998c), les clés botaniques établies par Guillaumin (1948) pour les genres *Geissois*, *Codia* et *Pancheria*, ainsi que les herbiers référencés de l'I.R.D., nous ont permis d'identifier 52 espèces sur la centaine d'échantillons collectés. Ce rapport de 2 s'explique par des collectes en des lieux différents de la même espèce, permettant ainsi d'établir des cartes de répartition géographique. En complément des descriptions, une photo caractéristique de chaque espèce permet, de manière rapide, de reconnaître lors de futures récoltes l'espèce en présence. Une photothèque est aujourd'hui créée au sein du L.B.P.V.A. et sera complétée au fur et à mesure de la collecte de nouveaux échantillons.

L'analyse des résultats permet de constater que les espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie se développent sur différents types de milieux que sont les maquis miniers, les forêts denses et humides, les zones marécageuses, à des altitudes basses ou moyennement élevées voire au dessus de 1200 mètres. Chaque genre présente ses particularités. Les espèces du genre *Acsmithia* sont des arbustes lorsqu'elles se développent sur maquis ou de grands arbres en forêt. La même remarque peut être appliquée au genre *Cunonia* avec en plus la présence d'espèces rupicoles comme *C. deplanchei* et *C. purpurea*. Le genre *Geissois* n'est constitué que d'espèces de grande taille qui se développent sur les deux types de milieu mais la grande majorité d'entre-elles en forêts humides. Quant au genre *Weinmannia*, toutes les espèces qui le constituent sont des espèces de forêt. Enfin, les genres *Codia* et *Pancheria*, se retrouvent essentiellement sur les sols de type maquis miniers à roches ultrabasiqes dont la composition extrême en éléments minéraux, leur confère vraisemblablement leur endémicité.

Quel que soit le genre considéré, il est important de constater que certaines espèces possèdent ce que l'on nomme une « endémicité régionale » caractérisée par une localisation restreinte de celle-ci, comme dans le cas de *Cunonia aoupiniensis* présente essentiellement au Mont Aoupinié et au Mont Panié ou encore comme l'espèce *Codia ferruginea* localisable uniquement dans la région s'étendant de Thio à Canala. Un dernier exemple concernant l'espèce *Weinmannia ouaiemensis*, non collectée, est le plus frappant puisque celle-ci ne se développe qu'au niveau de la roche Ouaième sur la cote Est de la Nouvelle-Calédonie (Hopkins, 1998c).

Enfin, la répartition géographique des espèces de la famille des Cunoniaceae sur la Grande Terre est assez équilibrée et il est assez aisé de collecter la majeure partie des espèces dans la région sud, ce qui a été réalisé au cours de ce travail. Malgré tout, l'étude de l'ensemble des espèces, de leur répartition, de leurs caractéristiques en fonction du milieu de développement, au cours d'une investigation botanique approfondie doit conduire le collecteur dans toutes les régions de Nouvelle-Calédonie. Une fois encore, il convient de rappeler que notre travail s'inscrivait essentiellement dans le cadre d'une contribution à la connaissance de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie et non à une étude botanique approfondie.

A photograph of a laboratory setup for extraction and preparation of extracts. The scene includes a large glass flask on a magnetic stirrer, a digital scale, a yellow rack of test tubes, and various glassware. The text is overlaid on the image.

PARTIE II

Tests préliminaires
chimiques et biologiques
pour la sélection des
espèces de Cunoniaceae
néo-calédoniennes
d'intérêt.

Matériel d'extraction et de préparation d'extraits au L.B.P.V.A.

PARTIE II

Chapitre 1 :

Tests chimiques préliminaires



Test de mise en évidence de la présence de saponosides sur quelques décoctions de feuilles et écorces de Cunoniaceae

Chapitre 1 : TESTS CHIMIQUES PRELIMINAIRES

Introduction

La réalisation de ces tests préliminaires a eu pour but d'orienter les recherches chimiques en déterminant la présence ou l'absence de grands groupes de métabolites secondaires connus pour des activités biologiques diverses (voir synthèse bibliographique). Ils ne sont qu'à titre indicatif et n'ont en aucun cas de valeur quantitative même si pour certains, l'apparition d'un précipité plutôt qu'un trouble permet de fixer un ordre de grandeur.

Notre attention s'est portée sur les terpénoïdes (triterpènes et/ou stéroïdes, saponosides), les polyphénols (tanins, flavonoïdes, quinones) et les alcaloïdes. Pour ces derniers, il semble que la famille des Cunoniaceae en soit totalement dépourvue (Bate-Smith, 1977).

I/ Matériel et Méthodes

Selon la famille de molécules recherchée, le test a été réalisé soit directement à partir de la poudre végétale, soit à partir d'une décoction de celle-ci.

Préparation de la décoction:

Dans une fiole conique de 500 mL environ, contenant 100 mL d'eau distillée bouillante, on introduit 1g de poudre grossière de la drogue. Il s'agit ensuite de maintenir une ébullition modérée pendant 30 minutes. Après refroidissement, on réalise une filtration sur papier filtre Whatman 540 (125 mm de diamètre), on ajuste ce filtrat à 100 mL. On peut alors effectuer les tests.

A/ Recherche de terpénoïdes

A.1/ Recherche de saponosides

A.1.1/ Mise en évidence

Cette recherche est réalisée selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Française (X^{ème} édition).

Dans un tube à essai de 16 cm de haut et 16 mm de diamètre, on verse 10 mL de la décoction. On agite ce tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. On mesure immédiatement et après 15 minutes la hauteur de la colonne de mousse.

Si à 15 minutes, elle est inférieure à 1 cm, la présence de saponosides est négligeable. En revanche si elle est supérieure à 1 cm, on en conclut que la plante contient des saponosides.

A.1.2/ Calcul de l'indice mousse

Il convient alors de déterminer l'indice mousse qui correspond à la dilution de la décoction pour laquelle la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

Pour cela, on réalise une série de tubes à essai contenant 10, 8, 6, 4 et 2 mL de la décoction ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. On renouvelle alors l'étape décrite précédemment.

Le calcul de l'indice mousse s'effectue selon la formule suivante :

Si par exemple il s'agit du tube renfermant 4 mL de la décoction à 1%, soit 0,04 g de drogue, qui donne 1 cm de mousse après 15 minutes, on a :

$$(10 \times 1) / 0,04 = 250$$

Dans le cas où, dans le tube contenant 10 ml, la hauteur de mousse serait inférieure à 1 cm, l'indice est *inférieur à 100*.

Par contre si la hauteur est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est *supérieur à 1000* et l'on peut considérer que la poudre végétale est riche en saponosides.

A.2/ Recherche de stéroïdes et/ou triterpènes

Dans un bécher contenant 2g de poudre végétale, on ajoute 20 mL d'éther éthylique et on laisse agir 2 heures. On filtre la solution et quelques gouttes du filtrat sont déposées dans trois verres de montre :

- Le premier sert de témoin ;
- Dans le second, après évaporation de l'éther, on ajoute une goutte d'acide sulfurique concentré à 98° et on note immédiatement la coloration, de jaune à vert.
- Dans le troisième, on réalise la réaction de Liebermann-Burchard. Après évaporation de l'éther, on ajoute une goutte d'anhydride acétique, puis on ajoute une goutte d'acide sulfurique concentré. On note immédiatement et après 20 minutes la coloration. Si l'on note le passage du mauve au vert c'est que l'échantillon contient des stéroïdes et/ou des triterpènes (Bouquet, 1972).

B/ Recherche de polyphénols

B.1/ Recherche de tanins

La mise en évidence des tanins est basée sur la coloration qu'ils donnent avec une solution de perchlorure de fer à 1%, les tanins galliques et ellagiques donnant des colorations et des précipités bleus/noirs et les tanins condensés des précipités bruns/verdâtres (Bouquet, 1972).

Dans un tube à hémolyse contenant quelques millilitres de la décoction, on verse quelques gouttes de perchlorure de fer et on note la coloration.

B.2/ Recherche de flavonoïdes

- On prépare deux tubes à essais contenant chacun 5 mL de la décoction, dans l'un d'eux on ajoute quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique pur, l'autre servant de témoin pour la comparaison.

- On porte ensuite ces tubes au bain-marie à 100°C pendant 1 heure.

- La réaction est positive si l'on obtient une coloration rouge. On note + à +++ en fonction de l'intensité de la coloration caractérisant une présence plus ou moins importante de flavonoïdes (Bouquet, 1972).

B.3/ Recherche de quinones

Ce test est réalisé en parallèle sur la décoction et sur la poudre végétale.

- On prépare deux tubes à hémolyse contenant quelques millilitres de la décoction, on introduit dans l'un d'eux quelques gouttes d'une solution de potasse (KOH) à 4%.

- Dans un bécher contenant 2g de poudre végétale, on ajoute 4 à 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 5% pour l'humidifier et on attend 30 minutes. On ajoute alors 20 ml d'éther éthylique, puis on attend de nouveau 2 heures. On filtre alors la solution. Quelques gouttes du filtrat sont déposées dans deux verres de montre. Dans l'un d'eux, on ajoute quelques gouttes d'une solution de potasse à 4 %.

Dans les deux cas, la présence de quinones est caractérisée par l'apparition d'une coloration rouge (Paris & Nothis, 1969).

C/ Recherche d'alcaloïdes

5 g de poudre végétale sont versés dans un Erlenmeyer de 100 mL, puis on ajoute 2 à 3 mL d'ammoniaque à 20% pour l'obtention d'un crottin humide après mélange avec une tige de verre.

On ajoute alors 30 à 40 ml de dichlorométhane. On chauffe le tout en agitant, puis on filtre sur coton dans un tube à hémolyse. On évapore à sec puis on reprend dans une dizaine de gouttes de solution d'HCl à 3%.

Reste alors à introduire quelques gouttes du réactif de Mayer qui donne un précipité blanc en présence d'alcaloïdes (Bouquet, 1972).

Composition du réactif de Mayer et préparation :

Solution 1 : 13,5 g de chlorure mercurique
600 mL d'eau distillée

Solution 2 : 49,8 mg d'iodure de potassium
40 mL d'eau distillée

On ajoute progressivement la solution 2 dans la solution 1 en agitant jusqu'à dissolution complète. On ajuste à 1 litre avec de l'eau distillée.

Remarque : Le réactif photosensible est stocké dans une bouteille teintée pour éviter l'exposition lumineuse.

III/ Résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces tests chimiques préliminaires est joint en annexe I. Il apparaît très clairement que les espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie étudiées sont en possession d'une grande quantité de polyphénols et en particulier de tanins qui semblent occuper une place importante dans les métabolites secondaires. Il est d'ailleurs à noter que chez certaines Cunoniaceae, les tanins représentent 30% ou plus du poids de matière sèche de leurs feuilles (Bate-Smith, 1977). Ces tanins se retrouvent chez toutes les espèces et tous les genres reconnus en Nouvelle-Calédonie (Tableau IX).

Il en est de même pour les flavonoïdes qui semblent être plus abondants chez les genres *Cunonia*, *Geissois* et *Pancheria*. Les quinones enfin sont en quantité toujours plus importante au niveau des feuilles quelle que soit l'espèce considérée.

Tableau IX : Synthèse des résultats des tests chimiques préliminaires concernant les polyphénols.

Genre	Partie testée	Tanins	Flavonoïdes	Quinones
<i>Acsmithia</i>	Feuilles	+	+	++ / +++
	Ecorce	+	+	+ / ++
<i>Codia</i>	Feuilles	+	++	++
	Ecorce	+	++	+
<i>Cunonia</i>	Feuilles	+	+ / +++	++
	Ecorce	+	+ / +++	+
<i>Geissois</i>	Feuilles	+	+ / +++	++
	Ecorce	+	+ / +++	+
<i>Pancheria</i>	Feuilles	+	+ / +++	++ / +++
	Ecorce	+	+ / +++	+
<i>Weinmannia</i>	Feuilles	+	+	+++
	Ecorce	+	+	+

Les terpénoïdes sont présents en quantité plus ou moins abondante au sein de chaque genre et espèce (Tableau X) avec une forte concentration en saponosides au sein du genre *Acsmithia* ; avec des indices de mousse supérieurs à 1000 pour les espèces *Acsmithia collina*, *Acsmithia pubescens*, *Acsmithia elliptica* et *Acsmithia pedunculata* (Tableau XI).

Tableau X : Synthèse des résultats des tests chimiques préliminaires concernant les terpénoïdes.

Genre	Partie testée	Triterpènes et /ou stéroïdes	Saponosides
<i>Acsmithia</i>	Feuilles	+	+++
	Ecorce	+	+++
<i>Codia</i>	Feuilles	+	+ / -
	Ecorce	+	-
<i>Cunonia</i>	Feuilles	+	+ / -
	Ecorce	+	-
<i>Geissois</i>	Feuilles	+	-
	Ecorce	+	-
<i>Pancheria</i>	Feuilles	+	+ / -
	Ecorce	+	-
<i>Weinmannia</i>	Feuilles	+	+ / -
	Ecorce	+	-

Tableau XI : Indices de mousse déterminés pour les espèces du genre *Acsmithia* de Nouvelle-Calédonie et *Spiraeanthemum* du Vanuatu.

Espèce	Partie testée	Indice de mousse
<i>A. austrocaledonica</i> (Brongniart et Gris) Hoogland (Lit 114)	Feuilles	500
	Ecorce	250
<i>A. collina</i> Schlechter Hoogland (Lit 116)	Feuilles	> 1000
	Ecorce	> 1000
<i>A. elliptica</i> (Vieillard ex Pampanini) Hoogland (BF 58)	Feuilles	500
	Ecorce	>1000
<i>A. meridionalis</i> Hoogland (BF 70)	Feuilles	500
	Ecorce	500
<i>A. pedunculata</i> (Schlechter) Hoogland (BF 69)	Feuilles	500
	Ecorce	>1000
<i>A. pubescens</i> Pampanini (BF 34)	Feuilles	500
	Ecorce	>1000
<i>S. macgillivrayi</i>	Feuilles	> 1000
	Ecorce	> 1000
<i>S. cf. Katakata</i>	Feuilles	> 1000
	Ecorce	> 1000

Il est intéressant de noter que des résultats obtenus au sein du laboratoire des substances naturelles végétales de l'I.R.D. de Nouméa par le Dr Pierre Cabalion sur deux espèces de *Spiraeanthemum* du Vanuatu révèlent les mêmes caractéristiques (comm. pers.). Il existerait donc une affinité phytochimique entre ces deux genres, confortée par le fait que les espèces du genre *Acsmithia* de Nouvelle-Calédonie étaient précédemment confondues avec celles du genre *Spiraeanthemum*.

Le test chimique préliminaire de recherche d'alcaloïdes n'a donné aucun résultat positif. Ceci est en accord avec les résultats de Bate-Smith (1977) selon lequel cette classe de métabolites secondaires est absente chez les Cunoniaceae (Bate-Smith, 1977) .

PARTIE II

Chapitre 2 :

Tests d'activités biologiques
pour la sélection des espèces
d'intérêt



Test antibiotique sur *Corynebacterium accolans*
de quelques extraits de Cunoniaceae

CHAPITRE 2 : TESTS D'ACTIVITES BIOLOGIQUES POUR LA SELECTION DES ESPECES D'INTERET

Introduction

Divers tests biologiques à notre disposition en Nouvelle-Calédonie ont pu être réalisés. Tous utilisent des extraits préparés à partir de la poudre végétale, c'est pourquoi dans un premier temps deux types d'extraits bruts ont été préparés, à savoir un extrait au méthanol et un extrait à l'acétate d'éthyle. La raison du choix de ces deux solvants est de couvrir une large gamme de polarité dans le cadre d'un criblage préliminaire (Perumal Samy *et al.*, 1998, Bosisio *et al.*, 2000). Par la suite, les extraits obtenus ont été étudiés dans divers domaines. Nos études ont été surtout guidées par les idées directrices suivantes :

- Dans l'optique de découvrir de nouveaux antimicrobiens et anticancéreux, nous avons exposé chacun de nos extraits à 10 souches bactériennes ou fongiques et à une lignée de cellules cancéreuses Kb, provenant d'un carcinome d'épiderme buccal.
- Le domaine de la cosmétologie est en permanence à la recherche de molécules pour lutter contre les effets du vieillissement, c'est la raison pour laquelle nos extraits ont été testés pour leur éventuelle capacité inhibitrice à l'encontre de deux enzymes : la xanthine oxydase intervenant dans la libération des radicaux libres et l'élastase responsable de la perte d'élasticité de la peau et donc de l'apparition des rides. Il faut signaler également que la xanthine oxydase participe au phénomène de la goutte.
- Enfin, dans un souci de lutte contre la tique, fléau de l'agriculture Néo-Calédonienne nos extraits ont été testés pour leur effet toxique sur un petit crustacé considéré comme représentatif des organismes à sang froid, *Artemia salina*.

I/ Préparation des extraits bruts

A/ Matériel et Méthodes

Les échantillons prélevés sur le terrain, une fois séchés, sont broyés par un broyeur de type Forplex, permettant l'obtention d'une poudre grossière.

Cette poudre est ensuite soumise à des extractions par macération pendant 24 heures soit dans du méthanol, soit dans de l'acétate d'éthyle à température ambiante, dans la proportion de 10g de poudre pour 100 mL de solvant.

Après filtration sur papier filtre Whatman 540 (125 mm de diamètre, durci sans cendres), le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite, à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-114. L'extrait brut ainsi obtenu est pesé pour la détermination du rendement d'extraction, avant d'être stocké au réfrigérateur à 4°C, dans des tubes à hémolyse jusqu'à son utilisation (Figure 52).

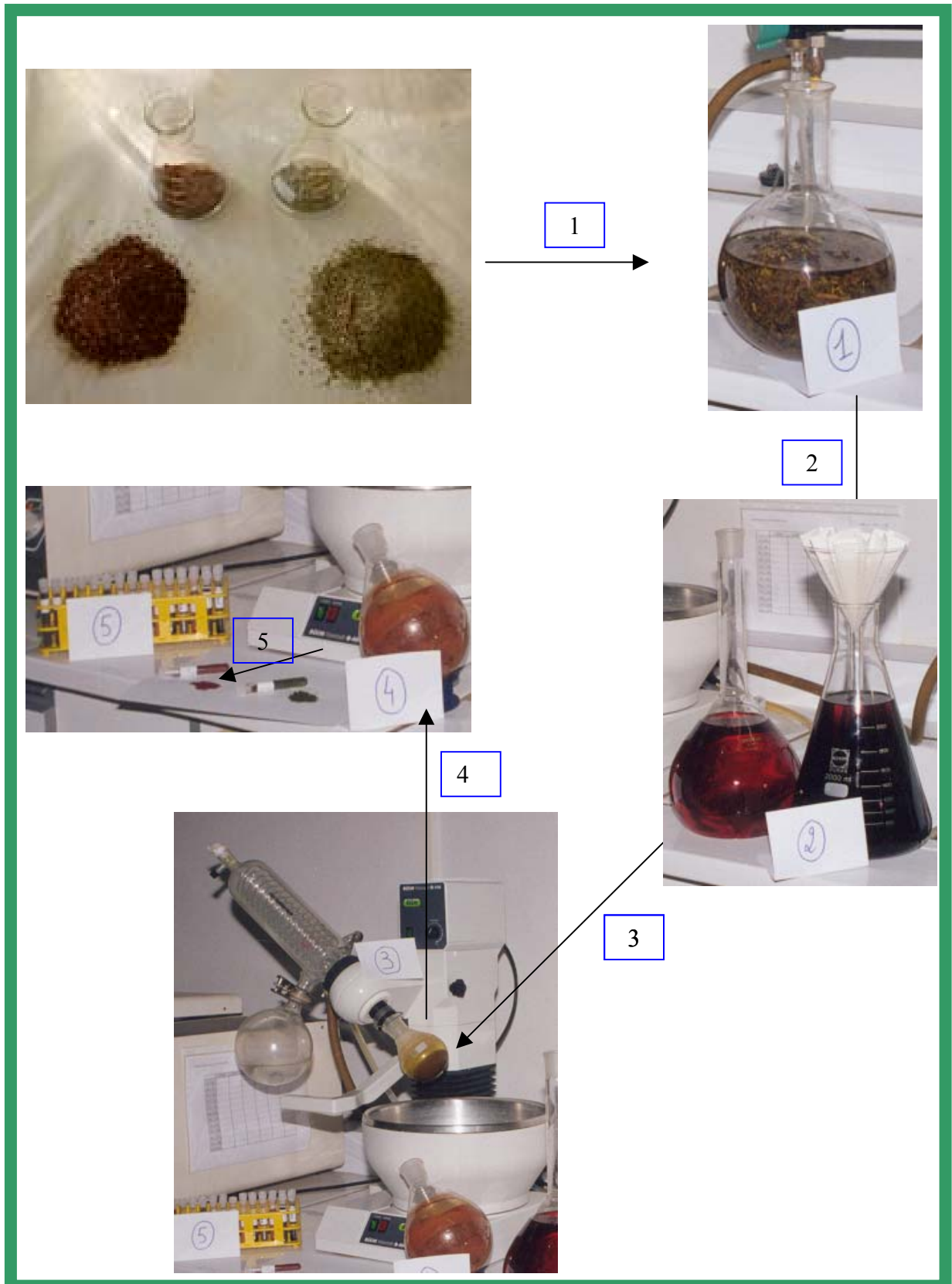


Figure 52 : Etapes de la préparation des extraits bruts après broyage : 1/ Extraction par macération pendant 24h à température ambiante ; 2/ Filtration ; 3/ Evaporation à sec sous pression réduite à 45°C ; 4/ Récupération de l'extrait sec ; pesée ; 5/ Stockage en tubes à hémolyse.

B/ Résultats et Discussion

C'est ainsi que 204 extraits bruts ont donc été préparés. Le rendement d'extraction indispensable pour leur valorisation industrielle est fourni en annexe II. Chaque extrait au méthanol est référencé FO et HL dans le cas des extraits à l'acétate d'éthyle.

Les résultats obtenus montrent clairement que l'extraction au méthanol permet d'obtenir, pour toutes les espèces, des rendements de 0.6 à 28.4% supérieurs à ceux obtenus pour l'extraction à l'acétate d'éthyle allant de 0.27% à 6.61%. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les molécules de polarité élevée occupent une place plus importante au sein des métabolites secondaires chez les Cunoniaceae étudiées.

Une expérience menée sur quelques unes des poudres végétales, nous a permis de montrer le rôle fondamental du broyage sur le rendement de l'extraction. En effet, comme le montre le tableau XII, plus la poudre est fine (broyage à l'aide d'un mixeur électrique), plus le rendement d'extraction est important et ceci quel que soit le solvant considéré. Il nous paraît donc essentiel de rechercher les voies et moyens d'optimiser l'extraction dans le cadre de la valorisation d'une espèce d'intérêt.

Tableau XII : Rendements comparés d'une extraction sur poudre végétale grossière et fine sur différentes parties de plantes et avec différents types de solvants.

Espèce	Partie utilisée	Type de solvant	Type de poudre	Rendement (%)
<i>Acsmithia elliptica</i>	Feuilles	Acétate d'éthyle	Grossière	2.3
			Fine	3.9
		Méthanol	Grossière	14.4
			Fine	17.9
<i>Codia arborea</i>	Ecorce	Acétate d'éthyle	Grossière	0.7
			Fine	2.1
		Méthanol	Grossière	4.2
			Fine	7.9
<i>Cunonia pterophylla</i>	Feuilles	Acétate d'éthyle	Grossière	0.8
			Fine	2.3
		Méthanol	Grossière	3.9
			Fine	5.2
<i>Geissois hirsuta</i>	Feuilles	Acétate d'éthyle	Grossière	1.4
			Fine	3.1
		Méthanol	Grossière	3
			Fine	5.7
<i>Pancheria elegans</i>	Ecorce	Acétate d'éthyle	Grossière	1.1
			Fine	2.6
		Méthanol	Grossière	3.8
			Fine	5.4
<i>Weinmannia dichotoma</i>	Ecorce	Acétate d'éthyle	Grossière	4.4
			Fine	7.2
		Méthanol	Grossière	12.7
			Fine	15.3

II/ Tests d'activités antimicrobiennes

A/ Introduction

Les infections microbiennes tant chez l'animal que chez le végétal restent une source importante de problèmes encore aujourd'hui. Malgré tous les antibiotiques et fongicides existants, l'apparition de nouvelles souches résistantes en milieu hospitalier ou sur les végétaux en champs, induit une recherche permanente de nouvelles molécules actives. Même si historiquement, les premières recherches sur les antibiotiques débutent en 1877 avec Pasteur, qui constate que certaines espèces de bactéries empêchent d'autres groupes de se développer, les plantes ont aujourd'hui fait la preuve qu'elles en étaient, elles aussi, une source importante (Burapadaja & Bunchoo, 1995; Adesina *et al.*, 2000).

C'est pourquoi, nous avons testé chacun de nos extraits pour leur éventuelle activité antimicrobienne sur une collection de pathogènes humains et de pathogènes de plante. L'objectif final est de sélectionner les espèces de Cunoniaceae présentant le plus grand intérêt. Leur étude approfondie conduira à coup sûr à la purification de molécules bioactives.

Ce travail a fait l'objet d'une publication que nous nous proposons de présenter sous sa forme de parution accompagnée d'une conclusion.

B/ Article paru : Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties. (Fogliani *et al.*, 2002a)

Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties

B. FOGLIANI
S. BOURAÏMA-MADJEBI
V. MEDEVIELLE
R. PINEAU

L.B.P.V.A.: Laboratoire de Biologie et
Physiologie Végétales Appliquées
Université de la Nouvelle-Calédonie
BP 4477, 98847 Nouméa, New Caledonia
Email: bfoaglian@univ-nc.nc

Abstract Some species of the Cunoniaceae are reputed to possess medicinal properties. An investigation of 50 species of this family in New Caledonia has permitted the screening of 204 extracts (101 ethyl acetate extracts and 103 methanol extracts) for antimicrobial activities against one yeast (*Candida albicans*), one filamentous fungus (*Fusarium oxysporum*), and eight bacterial species (*Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium accolans*, *Bacillus subtilis*). Ninety-six per cent of the plants exhibited antimicrobial activity, with a significant difference in the number of responses between fungi (18.8%) and bacteria (81.2%). Moreover, Gram +ve strains appear more sensitive than Gram –ve ones. The most active plants were *Acsmithia meridionalis*, *A. pedunculata*, *Cunonia macrophylla*, *C. vieillardii*, *Pancheria alaternoides*, and *P. elegans*. *Cunonia macrophylla* appears to be the best candidate for a chemical investigation using bioguided fractionation as extracts from its leaves and flowers effectively inhibited six strains (one yeast, two Gram –ve bacteria and three Gram +ve bacteria).

Keywords antibacterial activity; antifungal activity; Cunoniaceae; ethyl acetate extract; methanol extract; New Caledonia

INTRODUCTION

Due to its geographical isolation from Australia and New Zealand 65 million years ago (Raven 1980), New Caledonia possesses a very rich flora. It is characterised by an endemism of 76.4%, with affinities to the Australian and New Zealand floras (Barnes & Hill 1999). Jaffre (1993) estimated that there are 3380 indigenous plant species in New Caledonia. They are represented by four large families, Myrtaceae, Rubiaceae, Orchidaceae, and Euphorbiaceae, with a total of 831 species (26.9% of the flowering plants), and seven families with 80 or more species each, Paaceae, Apocynaceae, Cyperaceae, Cunoniaceae, Rutaceae, Araliaceae, and Sapotaceae, with a total of 660 species (21.3% of the angiosperm flora) (Morat 1993).

Few New Caledonian plants have been studied for pharmaceutical properties. The literature on the Cunoniaceae family in the order Rosales (Cronquist 1988) is particularly poor, in this domain (Luis Diego Gomez 1995; Bosisio et al. 2000) and in chemistry (Bate-Smith 1977; Wollenweber et al. 2000). The majority of articles are concerned with taxonomy (Godley 1983; Hopkins 1998) and physiology (Burrows 1999). However, some members of the Cunoniaceae are reputed to have medicinal properties and are used in some cultures to treat various diseases (Table 1).

Fifty species from the six genera of Cunoniaceae known in New Caledonia, *Acsmithia*, *Codia*, *Cunonia*, *Geissois*, *Pancheria*, and *Weinmannia* (Guillaumin 1948), were subjected to biological assays. Additional tests were carried out after the first results showed xanthine oxidase inhibitory (Fogliani et al. 2001) and antimicrobial activity (Fogliani et al. 2000).

B02003

Received 7 January 2002; accepted 31 May 2002

Microbial infections are an important health problem throughout the world, and plants are a possible source of antimicrobial agents (Burapadaja & Bunchoo 1995; Adenisa et al. 2000). In this study, 204 extracts (101 ethyl acetate extracts and 103 methanol extracts) from New Caledonian species of Cunoniaceae were assayed against a collection of human and plant pathogens. The objective was to select species with higher activity for further chemical investigation to isolate the active compounds by means of bioactivity guided fractionation.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plant materials

Material was collected from localities in New Caledonia during different seasons but always from plants in flower or fruit. All accessible parts were sampled, including leaves, bark, flowers, fruit, and roots. Identification was carried out by comparison with collections in the herbarium at the Institut de la Recherche pour le Développement (I.R.D.), Noumea, and some were verified by Helen Fortune Hopkins (Lancaster University) and Jason Bradford

Table 1 Members of Cunoniaceae used medicinally.

Botanical name	Common name	Part used	Popular uses	Country	Reference
<i>Weinmannia</i> spp.			Genito-urinary antiseptic	Costa Rica	Luis Diego Gomez 1995
<i>W. richii</i>	manawi	Bark	Panacea for a pain in the lungs and for a cough	Fiji	Cambie & Ash 1994
<i>W. vitiensis</i>	molaudamu	Leaf	Treatment of headaches caused by getting over heated in the sun or by strenuous work	"	Cambie & Ash 1994
<i>W. racemosa/silvicola</i>	kamahi/tawhero or towhai		Treatment of abdominal and thoracic pains, baby's thrush, constipation. Tonic. Externally for open sores, burns and cuts	New Zealand	Brooker et al. 1987 Riley 1994
<i>Spiraeanthemum macgillivrayi</i>	sasahe	Bark	Treatment of fever. Treatment of spleen and kidney pain	Vanuatu	P. Cabalion unpubl. data
<i>S. katakata</i>	haondessi or nakaimal	Bark	Treatment of fever and spleen pain. Treatment of headaches	"	P. Cabalion unpubl. data
<i>Geissois denhamii</i>	hokara	Bark	Treatment of infected wounds	"	P. Cabalion unpubl. data
<i>Codia</i> sp.	mwêšô	Bark	Treatment of symptoms of ciguatera (intoxication by ciguatoxin)	New Caledonia	D. Cortadellas unpubl. data
<i>Cunonia</i> sp.	mwîšô	Bark	Appétite suppressant	"	D. Cortadellas unpubl. data
<i>Geissois trifoliata</i>	pèjalë	Bark	Treatment of tiredness and headaches	"	D. Cortadellas unpubl. data
<i>Weinmannia linearisepala</i>		Bark	Treatment of fever	"	Rageau 1957

(Missouri Botanical Garden) who are currently revising some genera of New Caledonian Cunoniaceae. Voucher specimens (BF 1-90) were deposited in our laboratory at the University of New Caledonia. Specimen Lit048 was provided by Marc Litaudon from the C.N.R.S. (Centre national de la recherche scientifique), Noumea.

Preparation of crude extracts

Two 10-g samples of the air-dried powdered plant material were extracted separately by maceration for 24 h with ethyl acetate (100 ml) or methanol (100 ml). After filtration, the extracts were concentrated *in vacuo* at 45°C and weighed to determine the w/w yield.

Test solutions

Dried crude extracts were dissolved in their extraction solvent to obtain the desired final concentration of 50 µg µl⁻¹.

Microbial strains

Bacterial strains used for testing included human pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium accolans*, and *Bacillus subtilis*) and a plant pathogen (*Erwinia carotovora*).

Two strains of fungi were used, one human pathogenic yeast (*Candida albicans*) and one plant pathogenic filamentous fungi (*Fusarium oxysporum*).

The human pathogens were isolated at the Institut Pasteur in Noumea and provided by the I.R.D.; the plant pathogens were isolated in our laboratory (L.B.P.V.A.). The stock culture was maintained on Müller Hinton (MH) agar medium pH 7.4 at 37°C for the human pathogens and at 30°C for the others.

Assay for antimicrobial testing

Antimicrobial activities of the two types of crude extracts were assayed using the disc diffusion method (Bauer et al. 1966).

Petri plates (9 cm diam.) containing 12 ml of MH agar medium were seeded with 24-h-old cultures of a selected microbial strain, except for *F. oxysporum* which required 72 h incubation. Five hundred µg of a selected extract was deposited on a sterile filter paper disc (6 mm diam.) which was then placed on the agar surface. Methanol and ethyl acetate alone served as negative controls. Standard discs containing gentamycin sulfate (10 µg), an antibiotic drug with a large spectrum, was used as a positive

control on bacteria. For fungi, nystatin (20 µg) and actidione (20 µg) were used.

Plates were incubated for 24 h at 37°C for human pathogens and at 30°C for plant pathogens, except for *F. oxysporum* which was incubated for 4 days.

The assessment of antimicrobial activity was based on the measurement of diameter of inhibition zones formed around the discs. Six independent trials were conducted for each extract on six different plates for each strain.

RESULTS

All plants studied here showed antimicrobial activity against some of the test micro-organisms, with the exception of *Pancheria brunhesii* and *P. confusa* (Table 2). Thus, most of the Cunoniaceae species studied here are a potential source of antimicrobial agents.

Activity against fungi

Candida albicans

Eight species in *Acsmithia*, *Cunonia*, and *Pancheria* showed activity; species in *Codia*, *Geissois*, and *Weinmannia* exhibited no activity. The most active species were *Cunonia macrophylla*, *C. linearisepala*, and *Pancheria elegans*. Activity was found in the leaves and bark of *P. elegans* (both extracts) and *C. linearisepala* (methanol extract only). In the case of *C. macrophylla*, both extracts from leaves and flowers were active but bark showed no activity.

Fusarium oxysporum

Species in all genera studied except *Weinmannia* showed activity. In all cases, activity was found from all parts of the plants but only in the methanol extracts.

Antimicrobial activities

Against Gram -ve bacteria

The largest number of positive results was found for *Erwinia carotovora*. The most active genera appear to be *Acsmithia* (Fig. 1B) and *Weinmannia* as all the species studied showed an effect. The most effective species were *Cunonia macrophylla* and *C. vieillardii*, with an inhibition diameter > 15 mm (Fig. 1A). *Pancheria* (Fig. 1B), *Codia*, and *Geissois* also showed activity for each extract type, but to a lesser degree.

Table 2 Antimicrobial activity of extracts from members of Cunoniaceae against bacteria and fungi. Strains: C.a, *Candida albicans*; F.o, *Fusarium oxysporum*; E.ca, *Erwinia carotovora*; K.pneu, *Klebsiella pneumoniae*; P.aeru, *Pseudomonas aeruginosa*; E.c, *Escherichia coli*; S.epi, *Staphylococcus epidermidis*; S.aur, *Staphylococcus aureus*; Co.ac, *Corynebacterium accolans*; B.subt, *Bacillus subtilis*. Parts used: LF, leaf; BA, bark; F.l, flowers; Fr, fruit; RO, roots. Type of extract: Ea, ethyl acetate; Me, methanol.

Genus/Species/ (Voucher specimen)	Part used	Inhibition zone diameter (mm)																			
		C.a		F.o		E.ca		K.pneu		P.aeru		E.C		S.epi		S.aur		Co.ac		B.subt	
		Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me
Codia																					
<i>C. albifrons</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vieillard ex Guillaumin (BF 83)	BA	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. arborea</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart ex Guillaumin (BF 14)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. discolor</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Brongniart & Gris) Guillaumin	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(BF 55)	FL	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. ferruginea</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 88)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. incrassata</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pampanini (BF 36)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. montana</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Forster & Forster (BF 37)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. nitida</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schlechter (BF 62)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sp.</i> (BF 84)	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Weinmannia																					
<i>W. dichotoma</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 40)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. monticola</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Däniker (BF 39)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cunonia																					
<i>C. alticola</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guillaumin (BF 59)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. aoupiniensis</i> Hoogland (Lit048)	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. atrorubens</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schlechter (BF 52)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2 continued

Genus/Species/ Voucher specimen	Part used	Inhibition zone diameter (mm)																			
		C.a		F.o		E.ca		K.pneu		P.aeru		E.C		S.epi		S.aur		Co.ac		B.subt	
		Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me	Ea	Me
<i>P. elliptica</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pampanini (BF 20)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. engleriana</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schlechter (BF 56)	BA	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	7	-
<i>P. ferruginea</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 61)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. hirsuta</i>	LF	-	-	-	-	-	-	9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	-	-
Vieillard ex Pampanini (BF 22)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. obovata</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 51)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. phyllitracoides</i> (BF 85)	LF	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris ex Guillaumin	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. reticulata</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guillaumin (BF 60)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sebertii</i>	LF	-	-	-	-	-	-	7	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guillaumin (BF 86)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vieillardii</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 87)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geissois																					
<i>G. hippocastaneifolia</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guillaumin (BF 23)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. hirsuta</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 29)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. magnifica</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baker (BF 24)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. polyphylla</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecard ex Guillaumin (BF 38)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. pruinosa</i>	LF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brongniart & Gris (BF 15)	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

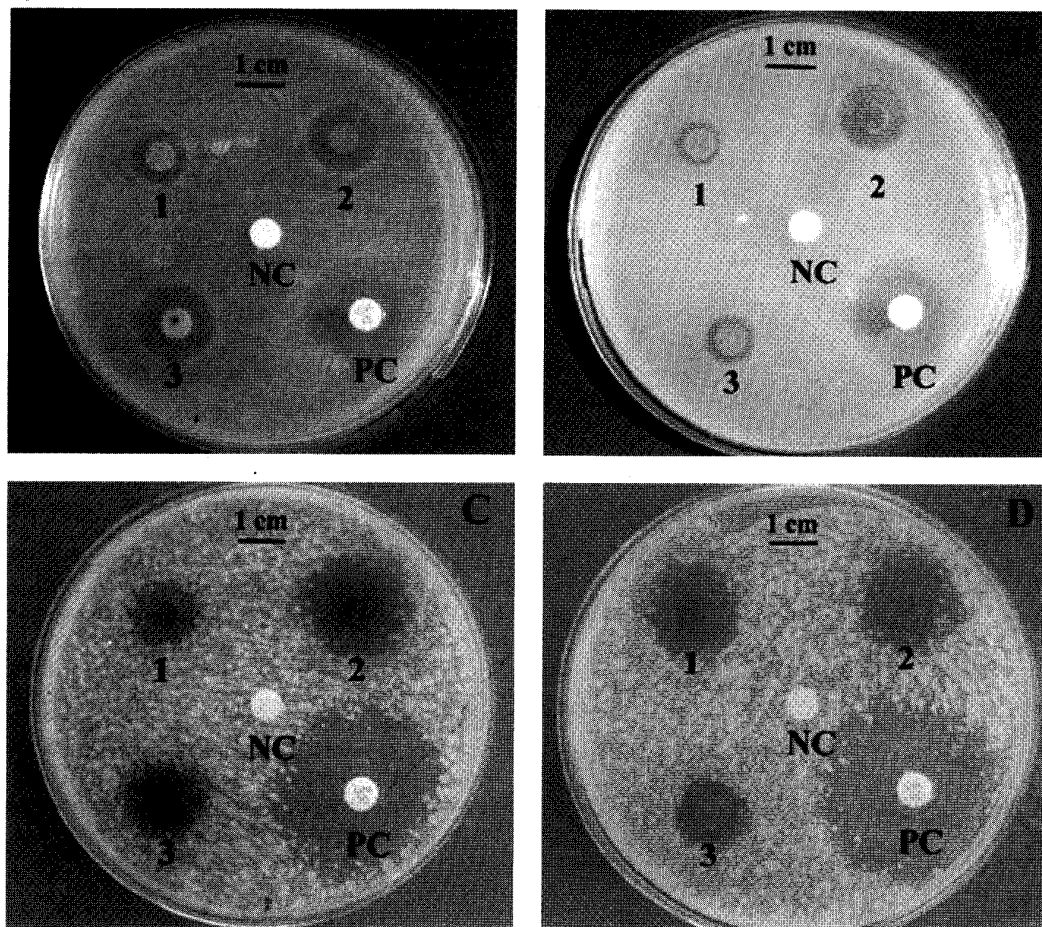


Fig. 1 Antibiotic effects of plant extracts from New Caledonian Cunoniaceae. **A-B**, Against *Erwinia carotovora*: A1, Me Leaf extract and A2, Me Flower extract of *Cunonia macrophylla*; A3, Me Leaf extract of *Cunonia vieillardii*; B1, Ea Bark extract of *Pancheria alaternoides*; B2, Ea Leaf extract of *Pancheria elegans*; B3, Ea Bark extract of *Acsmithia meridionalis*. **C-D**, Against *Corynebacterium accolans*: C1, Ea Leaf extract and C2, Ea Flower extract of *Cunonia macrophylla*; C3, Ea Bark extract of *Geissois hirsuta*; D1, Ea Leaf extract of *Pancheria elegans*; D2, Ea Bark extract of *Codia ferruginea*; D3, Me leaf extract of *Acsmithia pedunculata*. Ea, ethyl acetate; Me, methanol; NC, negative control; PC, positive control (Gentamycin 10 µg).

species showed antimicrobial activity on one or more pathogen strains.

Antibacterial agents were more common in the studied plants than antifungal agents. Of 255 detectable effects, 48 (18.8%) were against fungi and 207 (81.2%) were against bacteria (Table 2). A comparison between the two types of bacteria also reveals that Gram +ve strains were more sensitive than Gram -ve strains as there were 161 (77.8%)

activities against the positive ones and 46 (22.2%) against the negative ones. This may be attributed to the structural differences of the cell wall of the two types of bacteria, Gram -ve possessing a multilayered structure bounded by an outer cell membrane, whereas a Gram +ve bacterium has a single layer (Yao & Moellering 1995).

Overall, species of *Acsmithia* showed the greatest number of responses; all inhibited at least four

bacterial or fungal strains. In particular, *A. meridionalis* and *A. pedunculata* were active against six and five of them, respectively. However, the strongest effects were mainly from species of *Cunonia*, especially *C. vieillardii* and *C. macrophylla*. The latter, in particular, appears to be worthy of chemical investigation as its antimicrobial agents were active against bacteria as much as against fungi. *Pancheria alaternoides* and *Pancheria elegans* should also be considered as they inhibited six and five strains, respectively, of those studied.

These results demonstrate that species of Cunoniaceae from New Caledonia have potential for the isolation of antimicrobial agents.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Province Sud de Nouvelle-Calédonie for financial support of this project and for the grant provided to Bruno Fogliani. We thank Jean-Marie Veillon and Tanguy Jaffre for their help in the primary identification of plants and Pierre Cabalion for his help finding ethnobotanic information. Special thanks go to Hamid Amir and Attika Amir for their technical assistance.

REFERENCES

- Adenisa, S. K.; Idowu, O.; Ogundaini, A. O.; Oladimeji, H.; Olugbade, T. A.; Onawunmi, G. O.; Pais, M. 2000: Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14: 371–374.
- Barnes, R. W.; Hill, R. S. 1999: Macrofossils of *Callicoma* and *Codia* (Cunoniaceae) from Australian Cainozoic Sediments. *Australian Systematic Botany* 12: 647–670.
- Bate-Smith, E. C. 1977: Chemistry and taxonomy of the Cunoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 5: 95–105.
- Bauer, A. W.; Kirby, M. D. K.; Sherris, J. C.; Turck, M. 1966: Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493–496.
- Bosisio, E.; Mascetti, D.; Cabalion, P. 2000: Screening of plants from New Caledonia and Vanuatu for inhibitory activity of xanthine oxidase and elastase. *Pharmaceutical Biology* 38(1): 18–24.
- Brooker, S. G.; Cambie, R. C.; Cooper, R. C. 1987: New Zealand medicinal plants. New Zealand, Heinemann. Pp. 119–122.
- Burapadaja, S.; Bunchoo, A. 1995: Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica* 61: 365–366.
- Burrows, C. J. 1999: Germination behaviour of seeds of the New Zealand woody species *Beilschmieda tawa*, *Dysoxylum spectabile*, *Griselinia lucida*, and *Weinmannia racemosa*. *New Zealand Journal of Botany* 37: 391–395.
- Cambie, R. C.; Ash, J. 1994: Fijian medicinal plants. Australia, CSIRO. 135 p.
- Cronquist, A. 1988: An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press. 1262 p.
- Fogliani, B.; Bouraïma-Madjebi, S.; Cabalion, P. 2000: Cunoniaceae bioactives de Nouvelle-Calédonie. Proceedings of the Colloque Extraction par Solvant pour la Valorisation des Matières Premières Végétales, Toulouse, France, 27–28 avril. Pp. 9–16.
- Fogliani, B.; Bouraïma-Madjebi, S.; Pineau, R.; Cabalion, P. 2001: Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions. *Pharmaceutical Biology* 40.
- Godley, E. J. 1983: The fruit in *Ackama*, *Caldcluvia*, and *Weinmannia* (Cunoniaceae). *New Zealand Journal of Botany* 21: 455–456.
- Guillaumin, A. 1948: Flore analytique et synoptique de Nouvelle-Calédonie. Phanérogames. Flore de la France d'outremer. Paris, Office de la Recherche Scientifique Coloniale. Pp. 137–143.
- Hopkins, H. C. F. 1998: A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and the Pacific. 3. New Guinea, Solomon Islands, Vanuatu and Fiji, with notes on the species of Samoa, Rarotonga, New Caledonia and New Zealand. *Adansonia, Sér. 3*, 20(1): 67–106.
- Jaffre, T. 1993: The relationship between ecological diversity and floristic diversity in New Caledonia. *Biodiversity Letters* 1: 82–87.
- Luis Diego Gomez, P. 1995: *Weinmannia* spp. (Cunoniaceae): Fitoquímica básica. *Revista de Biología Tropical* 43: 311–312.
- Morat, Ph. 1993: Our knowledge of the flora of New Caledonia: endemism and diversity in relation to vegetation types and substrates. *Biodiversity Letters* 1: 72–81.
- Rageau, J. 1957: Plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Nouméa, ORSTOM. 23 p.
- Raven, P. H. 1980: Plate tectonics and Australasian paleobiogeography. *Science* 176: 1379–1386.
- Riley, M. 1994: Maori healing and herbal. New Zealand, Viking Sevenses. 452 p.

C/ Conclusion

L'ensemble de ces résultats confirme que les espèces de Cunoniaceae néo-calédoniennes sont une source très prometteuse d'agents antimicrobiens comme certainement d'autres espèces de la famille dans le monde (Luis Diego Gomez, 1995). Les activités détectées sur l'espèce *Weinmannia parviflora* qu'il nous a été donné de récolter au Mont Marau à Tahiti (Tableau XIII), sont une indication supplémentaire soutenant cette hypothèse.

Tableau XIII : Activités antimicrobiennes (auréoles d'inhibition en mm) détectées pour l'espèce *Weinmannia parviflora* (BF 91) récoltée en Polynésie Française.

Partie testée	Type d'extrait	C.a	E. ca	K. pneu	P. aeru	E. C	S. epi	Co. ac	B. subt
Feuilles	Ae	10	10	8	10	8	8	8	-
	Me	15	15	10	12	10	10	11	8
Ecorce	Ae	-	7	-	-	-	7	-	-
	Me	-	9	-	-	-	7	-	-

Les abréviations utilisées sont semblables à celle employées dans le tableau de résultats de la publication présentée.

Le choix tactique de cette famille basée sur quelques données ethnopharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines affections, qui pouvaient être attribuées à des agents microbiens, semble avoir été judicieux à la vue du nombre de réponses obtenues.

A l'issue de cette étude, la sélection de plusieurs espèces a pu être réalisée en se basant sur deux critères essentiels, à savoir le nombre de souches microbiennes inhibées et l'efficacité de l'inhibition. Ainsi, 6 espèces sélectionnées par ordre d'intérêt sont indiquées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Espèces sélectionnées par ordre d'intérêt pour leurs activités antimicrobiennes.

Genre/ Espèce	Nombre de souches inhibées	Efficacité de l'inhibition (auréole en mm)	Nombre d'extraits actifs	Rang d'intérêt
<i>C. macrophylla</i> Brongniart & Gris (BF75)	5	8 \diamond 17	21	1
<i>C. vieillardii</i> Brongniart & Gris (BF 89)	5	8 \diamond 17	7	2
<i>P. alaternoides</i> Brongniart & Gris (BF 12)	6	8 \diamond 18	4	3
<i>P. elegans</i> Brongniart & Gris (BF 78)	5	8 \diamond 15	12	4
<i>A. meridionalis</i> Hoogland (BF 70)	6	8 \diamond 13	18	5
<i>A. pedunculata</i> (Schlechter) Hoogland (BF 69)	5	8 \diamond 12	9	6

III/ Tests d'inhibitions enzymatiques

Selon le même principe que celui appliqué aux tests antimicrobiens, il nous a paru important de tester nos extraits pour leurs éventuelles activités inhibitrices à l'encontre de protéines enzymes. Notre choix s'est porté sur l'élastase et la xanthine oxydase qui jouent des rôles bien connus dans le vieillissement de la peau. La découverte de nouveaux inhibiteurs pourrait dès lors permettre de valoriser des substances susceptibles d'intéresser le domaine de la cosmétologie. La xanthine oxydase joue également un rôle dans le phénomène de la goutte, qui reste encore aujourd'hui une pathologie difficile à traiter. Le choix de ces deux enzymes s'est également appuyé sur des résultats de Bosisio *et al.* (2000) qui ont montré que l'espèce *Cunonia montana* Schlechter possède des activités inhibitrices anti-élastase et anti-xanthine oxydase.

A/ Activités inhibitrices à l'encontre de la xanthine oxydase

A.1/ Introduction

La xanthine oxydase (XOD) catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, dont l'accumulation provoque de l'hyper-uricémie associée à la goutte (Noro *et al.*, 1983a ; Hayashi *et al.*, 1989). Elle est également la source de radicaux libres à l'origine de dommages causés aux tissus vivants. Ces radicaux participent à des phénomènes pathologiques graves tels que les allergies, les inflammations, le diabète, l'emphysème, l'artère-sclérose, etc. (Crastes de Poulet *et al.*, 1994) ainsi que dans le phénomène de vieillissement. C'est pourquoi, la découverte de piègeurs de radicaux libres ou d'inhibiteurs spécifiques de la xanthine oxydase offrirait une solution thérapeutique pour le traitement de ces pathologies (Goodman Gilman's, 1990).

De nombreux composants de plantes comme les xanthonnes, les flavonoïdes, les coumarines ou encore les proanthocyanidines sont reconnus comme inhibiteurs potentiels de la xanthine oxydase (Sumahara *et al.*, 1977 ; Noro *et al.*, 1983b ; Hsüch-Ching & Yen-yeou, 1993 ; Aucamp *et al.*, 1997 ; Kong *et al.*, 1999) et comme possédant des propriétés anti-oxydantes (Cimanga *et al.*, 2000). Ainsi nos 204 extraits de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie ont été criblés pour ces deux propriétés afin de sélectionner les espèces les plus efficaces qui mériteraient une étude chimique approfondie.

De la même façon que précédemment, ce travail a été valorisé sous forme d'un article scientifique que nous présentons sous sa forme de publication avec une conclusion résumant l'essentiel du travail.

A.2/ Article paru : Screening of Fifty Cunoniaceae Species from NewCaledonia for Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions (Fogliani *et al.*, 2002b)

Screening of Fifty *Cunoniaceae* Species from New Caledonia for Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions

Bruno Fogliani¹, Saliou Bouraïma-Madjebi¹, René Pineau¹ and Pierre Cabalion²

¹L.B.P.V.A.: Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées, Université de la Nouvelle-Calédonie, BP 4477, 98847 Nouméa, New Caledonia and ²Laboratoire des Substances Naturelles Végétales, Centre I.R.D. de Nouméa, Nouméa, New Caledonia

Abstract

Two-hundred-and-four extracts (101 ethyl acetate extracts and 103 methanol extracts) from 50 species of *Cunoniaceae* from New Caledonia were screened for antioxidant properties due to free radical scavenging and/or xanthine oxidase (XOD) inhibitory activity. Of the crude extracts, 95.1% were active at a concentration of 50 µg/ml. Fifteen (27.8%) extracts showed more than 50% activity at 10 µg/ml and were studied for XOD inhibition. All were active against XOD at 50 µg/ml but only 6 (40%) showed up to 60% inhibition. Ethyl acetate extracts from the bark of *Weinmannia dichotoma* Brongniart & Gris, *Weinmannia monticola* Däniker and *Cunonia linearisepala* (Guillaumin) Bernardi and from the roots of *Codia incrassata* Pampanini, as well as methanol extract from the bark of *Pancheria brunhesii* Pampanini, exhibited the highest activities (between 70% and 86% XOD inhibition at 50 µg/ml). In view of these preliminary results, New Caledonian *Cunoniaceae* species appears to be promising material for the isolation of bioactive compounds.

Keywords: *Cunoniaceae*, ethyl acetate extract, free radical scavengers, methanol extract, New Caledonia, xanthine oxidase.

Introduction

In general, the biodiversity of New Caledonia is rich and unique. The flora, in particular, shows up to 80% endemism (Jaffre et al., 1995), due to the Island's long geographical isolation after physical separation from Australia about 65 million years ago.

The flowering plant family *Cunoniaceae*, in the order *Rosales* (Cronquist, 1982), comprises 26 genera including more than 250 species (Heywood, 1985). It occurs largely in the southern hemisphere and is an example of this rich endemism, since in New Caledonia, it contains 6 genera, *Acsmithia*, *Codia*, *Cunonia*, *Geissois*, *Pancheria* and *Weinmannia*, represented by more than 80 species, all of which are endemic (Guillaumin, 1948). Moreover, two of these genera, *Codia* and *Pancheria*, are endemic with 36 species all together.

Some members of the *Cunoniaceae* are reputed to have medicinal properties and are used to cure various diseases (Cambie & Ash, 1931; Rageau, 1957; Luis Diego Gomez, 1995). Because of this and the results of Bosisio et al. (2000), who showed that *Cunonia montana* Schlechter has anti-elastase and anti-xanthine oxidase activities, our laboratory decided to investigate several biological activities in this family, such as antibiotic effects, cytotoxicity and inhibition of different enzymes. Preliminary results show that some species present properties in all of these domains (Fogliani et al., 2000).

Xanthine oxidase (XOD) converts hypoxanthine to xanthine and finally to uric acid, the accumulation of which causes hyperuricacidemia associated with gout (Noro et al., 1983a; Hayashi et al., 1989). It is also responsible for oxidative damage to living tissues under conditions such as allergies, inflammation, diabetes, emphysema, heart ischemia-reperfusion, aging, atherosclerosis, etc. (Crales de Poulet et al., 1994). Thus, free radical scavengers and/or specific inhibitors of XOD are expected to be therapeutically

Accepted: April 19, 2002

Address correspondence to: Bruno Fogliani, L.B.P.V.A., Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales Appliquées, Université de la Nouvelle-Calédonie, BP 4477, 98847 Nouméa, New Caledonia; Fax: (687) 25 48 29; E-mail: bfogliani@univ-nc.nc

useful for the treatment of these pathologies (Goodman & Gilman, 1990). Plant compounds such as xanthenes, flavonoids, coumarins and proanthocyanidins have been reported to be potent inhibitors of xanthine oxidase (Sumahara et al., 1977; Noro et al., 1983b) and to possess anti-oxidant properties.

For these reasons, 50 species of *Cunoniaceae* from New Caledonia were assayed on XOD, using hypoxanthine and then xanthine as substrates. The objective was to select species with high activity and then to submit the active extracts for detailed phytochemical investigations in order to isolate the bioactive constituents.

Materials and methods

Plant material

Material was collected by Bruno Fogliani from localities in New Caledonia at different seasons but always from plants in flower or fruit. All accessible parts were sampled, including leaves, bark, flowers, fruits and roots, and herbarium voucher specimens were made. Identifications were made by comparison with named collections in the herbarium at the Institut de la Recherche pour le Développement (I.R.D.), Nouméa, and some were verified by Helen Fortune Hopkins (Lancaster University) and Jason Bradford (Missouri Botanical Garden) who are currently revising some genera of New Caledonian *Cunoniaceae*. Voucher specimens were deposited in our laboratory (L.B.P.V.A.) in the University of New Caledonia. Samples are referred to as BF 1-90.

Preparation of the crude extracts

Two samples of 10 g each of the air-dried powdered plant material were extracted separately by maceration for 24 h with ethyl acetate (100 ml) and methanol (100 ml). After filtration, the extracts were concentrated *in vacuo* at 45 °C and weighed for the determination of the w/w yield. The residue was dissolved in methanol to a concentration of 1 mg/ml for the tests.

Test solutions

Crude extracts in methanol were diluted in buffer to obtain the desired final concentrations of 50, 10 and 1 µg/ml in the reaction mixture as described by Gonzales et al. (1995).

Reagents

XOD (EC 1.1.3.22) from buttermilk (Grade III, 1.1 units/mg protein), hypoxanthine, xanthine, nitroblue tetrazolium, quercetin and all other reagents and chemicals were purchased from the Sigma Chemical Company. In the assay with hypoxanthine substrate, all products were dissolved and diluted with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, while in the case

of xanthine substrate, this was done in 0.1 M K⁺ phosphate buffer, pH 7.8.

Activity assay with hypoxanthine as substrate

At first, all the extracts were tested with hypoxanthine as substrate to find XOD inhibitory activity and/or antioxidant properties due to free radical scavenging. This phenomenon was measured spectrophotometrically following the conversion of nitroblue tetrazolium (NBT) to formazan, at 560 nm for 3 min, as reported by Bors et al. (1989).

The assay mixture consisted of 100 µl test solution, 500 µl of hypoxanthine (5 µM), and 100 µl of NBT (1 mM). After preincubation of the mixture at 25 °C for 15 min, the reaction was initiated by adding 100 µl of enzyme solution (1.67 U/ml) and stopped after 3 min of incubation by adding 100 µl of HCl (1 N). Variation of absorbance was measured against a blank prepared in the same way except that the enzyme solution was added to the assay mixture after adding HCl. Percent activity was calculated according to the following formula: $(1-B/A) \times 100$, where A is the absorbance without the test material and B the absorbance with the test material. All crude extracts with an activity up to 60% at 50 µg/ml were then tested at concentrations of 10 and 1 µg/ml. Extracts showing an activity up to 50% at 10 µg/ml were then assayed with xanthine as the substrate, in order to determine whether the activity was due to xanthine oxidase inhibition.

XOD activity assay

The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 295 nm following the conversion of xanthine to uric acid for 3 min as reported by Robak et al. (1988), with the following modifications. The assay mixture contained 0.1 M K⁺-phosphate buffer, pH 7.8, 10 µM EDTA, 0.1 mM xanthine and 0.04 units/ml XOD, with a final volume of 1 ml. This mixture was preincubated for 15 min at 25 °C with the test material before adding the substrate. The reaction was stopped by adding 100 µl of 1 N HCl and the variation of absorbance was measured against a blank prepared in the same way except that the enzyme solution was added to the assay mixture after adding HCl. XOD inhibitory activity was expressed as the percentage of inhibition calculated as $(1-B/A) \times 100$, as described above. The selected extracts were tested at 50 µg/ml and extracts with activity up to 60% were then tested at 10 and 1 µg/ml. Quercetin (3.4 µg/ml) was used as reference inhibitor.

Results and discussion

Two hundred and four extracts from 50 species of New Caledonian *Cunoniaceae* were assayed for anti-oxidant properties due to free radical scavenging and/or XOD inhibitory activity at a concentration of 50 µg/ml. The results are shown in Table 1. Of all the extracts assayed, 194 (95.1%) demonstrated an activity at 50 µg/ml. Among these, 54 (26.5%) extracts showed an activity above 60% at that concentration.

Table 1. Extraction yield (% starting material, w/w) and % of activity.

Genera/Species voucher specimen	Plant part	Extract	Yield	Activity (%) ^a		
				50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>Acsmithia</i>						
<i>Acsmithia elliptica</i> (Vieillard ex Pampanini) Hoogland (BF 58)	Leaves	AcOEt	2.3	50.1		
		MeOH	14.4	54.5		
	Bark	AcOEt	2.3	28.6		
		MeOH	17.1	64.4	26	1.4
<i>Acsmithia meridionalis</i> Hoogland (BF 70)	Leaves	AcOEt	6.6	10.2		
		MeOH	7.3	31.4		
	Bark	AcOEt	3.3	18.9		
		MeOH	5.7	41.7		
<i>Acsmithia pedunculata</i> (Schlechter) Hoogland (BF 69)	Leaves	AcOEt	1.9	19.1		
		MeOH	5.2	32.1		
	Bark	AcOEt	1.5	10.3		
		MeOH	4	40.3		
<i>Acsmithia pubescens</i> Pampanini (BF 34)	Leaves	AcOEt	2.8	30.7		
		MeOH	13	34.1		
	Bark	AcOEt	3.8	23.9		
		MeOH	16.7	54.6		
<i>Codia</i>						
<i>Codia albifrons</i> Vieillard ex Guillaumin (BF 83)	Leaves	AcOEt	2.5	12.6		
		MeOH	8.5	37.5		
	Bark	AcOEt	0.5	47.9		
		MeOH	4.7	37.8		
<i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin (BF 14)	Leaves	AcOEt	0.9	31		
		MeOH	7.2	64.9	18.1	8.4
	Bark	AcOEt	0.7	81.1	78.2	45.5
		MeOH	4.2	73.7	18.7	12.5
<i>Codia discolor</i> (Brongniart & Gris) Guillaumin (BF 55)	Leaves	AcOEt	1.9	62.4	16.8	0
		MeOH	11.6	72.1	39.5	9.7
	Bark	AcOEt	1.7	47.6		
		MeOH	16.3	77.5	35.6	8.8
<i>Codia ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 88)	Leaves	AcOEt	2.3	1.2		
		MeOH	9.2	74.6	18	3.8
	Bark	AcOEt	0.7	68.8	6.7	0
		MeOH	8.2	46.3		
<i>Codia incrassata</i> Pampanini (BF 36)	Leaves	AcOEt	1.3	9.4		
		MeOH	15.4	40.3		
	Bark	AcOEt	1.1	54.1		
		MeOH	11.6	70.5	42.6	14.2
<i>Codia montana</i> Forster (BF 37)	Leaves	AcOEt	1.2	62.1	50.2	0
		MeOH	9.3	77.8	26.9	10.4
	Bark	AcOEt	1.7	56.9		
		MeOH	9	77.9	47.2	9.5
<i>Codia nitida</i> Schlechter (BF 62)	Leaves	AcOEt	1.7	55.1		
		MeOH	4	76.1	20.2	0
	Bark	AcOEt	1.1	76.3	34.7	0
		MeOH	13.5	67.9	12.1	0
<i>Codia sp nov.</i> (BF 84)	Leaves	AcOEt	1.8	49		
		MeOH	16	72.8	52.2	28.5
	Bark	AcOEt	1.1	59.7		
		MeOH	10.2	73.6	50.4	28.5
<i>Codia sp nov.</i> (BF 84)	Leaves	AcOEt	1.1	13.5		
		MeOH	12.9	41.3		
	Bark	AcOEt	1.5	12.5		
		MeOH	5.8	80.9	23.9	0

Table 1. Continued

Genera/Species voucher specimen	Plant part	Extract	Yield	Activity (%) ^a		
				50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>Cunonia</i>						
<i>Cunonia alticola</i> Guillaumin (BF 59)	Leaves	AcOEt	2.1	51.5		
		MeOH	28.4	52.3		
	Bark	AcOEt	0.9	50.8		
		MeOH	9.5	53.1		
	Leaves	AcOEt	2.9	21.6		
		MeOH	2.4	48.5		
<i>Cunonia aoupiniensis</i> Hoogland (Lit 048*)	Leaves	AcOEt	3.9	53.6		
		MeOH	12.5	44.6		
	Bark	AcOEt	2.2	18.1		
		MeOH	13	52.9		
<i>Cunonia austrocaledonica</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin (BF 79)	Leaves	AcOEt	2.3	41.8		
		MeOH	9	26.4		
	Bark	AcOEt	0.9	72.6	50.3	44.7
		MeOH	0.6	48.7		
<i>Cunonia bullata</i> Brongniart & Gris (BF 67)	Leaves	AcOEt	4	14.2		
		MeOH	4.3	22.1		
	Bark	AcOEt	1.7	12.9		
		MeOH	3.2	26.8		
<i>Cunonia balansae</i> Brongniart & Gris (BF 54)	Leaves	AcOEt	1.7	37.6		
		MeOH	9.7	61.1	0	0
	Bark	AcOEt	1.3	33		
		MeOH	9.8	75.1	23.5	2.8
	Fruit	AcOEt	1.4	43.8		
		MeOH	5.3	85.2	28.4	3.1
<i>Cunonia deplanchei</i> Brongniart & Gris (BF 17)	Leaves	AcOEt	3.9	37.8		
		MeOH	5.6	11.4		
	Bark	AcOEt	0.7	9.3		
		MeOH	2.8	77.4	20.9	0
<i>Cunonia lenormandii</i> Vieillard ex Brongniart & Gris (BF 66)	Leaves	AcOEt	1.4	8.7		
		MeOH	7.6	0.1		
	Bark	AcOEt	4.1	10.8		
		MeOH	2.2	28		
<i>Cunonia linearisepala</i> (Guillaumin) Bernardi (BF 81)	Leaves	AcOEt	2.6	20.1		
		MeOH	8.8	51.5		
	Bark	AcOEt	1.9	88.7	50.9	9.8
		MeOH	3.2	53.6		
<i>Cunonia macrophylla</i> Brongniart & Gris (BF 53)	Leaves	AcOEt	2.4	37.6		
		MeOH	18	76.9	27.8	10.3
	Bark	AcOEt	0.7	30.4		
		MeOH	13	76.1	20.6	0
	Flowers	AcOEt	2.3	61.8	9.2	2.2
		MeOH	17.5	88.7	27.1	25.6
<i>Cunonia montana</i> Schlechter (BF 57)	Leaves	AcOEt	0.7	48.3		
		MeOH	10.2	52.8		
	Bark	AcOEt	1.1	54.5		
		MeOH	16.4	57.1		
<i>Cunonia pulchella</i> Brongniart & Gris (BF 35)	Leaves	AcOEt	1.1	47.4		
		MeOH	8	16.8		
	Bark	AcOEt	0.6	52.3		
		MeOH	11	56.7		
<i>Cunonia pterophylla</i> Schlechter (BF 13)	Leaves	AcOEt	0.8	25.9		
		MeOH	3.9	49.1		
	Bark	AcOEt	0.6	21.1		
		MeOH	4.7	70.8	13	12.5

Table 1. Extraction yield (% starting material, w/w) and % of activity.

Genera/Species voucher specimen	Plant part	Extract	Yield	Activity (%) ^a		
				50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>Cunonia purpurea</i> Brongniart & Gris (BF 48)	Leaves	AcOEt	1.3	7.9		
		MeOH	10	13.9		
	Bark	AcOEt	1.4	78.3	54.6	35.9
		MeOH	10	51		
<i>Cunonia rotundifolia</i> Däniker (BF 68)	Leaves	AcOEt	0.8	0		
		MeOH	7.1	78.9	50.2	9.7
<i>Cunonia varijuga</i> Hoogland (BF 28)	Leaves	AcOEt	0.7	52.2		
		MeOH	7.5	46.9		
	Bark	AcOEt	0.3	22.9		
		MeOH	9.4	50.4		
<i>Cunonia vieillardii</i> Brongniart & Gris (BF 89)	Leaves	AcOEt	4.3	0		
		MeOH	10.6	87.6	27.9	5.5
	Bark	AcOEt	0.5	29.2		
		MeOH	3	51.6		
<i>Geissois</i>						
<i>Geissois hippocastaneifolia</i> Guillaumin (BF 23)	Leaves	AcOEt	1.5	18.6		
		MeOH	18	31.3		
	Bark	AcOEt	0.4	20.7		
		MeOH	14.5	51.6		
<i>Geissois hirsuta</i> Brongniart & Gris (BF 29)	Leaves	AcOEt	1.4	0		
		MeOH	3	39.3		
	Bark	AcOEt	3.1	75.6	28.9	1.6
		MeOH	3.4	56.6		
<i>Geissois polyphylla</i> Lecard ex Guillaumin (BF 38)	Leaves	AcOEt	1.4	1.1		
		MeOH	8.5	24.1		
	Bark	AcOEt	0.4	55.3		
		MeOH	10.2	54		
<i>Geissois pruinosa</i> Brongniart & Gris (BF 15)	Leaves	AcOEt	2.5	30.6		
		MeOH	4.8	36		
	Bark	AcOEt	0.4	34		
		MeOH	5.9	49		
<i>Geissois magnifica</i> Baker (BF 24)	Leaves	AcOEt	1.1	30.1		
		MeOH	8.5	45.5		
	Bark	AcOEt	0.7	26.3		
		MeOH	12	63.7	20	6.3
<i>Weinmannia</i>						
<i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart & Gris (BF 40)	Leaves	AcOEt	4.4	36.8		
		MeOH	12.7	59.9		
	Bark	AcOEt	5.9	95.9	54.1	32.8
		MeOH	14.4	53.8		
<i>Weinmannia monticola</i> Däniker (BF 39)	Leaves	AcOEt	5.2	43.2		
		MeOH	13.7	54		
	Bark	AcOEt	6.6	91.9	67.9	16.9
		MeOH	13.6	58.7		
<i>Pancheria</i>						
<i>Pancheria alaternoides</i> Brongniart & Gris (BF 12)	Leaves	AcOEt	1.7	10.1		
		MeOH	12.9	60.6	9.6	0
	Bark	AcOEt	0.8	8.1		
		MeOH	11.3	71.2	15.2	0
<i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini (BF 16)	Leaves	MeOH	4.4	50.7		
		MeOH	3.8	87.2	50.8	10.5
<i>Pancheria communis</i> Baker (BF 82)	Leaves	AcOEt	2.7	14.7		
		MeOH	8.1	41.9		
	Bark	AcOEt	0.6	24.2		
		MeOH	6.5	33.9		

Table 1. Continued

Genera/Species voucher specimen	Plant part	Extract	Yield	Activity (%) ^a		
				50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>Pancheria confusa</i> Guillaumin (BF 21)	Leaves	AcOEt	1.3	10.5		
		MeOH	13.6	39.7		
<i>Pancheria elegans</i> Brongniart & Gris (BF 78)	Leaves	AcOEt	1.3	12.4		
		MeOH	12.1	68.7	31	9
	Bark	AcOEt	3.9	4.8		
		MeOH	10.3	27.4		
<i>Pancheria elliptica</i> Pampanini (BF 20)	Leaves	AcOEt	1.1	0		
		MeOH	3.8	29.6		
	Bark	AcOEt	3.9	37.8		
		MeOH	11.9	65	27.2	0.6
<i>Pancheria engleriana</i> Schlechter (BF 56)	Leaves	AcOEt	1.3	29.5		
		MeOH	10.2	92.1	33.9	5.5
	Bark	AcOEt	1.8	43.2		
		MeOH	9.7	47.4		
<i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 61)	Leaves	AcOEt	0.7	63.1	31.7	2.3
		MeOH	13.2	68.1	13.7	0
	Bark	AcOEt	2.9	36.6		
		MeOH	15.3	75.7	50.7	15.7
<i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard ex Pampanini (BF 22)	Leaves	AcOEt	1.6	68.5	34.7	0
		MeOH	11.3	79	56.4	39.9
	Bark	AcOEt	3.3	16.1		
		MeOH	12.6	43.4		
<i>Pancheria obovata</i> Brongniart & Gris (BF 51)	Leaves	AcOEt	0.5	55.6		
		MeOH	2.2	21.9		
	Bark	AcOEt	4	14.4		
		MeOH	10	43.1		
<i>Pancheria phylliraeoides</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin (BF 85)	Leaves	AcOEt	0.9	80.2	50.1	26.6
		MeOH	10	33.6		
	Bark	AcOEt	6.3	0		
		MeOH	11.2	52.3		
<i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin (BF 60)	Leaves	AcOEt	0.5	62.4	10.7	0
		MeOH	12.7	49.4		
	Bark	AcOEt	4.3	20.7		
		MeOH	19.7	49.9		
<i>Pancheria sebertii</i> Guillaumin (BF 86)	Leaves	AcOEt	0.6	89.2	22.8	15.2
		MeOH	13.4	71.4	50.49	0
	Bark	AcOEt	5.8	0		
		MeOH	9.2	59.5		
<i>Pancheria vieillardii</i> Brongniart & Gris (BF 87)	Leaves	AcOEt	1.5	72.9	18.8	5.1
		MeOH	5.5	51.3		
	Bark	AcOEt	5.2	1.1		
		MeOH	7.9	55.9		
	Bark	AcOEt	1.5	69	11.1	4.7
		MeOH	8	38		

^aMean 9 determinations. In control samples, Δ_{abs} was $0.303 \pm 0.05/\text{min}$ for activity with hypoxanthine as substrate (mean \pm s.e.; n = 20).
* plant powder from Mr Marc Litaudon, C.N.R.S center of Noumea.

All of these were then tested at 10 and 1 µg/ml. At 10 µg/ml, 53 (98.1%) of the extracts were active; 15 (27.8%) showed activity over 50%. At 1 µg/ml, 36 (66.6%) were still active.

It is clear from Table 1 that the genera *Acsmithia* and *Geissois* are the least interesting for further studies. In con-

trast, the endemic genera *Codia* and *Pancheria* appear to be good potential sources of bioactive compounds, as an activity of over 60% at 50 µg/ml was showed by, respectively, 87.5 and 75% of the species tested. These values represent 18 (47.4%) of the extracts from *Codia* species and 15 (32.6%)

Table 2. Extraction yield (% starting material, w/w) and XOD inhibition.^a

Genera/Species voucher specimen	Plant Part	Extract	Yield	Inhibition (%) ^b			
				50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	IC ₅₀
Codia							
<i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin (BF 14)	Bark	AcOEt	0.7	44.1			
<i>Codia incrassata</i> Pampanini (BF 36)	Roots	AcOEt	1.2	69.9	17.1	0.8	41.8
<i>Codia nitida</i> Schlechter (BF 62)	Leaves	MeOH	16	50.6			
	Bark	MeOH	10.2	49.4			
Cunonia							
<i>Cunonia austrocaledonica</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin (BF 79)	Bark	AcOEt	0.9	34.6			
<i>Cunonia linearisepala</i> (Guillaumin) Bernardi (BF 81)	Bark	AcOEt	1.9	81.7	10.2	1.8	33.1
<i>Cunonia purpurea</i> Brongniart & Gris (BF 48)	Bark	AcOEt	1.4	38.2			
<i>Cunonia rotundifolia</i> Däniker (BF 68)	Leaves	MeOH	7.1	62.1	0	0	nd
Weinmannia							
<i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart & Gris (BF 40)	Bark	AcOEt	5.9	82.2	18.9	2.8	22.4
<i>Weinmannia monticola</i> Däniker (BF 39)	Bark	AcOEt	6.6	86.1	19.2	3.4	30.2
Pancheria							
<i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini (BF 16)	Bark	MeOH	3.8	72.1	10.6	1.5	28.7
<i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 61)	Leaves	MeOH	15.3	30.3			
	Bark	MeOH	11.3	31.7			
<i>Pancheria obovata</i> Brongniart & Gris (BF 51)	Bark	AcOEt	0.9	31.5			
<i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin (BF 60)	Bark	MeOH	13.4	54.1			

^a Under the described experimental conditions, quercetin 10 µM (3.4 µg/ml) gave an inhibition of 58.8 ± 2.2% (mean ± s.e.; n = 12 assays).

^b Mean of nine determinations. In control samples, Δabs was 0.251 ± 0.05/min for XOD activity (mean ± s.e.; n = 20 assays).

of those from *Pancheria* species. The genus with the highest activities, *Weinmannia*, was represented here by two species among the five existing in New Caledonia, although Hopkins (1998) considered there are only four species and placed *Weinmannia monticola* Däniker into synonymy with *Weinmannia dichotoma* Brongniart & Gris. Both species of *Weinmannia* tested here gave similar results, which may perhaps support this conclusion.

At this stage of our investigations, we arbitrarily decided that we should only conserve the 15 extracts with activity up to 50% at 10 µg/ml for further studies. All of them were tested for XOD inhibitory activity at 50 µg/ml; results are shown in Table 2. All demonstrated XOD inhibitory activity, but only 6 (40%) showed enzyme inhibition of over 60% at this concentration. The nine less active extracts probably possessed both free radical scavengers and inhibitors of xanthine oxidase.

The six with the highest XOD inhibitory activities were then tested at 10 and 1 µg/ml. Five of them were active at these concentrations; their IC₅₀ values were calculated and are given in Table 2. It is interesting to note that except for the extract obtained from the roots of *Codia incrassata* Pampanini, all are extracts of bark, and three are ethyl acetate extracts.

It thus appears that five species, *Codia incrassata* Pampanini, *Cunonia linearisepala* (Guillaumin) Bernardi, *Weinmannia dichotoma* Brongniart & Gris, *Weinmannia monticola* Däniker and *Pancheria brunhesii* Pampanini, are encouraging starting materials for the further isolation of compounds with anti-XOD activities. In our experimental conditions, XOD inhibition by 10 µM (3.4 µg/ml) quercetin was 58.8 ± 2.2% (mean ± s.e.; n = 12 assays), while the IC₅₀ for quercetin has been reported as 10 µM (Robak et al., 1988). In comparison, our extracts from the five species cited above,

showed XOD inhibitory activities between 70 and 86% at a concentration of 50 µg/ml.

In conclusion, based on these results, Cunoniaceae from New Caledonia seem to be a very promising source for the isolation of active molecules, through a bioassay guided fractionation, that could be used from a therapeutic perspective against gout and in the treatment of free radical tissues injuries.

Acknowledgements

We are grateful to the Province Sud de Nouvelle-Calédonie for financial support of this project and for the grant provided to Mr. Bruno Fogliani. We thank Mr. Jean-Marie Veillon and Mr. Tanguy Jaffre for their help on the primary identification of plants. Special thanks are due to Ms. Valérie Médevielle for her technical assistance and Ms. Danielle Saintpierre for her help with the translation of this manuscript.

References

- Bors W, Heller W (1989): In: Packer L, Glazer AN (Eds), Oxygen radicals in biological systems, Part B: Oxygen radicals and antioxidants. *Meth Enzymol* 186: 855 pp.
- Bosisio E, Mascetti D, Cabalion P (2000): Screening of plants from New Caledonia and Vanuatu for inhibitory activity of xanthine oxidase and elastase. *Pharm Biol* 38: 18–24.
- Cambie RC, Ash J (1931): Flowering plants. Dicotyledons. *Weinmannia. Fijian Medicinal Plants*. CSIRO, Australia: 135.
- Crastes de Poulet A, Torreilles J, Cristol JP (1994): Membrane lipids as a preferential target for oxidative processes. In: Paoletti R, Samuelson B, Catapano AL, Poli A, Rinetti M (Eds), *Oxidative Processes and Antioxidants*. Raven Press, New York, N.Y. USA.
- Cronquist A (1982): Family Cunoniaceae. An integrated system of classification of flowering plants. *New York Botanical Garden*: 545–548.
- Fogliani B, Bouraïma-Madjebi S, Cabalion P (2000): *Cunoniaceae* bioactives de Nouvelle-Calédonie. Paper presented at the Colloque "Extraction par Solvant pour la Valorisation des Matières Premières Végétales," Toulouse, France, 27–28 Avril: 9–16.
- Gonzales AG, Bazzocchi IL, Moujir L, Ravelo AG, Correa MD, Gupta MP (1995): Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. *J Ethnopharmacol* 46: 25–29.
- Goodman and Gilman (1990): In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (Eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Edn. Pergamon, New York: 674–681.
- Guillaumin A (1948): *Cunoniaceae*. Flore analytique et synoptique de Nouvelle-Calédonie. Phanérogames. *Flore de la France Doutremer*: 137–143.
- Hayashi T, Nagayama K, Arisawa M, Shimizu M, Suzuki S, Yoshizaki M, Morita N, Ferro E, Basualdo I, Berganza LH (1989): Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, Molle I (*Schinus terebinthifolius*). *J Nat Prod* 52: 210–211.
- Heywood VH (1985): Rosidae. *Flowering Plants of the World*: 137–221.
- Hoopkins HCF (1998): A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and in the Pacific. 3. New Guinea, Solomon Islands, Vanuatu and Fiji, with notes on the species of Samoa, Rarotonga, New Caledonia and New Zealand. *Adansonia, Sér 3, 20 (1)*: 67–106.
- Jaffre T, Veillon JM (1995): Structural and floristic characteristics of a rain forest on schist in New Caledonia: a comparison with an ultramafic rain forest. *Bull Mus natn Hist nat. Sér 4, Section B. Adansonia. Botanique, Phytochimie, Paris 17 (3–4)*: 201–226.
- Luis Diego Gomez P (1995): *Weinmannia* spp. (Cunoniaceae): Fitoquímica básica. *Rev Biol Trop* 43 (1–3): 311–312.
- Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S (1983a): Studies of enzyme inhibitors. *Chem Pharm Bull* 31: 2708–2711.
- Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S (1983b): Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull* 31: 3984–3987.
- Rageau J (1957): Plantes médicinales de Nouvelle-Calédonie. *Travaux et documents de l'ORSTOM* 23: 139 pp.
- Robak J, Gryglewsky RJ (1988): Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem J* 37: 837–841.
- Sumahara N, Nogi K, Yokoagawa K (1977): Production of xanthine oxidase inhibitor, 2,8-dihydroxyadenine, by *Alcaligenes aquamarinus*. *Agr Biol Chem* 41: 1103–1109.

A.3/ Conclusion

Ce test démontre une fois encore que la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie est en possession d'un matériel potentiellement bioactif riche. Il apparaît possible d'isoler des inhibiteurs de la xanthine oxydase ainsi que des piègeurs de radicaux libres susceptibles d'être utilisés dans des traitements pharmaceutiques contre la goutte ou contre les effets néfastes des radicaux libres sur les tissus. Cinq espèces en particulier se sont distinguées au cours de ce test et peuvent être retenues : *Codia incrassata* Pampanini, *Cunonia linearisepala* (Guillaumin) Bernardi, *Weinmannia dichotoma* Brongniart & Gris, *Weinmannia monticola* Däniker et *Pancheria brunhesii* Pampanini.

B/ Activités inhibitrices à l'encontre de l'élastase

B.1/ Introduction

L'élastase, tout comme la xanthine oxydase est impliquée dans des pathologies graves. Outre le fait qu'elle dégrade l'élastine (Galdston *et al.*, 1979 ; Janoff, 1985) dont on connaît l'importance dans l'élasticité de l'épiderme, conduisant ainsi à l'apparition des rides, cette enzyme de type protéase est également impliquée dans la destruction des tissus lors d'inflammations chroniques. Il est à noter en particulier que l'élastase contenue dans les leucocytes humains intervient dans l'emphysème pulmonaire (Groutas *et al.*, 1980), dans l'arthrite rhumatoïdale (Snider, 1981) ainsi que dans le phénomène de vieillissement (Hall, 1964). La découverte de molécules inhibitrices de cette enzyme permettrait en plus de leur utilisation pharmaceutique pour lutter contre ces effets néfastes pour la santé, la création de produits cosmétiques susceptibles de lutter contre les effets du vieillissement. Les plantes ont là aussi prouvé qu'elles pouvaient être une source importante de molécules inhibitrices de l'élastase (Maffei Facino *et al.*, 1995 ; Bosisio *et al.*, 2000 ; Melzig *et al.*, 2001).

B.2/ Matériel et méthodes

- *Réactifs*

L'élastase (EC 3.4.21.36) provenant de pancréas de porc (Type I, 6.3 U/mg protéine), la N-Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-para-nitroanilide et tous les autres réactifs proviennent de chez Sigma Chemical Company.

Dans ce test, tous les produits ont été solubilisés et dilués avec une solution tampon Tris-HCl, 100 mM, pH 8.8.

- *Préparation des extraits*

Les extraits bruts en solution dans du méthanol sont dilués dans la solution tampon afin d'obtenir les concentrations finales désirées de 50, 10 et 1 µg/mL dans le mélange de réaction.

- *Test d'activités inhibitrices de l'élastase*

L'activité enzymatique de l'élastase est mesurée au spectrophotomètre à 410 nm en suivant l'apparition de la para-nitroanilide, provenant de la dégradation de la N-Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-para-nitroanilide par cette enzyme, pendant 1 min 45 s comme indiqué par Herbert *et al.* (1992), avec les quelques modifications suivantes:

Le mélange réactionnel contient du Tris-HCl 100 mM, pH 8.8, 0.35 U/mL d'élastase, avec ou sans extrait, incubé 20 min à 25°C, avant ajout du N-Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-p-nitroanilide, 0.3 mM, pour un volume final de 1 mL. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL d'HCl 1N et la variation d'absorbance est mesurée contre un blanc préparé de la même manière à l'exception du fait que l'addition de la solution enzymatique est réalisée après celui de l'HCl.

L'activité inhibitrice sur l'élastase est exprimée comme un pourcentage d'inhibition calculé selon la formule $(1-B/A) \times 100$, où A représente la variation d'absorption entre le temps $t=0$ et $t=1$ min 45 s pour le témoin sans extrait et B celle relevée avec l'extrait. Les extraits sélectionnés sont testés à 50 µg/mL et ceux présentant une activité supérieure à 60% le sont de nouveau aux concentrations de 10 et 1 µg/mL. Le 3-4 DCI (5 µM) est utilisé comme inhibiteur de référence.

B.3/ Résultats et discussion

70 des 104 extraits méthanoliques de Cunoniaceae ont été testés pour leur éventuelle activité inhibitrice à l'encontre de l'élastase à une concentration de 50 µg/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XV.

Tous les extraits testés présentent une activité à la concentration de 50 µg/mL. 38 d'entre eux, soit 54%, montrent une activité supérieure ou égale à 60% à cette même concentration. Ils ont alors été testés aux concentrations de 10 et 1 µg/mL. A 10 µg/mL, tous sont actifs, cependant aucun ne possède un taux d'activité supérieur à 50%. On note malgré tout que 20 d'entre eux, soit 53%, sont actifs avec un taux d'environ 20% ou plus, en particulier l'extrait d'écorce de *Pancheria obovata* avec 40% d'inhibition. A la concentration de 1 µg/mL, très peu excèdent un niveau d'activité supérieur à 10% (3 sur les 20 testés).

Ces résultats bien que moins exploitables que ceux obtenus pour la xanthine oxydase, suggèrent malgré tout que certaines espèces de la famille des Cunoniaceae pourraient être étudiées pour leur capacité à produire des molécules inhibitrices de l'élastase. Ainsi, le genre *Cunonia*, dont 9 des espèces sur 11 testées inhibent à plus de 60% cette enzyme, à la concentration de 50 µg/mL, mérite d'être exploré plus en profondeur. Les extraits de feuilles et de fruit de *C. balansae* et ceux d'écorce de *C. alticola*, en particulier, présentent les pourcentages d'activités les plus forts à cette même concentration. Le genre *Pancheria* n'est pas en reste puisqu'il possède l'espèce *P. obovata*, dont l'extrait d'écorce donne le résultat le plus intéressant, avec un taux d'activité de 40% à une concentration de 10 µg/mL, soit une IC₅₀ de 30.4 µg/mL. Le genre *Geissois* avec 2 des 4 espèces étudiées dont les extraits d'écorce inhibent à près de 80% l'élastase, paraît tout aussi attrayant. Quant aux genres, *Weinmannia* et *Codia*, des résultats sont à noter mais à un moindre niveau. Enfin, seul le genre *Acsmithia* représenté ici par 2 espèces sur les 10 existantes semble d'un très faible intérêt pour des recherches plus approfondies.

Tableau XV: Pourcentage d'inhibition de l'élastase obtenu pour les différents extraits des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie.

Genre / Espèce N° Herbar	Partie de Plante	Type d'extrait	Activité (%) ^a		
			50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
<i>Acsmithia</i>					
<i>Acsmithia elliptica</i> (Vieillard ex Pampanini) Hoogland (BF 58)	Feuilles	MeOH	45.2		
	Ecorce	MeOH	43.3		
<i>Acsmithia pubescens</i> Pampanini (BF 34)	Feuilles	MeOH	30.3		
	Ecorce	MeOH	20.9		
<i>Codia</i>					
<i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin (BF 14)	Feuilles	MeOH	69.1	11.1	Nd
	Ecorce	MeOH	58.9	12.9	Nd
<i>Codia discolor</i> (Brongniart & Gris) Guillaumin (BF 55)	Feuilles	MeOH	68.9	12.4	Nd
	Ecorce	MeOH	58.5	5.6	Nd
	Fleurs	MeOH	48.7	6.1	Nd
<i>Codia incrassata</i> Pampanini (BF 36)	Feuilles	MeOH	50.6	7.6	Nd
	Ecorce	MeOH	57.8	15.1	Nd
	Racines	MeOH	73.6	23.5	0.3
<i>Codia montana</i> Forster (BF 37)	Feuilles	MeOH	58.9	8.7	Nd
	Ecorce	MeOH	47.7	1.9	Nd
	Racines	MeOH	62.7	11.1	Nd
<i>Cunonia</i>					
<i>Cunonia alticola</i> Guillaumin (BF 59)	Feuilles	MeOH	53.9	1.7	Nd
	Ecorce	MeOH	80.8	21.3	1.3
<i>Cunonia aoupiniensis</i> Hoogland (Lit 048*)	Feuilles	MeOH	58.5	19.7	1.2
	<i>Cunonia atrorubens</i> Schlechter (BF 52)	Feuilles	MeOH	24.9	
Ecorce		MeOH	59.4	24.1	1.8
<i>Cunonia balansae</i> Brongniart & Gris (BF 54)	Feuilles	MeOH	83.9	20.5	12.4
	Ecorce	MeOH	77.2	12.8	0.9
	Fruit	MeOH	82.8	25.3	2.9

- ^a Résultats pour 9 essais. Dans l'échantillon contrôle, Δ_{abs} était de 0.290 ± 0.05 / min pour l'activité de l'élastase (moyenne déterminée avec 20 essais).
- Nd : résultat non déterminé.

Tableau XV(suite)

Genre / Espèce N° Herbier	Partie de Plante	Type d'extrait	Activité (%) ^a		
			50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
<i>Cunonia</i>					
<i>Cunonia deplanchei</i> Brongniart & Gris (BF 17)	Feuilles	MeOH	23.8		
	Ecorce	MeOH	70.9	19.2	3.7
<i>Cunonia macrophylla</i> Brongniart & Gris (BF 53)	Feuilles	MeOH	45.9		
	Ecorce	MeOH	62.9	19.3	1.9
	Fleurs	MeOH	19.7		
<i>Cunonia montana</i> Schlechter (BF 57)	Feuilles	MeOH	34.6		
	Ecorce	MeOH	78.3	25	10.3
<i>Cunonia pulchella</i> Brongniart & Gris (BF 35)	Feuilles	MeOH	53.5	7.4	Nd
	Ecorce	MeOH	77.1	12.7	1.2
<i>Cunonia pterophylla</i> Schlechter (BF 13)	Feuilles	MeOH	77.1	12.7	1.2
	Ecorce	MeOH	51.5	15.1	1.8
<i>Cunonia purpurea</i> Brongniart & Gris (BF 48)	Feuilles	MeOH	10.6		
	Ecorce	MeOH	71.6	10.2	0
<i>Cunonia varijuga</i> Hoogland (BF 28)	Feuilles	MeOH	13.5		
	Ecorce	MeOH	78.7	23.1	3.7
<i>Geissois</i>					
<i>Geissois hippocastaneifolia</i> Guillaumin (BF 23)	Feuilles	MeOH	44.8		
	Ecorce	MeOH	65.6	8.8	0.3
<i>Geissois hirsuta</i> Brongniart & Gris (BF 29)	Feuilles	MeOH	49.1	3.9	Nd
	Ecorce	MeOH	82.4	20.5	4.4
<i>Geissois polyphylla</i> Lecard ex Guillaumin (BF 38)	Feuilles	MeOH	72.1	11.2	7.1
	Ecorce	MeOH	74.5	27.1	5.5
<i>Geissois magnifica</i> Baker (BF 24)	Feuilles	MeOH	62.8	9.3	Nd
	Ecorce	MeOH	75.5	15.3	2.8
<i>Weinmannia</i>					
<i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart & Gris (BF 40)	Feuilles	MeOH	54.3	2.3	Nd
	Ecorce	MeOH	72	21.2	3.2
<i>Weinmannia monticola</i> Däniker (BF 39)	Feuilles	MeOH	53.6	14.7	Nd
	Ecorce	MeOH	68.1	23.8	3.5

Tableau XV(suite)

Genre / Espèce N° Herbarier	Partie de Plante	Type d'extrait	Activité (%) ^a		
			50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
<i>Pancheria</i>					
<i>Pancheria alaternoides</i> Brongniart & Gris (BF 12)	Feuilles	MeOH	52.7	13.6	Nd
	Ecorce	MeOH	66.9	15.2	Nd
<i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini (BF 16)	Feuilles	MeOH	49.3	7.5	Nd
	Ecorce	MeOH	80.1	21.2	1.1
<i>Pancheria confusa</i> Guillaumin (BF 21)	Feuilles	MeOH	16.1		
	Ecorce	MeOH	68.5	23.8	12.3
<i>Pancheria elliptica</i> Pampanini (BF 20)	Feuilles	MeOH	31.1		
	Ecorce	MeOH	85.7	19.5	2.9
<i>Pancheria engleriana</i> Schlechter (BF 56)	Feuilles	MeOH	15.6		
	Ecorce	MeOH	56.2		
<i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 61)	Feuilles	MeOH	31.8		
	Ecorce	MeOH	71	23.3	0
<i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard ex Pampanini (BF 22)	Feuilles	MeOH	64.9	5.3	Nd
	Ecorce	MeOH	52.2	2.5	Nd
<i>Pancheria obovata</i> Brongniart & Gris (BF 51)	Feuilles	MeOH	42.3		
	Ecorce	MeOH	71.9	40	2.8
<i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin (BF 60)	Feuilles	MeOH	21.9		
	Ecorce	MeOH	63.5	11	Nd
<i>Pancheria sebertii</i> Guillaumin (BF 86)	Feuilles	MeOH	43.1		
	Ecorce	MeOH	80.1	19.1	5.3

- ^a Résultats pour 9 essais. Dans l'échantillon contrôle, Δ_{abs} était de 0.290 ± 0.05 / min pour l'activité de l'élastase (moyenne déterminée avec 20 essais).
- Nd : résultat non déterminé.

B.4/ Conclusion

Les résultats de ce test, même s'ils semblent moins exploitables que dans le cas de la xanthine oxydase, sont tout aussi intéressants. Ils apportent des informations importantes sur la capacité des espèces de la famille des Cunoniaceae à produire des substances inhibitrices de l'élastase. Nos résultats confirment ceux de Bosisio *et al.* (2000) obtenus avec l'espèce *Cunonia montana*. De nouvelles espèces toutes aussi intéressantes ont été décelées. Elles sont au nombre de 7 dont les 4 plus importantes sont : *Cunonia alticola*, *C. balansae*, *Geissois hirsuta* et *Pancheria obovata*.

C/ Conclusion globale sur les tests enzymatiques

L'ensemble des résultats obtenus tant sur la xanthine oxydase que sur l'élastase confirment l'hypothèse que nous avons émise au début de ce travail, nous appuyant sur les résultats de Bosisio *et al.* (1995), selon laquelle la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie serait une source prometteuse de molécules inhibitrices de ces deux enzymes.

L'examen des résultats de ces deux expériences est révélateur de l'importance de certaines espèces. En effet, 4 d'entre elles, *Codia incrassata*, *Weinmannia dichotoma*, *W. monticola* et *Pancheria brunhesii*, présentent des activités inhibitrices toutes aussi importantes à l'encontre de la xanthine oxydase que de l'élastase. S'il s'avérait que la même molécule soit responsable de ces deux activités, on comprend aisément l'intérêt de son utilisation dans le traitement de pathologies graves où les deux phénomènes se combineraient. Plus encore, dans le domaine de la cosmétologie, une telle substance serait d'une grande utilité dans la lutte contre les effets du vieillissement.

Une investigation plus approfondie consistant en la purification de la ou les molécules actives responsables de ces inhibitions serait l'aboutissement logique de cette étude si elle était poursuivie. En parallèle, la réalisation des tests enzymologiques sur les extraits non encore étudiés ou sur les espèces de la famille non encore collectées, nous permettrait sans aucun doute de confirmer les potentialités de cette famille.

IV/ Tests d'activités toxiques et cytotoxiques

Ces deux types de tests, complémentaires et indépendants, ont été réalisés dans le but de trouver au sein des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-calédonie des bio-molécules susceptibles d'être utilisées dans le traitement des cancers sans pour autant être toxiques pour l'organisme. De surcroît, l'obtention de molécules actives contre un organisme à sang froid (*Artemia salina*) permettrait d'envisager leur utilisation dans la lutte contre l'espèce *Boophilus microplus* (Tique du bétail), fléau de l'agriculture néo-calédonienne. Il est à noter que seuls les extraits de type méthanolique ont été étudiés au cours de ces deux tests pour des raisons purement logistiques.

A/ Test d'activité cytotoxique

A.1/ Introduction

Ce test réalisé au sein de l'I.R.D., consistait à mettre nos extraits au contact d'une souche de cellules cancéreuses (Kb) afin d'en déterminer les potentialités cytotoxiques. Les cellules Kb proviennent d'un carcinome d'épiderme buccal humain.

A.2/ Matériel et Méthodes

A.2.1/ Mise en culture à partir du stock congelé

Les cellules cancéreuses Kb sont conservées dans l'azote liquide sous forme de suspension à $2.5 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^6$ cellules/mL dans un milieu de croissance (sérum de veau fœtal 5% + 2 mL de gentamycine à 80 µg/mL), additionné de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde, 10% final). La décongélation se fait au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. Ces cellules sont remises en culture sur du milieu neuf à 37°C pendant 24 heures pour permettre leur adhésion sur la boîte. Le lendemain, le milieu est éliminé afin de se débarrasser des cellules mortes et du milieu neuf est ajouté, les cellules sont remises à incuber à 37°C.

A.2.2/ Comptage des cellules vivantes et entretien de la lignée

Les cultures cellulaires sont entretenues par des repiquages réalisés comme suit tous les 3 jours :

- le milieu de culture est éliminé
- les cellules vivantes ayant adhérentes aux parois de la boîte de culture Corning, sont rincées avec 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) puis avec 4 mL d'une solution de Versène (0.1g EDTA dans 500 mL de PBS) pendant une minute
- pour décoller les cellules de la boîte de culture, on les incube dans 2 mL d'une solution trypsine/EDTA (10 mL de trypsine liquide stérile + 90 mL de la solution de Versène) pendant une minute à 37°C
- après élimination de la solution, la boîte est remplacée à l'étuve à 37°C pendant 10 à 15 minutes
- le tapis cellulaire décollé est repris dans 10 mL de milieu de culture
- les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez (0.5 mL de suspension + 0.5 mL de bleu de trypan (0.04%))
- le résultat de ce comptage est utilisé pour remettre en culture dans 20 mL de milieu complet, le volume de suspension cellulaire nécessaire à l'ensemencement de 50 000 cellules par millilitre. On remplace le tout à l'étuve à 37 °C.

A.2.3/ Test de cytotoxicité

Les cellules sont préparées comme précédemment pour être comptées afin de préparer 200 millilitres d'une suspension cellulaire à 100 000 cellules par millilitre en les diluant avec du milieu de culture. Cette suspension est ensuite distribuée dans les 96 puits d'une microplaque à raison de 200 µL par puits, puis mise à incuber pendant 1 heure à l'étuve à 37°C.

Les extraits sont alors pesés et dilués dans un mélange eau/éthanol (3/1) de façon à obtenir une concentration de 1 mg/mL. Une dilution au 1/10^{ème} est ensuite réalisée dans de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 100 µg/mL.

Après incubation, on dépose 20 µL d'extrait dans un puits soit une concentration finale de 10 µg/mL et ceci dans une colonne de 8 puits pour un extrait. On réserve une colonne de la microplaque pour le blanc (milieu de culture seul) et une pour le témoin (milieu de culture contenant des cellules mais sans extrait). On doit également réaliser un témoin positif, en l'occurrence la doxorubicine dont l'activité cytotoxique est connue.

Le tout est mis à incuber à 37°C pendant 3 jours en ayant pris soin de fermer hermétiquement à l'aide d'un papier adhésif la microplaque pour éviter l'évaporation du milieu.

Au troisième jour, on rajoute 25 µL de rouge neutre dilué extemporanément à 0.02% (0.2 mL de la solution à 1% + 0.2 mL de tampon Hepés + 9.6 mL de PBS, le tout filtré sur filtre millipore de 0.22 µm) dans chaque puits et on incube à nouveau pendant une nuit.

Le lendemain après élimination des cellules mortes par égouttage puis rinçage avec 200 µL de PBS, on provoque la lyse des cellules vivantes par ajout de 150 µL de sulfate laurylé chauffé à 45°C. La dissolution complète du culot est réalisée à l'étuve à 37°C pendant 2 heures.

La lecture des microplaques est effectuée à une longueur d'onde de 540 nm au spectrophotomètre, elle consiste en la mesure de la quantité de rouge neutre, qui marque les noyaux des cellules vivantes, libéré après la lyse des cellules.

Le pourcentage de cytotoxicité provoqué par la présence de l'extrait à 10 µg/mL est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ cytotoxicité} = \left[1 - \frac{\text{DO extrait} - \text{DO témoin}}{\text{DO témoin}} \right] \times 100$$

Remarque : La DO du témoin et de l'extrait sont données par le spectrophotomètre qui soustrait au préalable la DO du blanc.

On estime qu'une activité est notable lorsque le pourcentage de cytotoxicité est supérieur à 60%

Dans ce cas, on recherche la CL 50 (concentration pour laquelle 50% des cellules sont tuées). Pour cela, on refait le test à des dilutions de 10, 1 et 0.1 µg/mL. Ceci permet par ailleurs de vérifier et d'estimer l'efficacité de l'extrait.

A.3/ Résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus pour ce test est présenté dans le tableau XVI.

Sur les 102 extraits testés, seuls 19 d'entre eux, soit 18%, présentent une activité cytotoxique proche ou supérieure à 60%, à l'encontre des cellules cancéreuses Kb, à la concentration de 10 µg/mL. 11 de ces extraits ont fait l'objet d'un test aux concentrations de 1 et 0.1 µg/mL. Excepté l'extrait d'écorce de l'espèce *Pancheria elliptica*, tous sont encore actifs à ces deux concentrations. Cependant, les pourcentages d'activité pour une concentration d'extrait de 10 µg/mL sont pour la plupart inférieurs à 15% excepté l'extrait d'écorce de *Codia arborea* et les extraits de feuilles et d'écorce de *Geissois hirsuta*.

Si l'on considère le type d'extraits ayant donné des résultats probants, on constate que la plupart d'entre eux proviennent de l'écorce des végétaux collectés (soit près de 75% des extraits). Il est toutefois à noter que pour chaque espèce dont l'extrait d'écorce présente une forte activité, l'extrait de feuilles l'est également à un niveau moindre. Cette remarque prend toute son importance si le végétal est cultivé pour l'exploitation d'une molécule bioactive. En effet, il sera plus aisé de collecter les feuilles par simple taille, que l'écorce qui conduit le plus souvent à la mort de l'individu. Ceci suppose évidemment que la molécule responsable de l'activité détectée au niveau de l'écorce soit la même que celle présente dans les feuilles. Cette confirmation ouvrirait, de plus, la voie à une meilleure compréhension des phénomènes métaboliques existant au sein des espèces de la famille des Cunoniaceae.

A l'exception du genre *Weinmannia* pour lequel aucune activité notable n'a été détectée, tous les autres possèdent une ou plusieurs espèces actives. Les mieux placés, proportionnellement au nombre d'espèces testées, sont les genres *Acsmithia* et *Geissois* (environ 50% des espèces) suivis du genre *Pancheria* (environ 20% des espèces), puis des genres *Codia* et *Cunonia* (environ 10% des espèces). Cependant la seule espèce de *Codia* active, *C. arborea* fournit l'un des extraits les plus efficaces, avec un pourcentage d'inhibition de 93% à une concentration de 10µg/mL et de 30% à 1 µg/mL.

A.4/ Conclusion

Comparativement à la doxorubicine purifiée qui donne une inhibition de 43% à une concentration de 0.1 µg/mL, l'extrait brut d'écorce de *Codia arborea*, ainsi que ceux de feuilles et d'écorce de *Geissois hirsuta*, apparaissent comme de bons candidats dans le cadre de la purification de molécules anti-cancéreuses.

Une poursuite des tests préliminaires sur les espèces non encore collectées de la famille permettrait sans aucun doute de détecter d'autres activités cytotoxiques toutes aussi intéressantes.

Tableau XVI: Pourcentages de cytotoxicité à l'encontre des cellules Kb obtenus pour les différents extraits méthanoliques des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie.

Genre / Espèce N° Herbarier	Partie de Plante	Cytotoxicité ^a		
		10 µg/mL	1 µg/mL	0.1 µg/mL
<i>Acsmithia</i>				
<i>Acsmithia austrocaledonica</i> (Brongniart & Gris) Hoogland (Lit 114) ^b	Feuilles	22 %		
	Ecorce	65 %		
<i>Acsmithia collina</i> Hoogland inédit (Lit 116) ^b	Feuilles	22 %		
	Ecorce	65 %		
<i>Acsmithia elliptica</i> (Vieillard ex Pampanini) Hoogland (BF 58)	Feuilles	22 %		
	Ecorce	65 %	11 %	6 %
<i>Acsmithia meridionalis</i> Hoogland (BF 70)	Feuilles	9 %		
	Ecorce	14 %		
<i>Acsmithia pedunculata</i> (Schlechter) Hoogland (BF 69)	Feuilles	42 %		
	Ecorce	10 %		
<i>Acsmithia pubescens</i> Pampanini (BF 34)	Feuilles	1 %		
	Ecorce	15 %		
<i>Codia</i>				
<i>Codia albifrons</i> Vieillard ex Guillaumin (BF 83)	Feuilles	30 %		
	Ecorce	54 %		
<i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin (BF 14)	Feuilles	65 %	10 %	7 %
	Ecorce	93 %	30 %	6 %
<i>Codia discolor</i> (Brongniart & Gris) Guillaumin (BF 55)	Feuilles	18 %		
	Ecorce	6 %		
	Fleurs	7 %		
<i>Codia ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 88)	Feuilles	Nd		
	Ecorce	Nd		
<i>Codia incrassata</i> Pampanini (BF 36)	Feuilles	18 %		
	Ecorce	6 %		
	Racines	9 %		
<i>Codia montana</i> Forster (BF 37)	Feuilles	12 %		
	Ecorce	1 %		
	Racines	9 %		
<i>Codia nitida</i> Schlechter (BF 62)	Feuilles	6 %		
	Ecorce	43 %		
<i>Codia sp nov.</i> (BF 84)	Feuilles	5 %		
	Ecorce	18 %		

- ^a Résultats pour 8 essais. Dans l'échantillon contrôle, la DO était en moyenne de 0.520 ± 0.1 pour la croissance cellulaire sans extrait (moyenne déterminée avec 40 essais)

- ^b Résultats obtenus sur des poudres végétales fournies par le CNRS au cours du DEA (Fogliani, 1997).

- Nd : Résultat non déterminé

Tableau XVI (suite)

Genre / Espèce N° Herbar	Partie de Plante	Cytotoxicité ^a		
		10 µg/mL	1 µg/mL	0.1 µg/mL
<i>Cunonia</i>				
<i>Cunonia alticola</i> Guillaumin (BF 59)	Feuilles	15 %		
	Ecorce	25%		
<i>Cunonia aoupiniensis</i> Hoogland (Lit 048) ¹	Feuilles	31 %		
<i>Cunonia atrorubens</i> Schlechter (BF 52)	Feuilles	19 %		
	Ecorce	0 %		
<i>Cunonia austrocaledonica</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin (BF 79)	Feuilles	15 %		
	Ecorce	6 %		
<i>Cunonia bullata</i> Brongniart & Gris (BF 67)	Feuilles	7 %		
	Ecorce	9 %		
<i>Cunonia balansae</i> Brongniart & Gris (BF 54)	Feuilles	18 %		
	Ecorce	13 %		
	Fruit	16 %		
<i>Cunonia deplanchei</i> Brongniart & Gris (BF 17)	Feuilles	37 %		
	Ecorce	65 %	9 %	3 %
<i>Cunonia lenormandii</i> Viellard ex Brongniart & Gris (BF 66)	Feuilles	20 %		
	Ecorce	20 %		
<i>Cunonia linearisepala</i> (Guillaumin) Bernardi (BF 81)	Feuilles	0 %		
	Ecorce	4 %		
<i>Cunonia macrophylla</i> Brongniart & Gris (BF 53)	Feuilles	35 %		
	Ecorce	67 %	15 %	11 %
	Fleurs	42 %		
<i>Cunonia montana</i> Schlechter (BF 57)	Feuilles	30 %		
	Ecorce	42 %		
<i>Cunonia pulchella</i> Brongniart & Gris (BF 35)	Feuilles	5 %		
	Ecorce	0 %		
<i>Cunonia pterophylla</i> Schlechter (BF 13)	Feuilles	51 %		
	Ecorce	84 %	11 %	3 %
<i>Cunonia purpurea</i> Brongniart & Gris (BF 48)	Feuilles	20 %		
	Ecorce	13 %		
<i>Cunonia rotundifolia</i> Däniker (BF 68)	Feuilles	0 %		
<i>Cunonia varijuga</i> Hoogland (BF 28)	Feuilles	2 %		
	Ecorce	5 %		
<i>Cunonia vieillardii</i> Brongniart & Gris (BF 89)	Feuilles	Nd		
	Ecorce	Nd		

Tableau XVI (suite)

Genre / Espèce N° Herbier	Partie de Plante	Cytotoxicité (%) ^a		
		10 µg/mL	1 µg/mL	0.1 µg/mL
<i>Pancheria</i>				
<i>Pancheria alaternoides</i> Brongniart & Gris (BF 12)	Feuilles	47 %		
	Ecorce	60 %	14 %	11 %
<i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini (BF 16)	Feuilles	50 %		
	Ecorce	88 %	12 %	5 %
<i>Pancheria communis</i> Baker (BF 82)	Feuilles	Nd		
	Ecorce	Nd		
<i>Pancheria confusa</i> Guillaumin (BF 21)	Feuilles	35 %		
	Ecorce	58 %		
<i>Pancheria elegans</i> Brongniart & Gris (BF 78)	Feuilles	0 %		
	Ecorce	1 %		
<i>Pancheria elliptica</i> Pampanini (BF 20)	Feuilles	43 %		
	Ecorce	88 %	6 %	0 %
<i>Pancheria engleriana</i> Schlechter (BF 56)	Feuilles	39 %		
	Ecorce	40 %		
<i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart & Gris (BF 61)	Feuilles	40 %		
	Ecorce	45 %		
<i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard ex Pampanini (BF 22)	Feuilles	50 %		
	Ecorce	54 %		
<i>Pancheria obovata</i> Brongniart & Gris (BF 51)	Feuilles	12 %		
	Ecorce	23 %		
<i>Pancheria phylliraeoides</i> Brongniart & Gris ex Guillaumin (BF 85)	Feuilles	16 %		
	Ecorce			
<i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin (BF 60)	Feuilles	41 %		
	Ecorce	24 %		
<i>Pancheria sebertii</i> Guillaumin (BF 86) (Lit 101) ^b	Feuilles	Nd		
	Ecorce	Nd		
	Feuilles	62 %		
	Ecorce	45 %		
<i>Pancheria vieillardii</i> Brongniart & Gris (BF 87)	Feuilles	Nd		
	Ecorce	Nd		

Tableau XVI (suite)

Genre / Espèce N° Herbarier	Partie de Plante	Cytotoxicité (%) ^a		
		10 µg/mL	1 µg/mL	0.1 µg/mL
<i>Geissois</i>				
<i>Geissois hippocastaneifolia</i> Guillaumin (BF 23)	Feuilles	57 %		
	Ecorce	1 %		
<i>Geissois hirsuta</i> Brongniart & Gris (BF 29)	Feuilles	69 %	25 %	5 %
	Ecorce	87 %	30 %	7 %
<i>Geissois magnifica</i> Baker (BF 24)	Feuilles	5 %		
	Ecorce	0 %		
<i>Geissois montana</i> Vieillard (Lit 170) ^b	Feuilles	52 %		
	Ecorce	77 %		
<i>Geissois polyphylla</i> Lecard ex Guillaumin (BF 38)	Feuilles	0 %		
	Ecorce	0 %		
<i>Geissois pruinosa</i> Brongniart & Gris (BF 15)	Feuilles	37 %		
	Ecorce	55 %		
<i>Geissois racemosa</i> Labillardiere (Lit 246) ^b	Feuilles	58 %		
	Ecorce	88 %		
<i>Weinmannia</i>				
<i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart & Gris (BF 40)	Feuilles	11 %		
	Ecorce	12 %		
<i>Weinmannia monticola</i> Däniker (BF 39)	Feuilles	9 %		
	Ecorce	2 %		

- ^a Résultats pour 8 essais. Dans l'échantillon contrôle, la DO était en moyenne de 0.520 ± 0.1 pour la croissance cellulaire sans extrait (moyenne déterminée avec 40 essais)

- ^b Résultats obtenus sur des poudres végétales fournies par le CNRS au cours du DEA (Fogliani, 1997).

- Nd : Résultat non déterminé

B/ Test d'activité toxique

B.1/ Introduction

Ce test réalisé en collaboration avec l'I.R.D., a consisté à mettre nos extraits au contact d'un petit crustacé, *Artemia salina*, représentatif des organismes à sang froid. Il avait pour but de sélectionner les extraits les plus actifs afin de les tester par la suite sur la tique du bétail, *Boophilus microplus* (Fogliani, 1997).

B.2/ Rappel des résultats et de la discussion

Les conclusions restent les mêmes que celles établies en 1997 à savoir :

« Nous constatons une toxicité importante des extraits car 30 d'entre eux sont actifs, soit environ 64%. Là encore, les écorces présentent dans la majeure partie des cas une activité soit équivalente, soit supérieure à celle des feuilles excepté pour *Codia arborea*. Certaines espèces ne présentent aucune activité au niveau de leur feuilles.

Deux genres se distinguent par le fait que toutes leurs espèces sont actives, *Codia* et *Geissois*. Avec pour *Geissois pruinosa* une toxicité accrue pour l'écorce avec une CL 50 voisine de 1 µg/mL, ce qui pourrait s'avérer important sur les éventuels effets secondaires d'un tel extrait utilisé comme médicament.

Pour le Genre *Weinmannia*, on ne peut établir de règle absolue car nous n'avons pu étudier qu'une seule des quatre espèces locales mais celle-ci présente une forte toxicité avec une CL 50 de 10 µg/mL.

Pour les genres *Acsmithia*, *Cunonia* et *Pancheria*, les résultats sont très variables selon l'espèce avec des valeurs particulièrement fortes pour *Acsmithia austrocaledonica* et *Cunonia purpurea*. »

Il reste désormais à confirmer ces résultats préliminaires d'intérêt sur la tique du bétail et il serait tout aussi intéressant de tester les extraits qui ne l'ont pas encore été.

VI/ Bilan des tests chimiques et biologiques et choix des espèces à étudier.

Si l'on analyse le tableau XVII (au verso) qui récapitule l'ensemble des espèces d'intérêt qui se sont dégagées au cours des différents tests biologiques effectués, on constate un nombre important d'espèces différentes. En effet, si l'on ne considère que celles ayant donné les meilleurs résultats, qui sont au nombre de 17, une seule d'entre elles (*Geissois hirsuta*) est présente dans deux tests différents. Il nous a donc semblé judicieux d'étendre cette liste aux espèces présentant des activités moindres mais toutes aussi intéressantes dans chacun des tests. Cette manipulation nous a permis de dégager 12 espèces possédant des effets dans plusieurs domaines.

Quatre d'entre elles, en particulier apparaissent comme de bonnes candidates à une exploration chimique de leur composition en biomolécules dont certaines présentent des activités biologiques exploitables : *Weinmannia dichotoma*, *Cunonia macrophylla*, *Geissois hirsuta* et *Pancheria brunhesii*.

Notre choix s'est porté sur les deux premières pour des raisons logistiques dont la plus importante dans le cas de *Cunonia macrophylla* était une accessibilité aisée aux pieds mères dans le cadre des études physiologiques concernant les possibilités de sa multiplication tant sexuée (à partir des graines), qu'asexuée (à partir d'explants).

Tableau XVII: Tableau récapitulatif des espèces présentant un intérêt pour la purification de molécules bioactives en fonction du genre et du test biologique effectué

Tests biologiques	Espèces d'intérêt					
	<i>Acsmithia</i>	<i>Codia</i>	<i>Cunonia</i>	<i>Geissois</i>	<i>Pancheria</i>	<i>Weinmannia</i>
Activités antibiotiques et/ou antifongiques	<u><i>A. meridionalis</i></u> <u><i>A. pedunculata</i></u>	<i>C. nitida</i> <i>C. ferruginea</i>	<u><i>C. macrophylla</i></u> <u><i>C. vieillardii</i></u> <u><i>C. linearisepala</i></u>	<u><i>G. hirsuta</i></u> <u><i>G. polyphylla</i></u>	<u><i>P. alaternoides</i></u> <u><i>P. elegans</i></u> <u><i>P. obovata</i></u>	<u><i>W. dichotoma</i></u>
Activité inhibitrice Sur la xanthine oxydase		<u><i>C. incrassata</i></u>	<u><i>C. linearisepala</i></u> <i>C. rotundifolia</i>		<u><i>P. brunhesii</i></u>	<u><i>W. dichotoma</i></u> <u><i>W. monticola</i></u>
Activité inhibitrice sur l'élastase		<u><i>C. incrassata</i></u>	<u><i>C. alticola</i></u> <u><i>C. balansae</i></u> <u><i>C. macrophylla</i></u> <u><i>C. deplanchei</i></u> <i>C. atrorubens</i> <i>C. varijuga</i> <i>C. montana</i>	<u><i>G. hirsuta</i></u> <u><i>G. polyphylla</i></u>	<u><i>P. obovata</i></u> <u><i>P. brunhesii</i></u> <u><i>P. elliptica</i></u> <i>P. confusa</i> <i>P. ferruginea</i> <i>P. sebertii</i>	<u><i>W. dichotoma</i></u> <u><i>W. monticola</i></u>
Activité cytotoxique Sur cellules cancéreuses Kb	<i>A. elliptica</i>	<u><i>C. arborea</i></u>	<u><i>C. macrophylla</i></u> <u><i>C. deplanchei</i></u> <u><i>C. pterophylla</i></u>	<u><i>G. hirsuta</i></u> <i>G. racemosa</i> <i>G. montana</i>	<u><i>P. brunhesii</i></u> <u><i>P. alaternoides</i></u> <u><i>P. elliptica</i></u>	
Activité toxique sur <i>Artemia salina</i>	<i>A. austrocaledonica</i>		<i>C. purpurea</i>	<u><i>G. pruinosa</i></u>		<u><i>W. dichotoma</i></u> <u><i>W. monticola</i></u>

Les espèces surlignées sont celles ayant donné les meilleurs résultats pour chacun des tests, les autres sont également actives mais à des niveaux moindres. Les espèces soulignées sont celles possédant des effets dans plusieurs domaines.

PARTIE III

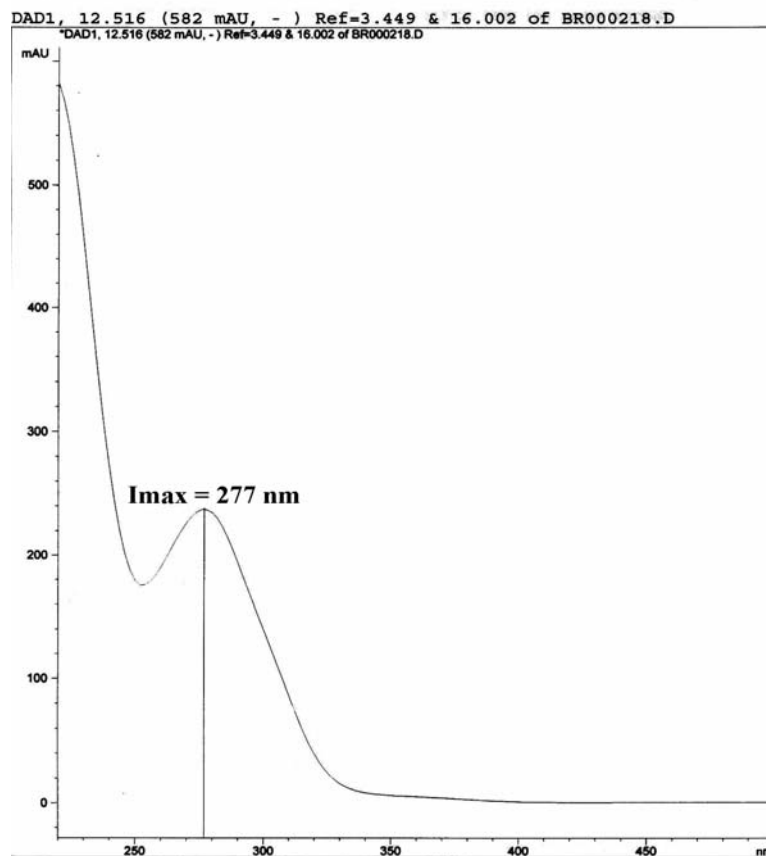
Purification et
caractérisation chimique
de molécules bioactives
synthétisées par
quelques espèces de
Cunoniaceae

Photo de *Cunonia macrophylla* (Schmid, 1995)

PARTIE III

Chapitre 1 :

Purification des molécules d'intérêt.



Spectre de la corilagine extraite de *Cunonia macrophylla*

Chapitre 1 : PURIFICATION DES MOLECULES D'INTERET

Introduction

Le chapitre précédent nous a permis de sélectionner plusieurs espèces présentant un intérêt certain pour le domaine médical ou cosmétique. Deux d'entre-elles, *Cunonia macrophylla* et *Weinmannia dichotoma* ont fait l'objet d'une étude chimique plus ou moins approfondie. Celle-ci a permis l'isolement de molécules qui ont pu être identifiées et qui apportent à coup sûr des renseignements sur la chimie de cette famille. Certaines de ces molécules ont été isolées par suivi de leur activité biologique, les autres ont pu être isolées au hasard des purifications concernant les premières.

I/ Purification de molécules antibiotiques chez l'espèce *Cunonia macrophylla*

Nous avons pu déterminer pour l'espèce *Cunonia macrophylla* de nombreuses activités biologiques qu'il nous semble essentiel de rappeler :

Tableau XVIII: Activités biologiques détectées sur les extraits bruts des différentes parties de l'espèce *Cunonia macrophylla*

Partie de plante	Feuilles		Ecorce		Fleurs et fruits	
	Acoet	MeOH	Acoet	MeOH	Acoet	MeOH
Activité :						
Antibiotique à 500 µg d'extrait /pastille sur :						
<i>Candida albicans</i>	12 mm	-	-	-	13 mm	9 mm
<i>Erwinia carotovora</i>	15 mm	12 mm	8 mm	8 mm	17 mm	15 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	8 mm	-	-	12 mm	9 mm
<i>Corynebacterium accolans</i>	13 mm	8 mm	9 mm	-	17 mm	13 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	10 mm	-	-	-	11 mm	-
Inhibitrice sur :						
Xanthine oxydase (50 µg/mL)	37.6 %	76.9 %	30.4 %	76.1 %	61.8 %	88.7 %
Elastase (50 µg/mL)	Nd	45.9 %	Nd	62.9 %	Nd	19.7 %
Cytotoxique sur :						
Cellules cancéreuses Kb (10 µg/mL)	Nd	35 %	Nd	67 %	Nd	42 %
Toxique sur :						
<i>Artemia salina</i>	Nd	-	Nd	-	Nd	-

Acoet : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol

Le choix de l'extrait à étudier de manière approfondie a été fait en fonction de plusieurs critères :

- la disponibilité en quantité suffisante de la matière végétale ; en effet, il est plus facile de collecter de grandes quantités de feuilles que de fleurs même s'il apparaît clairement que pour une activité donnée, l'efficacité est plus importante pour les extraits de fleurs et fruits
- le nombre et l'efficacité des activités détectées ; en effet, l'extrait méthanolique de feuilles présente les mêmes activités antibiotiques à moindre efficacité que celui de type acétate d'éthyle, mais l'activité inhibitrice à l'encontre de la xanthine oxydase est plus forte
- le rendement de l'extraction ; les résultats obtenus pour les feuilles de *Cunonia macrophylla* montrent une différence nette, avec 11.52% de rendement pour un extrait méthanolique contre 2.38% pour un extrait acétate d'éthyle, obtenus par macération.

Notre choix s'est ainsi porté sur l'extrait méthanolique de feuilles de cette espèce, ceci en considérant des paramètres tant biologiques que des paramètres de rentabilité.

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s)

Cette approche grossière a eu pour but de déterminer la carte d'identité en HPLC de la molécule active afin de pouvoir la suivre au cours de purifications plus poussées. Elle s'est appuyée sur une purification partielle de ces molécules.

A.1/ Matériel et méthodes

De nombreuses essais ont été réalisés mais nous ne nous attacherons qu'à développer ceux ayant conduit à un résultat probant.

A.1.1/ Extraction

Il s'agit d'une extraction séquentielle par macération dans trois solvants. Dans un premier temps, la poudre végétale de feuilles (50g) est mise à macérer à température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) dans 400 ml d'hexane pendant 24 heures. Le tout est filtré ; le filtrat est ensuite évaporé à sec à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à 45°C , et la poudre végétale est mise à sécher pendant 24 heures à 30°C pour évaporer l'excès de solvant. Elle est ensuite mise de nouveau à macérer à température ambiante dans 400 ml de dichlorométhane, filtrée, séchée, puis dans du méthanol à température ambiante (400 ml) avant d'être une dernière fois filtrée. Tous les filtrats sont évaporés à sec, pesés, puis testés pour leurs activités antibiotiques après chaque étape contre *Corynebacterium accolans*, *Staphylococcus aureus* et *Erwinia carotovora* à $500\mu\text{g}$ par pastille..

A.1.2/ Détermination de la polarité des molécules actives par bioguidage

L'extrait brut méthanolique s'étant révélé le plus actif, il est analysé par la méthode de chromatographie sur couche mince de silice (Macherey-Nagel, Polygram SilG/UV254), dans différents solvants d'élution, composés d'un mélange CH₂Cl₂-MeOH, en proportions variables afin de rechercher le mélange le plus adéquat. Les R_f (distance de migration de la molécule sur distance du front de solvant) des molécules actives, dans ces différents systèmes d'élution, sont déterminés par la technique de bioguidage.

Celle-ci consiste à faire migrer l'extrait brut sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM). La plaque de chromatographie est alors découpée dans le sens de la migration en bandelettes de 1 cm de large et celles-ci sont déposées à la surface de boîtes de Pétri préalablementensemencées avec le microorganisme cible sur milieu Müller Hinton. Après une nuit d'incubation à 37°C, des auréoles d'inhibition de croissance sont visibles de part et d'autre de la bandelette de CCM, aux points de migration des composés actifs. Les solvants qui donnent un R_f des molécules actives compris entre 0.3 et 0.5 sont retenus pour la séparation en chromatographie sur colonne de silice à pression atmosphérique.

A.1.3/ Purification partielle par bioguidage

Cette purification partielle se déroule en deux temps :

A.1.3.1/ Fractionnement sur colonne de silice

Les expériences de bioguidage réalisées à partir de l'extrait brut permettent de déterminer la composition du solvant idéal pour la chromatographie sur colonne de silice CH₂Cl₂-MeOH (85:15 v/v). 2g d'extrait brut, préalablement additionné de célite 545 (Fisher Scientific A.476425) afin de les rendre poudreux sont déposés au sommet d'une colonne de 3 cm de diamètre contenant du gel de silice 60 sur une hauteur de 25 cm (granulométrie 0,063-0,2 mm, Merk 1.07734).

L'élution est réalisée par 3 litres de solvant CH₂Cl₂-MeOH (85:15 v/v) avec récupération de fractions de 200 mL. L'activité des différentes fractions est testée par antibiose sur *Erwinia carotovora* à raison de 250 µg par pastille.

A.1.3.2/ Fractionnement sur colonne de LH20

Suite au fractionnement sur colonne de silice, un pool de fractions F9-12 (25 mg) est séparé après dépôt sur une colonne de 2 cm de diamètre contenant de la Sephadex LH20 sur une hauteur de 20 cm (Pharmacia Fine Chemical). L'élution est réalisée par un mélange CH₂Cl₂-MeOH (40:60 v/v) et une cinquantaine de fractions de 5 mL est récupérée. L'activité des différentes fractions est testée par un test d'antibiose sur *Erwinia carotovora* à raison de 100 µg par pastille.

A.1.4/ Analyse HPLC des fractions actives

Les fractions actives sont analysées en HPLC, dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire des Substances Naturelles de l'I.R.D. (centre de Nouméa), selon les conditions chromatographiques suivantes :

Pompes Waters 510
Injecteur vanne Rhéodyne
DéTECTEUR à barettes de diodes Waters 996
Logiciel Millennium 32

Conditions de l'analyse :
Colonne : Alphabond C18 150 x 3.9 mm (10 µm - 125Å)
Gradient d'éluTion : t₀ 100% H₂O → t_{20min} 100% acéTionitrile
Débit: 1 mL.min⁻¹
Détection: 280 nm

A.2/ Résultats et discussion

Les rendements obtenus au cours de l'extraction séquentielle de feuilles de *Cunonia macrophylla* ainsi que les activités détectées sur les 3 souches cibles, sont fournis dans le tableau XIX. Il révèle que la majorité des molécules extraites sont de type polaires puisque le rendement le plus fort est obtenu pour l'extrait méthanolique (13.04%), ce qui confirme l'hypothèse émise lors de l'obtention des extraits bruts. De plus, il présente des activités antibiotiques notables.

Tableau XIX : Rendements d'extraction des feuilles de *Cunonia macrophylla* et activités antibiotiques détectées sur les extraits (500 µg d'extrait par pastille).

Type d'extrait	Rendement d'extraction	Activités antibiotiques		
		<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium accolans</i>
Extrait Brut Méthanolique (annexe II)	11.52 %	12 mm	8 mm	8 mm
Hexane	1.24%	0	0	0
CH₂Cl₂	0.68%	0	0	0
Méthanolique	13.04%	14 mm	9 mm	9 mm

Le fractionnement sur colonne de silice a permis de récupérer 15 fractions toutes testées pour leurs activités antibiotiques à l'encontre d'*Erwinia carotovora* (Tableau XX). Il est important de constater que l'activité est détectée sur un grand nombre de fractions ce qui suggère que la molécule active traîne sur cette colonne. En fonction des résultats antibiotiques obtenus et des chromatographies sur couche mince de silice, nous avons décidé de réunir les fractions 9 à 12 pour le fractionnement suivant sur colonne de LH20.

Tableau XX : Résultats du fractionnement sur colonne de silice de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla* ; poids des extraits et activités antibiotiques à l'encontre d'*Erwinia carotovora* (250 µg d'extrait par pastille)

Fraction F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Poids (mg)	54.5	14.3	22.3	22.5	64.2	65.1	90.6	80.1	54.6	59.7	48.1	61.2	77.8	54.4	49.1
Activité (mm)	0	0	0	0	0	0	9	11	14	15	15	14	11	9	6

 Pool F9-12 réunissant les fractions 9 à 12

Le fractionnement sur LH20 du pool F9-12 permet de collecter 50 fractions qui sont toutes testées pour leurs activités antibiotiques à l'encontre d'*Erwinia carotovora* (Tableau XXI). Cette activité est localisée sur 13 fractions, qui sont toutes analysées en HPLC, avec un maximum d'efficacité pour la fraction F'20. L'analyse de cette fraction selon les conditions expérimentales décrites précédemment permet de distinguer une molécule majoritaire (60% des molécules en présence) dont le temps de rétention est de 8.487 min. (Figure 53A). Son spectre ultraviolet est fourni ainsi que celui des autres molécules qui l'accompagnent (Figure 53B). On note un maximum d'absorbance proche de 276 nm, cependant la pureté étant relative, nous n'avons pu à ce stade établir de manière formelle ce maximum. Quoi qu'il en soit, ce spectre aura servi de base à l'isolement de cette molécule en quantité plus importante et de molécules de spectre voisin susceptibles de présenter des activités de même type.

Un travail de purification et d'analyse spectrale réalisé par le Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de l'Université de Polynésie Française à Papeete en collaboration avec le Centre Régional de RMN (CRRMN) à l'Université d'Aix-Marseille III, a permis d'identifier cette molécule comme étant la corilagine.

Tableau XXI : Résultats du fractionnement sur colonne de LH20 du pool d'extraits F9-12 ; activité antibiotique à l'encontre d'*Erwinia carotovora* (100 µg d'extrait par pastille).

Fraction F'	F9-12	1 à 13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27 à 50
Activité (mm)	14	0	7	9	11	12	12	13	14	13	13	12	11	10	7	0

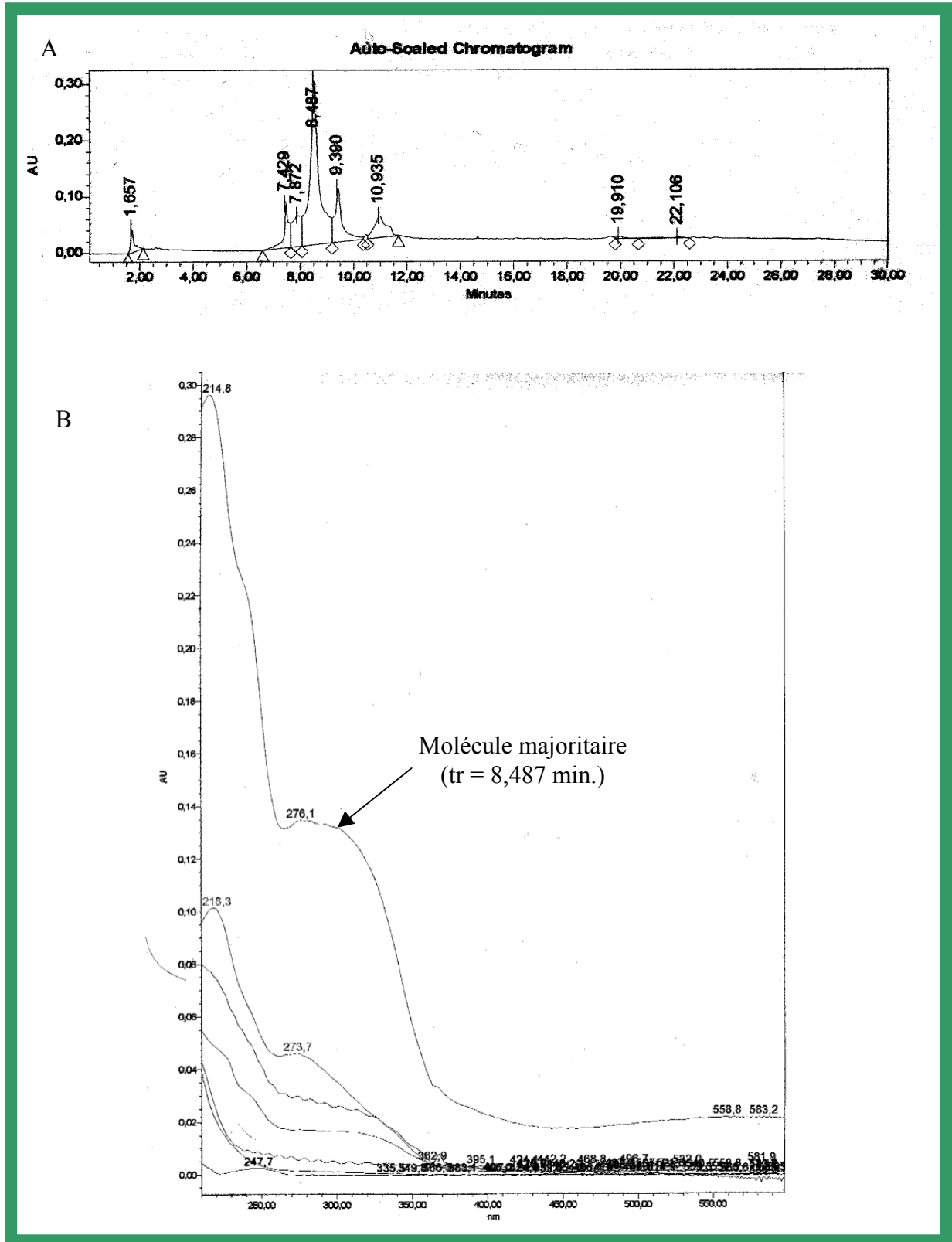


Figure 53 : Analyse HPLC de la fraction F'20 obtenue après fractionnements successifs de l'extrait méthanolique de feuilles de *C. macrophylla* sur colonne de silice suivie d'une colonne de LH20. A : profil d'éluion ; B : Spectre ultraviolet des molécules composants le mélange (tr = temps de rétention).

B/ Purification de molécules extraites des feuilles de *Cunonia macrophylla*

Après ce travail préliminaire, une purification en quantité plus importante des molécules bioactives a été conduite, à la fois en utilisant les données précédemment présentées, mais aussi à partir de résultats de manipulations ponctuelles non détaillées.

Ces travaux de purification se sont déroulés en deux temps. Dans un premier temps une extraction et un fractionnement grossier par séparation liquide/liquide ont été effectués au sein de notre laboratoire (L.B.P.V.A.). Puis, les fractionnements sur colonnes et le suivi HPLC ont eu lieu au sein du Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de l'Université de Polynésie Française à Papeete, au cours d'un stage de trois semaines qu'il m'a été donné de réaliser.

B.1/ Matériel et méthodes

B.1.1/ Extraction

La poudre végétale de feuilles de *Cunonia macrophylla* (300 g) est extraite de façon successive par trois solvants différents, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Cette extraction est réalisée en continu à l'aide d'un extracteur de Soxhlet. Celui-ci se compose d'une cartouche en cellulose d'une capacité équivalente à environ 150 g de poudre végétale sèche. Cette cartouche est placée dans l'extracteur dont la capacité en solvant est de 500 mL. Pour chaque solvant, le temps d'extraction correspond à environ 20 cycles de passage de ce même volume de solvant.

Le solvant chargé en molécules est récupéré, puis évaporé à sec sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-114. L'extrait brut ainsi obtenu est pesé pour la détermination du rendement d'extraction, avant d'être stocké au réfrigérateur à 4°C, jusqu'à son utilisation. Chacun des extraits est testé pour son activité antibiotique à l'encontre d'*Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium accolans* et *Candida albicans*.

B.1.2/ Fractionnement liquide/liquide

L'extrait méthanolique détecté comme actif, est fractionné par séparation liquide/liquide. 50 g de cet extrait sont solubilisés dans 500 mL d'eau puis extraits par 3 lavages successifs à l'acétate d'éthyle (200 mL) dans une ampoule à décanter d'une capacité de 1 litre. Les deux phases, aqueuse et organique, sont récupérées, filtrées, évaporées à sec sous pression réduite, pesées puis testées pour leur activité antibiotique.

La phase aqueuse est de nouveau solubilisée puis extraite selon la même méthodologie par du butanol.

B.1.3/ Fractionnement sur colonnes

Le fractionnement conduisant à la purification des molécules a impliqué divers types de colonnes :

B.1.3.1/ Chromatographie flash sur silice

100 g de silice (gel de silice type Sorbsil C60, 40-60 µm) sont imprégnés de 10 g de l'extrait butanolique, solubilisé dans le méthanol, puis mis à sécher.

Une colonne est ensuite préparée comme telle :

- 300 cm³ de silice
 - 200 cm³ de silice imprégnée séchée (dépôt à sec)
- soit une colonne de 8 cm de diamètre et 12 cm de hauteur.

L'éluion est réalisée par un mélange ternaire de solvants selon un gradient séquencé de 500 mL des mélanges de solvants suivants :

Acétate d'éthyle (mL)		Méthanol (mL)		Eau (mL)	
10	<i>416</i>	1	<i>42</i>	1	<i>42</i>
6	<i>375</i>	1	<i>62.5</i>	1	<i>62.5</i>
4	<i>333</i>	1	<i>83.5</i>	1	<i>83.5</i>
3	<i>300</i>	1	<i>100</i>	1	<i>100</i>
2	<i>286</i>	1	<i>143</i>	0.5	<i>71</i>

- En gras, proportion v/v ; en Italique, volume préparé

B.1.3.2/ Chromatographie sur colonne de LH20

la veille : la LH20 est mise à stabiliser dans du méthanol

le jour même :

colonne :

- la LH20 est disposée dans une colonne de 1 cm de diamètre et d'1 mètre de hauteur
- le méthanol choisi comme solvant d'éluion est injecté par une pompe (Jasco PU 980, HPLC pump) à un débit de 0,7 mL/min avec une légère syurpression.

extrait :

- l'extrait est solubilisé dans un volume réduit de méthanol (4-5 mL)
- l'apparition d'un trouble nous conduit le plus souvent à centrifuger l'extrait à 4500 trs/min pendant 10 min (centrifugeuse HETTICH EBA 3S)
- le surnageant est injecté sur la colonne
- le précipité est conservé

Les fractions obtenues sont récupérées dans des tubes de 8 mL à raison de 6 mL pendant 10 minutes grâce à un collecteur de fractions (Eldex Universal Fraction Collector).

Chaque fraction est analysée en HPLC.

B.1.3.3/ Chromatographie semi-préparative sur colonne de phase inverse

Les fractions récupérées après la chromatographie sur silice ou sur LH20 sont ensuite étudiées séparément afin d'en purifier les molécules constitutives.

Deux types de colonne de phase inverse sont employées :

- μ bondapack C18-7.8x300 mm

L'extrait est préalablement solubilisé dans le solvant d'éluion et centrifugé à 4500 trs/min pendant 10 min (centrifugeuse HETTICH EBA 3S) avant injection du surnageant sur la colonne. La détermination de ce solvant est réalisée par analogie avec les profils d'éluion obtenus en analyse HPLC pour chaque fraction. Le solvant d'éluion (mélange d'eau et d'acétonitrile) est injecté par une pompe (Jasco PU 980, HPLC pump) à un débit de 2 mL/min sous pression réduite.

- Spherisorb 5 μ ODS2 25cmx20mm Col Prolabo (ref 32621605)

L'extrait est préalablement solubilisé dans le solvant d'éluion et centrifugé à 4500 trs/min pendant 10 min (centrifugeuse HETTICH EBA 3S) avant injection du surnageant sur la colonne. La détermination de ce solvant est réalisé par analogie avec les profils d'éluion obtenus en analyse HPLC pour chaque fraction. Le solvant d'éluion (mélange d'eau et d'acétonitrile) est injecté par une pompe (Jasco PU 980, HPLC pump) à un débit de 10 mL/min sous une pression de 60 à 70 kg/cm².

Quelle que soit la colonne considérée, un détecteur universel (HP 1047 A) associé à un intégrateur/traceur (HP 3396A), nous permettent de suivre la sortie des molécules de la colonne à une longueur d'onde donnée.

A chaque étape de la purification, les différents extraits sont analysés en HPLC et testés pour leurs activités antibiotiques par la méthode des disques (Bauer *et al.*, 1966).

B.1.3.4/ Caractéristiques de l'HPLC et conditions de l'analyse

Le matériel instrumental est de la marque Hewlett Packard, HP séries 1100, composé des modules suivants :

Dégazeur G 1322A
Pompe quaternaire G 1311A
Injecteur automatique G 1313A
Détecteur à barettes de diode G 1315A

Le logiciel associé est HP-ChemStation version Rev.A.05.02(273) 1990-1997.

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

Colonne: Lichrospher C18 250 x 4,6 mm (5 μm - 100 Å)

Débit: 1 mL.min⁻¹

Détection: 280 nm

Gradient d'élution :

Temps (min)	Eau	Acétonitrile
0	100 %	0 %
2	100 %	0 %
13.5	50 %	50 %
15.5	50 %	50 %
16.5	100 %	0 %
20	100 %	0 %

B.2/ Résultats et discussion

Les rendements d'extraction des feuilles de *Cunonia macrophylla*, obtenus au cours de l'extraction proprement dite et de la séparation liquide/liquide sont fournis dans la figure 54. On remarque de nouveau que les molécules extraites par le méthanol sont les plus abondantes avec un rendement de 29.8%. Il est à noter que celui-ci a été triplé par l'utilisation de l'extracteur de Soxhlet. Il en est de même pour l'extrait de type dichlorométhane. En ce qui concerne les activités de ces différents extraits, l'extrait méthanolique se confirme comme le candidat idéal avec de surcroît une hausse sensible de son efficacité (Tableau XXII).

Quant aux séparations liquide/liquide effectuées sur l'extrait méthanolique, elles ont pour effet d'éliminer considérablement le nombre de molécules inactives. En effet, en partant d'un extrait méthanolique de 50 g, il est aisé de constater qu'en récupérant un extrait butanolique de 21.54 g, plus de la moitié des constituants sont écartés (57%). Cependant, l'activité antibiotique ne subit pas dans ce cas de hausse notable.

Tableau XXII : Activités antibiotiques détectées sur les différents extraits de feuilles de *Cunonia macrophylla* après extraction et séparation liquide/liquide.

Type de fraction*	Activité antimicrobienne en mm pour 500 μg d'extrait / pastille			
	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium accolans</i>	<i>Candida albicans</i>
CH ₂ Cl ₂	0	0	0	0
Acétate d'éthyle 1	9	7	6	0
Méthanolique	15	10	10	12
Acétate d'éthyle 2	6	0	0	0
Aqueuse épuisée	6	0	0	0
Butanolique	15	10	10	12

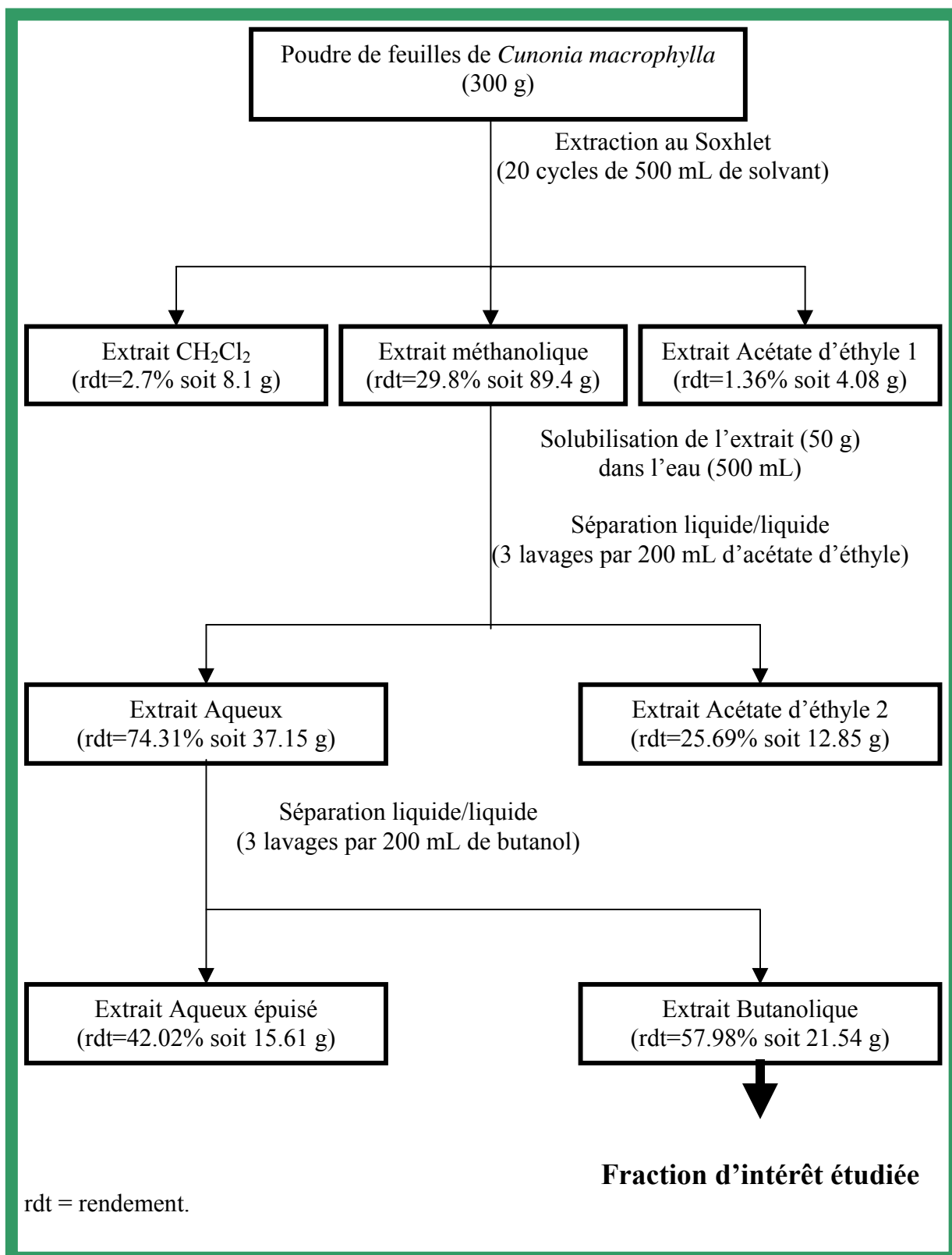


Figure 54 : Bilan de l'extraction de la poudre de feuilles de *C. macrophylla* et des séparations liquide/liquide de l'extrait méthanolique obtenu.

L'extrait butanolique donne après une chromatographie flash sur silice, 5 fractions référencées Si Frx (x étant le n° de fraction), correspondant chacune à une séquence de solvant. Deux d'entre-elles, sont la somme de sous-fractions collectées en sortie de colonne. Ainsi, la fraction Si Fr2 est la somme de 5 sous fractions de 100 mL, référencées Si Fr2-1 à Si Fr2-5. De la même façon Si Fr4 est la somme des deux sous fractions Si Fr4-1 et Si Fr4-2 de 250 mL. Leurs poids ainsi que les activités antibiotiques de chacune d'entre-elles sont fournis dans le tableau XXIII. Trois de ces fractions présentent des capacités d'inhibition notables (Si Fr2, Si Fr3, Si Fr4). Chacune est alors traitée séparément, exceptée la fraction Si Fr5 apparue inexploitable du fait d'une trop grande abondance de molécules.

Tableau XXIII : Résultat du fractionnement de l'extrait butanolique (10 g) sur colonne de silice et activités antibiotiques des extraits récupérés (250µg/pastille).

Fraction	Poids (g)	(%)	Activités			
			<i>E. caratovora</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. accolans</i>	<i>C. albicans</i>
Si Fr1	0.20	2.05	0	0	0	0
Si Fr2	2.63	26.38	18	16	14	14
Si Fr2-1	1.01	10.14	Nd	Nd	Nd	Nd
Si Fr2-2	0.61	6.13	Nd	Nd	Nd	Nd
Si Fr2-3	0.53	5.36	Nd	Nd	Nd	Nd
Si Fr2-4	0.34	3.41	Nd	Nd	Nd	Nd
Si Fr2-5	0.13	1.34	Nd	Nd	Nd	Nd
Si Fr3	1.36	13.67	12	6	10	10
Si Fr4	3.18	31.95	13	8	11	11
Si Fr4-1	1.07	10.78	14	10	12	12
Si Fr4-2	2.11	21.17	6	0	0	0
Si Fr5	1.56	15.61	6	0	0	0
Total	8.96	89.68				

Nd : non déterminé

B.2.1/ Traitement de Si Fr1

La présence d'une molécule majoritaire dans cette fraction nous conduit vers sa purification. Pour cela, une séparation sur colonne de type Sep-Pack C18 (Waters Vac 12cc-2g) est réalisée en utilisant de l'eau seule. La molécule purifiée obtenue est référencée **CM1**.

B.2.2/ Traitement de Si Fr2

La fraction Si Fr2 correspond à l'addition de 5 fractions de 100 mL récupérées en sortie de colonne de silice éluée avec 500 mL du solvant constitué du mélange ternaire acétate d'éthyle:méthanol:eau (6:1:1 v/v/v).

La 1^{ère} fraction de 100 mL référencée Si Fr2-1 est séparée sur colonne de phase inverse de type Sphérisorb alors que la fraction SiFr2 subit plusieurs séparations successives.

B.2.2.1/ Séparation de Si Fr2-1 sur colonne Sphérisorb ODS2

Cette séparation est réalisée par passage de l'extrait Si Fr2-1 sur la colonne Sphérisorb ODS2, en utilisant un gradient séquencé de solvants constitués d'un mélange eau :acétonitrile variable :

Solvant	% H ₂ O	% Acétonitrile	Volume
1	100	0	100 mL
2	95	5	100 mL
3	90	10	100 mL
4	85	15	100 mL
5	80	20	100 mL
6	75	25	100 mL
7	70	30	100 mL
8	65	35	100 mL
9	60	40	100 mL
10	55	45	100 mL
11	50	50	100 mL

6 molécules sont ainsi purifiées : **CM 18, CM20, CM21, CM22, CM24 et CM25.**

B.2.2.2/ Séparation de Si Fr2

Dans un premier temps, la fraction Si Fr2 est passée sur colonne de LH20. Sa solubilisation dans le méthanol, solvant d'éluion, provoque l'apparition d'un précipité. Ce précipité est récupéré par centrifugation puis subit 3 lavages successifs consistant en une solubilisation dans du méthanol à chaud par sonification puis en un refroidissement et une centrifugation. Ces manipulations aboutissent à la purification de la molécule **CM2**.

La séparation sur colonne de Sephadex LH20 fournit 50 fractions dont 4 successives présentent un intérêt pour une purification, elles sont réunies (16-19).

Ce pool de fractions est alors passé sur colonne de phase inverse μ bondapack C18 et élué par un solvant isocratique eau:acétonitrile (85:15 v/v). Une des fractions récupérées contient la molécule **CM6**, une autre le mélange des molécules CM4 et CM5.

La séparation des molécules **CM4** et **CM5** s'est faite par passage du mélange sur une colonne de phase inverse de type Sphérisorb ODS2, en utilisant un solvant isocratique eau:acétonitrile (75:25 v/v).

B.2.3/ Traitement de Si Fr3

Le même protocole que celui employé pour la fraction Si Fr2 permet d'aboutir à la purification de la molécule **CM3** qui précipite.

La séparation sur colonne de Sephadex LH20 fournit 50 fractions dont 5 successives présentent un intérêt pour une purification, elles sont réunies en deux pools de 2 et 3 fractions chacune (17-18 et 19-21).

Ces deux pools de fractions sont alors passés séparément sur colonne de phase inverse µbondapack C18 et élués par un solvant isocratique eau:acétonitrile (80:20 v/v). Du pool 17-18, deux molécules sont isolées, **CM8** et **CM9**, alors que le pool 19-21 fournit les 4 molécules **CM10**, **CM11**, **CM12** et **CM13**.

B.2.4/ Traitement de Si Fr4-1

Seule la fraction Si Fr4-1 est traitée sur colonne de Sephadex LH20. Des 50 fractions obtenues, 2 pools de 5 fractions (10-14 et 17-21) et 1 pool de 4 fractions (23-26) sont retenus.

Ces 3 pools sont traités séparément mais de la même façon sur colonne de phase inverse de type Sphérisorb ODS2, en utilisant un gradient séquencé de solvants constitués d'un mélange eau:acétonitrile variable :

Solvant	% H₂O	% Acétonitrile	Volume
1	100	0	100 mL
2	95	5	100 mL
3	90	10	100 mL
4	85	15	100 mL
5	80	20	100 mL
6	75	25	100 mL
7	70	30	100 mL
8	65	35	100 mL
9	60	40	100 mL
10	55	45	100 mL
11	50	50	100 mL

3 molécules sont ainsi purifiées : **CM15** de 10-14
 CM16 de 17-21
 CM17 de 23-26

B.2.5/ Bilan des purifications

L'ensemble des stratégies de purification mises en place ainsi que les molécules purifiées référencées CM est répertorié dans la figure 55. Près de 20 molécules ont ainsi pu être purifiées en quantité plus ou moins importante laissant présager pour certaines la difficulté d'en effectuer une analyse structurale (Tableau XXIV).

Les profils d'éluion ainsi que les spectres d'absorption ultraviolet acquis au cours de l'analyse HPLC dans les conditions expérimentales choisies sont présentés dans les figures 56 à 61.

Par analogie avec le spectre ultraviolet de la corilagine, obtenu au cours du travail préliminaire, 5 molécules semblent être de même type (CM17, CM18, CM21, CM22, CM24) avec des spectres présentant un seul maximum d'absorption (Tableau XXIV ; Figure 56 ; Annexe IV-1 à IV-4). La molécule CM22 semblant être elle-même de la corilagine.

Trois autres types de molécules ont été séparées au cours des purifications :

- Le premier groupe avec une dizaine de molécules, semble être constitué de flavonoïdes, avec deux maximums d'absorption. On y distingue trois sous-groupes ; le premier avec des maximums proches de 256-258 nm et 355-359 nm (CM4, CM5, CM6, CM8, CM9, CM10, CM12, CM15 ; Figure 57 ; Annexe IV-5 à IV-12), le second avec des maximums de 254 et 374 nm (CM13 ; Figure 58 ; Annexe IV-13) et le troisième avec des maximums de 260-261 nm et 355-360 nm (CM11, CM25 ; Figure 59 ; Annexes IV-14 et IV-15).
- Le second groupe est représenté par 3 molécules dont le spectre ultraviolet présente là aussi 2 maximums d'absorptions, cependant le second pic d'absorption est toujours plus faible. Le premier maximum est identique pour les trois molécules (254 nm) et le second varie entre 357 et 368 nm (CM2, CM3, CM25 ; Figure 60 ; Annexe IV-16 à IV-18). Ce type de spectre est à rapprocher de celui de l'acide ellagique.
- Le troisième groupe est représenté par deux molécules dont les spectres ultraviolets ne présentent qu'un maximum d'absorption. Mais comparativement aux molécules proches de celle purifiée dans les travaux préliminaires, on constate une diminution plus importante de l'absorption aux alentours de 240 nm (CM1, CM20 ; Figure 61 ; Annexes IV-19 et IV-20).

Les activités antibiotiques potentielles des molécules CM1, 2, 3, 14, 18, 20, 21, 22 et 24 ont été déterminées à l'encontre d'*Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Corynebacterium accolans* (Tableau XXV). Il est intéressant de constater que les 5 molécules, dont le spectre est proche de la corilagine, présentent des activités analogues avec une efficacité plus ou moins importante. En revanche, les molécules CM1 et CM20, dont le spectre présente une allure similaire mais avec une diminution plus importante aux alentours de 240 nm, ne font apparaître aucune activité. Enfin, les molécules CM2 et CM3 malgré deux spectres très proches réagissent de manière complètement opposée puisque CM2 est active sur 3 des souches bactériennes alors que CM3 ne l'est que sur *Erwinia carotovora*.

L'analyse structurale réalisée sur certaines de ces molécules nous a permis de mieux appréhender les groupes de molécules en présence (cf partie II).

Tableau XXIV : Liste des différentes molécules purifiées à partir de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla*.

<i>Référence de la molécule</i>	<i>Quantité Purifiée</i>	<i>Maximum(s) d'absorption(nm)</i>	<i>Solvant de solubilisation</i>	<i>Type de molécule</i>
CM1	25 mg	272	Eau	?
CM2	31.8 mg	254 et 368	DMSO	Type acide ellagique
CM3	91.8 mg	254 et 361	DMSO	Type acide ellagique
CM4	12.4 mg	256 et 356	Méthanol	Flavonoïde
CM5	7.7 mg	256 et 355	Eau	Flavonoïde
CM6	9.3 mg	257 et 355	Méthanol	Flavonoïde
CM8	5.2 mg	255 et 356	Méthanol	Flavonoïde
CM9	4.2 mg	257 et 356	Méthanol	Flavonoïde
CM10	9.3 mg	258 et 359	Méthanol	Flavonoïde
CM11	6.1 mg	260 et 360	Méthanol	Flavonoïde
CM12	2 mg	257 et 357	Méthanol	Flavonoïde
CM13	3 mg	254 et 374	Méthanol	Flavonoïde
CM15	11.7 mg	256 et 355	Méthanol	Flavonoïde
CM16	18 mg	254 et 357	Méthanol	Type acide ellagique
CM17	26.3 mg	275	Méthanol	Type corilagine
CM 18	7.1 mg	265	Méthanol	Type corilagine
CM20	4.6 mg	286	Eau	?
CM21	50 mg	265	Méthanol	Type corilagine
CM22	50 mg	269	Méthanol	Type corilagine
CM24	5 mg	277	Méthanol	Type corilagine
CM25	6 mg	261 et 355	Méthanol	Flavonoïde

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

Tableau XXV : Activités antibiotiques détectées par la méthode des disques (Bauer *et al.*, 1966) pour certaines des molécules purifiées de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla*.

<i>Référence de la molécule</i>	<i>Activité antibiotique en mm (pour 100 µg d'extrait par pastille)</i>			
	<i>E. carotovora</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. accolans</i>
CM1	0	0	0	0
CM2	15	0	10	12
CM3	12	0	0	0
CM17	13	7	7	7
CM18	13	9	9	9
CM20	0	0	0	0
CM21	15	10	10	10
CM22	20	12	12	12
CM24	19	11	12	10

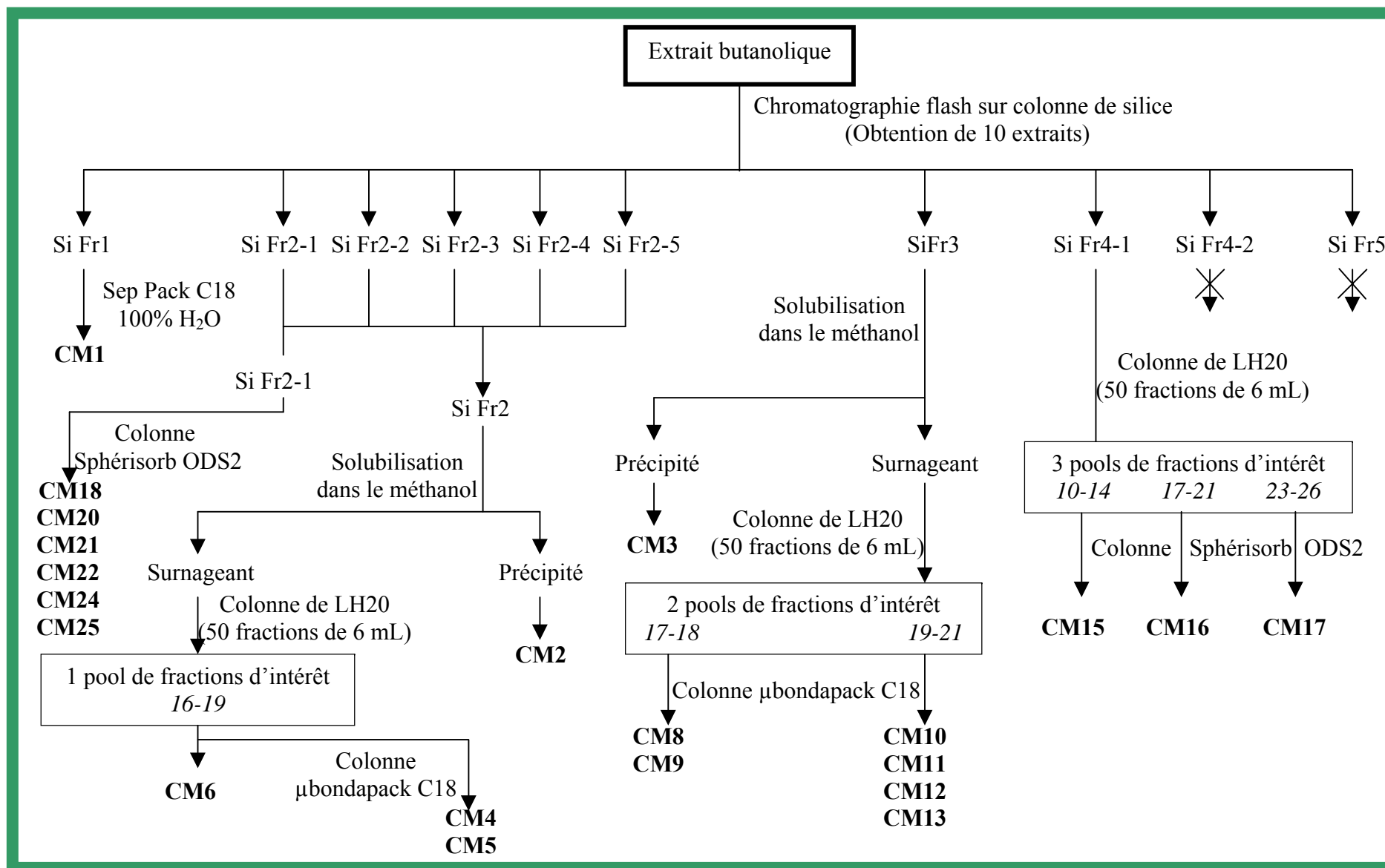


Figure 55 : Schéma récapitulatif des stratégies de purification des molécules extraites de feuilles de *Cunonia macrophylla*.

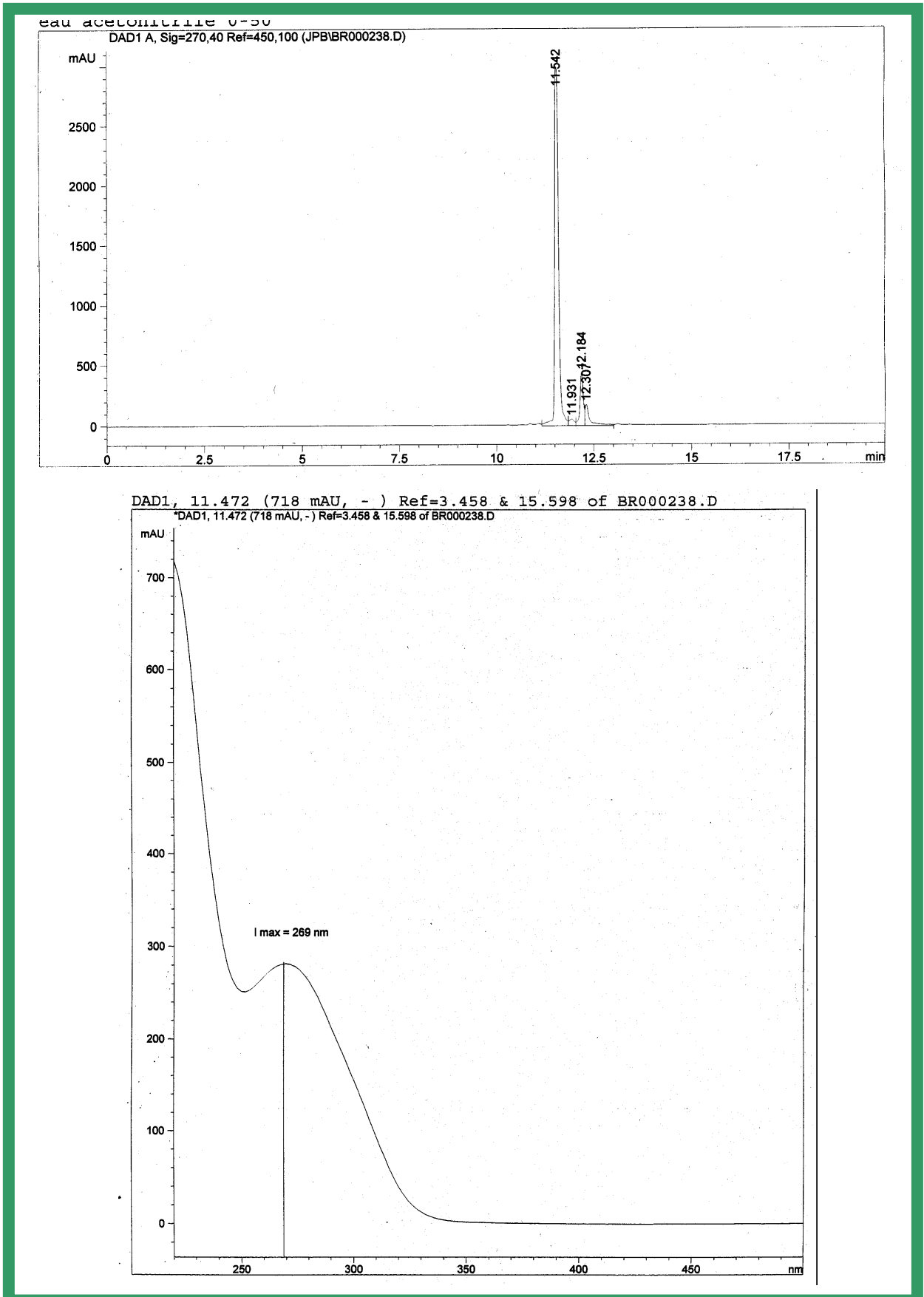


Figure 56 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM22, obtenus par analyse HPLC.

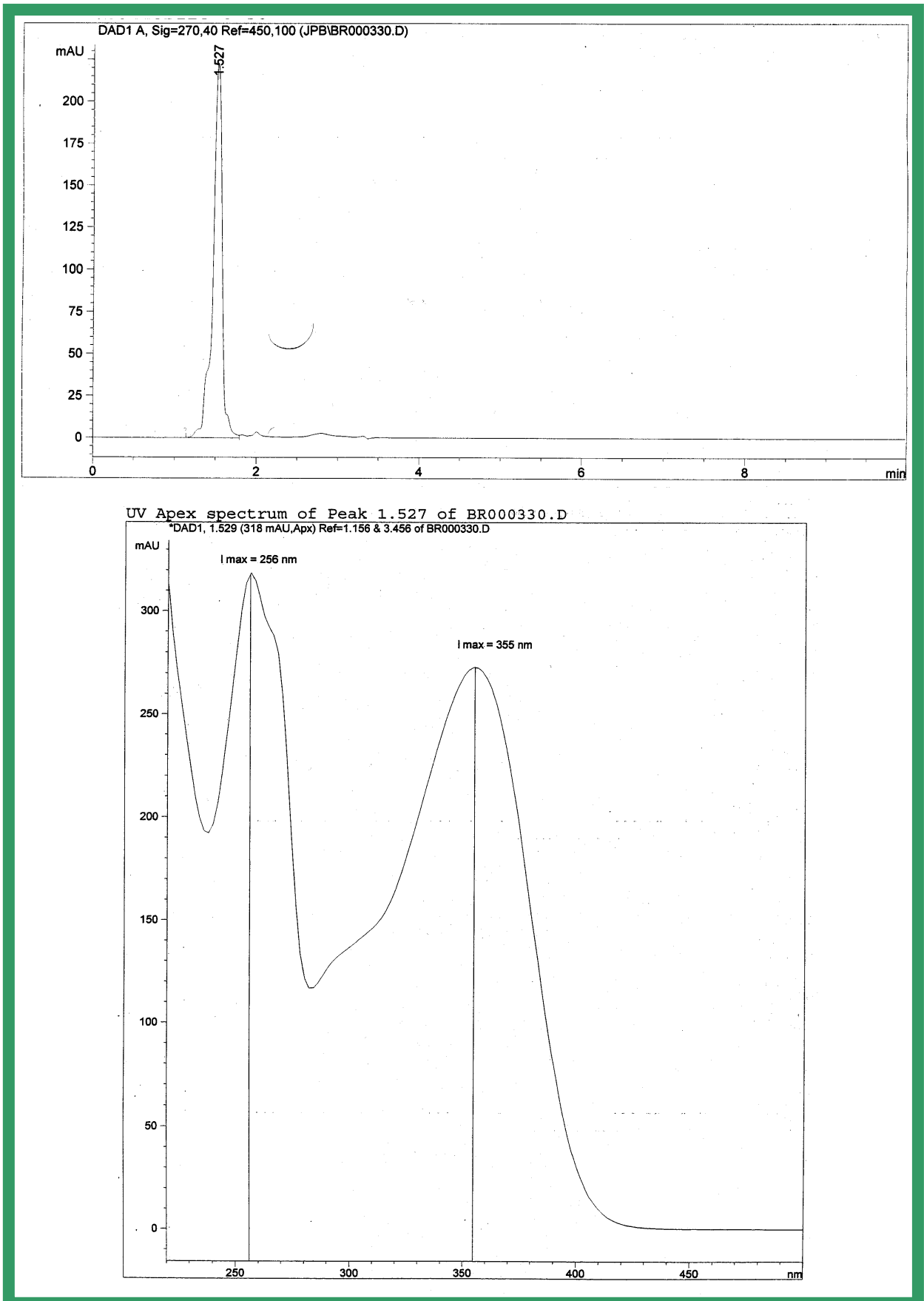


Figure 57: Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM15, obtenus par analyse HPLC.

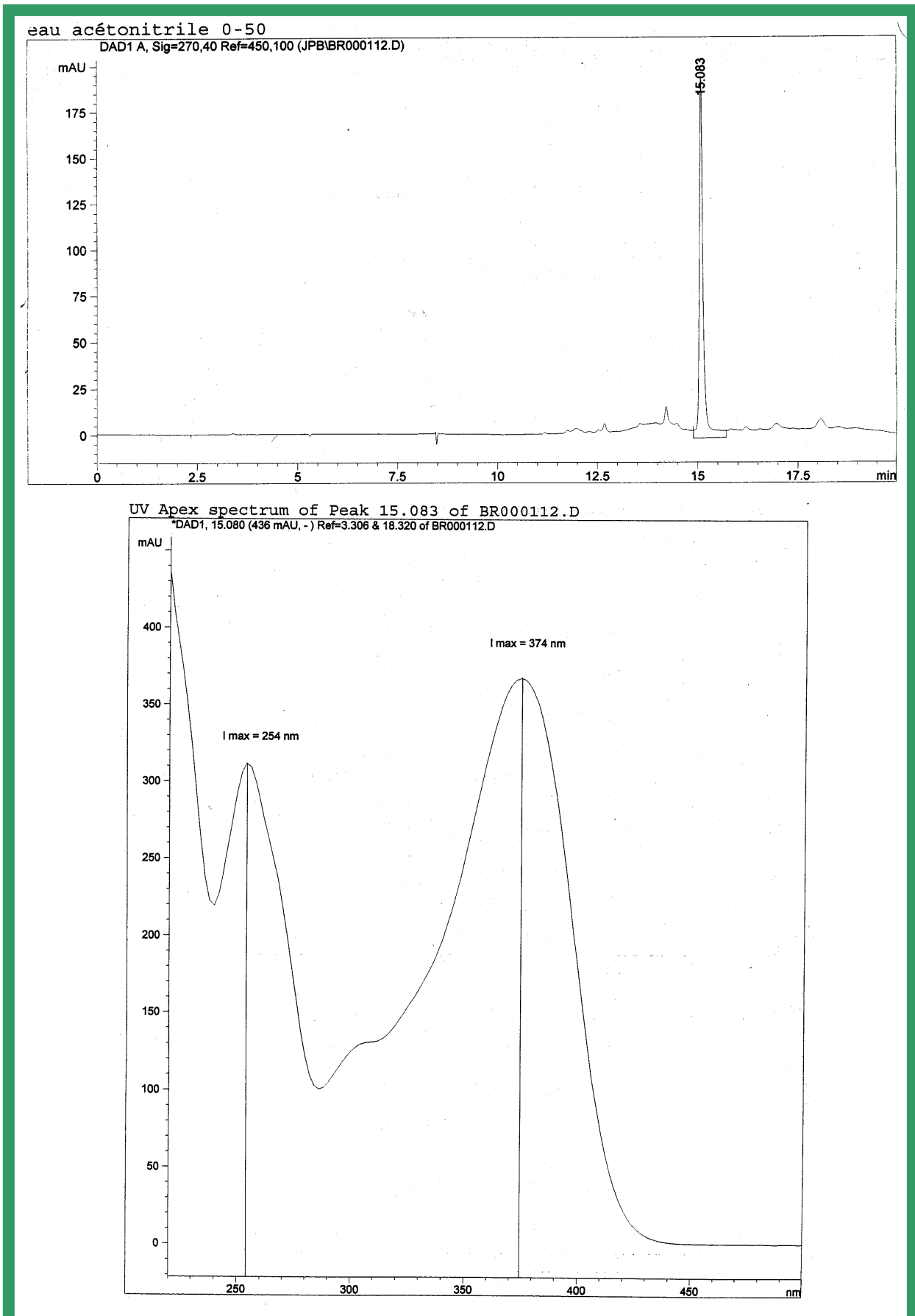


Figure 58 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM13, obtenus par analyse HPLC.

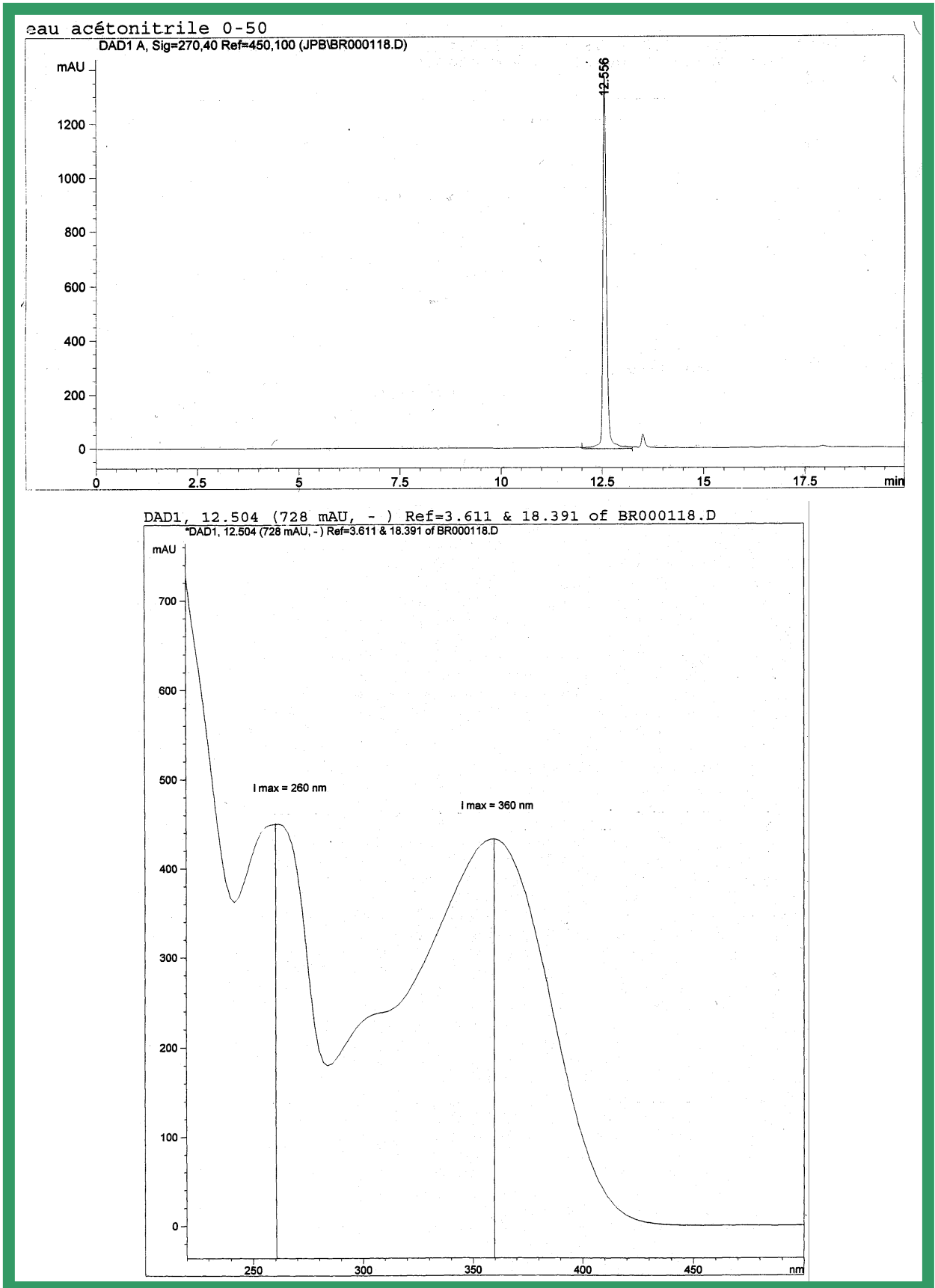


Figure 59 : Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM11, obtenus par analyse HPLC.

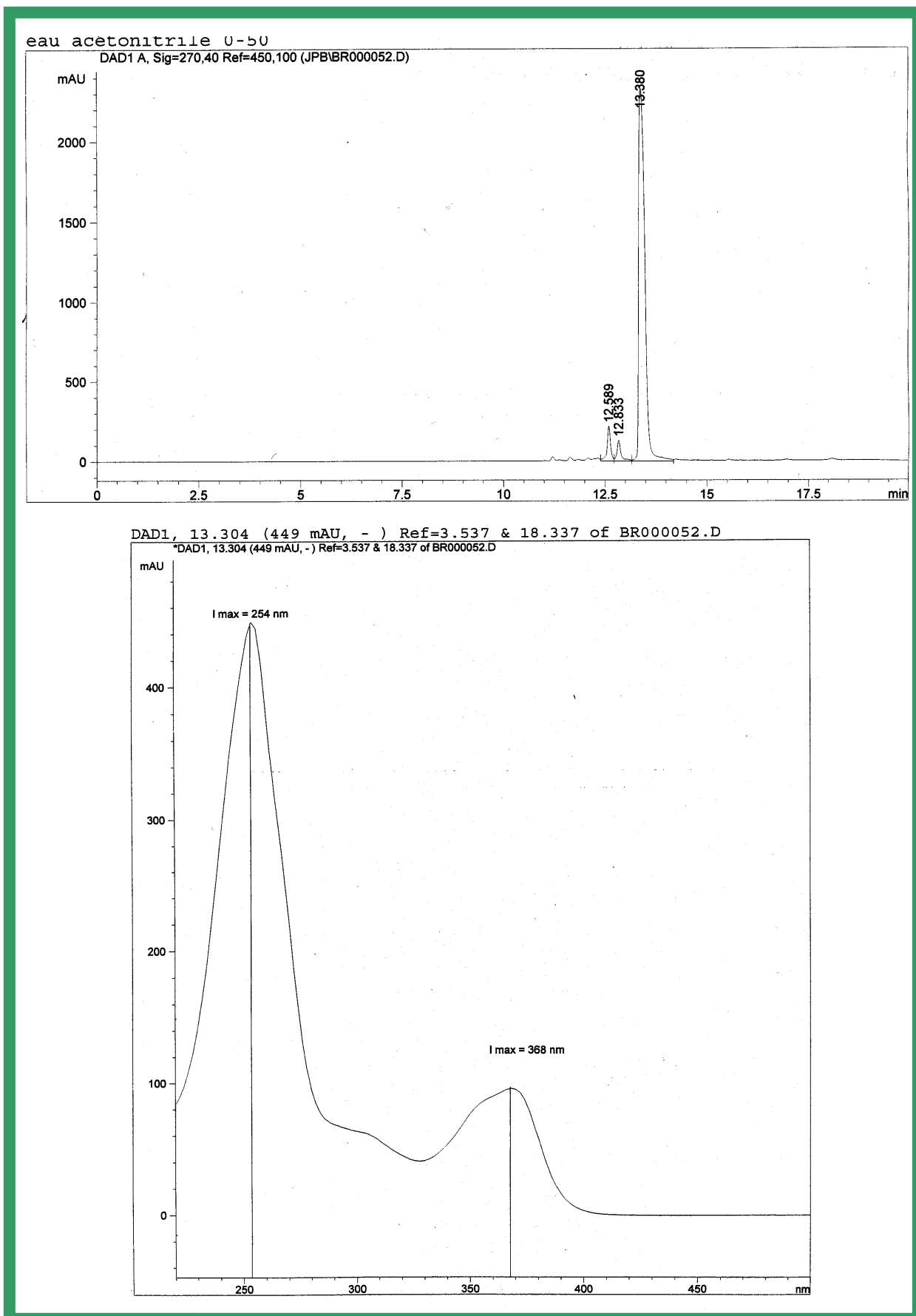


Figure 60 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM2, obtenus par analyse HPLC.

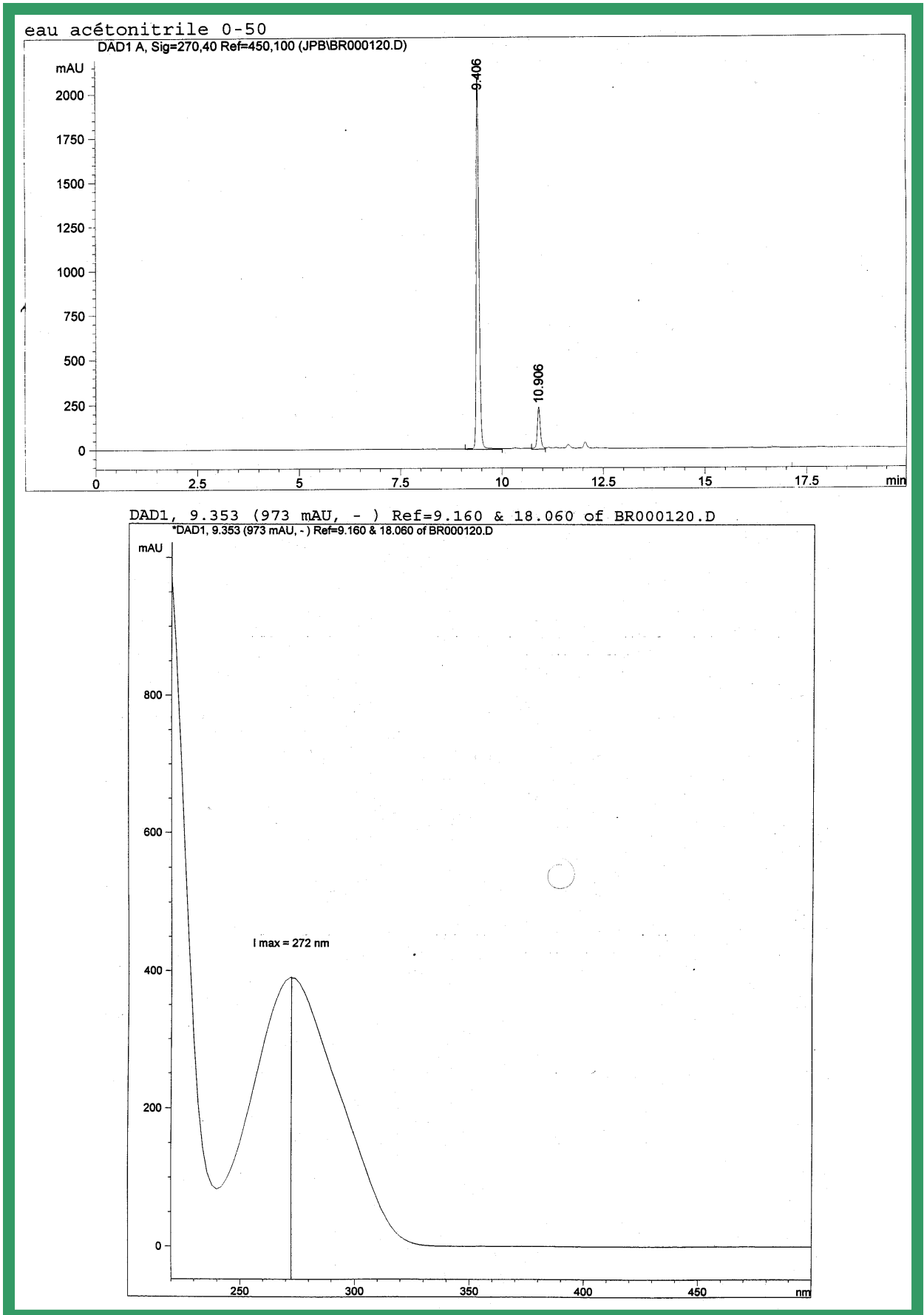


Figure 61 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM1, obtenus par analyse HPLC.

III/ Purification de molécules inhibitrices de la xanthine oxydase chez l'espèce *Weinmannia dichotoma*

Nous avons pu déterminer pour l'espèce *Weinmannia dichotoma* de nombreuses activités biologiques qu'il nous semble essentiel de rappeler :

Tableau XXVI: Activités biologiques détectées sur les extraits bruts des différentes parties de l'espèce *Weinmannia dichotoma*

Partie de plante	Feuilles		Ecorce	
	Acoet	MeOH	Acoet	MeOH
Type d'extrait				
Activité antibiotique (500µg d'extrait /pastille) sur : <i>Erwinia carotovora</i>	-	12 mm	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12 mm	-	-
<i>Corynebacterium accolans</i>	8 mm	9 mm	7 mm	-
Activité inhibitrice sur : Xanthine oxydase (uniquement) + piègeurs de radicaux libres (50µg/mL d'extrait)	Nd 36.8%	Nd 59.9%	82.2% 95.9%	Nd 53.8%
Elastase (50µg/mL d'extrait)	Nd	45.9 %	Nd	62.9 %
Activité cytotoxique sur : Cellules cancéreuses Kb (10 µg/mL d'extrait)	Nd	54.3 %	Nd	72 %
Activité toxique sur : <i>Artemia salina</i>	Nd	++	Nd	+++

Acoet : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol

Le choix de l'extrait à travailler de manière approfondie a été fait pour l'activité inhibitrice sur la xanthine oxydase. C'est donc l'extrait acétate d'éthyle d'écorce qui a été sélectionné.

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s)

Cette approche grossière a eu pour but de déterminer la carte d'identité en HPLC de la molécule active afin de pouvoir la suivre au cours de purifications plus pointues. Elle s'est appuyée sur une purification partielle de cette molécule.

A.1/ Matériel et méthodes

De nombreuses expérimentations ont été abordées mais nous ne nous attacherons qu'à développer celles ayant conduit à un résultat probant.

A.1.1/ Extraction

Il s'agit d'une extraction séquentielle par macération dans deux solvants. Dans un premier temps, la poudre végétale d'écorce (100g) est mise à macérer dans 400 ml de dichlorométhane pendant 24 heures. Le tout est filtré, le filtrat évaporé à sec à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à 45°C, et la poudre végétale mise à sécher pendant 24 heures à 30°C pour évaporer l'excès de solvant. Elle est ensuite mise de nouveau à macérer dans 400 ml d'acétate d'éthyle puis filtrée. Les deux filtrats sont évaporés à sec, pesés, puis testés pour leur activité inhibitrice à l'encontre de la xanthine oxydase.

A.1.2/ Détermination de la polarité des molécules actives par bioguidage

L'extrait brut acétate d'éthyle se révélant le plus actif, il est analysé par chromatographie sur couche mince de silice (Macherey-Nagel, Polygram SilG/UV254), dans différents solvants d'élution, composés d'un mélange CH₂Cl₂-MeOH, en proportions variables afin de rechercher le mélange le plus adéquat. Les R_f (distance de migration de la molécule sur distance du front de solvant) des molécules actives, dans ces différents systèmes d'élution, sont déterminés par la technique de bioguidage.

Celle-ci consiste à faire migrer l'extrait brut sur une plaque de chromatographie sur couche mince. La plaque de chromatographie est alors grattée sur différents niveaux, et la silice récupérée mise à tremper dans de l'acétate d'éthyle. Après une incubation et une sonification de 10 minutes, le tout est filtré sur coton. Le filtrat est alors testé pour son activité inhibitrice contre la xanthine oxydase.

A.1.3/ Purification partielle par bioguidage

Cette purification partielle réalisée, en grande partie grâce à la participation de Jean-François Arrighi, s'est déroulée en deux temps :

A.1.3.1/ Chromatographie flash sur colonne de silice

1g d'extrait brut, préalablement additionné de 1g de célite 545 (Fisher Scientific A.476425) afin de le rendre poudreux, est déposé au sommet d'une colonne (2 cm de diamètre) de silice (gel de silice 60, granulométrie 0,063-0,2 mm, Merk 1.07734).

L'élution est réalisée par un gradient séquencé de solvants CH₂Cl₂-MeOH dont le rapport de proportion v/v évolue par augmentation de 5 en 5 du méthanol soit :

100% CH₂Cl₂ puis 95/5 CH₂Cl₂-MeOH, jusqu'à 50/50 CH₂Cl₂-MeOH

L'activité inhibitrice de la xanthine oxydase des différentes fractions réunies par séquence de solvants est testée à 50µg/mL.

A.1.3.2/ Analyse HPLC des fractions actives et purification par HPLC semi-préparative

Les fractions actives sont analysées en HPLC, dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire des Substances Naturelles de l'IRD (centre de Nouméa), selon les conditions chromatographiques suivantes :

Pompes Waters 510
Injecteur vanne Rhéodyne
Détecteur à barrettes de diodes Waters 996
Logiciel Millennium 32

Conditions de l'analyse :

Colonne : μ bondapack waters C18 250 x 4.6 mm (10 μ m - 125Å)

Gradient d'éluion : t_0 H₂O:Méthanol 70:30 (%) $\rightarrow t_{15\text{min}}$ 100% H₂O:Méthanol 50:50 (%)

Débit: 1 mL.min⁻¹

Détection: 280 nm

Le pool des fractions 22 et 23 issues de la chromatographie flash sur silice est utilisé pour purifier une des molécules inhibitrices de la xanthine oxydase en réalisant une HPLC semi-préparative dans les mêmes conditions que celles précédemment citées. Il a suffi de collecter en sortie de colonne la fraction contenant cette molécule.

A.2/ Résultats et discussion

Les rendements obtenus au cours de l'extraction séquentielle de l'écorce de *Weinmannia dichotoma* ainsi que les activités inhibitrices détectées sont fournis dans la figure 62 qui récapitule l'ensemble du travail préliminaire réalisé. On constate que l'extraction au dichlorométhane qui joue un rôle de délipidation permet d'éliminer une grande partie de molécules très peu actives.

La chromatographie flash sur colonne de silice fournit 7 pools de fractions réunies par séquence de solvant ; seul deux d'entre eux présentent une forte activité inhibitrice. L'étude plus approfondie des fractions constitutives du pool C, par analyse HPLC et chromatographie sur couche mince nous a conduit à rassembler les fractions 22 et 23.

L'HPLC semi-préparative du mélange des fractions 22 et 23, a permis la purification partielle d'une des molécules actives dont le profil d'éluion dans les conditions fixées et le spectre ultraviolet nous ont servi pour une purification à plus grande échelle (Figure 63).

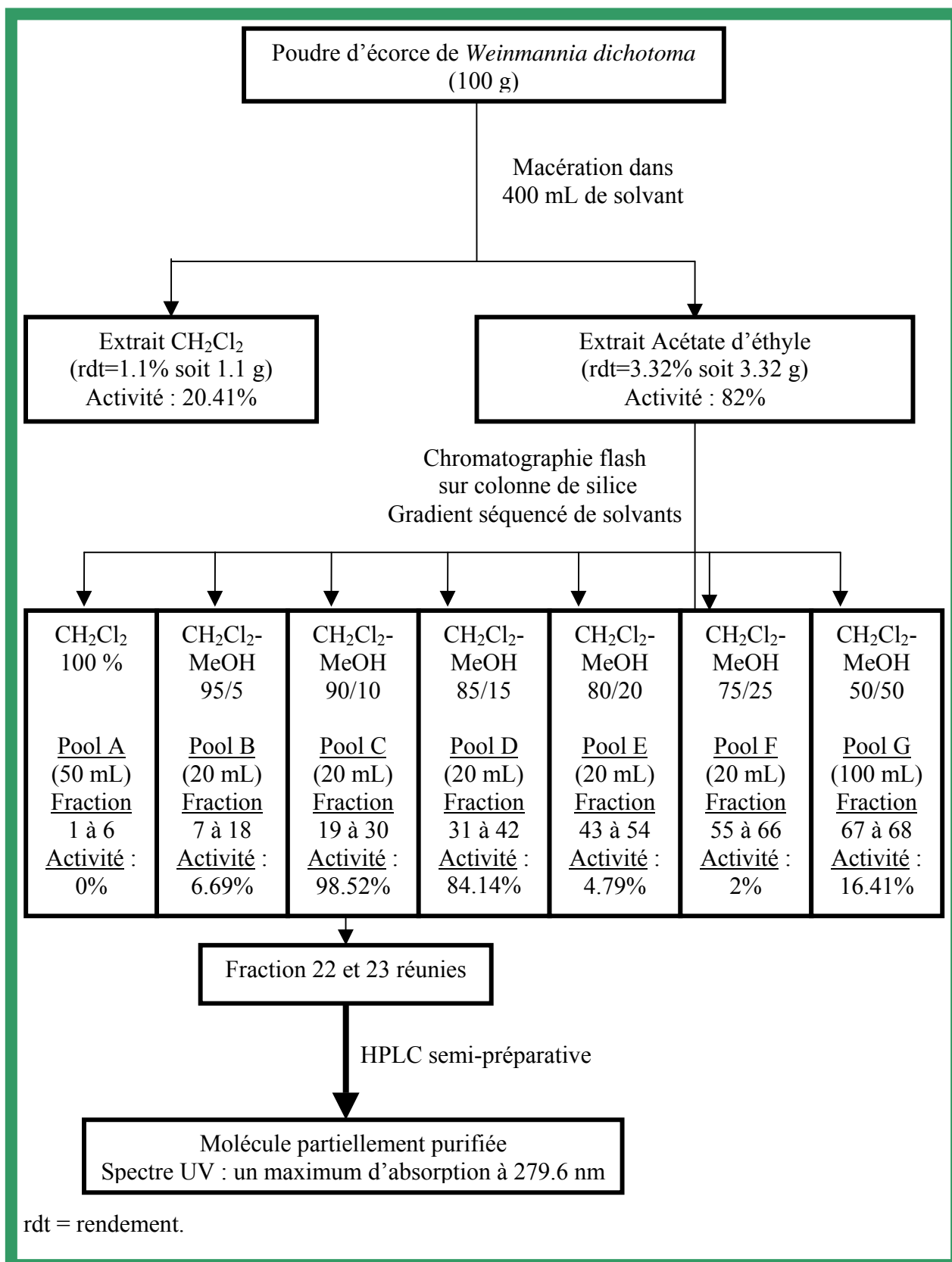


Figure 62: Schéma récapitulatif du protocole expérimental de purification partielle de l'une des molécules inhibitrices de la xanthine oxydase extraite par l'acétate d'éthyle de l'écorce de *Weinmannia dichotoma*.

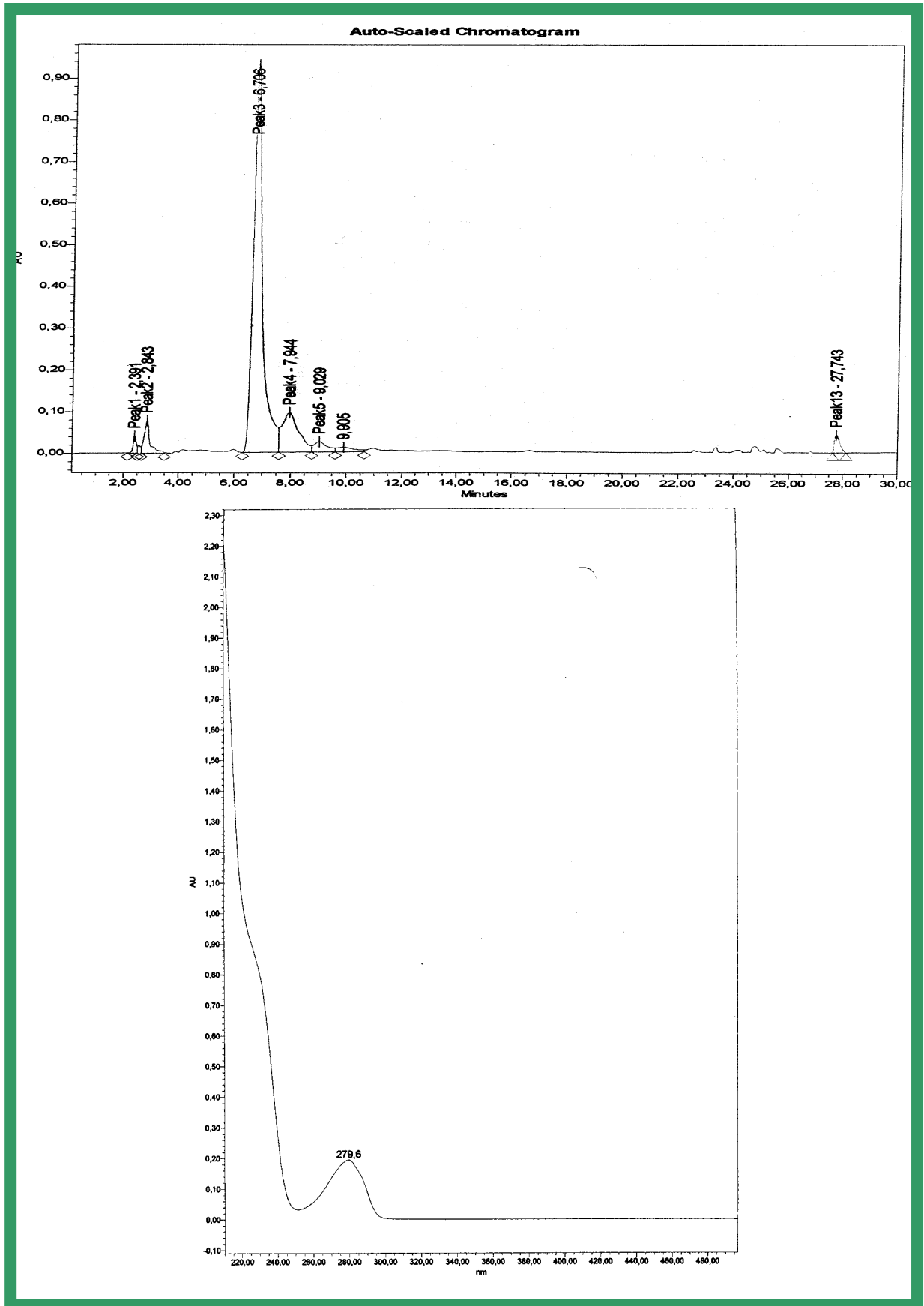


Figure 63: Analyse HPLC d'une molécule inhibitrice de la xanthine oxydase obtenue après fractionnements successifs de l'extrait acétate d'éthyle d'écorce de *Weinmannia dichotoma* ; profil d'élution et spectre ultraviolet .

B/ Purification de molécules extraites d'écorce de *Weinmannia dichotoma*

Après ce travail préliminaire, une purification en quantité plus importante des molécules bioactives a été conduite, à la fois en utilisant les données précédemment présentées, mais aussi à partir de résultats de manipulations ponctuelles non détaillées.

Ces travaux de purification se sont déroulés en deux temps. Dans un premier temps une extraction et un fractionnement grossier par séparation liquide/liquide ont été effectués au sein de notre laboratoire (L.B.P.V.A.). Puis, le fractionnement sur colonne et le suivi HPLC ont eu lieu au sein du Laboratoire de Chimie Analytique Appliquée de l'Université de Polynésie Française à Papeete, au cours du même stage de 3 semaines.

B.1/ Matériel et méthodes

B.1.1/ Extraction

La poudre végétale d'écorce de *Weinmannia dichotoma* (200 g) est extraite de façon successive par trois solvants différents, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Cette extraction est réalisée en continu à l'aide d'un extracteur de Soxhlet selon la même protocole que celui appliqué à l'espèce *Cunonia macrophylla*.

Le solvant chargé en molécules est récupéré, puis évaporé à sec sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-114. L'extrait brut ainsi obtenu est pesé pour la détermination du rendement d'extraction, avant d'être stocké au réfrigérateur à 4°C, jusqu'à son utilisation. Chacun des extraits obtenus est testé pour son activité inhibitrice sur la xanthine oxydase.

B.1.2/ Fractionnement liquide/liquide

L'extrait acétate d'éthyle sélectionné, est fractionné par séparation liquide/liquide. 10 g de cet extrait sont solubilisés dans 200 mL d'acétate d'éthyle. L'apparition d'un précipité nous conduit à centrifuger puis filtrer l'ensemble. La partie soluble est alors extraite par 3 lavages successifs à l'eau (200mL) dans une ampoule à décanter d'une capacité de 500 mL. Les deux phases, aqueuse et organique, sont récupérées, filtrées, évaporées à sec sous pression réduite, pesées puis testées pour leur activité inhibitrice sur la xanthine oxydase.

B.1.3/ Fractionnement sur colonne de la phase organique

Le fractionnement conduisant à la purification des molécules s'effectue à l'aide d'une colonne de type Spherisorb 5 μ ODS2 25cmx20mm Col Prolabo (ref 32621605)

L'extrait organique (1g) est préalablement solubilisé dans un solvant composé d'un mélange eau:acétonitrile 1:1 (v/v). L'apparition d'un précipité nous conduit à centrifuger l'échantillon à 4500 trs/min pendant 10 min (centrifugeuse HETTICH EBA 3S). Le surnageant est ensuite passé sur une colonne de type Sep-Pack C18 (Waters Vac 12cc-2g) pour être séparé en deux parties. La première provenant d'une élution par un solvant composé d'un mélange eau:acétonitrile 1/1 (v/v) et la seconde par de l'acétonitrile seul. La fraction éluee par le mélange eau:actéonitrile est solubilisée dans l'eau, centrifugée avant d'être injectée sur la colonne sphérisorb. Le solvant d'élution (mélange d'eau et d'acétonitrile) est injecté par une pompe (Jasco PU 980, HPLC pump) à un débit de 10 mL/min sous une pression de 60 à 70 kg/cm² selon :

Solvant	% H ₂ O	% Acétonitrile	Volume
1	100	0	120 mL
2	95	5	120 mL
3	90	10	120 mL
4	85	15	120 mL
5	80	20	120 mL
6	75	25	120 mL
7	70	30	120 mL
8	65	35	120 mL
9	60	40	120 mL
10	55	45	120 mL
11	50	50	120 mL

Les fractions obtenues sont récupérées dans des tubes de 25 mL à raison de 10 mL par tube toutes les minutes grâce à un collecteur de fractions (Eldex Universal Fraction Collector).

Chaque fraction collectée fait l'objet d'une analyse HPLC.

B.1.4/ Caractéristiques de l'HPLC et conditions de l'analyse

Le matériel instrumental est de la marque Hewlett Packard, HP séries 1100, composé des modules suivants :

- Dégazeur G 1322A
- Pompe quaternaire G 1311A
- Injecteur automatique G 1313A
- Détecteur à barettes de diode G 1315A

Le logiciel associé est HP-ChemStation version Rev.A.05.02(273) 1990-1997.

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

Colonne: Lichrospher C18 250 x 4,6 mm (5 µm- 100 Å)

Débit: 1 mL.min⁻¹

Détection: 280 nm

Gradient d'élution :

Temps (min)	Eau	Acétonitrile
0	100 %	0 %
2	100 %	0 %
13.5	50 %	50 %
15.5	50%	50 %
16.5	100 %	0 %
20	100 %	0 %

B .2/ Résultats et discussion

Les rendements d'extraction de l'écorce de *W. dichotoma* obtenus au cours de l'extraction proprement dite et de la séparation liquide/liquide sont fournis dans la figure 64. On remarque de nouveau que les rendements d'extraction comparés à ceux du travail préliminaire ont considérablement augmenté grâce à l'extraction en continu au Soxhlet.

Quant aux séparations liquide/liquide effectuées sur l'extrait acétate d'éthyle, elles ont eu pour effet de diminuer la masse de molécules mais contrairement aux résultats obtenus pour *C. macrophylla*, l'activité s'est répartie de manière équitable à chaque fois, il existerait donc de nombreuses molécules présentant une activité inhibitrice. Notre choix s'est porté sur l'extrait organique pour sa plus grande capacité de solubilisation et pour son profil d'élution HPLC montrant un nombre plus réduit de molécules semblant plus aisées à séparer.

Le fractionnement sur la colonne de phase inverse de type Sphérisorb, nous a permis de séparer 4 molécules (Figure 64). Leurs profils d'élution ainsi que leurs spectres ultraviolets ont pu être obtenus en HPLC (Figures 65 à 68). Seules les molécules WD3 et WD4 (Figures 67 et 68) ont une allure spectrale proche, comparable à celle de la molécule partiellement purifiée au cours des travaux préliminaires. La molécule WD3 en particulier a pu être purifiée par recristallisation du fait de sa différence de solubilité entre l'eau et le méthanol. Les molécules WD1 et WD2 sont, quant à elles, différentes l'une de l'autre avec un spectre présentant un seul maximum d'absorption de 272.4 nm pour WD1 (Figure 65) contre deux maximums à 261 et 296 nm pour WD2 (Figure 66).

Une seule d'entre-elles, la molécule WD3, a été purifiée en quantité suffisante pour être analysée. Il paraît donc essentiel de poursuivre ces travaux d'approches sur l'espèce *Weinmannia dichotoma* pour l'isolement de nouvelles molécules bioactives.

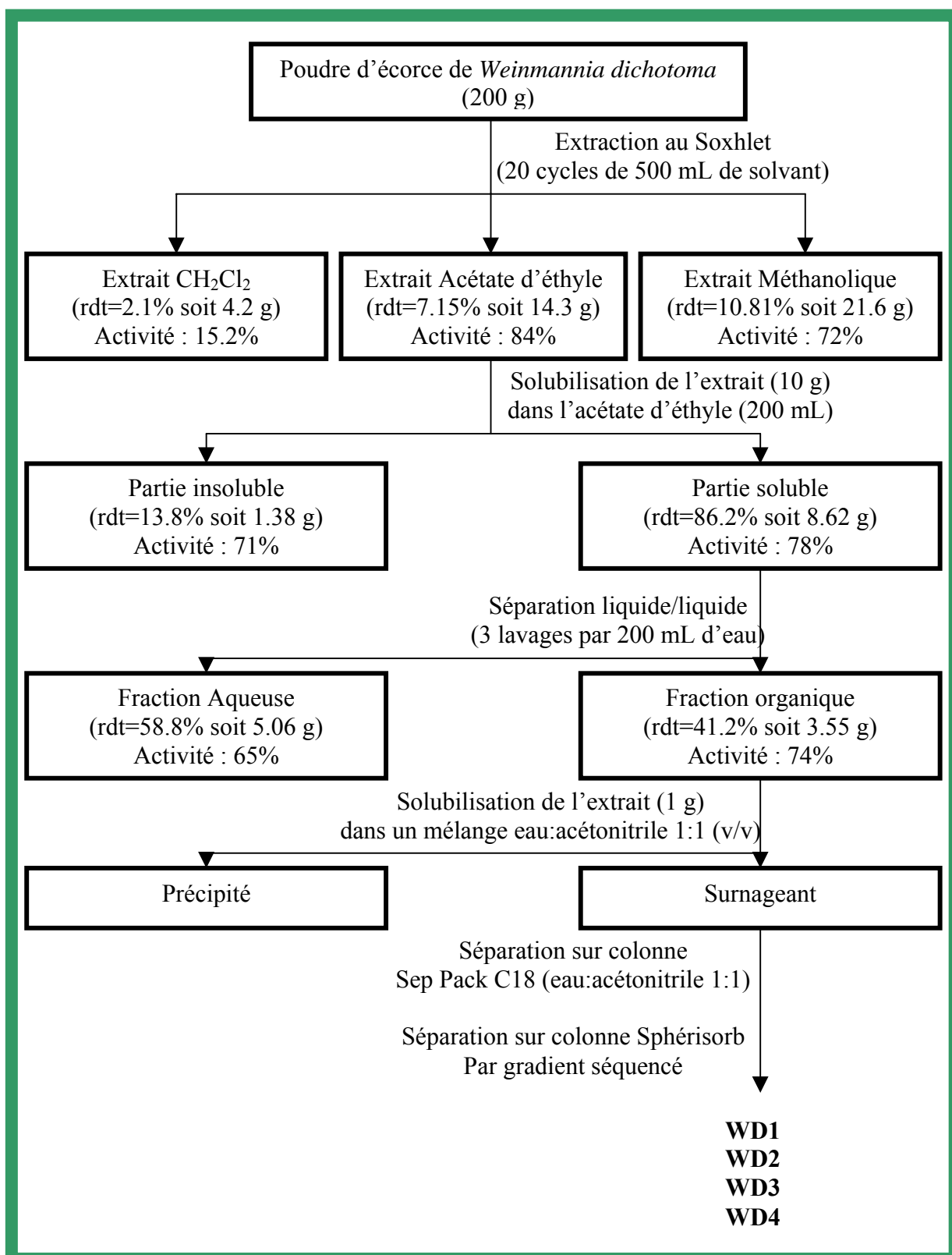


Figure 64 : Schéma récapitulatif des stratégies de purification des molécules inhibitrices de la xanthine oxydase extraites par l'acétate d'éthyle de l'écorce de *W. dichotoma*.

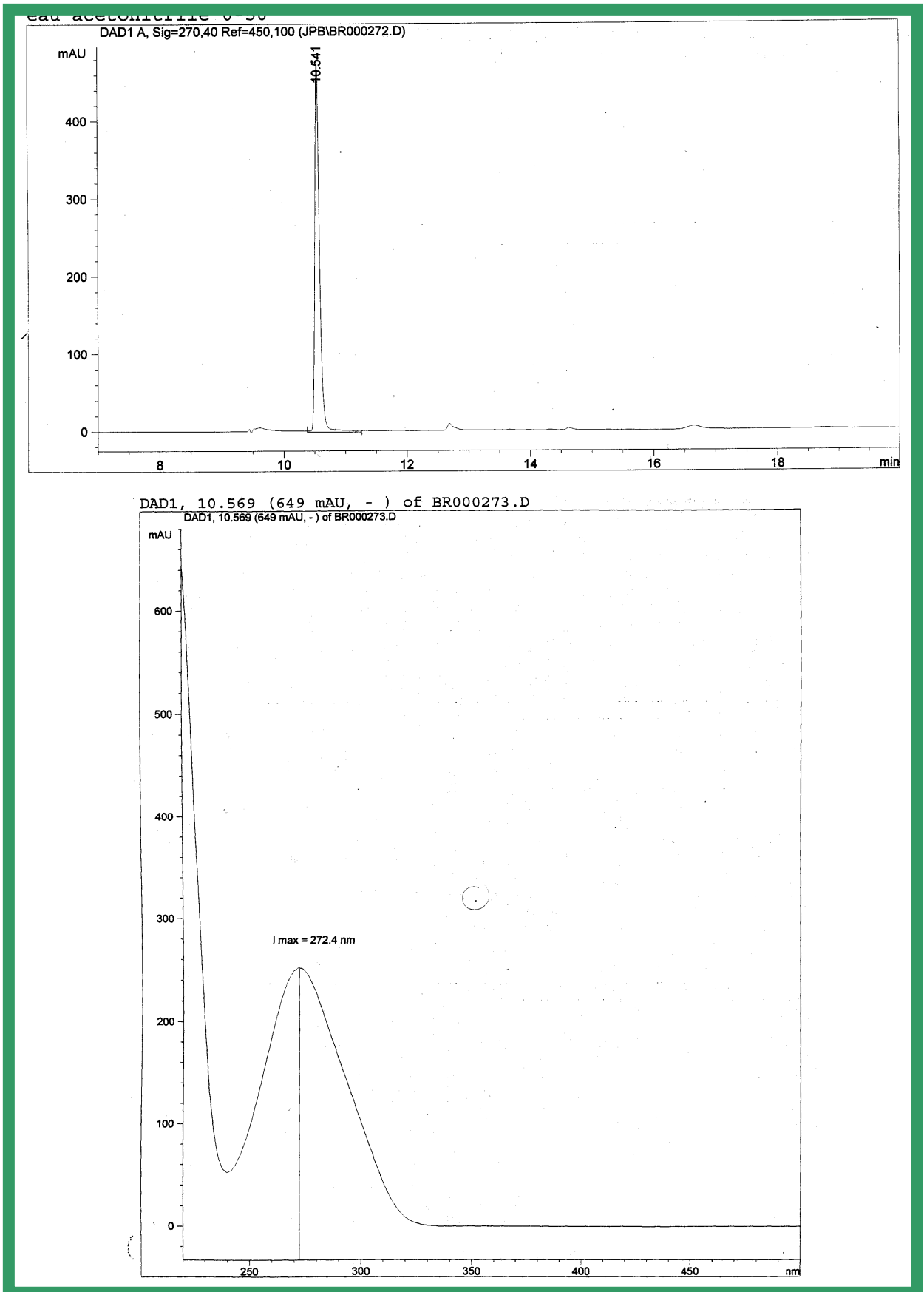


Figure 65: Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée WD1, obtenus par analyse HPLC.

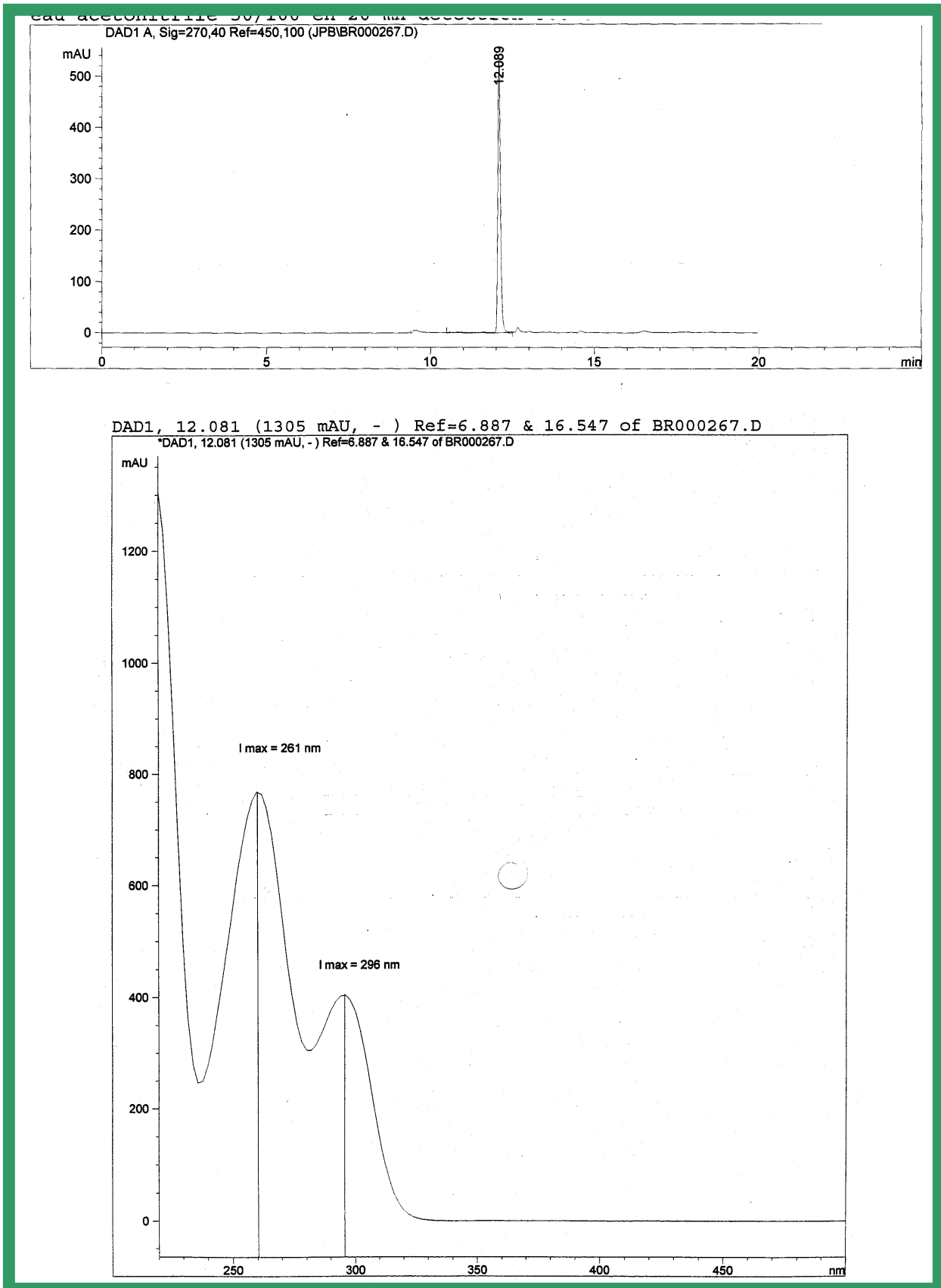


Figure 66: Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée WD2, obtenus par analyse HPLC.

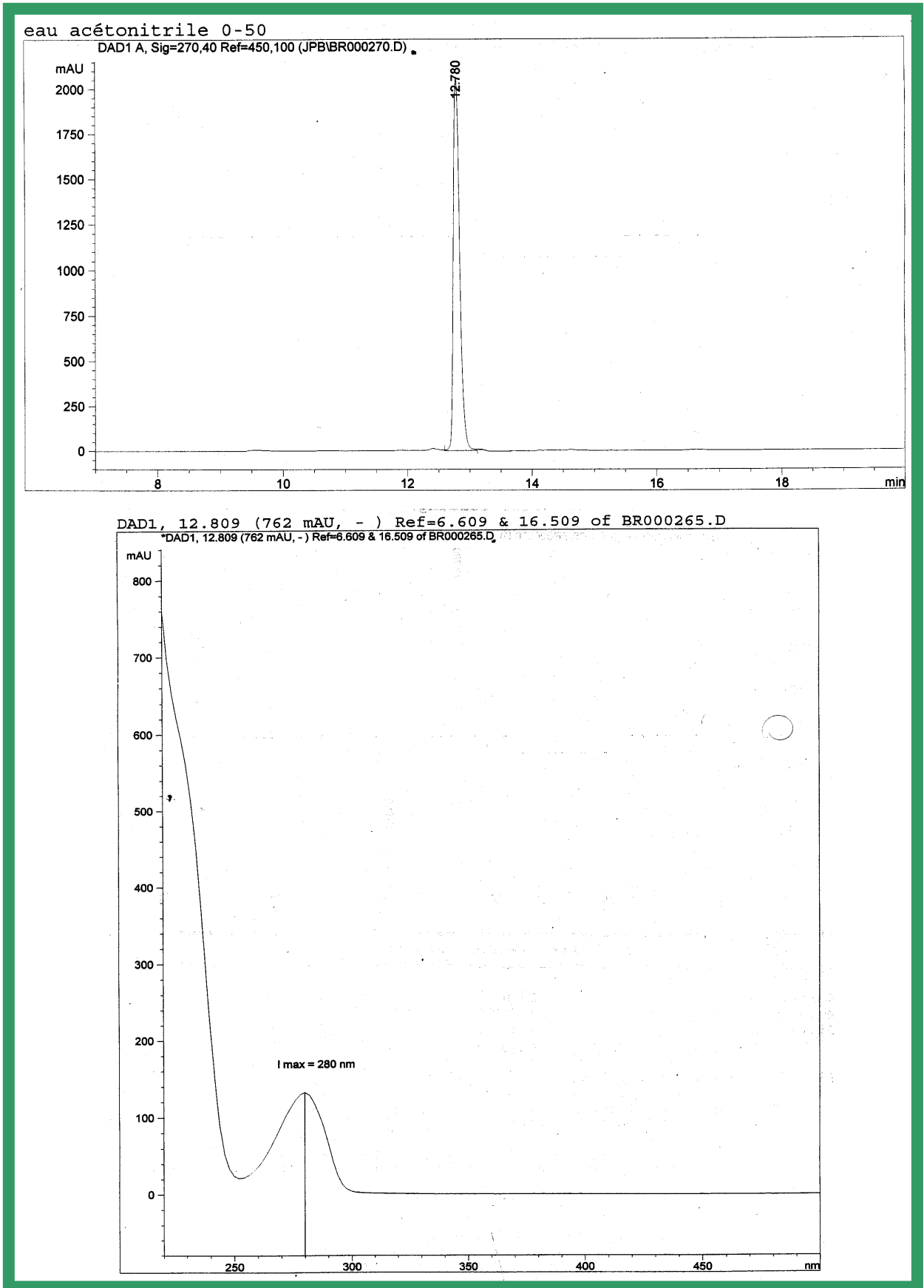


Figure 67: Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée WD3, obtenus par analyse HPLC.

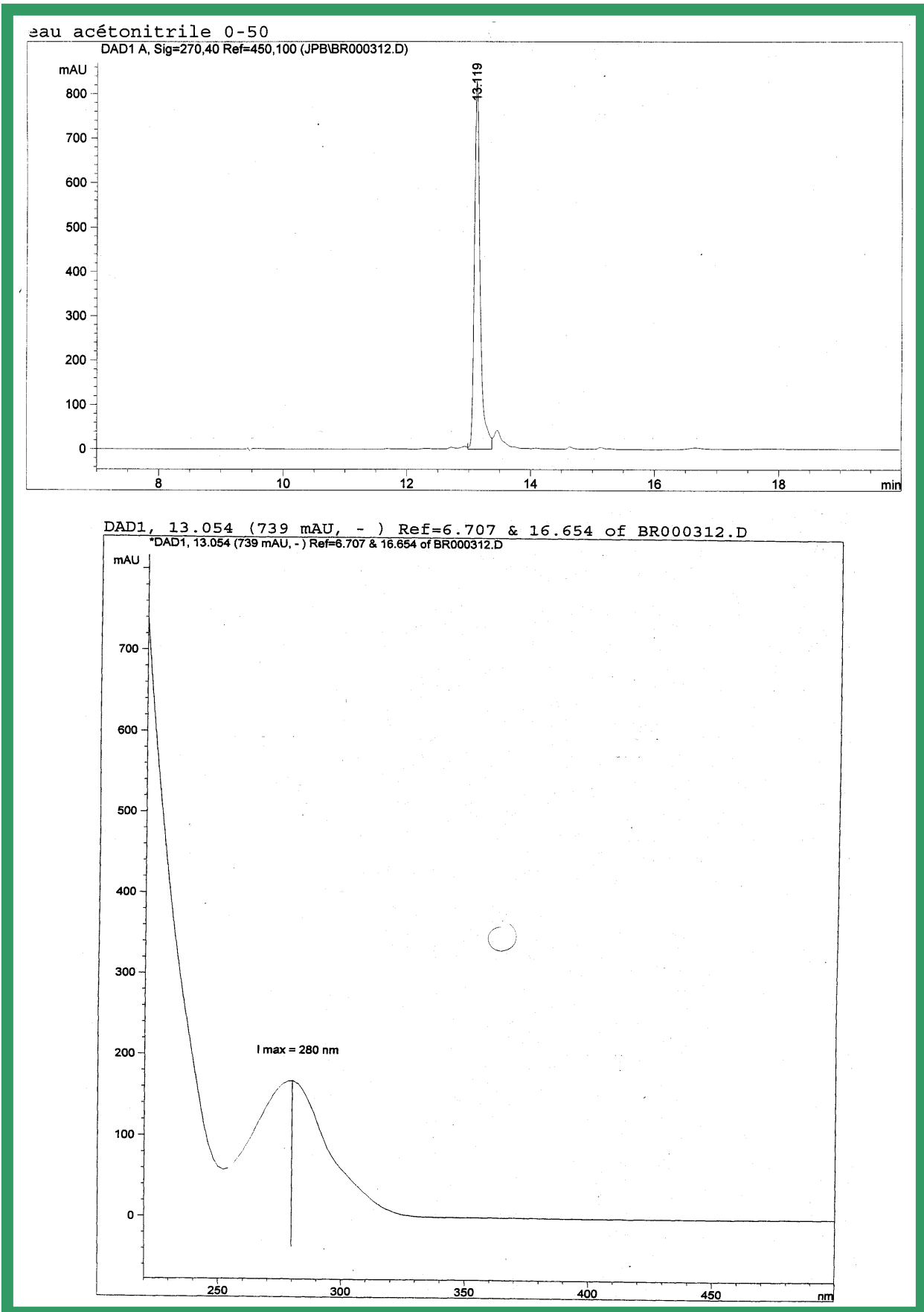
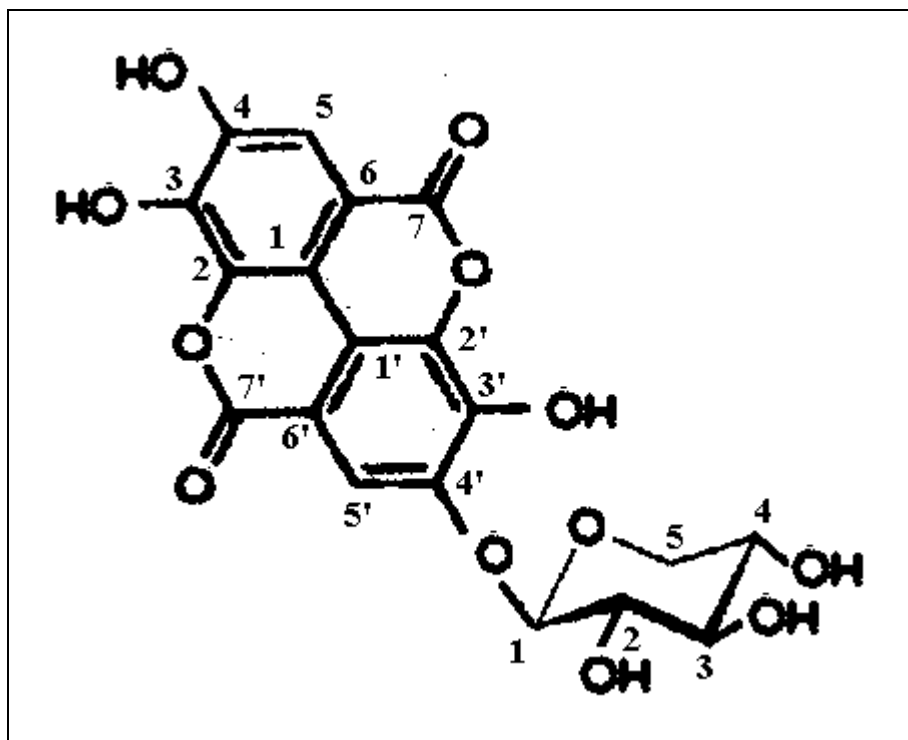


Figure 68: Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée WD4, obtenus par analyse HPLC.

PARTIE III

Chapitre 2 :

Identification structurale des
molécules purifiées
de *Cunonia macrophylla* et
Weinmannia dichotoma



Structure de l'acide ellagique 4'-O- β -D xylopyranoside
extrait des feuilles de *Cunonia macrophylla*

CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION STRUCTURALE DES MOLECULES PURIFIEES DE *CUNONIA MACROPHYLLA* ET *WEINMANNIA DICHOTOMA*

Les différentes molécules plus ou moins purifiées en quantité plus ou moins importante ont été analysées afin de déterminer leur structure. Toutes ces analyses ont permis d'identifier une quinzaine de molécules. Les autres n'ont pu l'être soit par manque de quantité soit par la présence d'impuretés trop importantes.

L'ensemble des analyses a été effectué par le Dr R. Faure, au Centre Régional de RMN (CRRMN) à l'Université d'Aix-Marseille III, Faculté des sciences et Techniques de Saint-Jérôme.

I/ Matériel et méthodes

En fonction de la molécule étudiée, la RMN du proton (RMN¹H) et la RMN du carbone (RMN¹³C) ont été réalisées. Le solvant le plus communément utilisé a été le méthanol deutérié (CD₃OD) excepté pour les molécules CM2 et CM3 solubilisées dans du diméthyl sulfoxyde deutérié (DMSO-d₆).

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont tous été enregistrés sur un appareil à 500 MHz en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence. Pour certaines molécules, la RMN ¹³C 2D a été utilisée, et ceci selon deux techniques, le HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) qui permet d'établir les corrélations entre les atomes de carbone et les protons directement associés et le HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), qui permet de déterminer les corrélations entre H et C plus distants (jusqu'à 4 liaisons), c'est à dire celles qui s'exercent à travers les liaisons présentes dans la molécule.

II/ Résultats et discussion

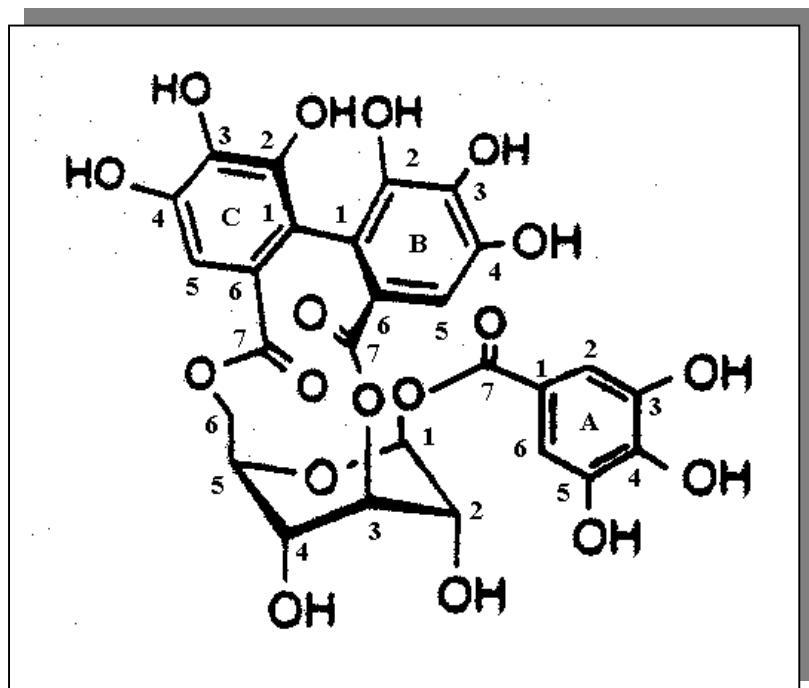
A/ Etude des molécules purifiées de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla*

Les analyses structurales ont donné des résultats interprétables pour 12 des 20 molécules purifiées. Deux grands groupes de métabolites secondaires ont été identifiés, des tanins (ellagiques et galliques) et des flavonoïdes (flavonol et hétérosides flavonoïdiques dérivés de la quercétine). Nous étudierons séparément ces deux grands groupes.

A.1/ Tanins ellagiques et galliques identifiés

Sept des douze molécules identifiées sont des tanins hydrolysables. Toutes sont connues, cependant certaines n'avaient jamais été détectées au sein de la famille des Cunoniaceae. Les caractéristiques physiques et spectrales de chacune sont établies ci-dessous.

Les données bibliographiques montrent que l'utilisation de la RMN du proton suffit dans la plupart des cas à identifier le tanin ellagique en présence, puisqu'elle permet d'attribuer aisément les protons galloyls et HHDP (hexahydroxydiphenyl) ainsi que ceux du sucre constitutif, le glucose. Seuls les groupements supplémentaires restent à déterminer et ce sont le plus souvent des sucres (galactose, glucose, xylose).

A.1.1/ Structure**Corilagine CM22**

$C_{27}H_{22}O_{18}$

634 g.mol^{-1}

poudre jaune

solubilité : Méthanol ou eau

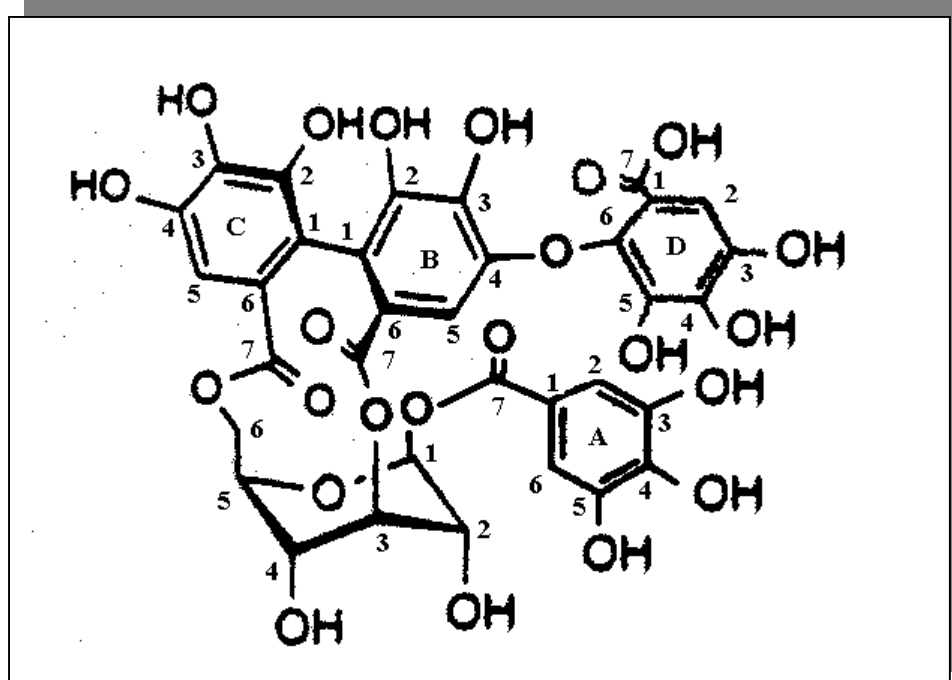
point de fusion : 211-212°C

UV (eau + acétonitrile): $\lambda_{\text{max}} = 269 \text{ nm}$

Tableau XXVII : RMN ^1H et RMN ^{13}C de la molécule CM22, la corilagine.

Carbone	RMN ^1H			RMN ^{13}C Résultats Expérimentaux CD ₃ OD
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques		
		Lee <i>et al.</i> , 1990 Acetone-d ₆	Nawwar <i>et al.</i> , 1994 DMSO-d ₆	
Galloyl A				
1	-	-	-	120.57
2	7.04 s	7.12 s	7.03 s	110.95
3	-	-	-	146.35
4	-	-	-	140.39
5	-	-	-	146.35
6	7.04 s	7.12 s	7.03 s	110.95
7	-	-	-	166.68
HHDP Cycle B				
1	-	-	-	117.18
2	-	-	-	145.32
3	-	-	-	138.16
4	-	-	-	145.58
5	6.68 s	6.69 s	6.58 s	110.19
6	-	-	-	125.49
7	-	-	-	166.50
Cycle C				
1	-	-	-	116.65
2	-	-	-	145.22
3	-	-	-	137.62
4	-	-	-	146.00
5	6.65 s	6.84 s	6.49 s	108.29
6	-	-	-	125.40
7	-	-	-	170.09
Sucre				
1	6.36 brs	6.38 brs	6.20 d, $J = 7.3$ Hz	94.99
2	3.98 brs	4.01 m	3.88 dd, $J = 7.3; 2.3$ Hz	69.39
3	4.80 brs	4.83 m	4.58 brs	71.56
4	4.46 brs	4.43 m	4.22 brs	62.42
5	4.51 t, $J = 9.5$ Hz	4.64 m	4.35 t, $J = 7.3$ Hz	76.14
6	4.14 dd, $J = 10.5; 8.3$ Hz 4.95 t, $J = 10.2$ Hz	4.20 m 5.08 m	4.25 dd, $J = 11.2; 6.2$ Hz 3.99 dd, $J = 11.2; 6.2$ Hz	64.98

Acide mallotinique CM18


 $C_{34}H_{26}O_{23}$
802 g.mol⁻¹

poudre brun pâle

solubilité : Méthanol

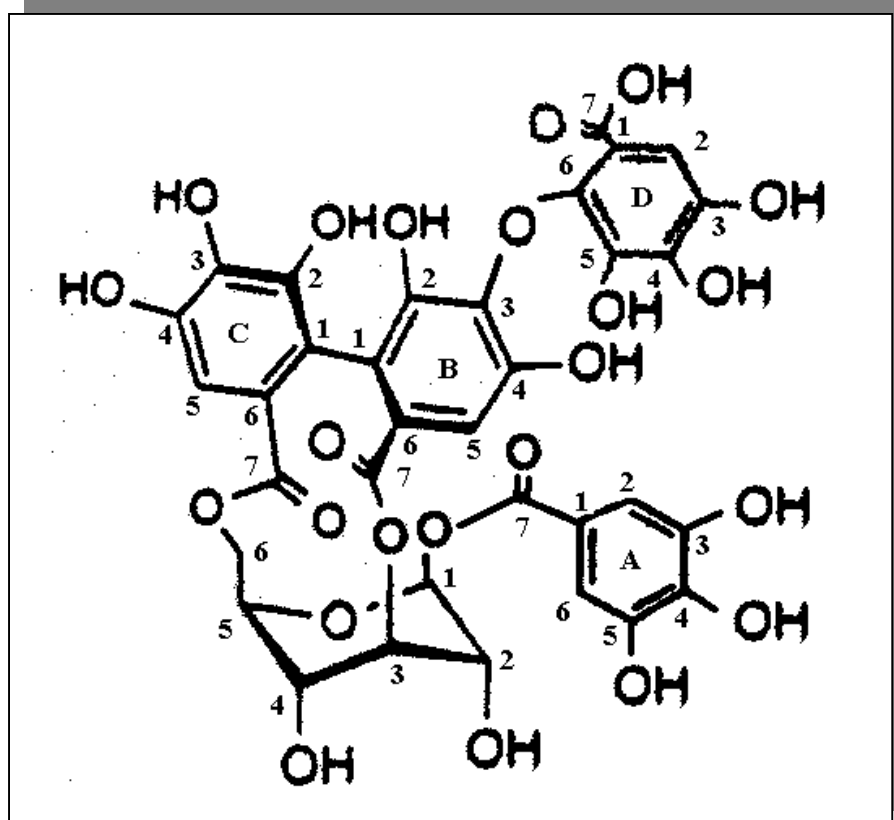
UV (eau + acétonitrile): $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm}$ Tableau XXVIII : RMN ¹H de la molécule CM18, l'acide mallotinique.

Carbone	RMN ¹ H	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lee <i>et al.</i> , 1990 Acetone-d ₆
Galloyl A		
1	-	-
2	7.13 s	7.10 s
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7.13 s	7.10 s
7	-	-

Tableau XXVIII (suite)

Carbone	RMN ¹ H	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lee <i>et al.</i> , 1990 Acetone-d ₆
HHDP Cycle B		
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	6.64 s	6.51 s
6	-	-
7	-	-
Cycle C		
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	6.82 s	6.72 s
6	-	-
7	-	-
Cycle D		
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	6.81 s	7.13 s
6	-	-
7	-	-
Sucre		
1	6.28 d, <i>J</i> = 3.2 Hz	6.35 d, <i>J</i> = 2 Hz
2	3.98 brs	4.07 brs
3	4.74 brs	4.81 d, <i>J</i> = 3 Hz
4	4.41 brs	4.40 d, <i>J</i> = 3 Hz
5	4.46 t, <i>J</i> = 8.9 Hz	4.47 t, <i>J</i> = 8 Hz
6	4.11 dd, <i>J</i> = 10.7; 7.8 Hz	4.06 dd, <i>J</i> = 8 ; 11 Hz
	4.69 t, <i>J</i> = 10.7 Hz	4.80 t, <i>J</i> = 11 Hz

Mallorépanine CM21


 $C_{34}H_{26}O_{23}$
802 g.mol⁻¹

poudre brun pâle

solubilité : Méthanol

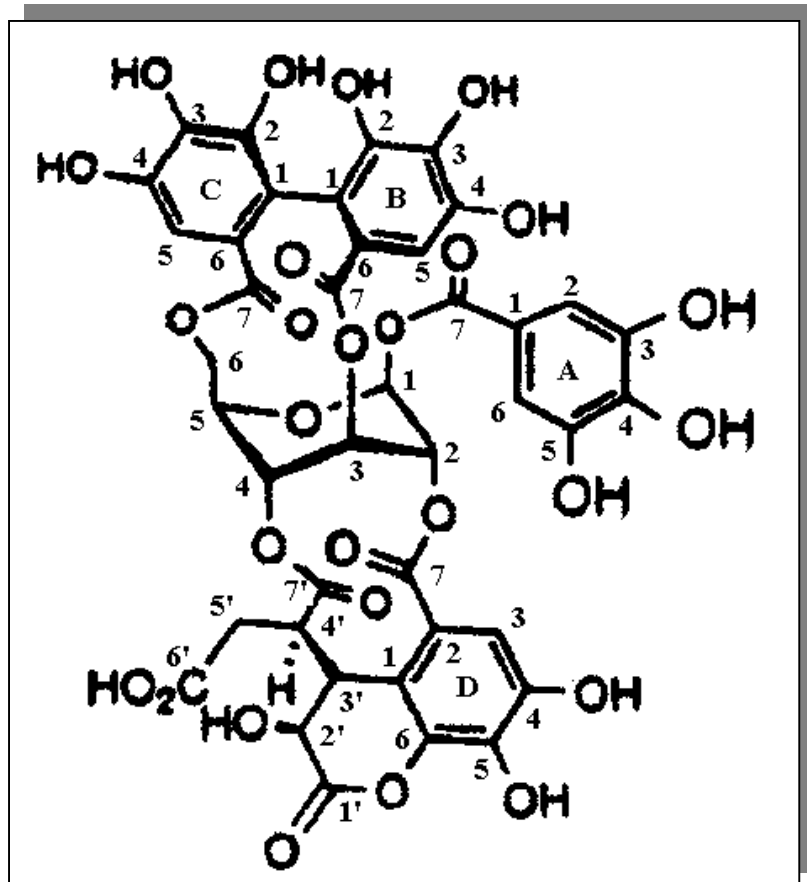
UV (eau + acétonitrile): $\lambda_{\max} = 265$ nmTableau XXIX: RMN ¹H et RMN ¹³C de la molécule CM21, la mallorépanine.

Carbone	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD
Galloyl A		
1	-	120.73
2	7.13 s	111.38
3	-	146.31
4	-	140.76
5	-	146.31
6	7.04 s	111.38
7	-	166.82

Tableau XXIX (suite)

Carbone	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD
HHDP Cycle B		
1	-	118.79
2	-	146.24
3	-	139.79
4	-	147.71
5	6.68 s	109.86
6	-	125.50
7	-	168.56
Cycle C		
1	-	116.48
2	-	145.27
3	-	137.61
4	-	145.93
5	6.66 s	108.26
6	-	124.86
7	-	169.63
Cycle D		
1	-	119.33
2	-	109.45
3	-	143.34
4	-	138.94
5	6.93 s	140.28
6	-	137.90
7	-	171.95
Sucre		
1	6.28 d, $J = 3.3$ Hz	94.23
2	3.94 brs	70.42
3	4.74 brs	74.32
4	4.41 brs	62.95
5	4.46 t, $J = 8.9$ Hz	76.65
6	4.10 dd, $J = 10.8 ; 7.9$ Hz 4.68 t, $J = 10.7$ Hz	64.94

Acide chébulagique CM24


 $C_{41}H_{30}O_{27}$
954 g.mol⁻¹

poudre jaune

solubilité : Méthanol

point de fusion : 178-180°C

UV (eau + acétonitrile): $\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}$ Tableau XXX : RMN ¹H de la molécule CM24, l'acide chébulagique.

Carbone	RMN ¹ H	
	Résultats expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1996 Acetone-d ₆ + D ₂ O
Galloyl A		
1	-	-
2	7.18 s	7.18 s
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7.10 s	7.18 s
7	-	-

Tableau XXX (suite)

Carbone	RMN ¹ H	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1996 Acetone-d ₆ + D ₂ O
HHDP Cycle B		
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	6.87 s	6.68 s
6	-	-
7	-	-
Cycle C		
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	6.66 s	6.35 s
6	-	-
7	-	-
Partie chébulagique		
1'	-	-
2'	Non visible	4.91 d, <i>J</i> = 7 Hz
3'	5.06 d, <i>J</i> = 8 Hz	5.10 d, <i>J</i> = 7 Hz
4'	3.82 d, <i>J</i> = 12 Hz	3.84 m
5'	(2H) 2.20 m	(2H) 2.18 m
6'	-	-
7'	-	-
Cycle D		
1	-	-
2	-	-
3	7.5 s	7.2 s
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
Sucre		
1	6.53 s	6.53 s
2	5.42 brs	5.52 brs
3	5.85 brs	5.92 brs
4	5.25 brs	5.25 d, <i>J</i> = 3 Hz
5	4.84 t	4.86 brt, <i>J</i> = 9 Hz
6	4.39 d	4.44 dd, <i>J</i> = 11; 8 Hz
	4.81 d	4.75 d, <i>J</i> = 10 Hz

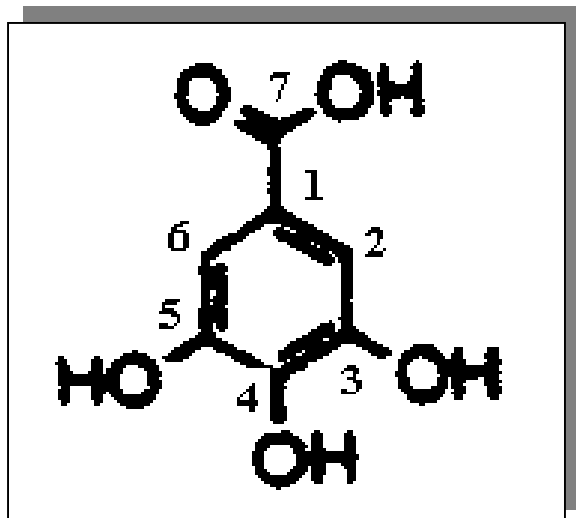
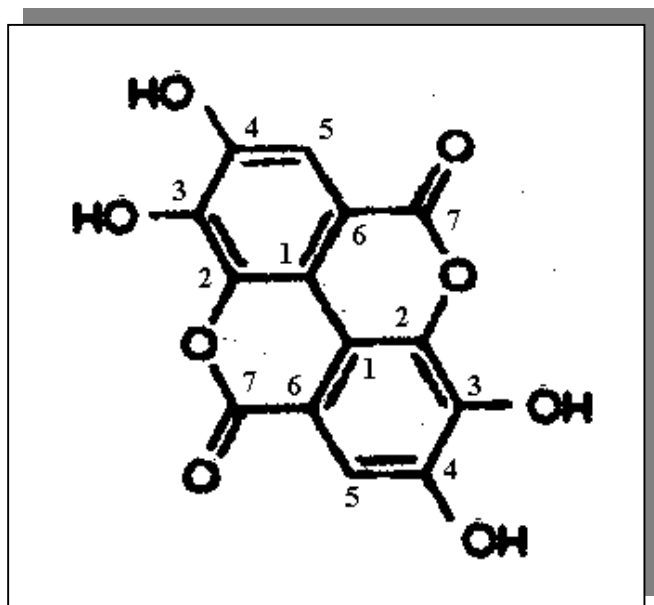
Acide gallique CM17 (+ acide ellagique)
 $C_7H_6O_5$
 $170 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
solubilité : Méthanol

Tableau XXXI : RMN ^1H de la molécule CM17, l'acide gallique.

Carbone	RMN ^1H	
	Résultats expérimentaux CD_3OD	Données bibliographiques Foo, 1993 $\text{Acetone-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$
1	-	-
2	7.06 s	7.17 s
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	7.06 s	7.17 s
7	-	-

Remarque : la détection de l'acide gallique associé à l'acide ellagique au sein de la molécule CM17 provient sans aucun doute de la dégradation de la molécule purifiée, il nous est donc impossible de la définir. Nous ne pouvons que supposer qu'elle contient ces deux types d'éléments.

Acide ellagique CM2



$C_{14}H_6O_8$

$302 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

poudre jaune pâle

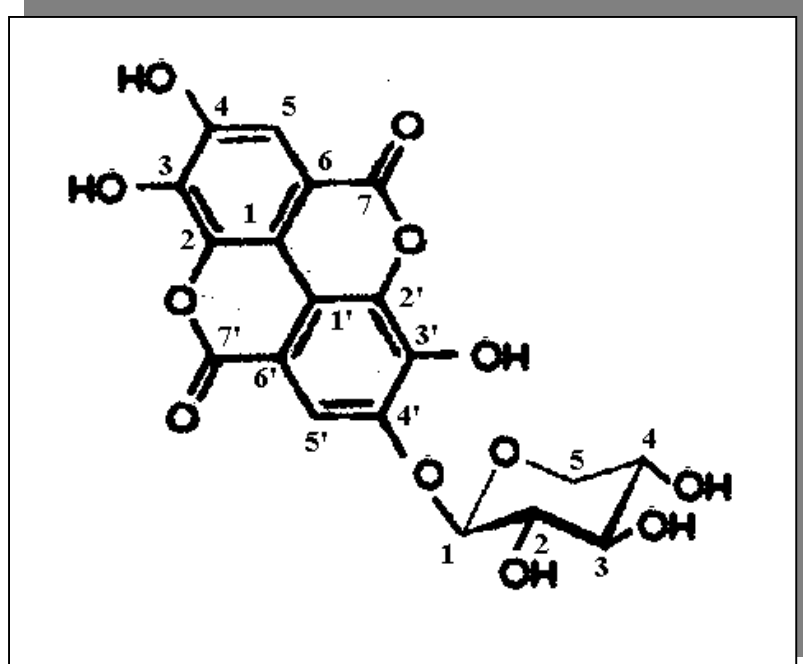
solubilité : Diméthylsulfoxyde (DMSO)

UV (eau + acétonitrile): $\lambda_{\text{max}} = 254$ et 368 nm

Tableau XXXII : RMN ^1H et RMN ^{13}C de la molécule CM2, l'acide ellagique.

Carbone	RMN ^1H			RMN ^{13}C	
	Résultats Expérimentaux DMSO- d_6	Données bibliographiques		Résultats Expérimentaux DMSO- d_6	Données bibliographiques Li <i>et al.</i> , 1999 DMSO- d_6
		Nawwar <i>et al.</i> , 1994 DMSO- d_6	Li <i>et al.</i> , 1999 DMSO- d_6		
1	-	-	-	112.39	112.2
2	-	-	-	136.47	136.3
3	-	-	-	139.62	139.4
4	-	-	-	148.18	148.2
5	7.55 s	7.5 s	7.45 s	110.34	110.2
6	-	-	-	107.76	107.6
7	-	-	-	159.20	159.0

Acide ellagique 4'-O-β-D xylopyranoside CM3



C₁₉H₈O₁₃

444 g.mol⁻¹

poudre rose

solubilité : DMSO

UV : (eau + acétonitrile): λ_{max} = 254 et 361 nm

Tableau XXXIII : RMN ¹H et RMN ¹³C de la molécule CM3, l'acide ellagique xylose.

Carbone	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	Résultats Expérimentaux DMSO-d ₆	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1998 DMSO-d ₆	Résultats Expérimentaux DMSO-d ₆	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1998 DMSO-d ₆
1	-	-	111.78	111.7
2	-	-	136.19	136.1
3	-	-	139.65	139.7
4	-	-	148.84	148.8
5	7.47 s	7.48 s	110.51	110.3
6	-	-	107.73	107.2
7	-	-	159.06	159

Tableau XXXIII (suite)

Carbone	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	Résultats Expérimentaux DMSO-d ₆	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1998 DMSO-d ₆	Résultats Expérimentaux DMSO-d ₆	Données bibliographiques Tanaka <i>et al.</i> , 1998 DMSO-d ₆
1'	-	-	114.90	114.8
2'	-	-	136.83	136.7
3'	-	-	140.87	141.3
4'	-	-	146.95	146.9
5'	7.69 s	7.69 s	111.46	111.5
6'	-	-	108.36	108.1
7'	-	-	158.96	158.9
Sucre				
1	4.99 d, <i>J</i> = 7.4 Hz	4.98 d, <i>J</i> = 7 Hz	102.89	102.9
2	*	3.30 m	73.12	73
3	*	3.30 m	75.57	75.5
4	*	3.30 m	69.40	69.3
5	3.85 dd, <i>J</i> = 4.4 ; 10.3 Hz *	3.83 dd, <i>J</i> = 5 ; 11 Hz 3.30 m	65.95	65.8

* Massif 3.28-3.45 ppm

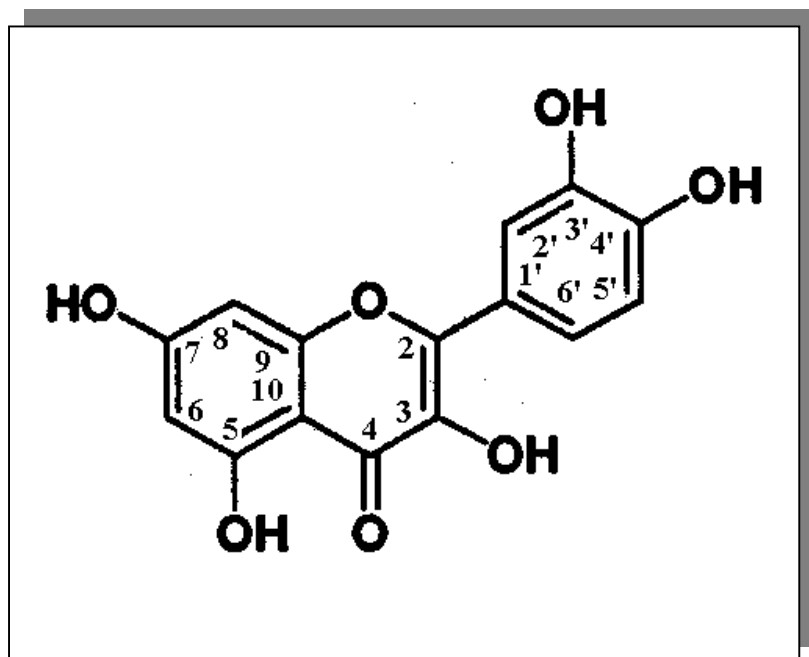
Remarque : Les variations observées pour les valeurs de RMN ¹H peuvent être attribuées à l'utilisation de solvants différents lors de l'analyse.

A.1.2/ Informations répertoriées sur ces tanins ; analogies et différences observées avec les résultats obtenus sur l'espèce *Cunonia macrophylla*

Les sept molécules purifiées sont connues mais les activités qui leur sont attribuées ne le sont pas pour autant. En effet, nous avons pu prouver dans le chapitre précédent que toutes possédaient au moins un effet antimicrobien contre l'une des quatre souches pathogènes testées. Ce type d'activité est d'ores et déjà répertorié pour la corilagine, l'acide chebulagique, l'acide ellagique et l'acide gallique (Burapadaja & Bunchoo, 1995 ; Chen Liu *et al.*, 1999 ; Adenisa *et al.*, 2000). Au contraire, il ne nous a pas été donné de trouver au cours de nos recherches bibliographiques de telles activités pour la mallorépanine, l'acide mallotinique et l'acide ellagique xylose. Pour ce dernier en particulier, nous avons pu détecter de surcroît une activité inhibitrice à l'encontre de la xanthine oxydase. Des recherches plus approfondies consistant en la détection de nouvelles activités de ces molécules purifiées seront envisagées dans les prochains mois. L'ensemble de ces ellagitanins seront testés dans la gamme des tests biologiques à notre disposition.

A.2/ FlavonoïdesA.2.1/ Structure

Malgré la présence estimée de 11 molécules de flavonoïdes purifiées au cours de nos travaux, seules 5 ont pu être identifiées. Il s'agit d'un flavonol, la quercétine et de plusieurs de ces dérivés de type hétérosides flavonoïdiques.

Quercétine CM 15

$C_{15}H_{10}O_7$

302 g.mol⁻¹

Poudre jaune

Solubilité : Méthanol

UV : (eau + acétonitrile): $\lambda_{max} = 256$ et 355 nm

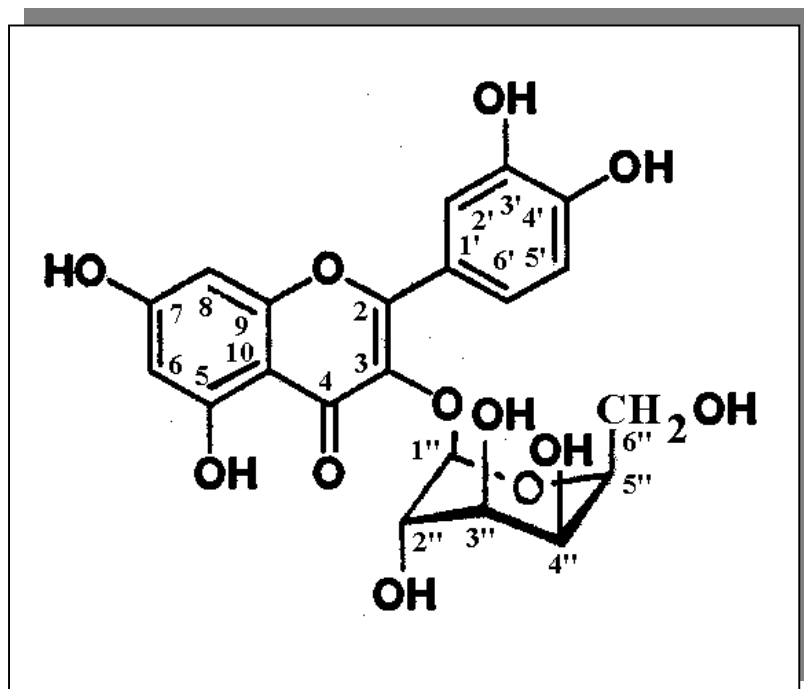
Tableau XXXIV : RMN ¹H et RMN ¹³C de la molécule CM15, la quercétine.

Carbone	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin <i>et al.</i> , 2000 DMSO-d ₆	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin <i>et al.</i> ^a , 2000 DMSO-d ₆
2	-	-	148.01	146.7
3	-	-	137.22	135.5
4	-	-	177.32	175.7
5	-	-	162.52	160.6

Tableau XXXIV (suite)

Carbone	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin <i>et al.</i> , 2000 DMSO-d ₆	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin <i>et al.</i> ^b , 2000 DMSO-d ₆
6	6.38 d, <i>J</i> = 1.9 Hz	6.38 d, <i>J</i> = 2.1 Hz	99.24	98.0
7	-	-	165.58	163.8
8	6.17 d, <i>J</i> = 1.9 Hz	6.17 d, <i>J</i> = 2.1 Hz	94.41	93.2
9	-	-	158.23	156
10	-	-	104.53	102.9
1'	-	-	124.15	121.8
2'	7.72 d, <i>J</i> = 1.9 Hz	7.66 d, <i>J</i> = 2.1 Hz	116.23	115.0
3'	-	-	146.23	144.9
4'	-	-	148.78	147.5
5'	6.87 d, <i>J</i> = 8.5 Hz	6.87 d, <i>J</i> = 8.7 Hz	116.00	115.4
6'	7.62 dd, <i>J</i> = 8.4 ; 1.9 Hz	7.52 dd, <i>J</i> = 8.7 ; 2.1 Hz	121.68	119.8

Hypéroside : Quercetine-3-O-β-D-galactopyranose CM8



C₂₁H₂₀O₁₂

Poudre jaune

464 g.mol⁻¹

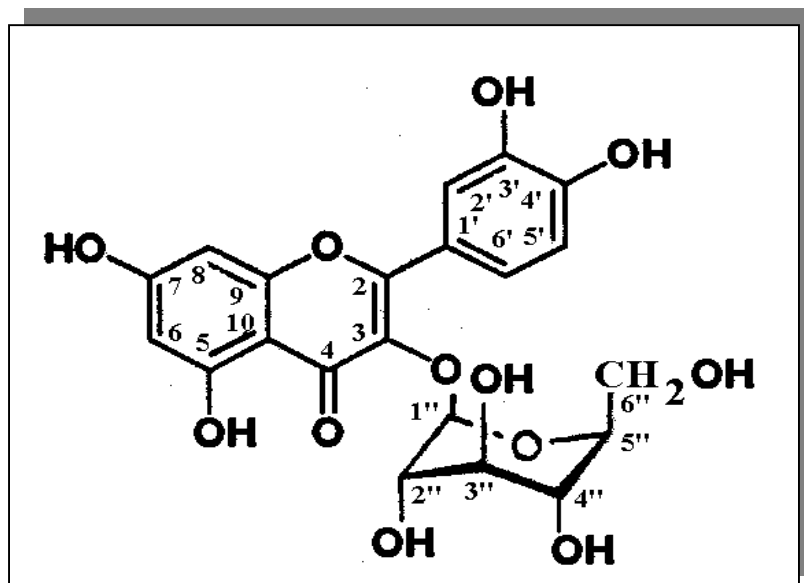
Solubilité : Méthanol

UV : (eau + acétonitrile): λ_{max} = 255 et 356 nm

Tableau XXXV : RMN ^1H et RMN ^{13}C de la molécule CM8, l'hypéroside.

Carbone	RMN ^1H	RMN ^{13}C
	Résultats Expérimentaux CD_3OD	Résultats Expérimentaux CD_3OD
2	-	158.9
3	-	135.9
4	-	(x)
5	-	163.2
6	6.43 d, $J= 1.8$ Hz	100.5
7	-	166.5
8	6.23 d, $J= 1.9$ Hz	95.2
9	-	158.6
10	-	105.9
1'	-	123.5
2'	7.87 d, $J= 1.8$ Hz	118.4
3'	-	146.0
4'	-	150.1
5'	6.89 d, $J= 8.5$ Hz	116.7
6'	7.61 dd, $J= 8.4 ; 1.9$ Hz	123.5
Sucre		
1''	5.20 d, $J= 7.9$ Hz	105.9
2''	3.84 dd, $J= 9.2 ; 8.1$ Hz	73.5
3''	3.58 dd, $J= 8.9 ; 2.5$ Hz	75.4
4''	3.87 d, $J= 2.9$ Hz	70.3
5''	3.50 t, $J= 6.1$ Hz	77.5
6''	3.57 dd, $J= 11.1 ; 5.9$ Hz 3.67 dd, $J= 11.1 ; 6.0$ Hz	62.0

(x) signal non observé

Isoquercitroside : Quercetine-3-O- β -D-glucopyranose CM4

C₂₁H₂₀O₁₂

Poudre jaune

464 g.mol⁻¹

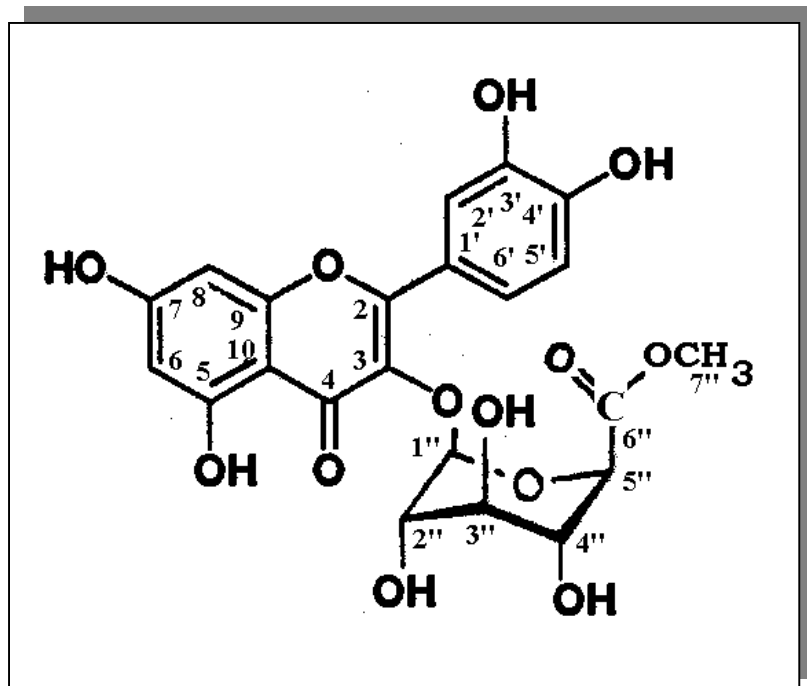
Solubilité : Méthanol

UV : (eau + acétonitrile): λ_{max} = 256 et 355 nm

Tableau XXXVI : RMN ¹H de la molécule CM4, l'isoquercitroside.

Carbone	RMN ¹ H	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin <i>et al.</i> ^a , 2000 DMSO-d ₆
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6.39 d, <i>J</i> = 2 Hz	6.38 d, <i>J</i> = 2.1 Hz
7	-	-
8	6.19 d, <i>J</i> = 2 Hz	6.18 d, <i>J</i> = 2.1 Hz
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7.83 d, <i>J</i> = 2.2 Hz	7.56 d, <i>J</i> = 2.1 Hz
3'	-	-
4'	-	-
5'	6.85 d, <i>J</i> = 8.6 Hz	6.90 d, <i>J</i> = 8.4 Hz
6'	7.58 dd, <i>J</i> = 8.5 ; 2.1 Hz	7.57 dd, <i>J</i> = 8.4 ; 2.1 Hz
Sucre		
1''	5.16 d, <i>J</i> = 7.8 Hz	5.45 d, <i>J</i> = 7.0 Hz
2''	3.52 dd, <i>J</i> = 7.6 ; 6.3 Hz	Nf
3''	3.47 t, <i>J</i> = 6.1 Hz	Nf
4''	3.81 dd, <i>J</i> = 9.6 ; 7.8 Hz	Nf
5''	3.84 br	Nf
6''	3.55 dd, <i>J</i> = 10.8 ; 6.4 Hz	Nf
	3.64 dd, <i>J</i> = 10.9 ; 6.1 Hz	Nf

Quercetine-3-O-β-D-glucuronopyranosyl méthyle ester CM6



$C_{22}H_{21}O_{13}$

Poudre jaune

$493 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solubilité : Méthanol

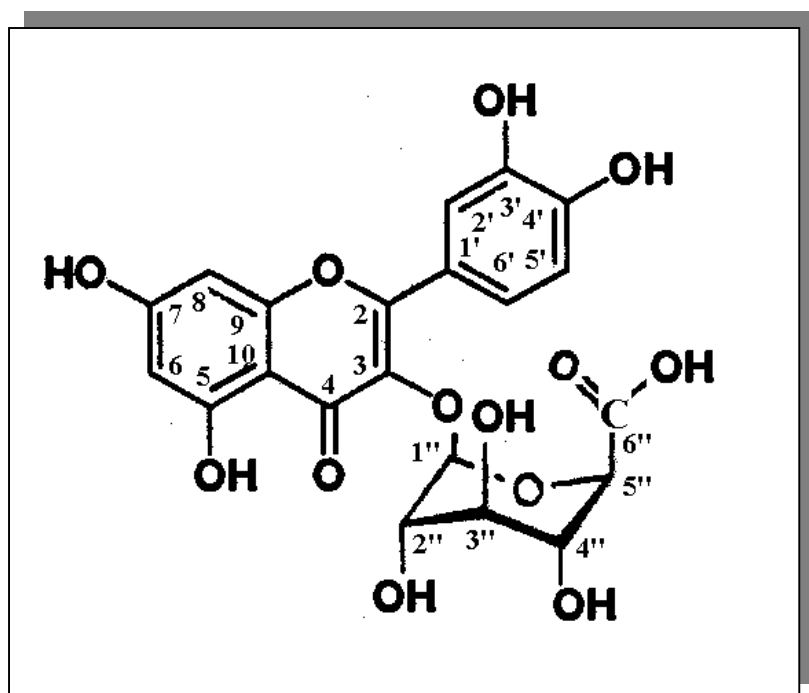
UV : (eau + acétonitrile): $\lambda_{\text{max}} = 257$ et 355 nm

Tableau XXXVII: RMN ^1H et RMN ^{13}C de la molécule CM6, la quercetine-3-O-β-D-glucuronopyranosyl méthyle ester.

Carbone	RMN ^1H	RMN ^{13}C
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD
2	-	159.35
3	-	135.39
4	-	179.20
5	-	163.01
6	6.42 d, $J = 2.0 \text{ Hz}$	99.93
7	-	166.10
8	6.23 d, $J = 2.0 \text{ Hz}$	94.75
9	-	158.44
10	-	105.56

Tableau XXXVII (suite)

1'	-	122.84
2'	7.61 d, $J= 2.0$ Hz	117.24
3'	-	145.93
4'	-	149.85
5'	6.87 d, $J= 9.0$ Hz	115.84
6'	7.61 dd, $J= 8.8 ; 2.0$ Hz	123.44
Sucre		
1''	5.26 d, $J= 7.7$ Hz	104.70
2''	3.54 dd, $J= 9.0 ; 7.9$ Hz	75.27
3''	3.47 t, $J= 9.0$ Hz	77.28
4''	3.59 t, $J= 9.3$ Hz	72.69
5''	3.78 d, $J= 9.8$ Hz	77.06
6''	-	170.63
7''	(3H) 3.68 s	52.80

Acide quercétine-3-O- β -D-glucopyranosyl CM12
 $C_{21}H_{19}O_{13}$

Poudre jaune

479 g.mol⁻¹

Solubilité : Méthanol

UV : (eau + acétonitrile): $\lambda_{\max} = 257$ et 357 nm

Tableau XXXVIII : RMN ¹H et RMN ¹³C de la molécule CM12, l'acide quercétine-3-O-β-D-glucopyranose.

Carbone	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD
2	-	159.01
3	-	135.45
4	-	179.35
5	-	162.97
6	6.41 d, <i>J</i> = 1.4 Hz	99.90
7	-	166.00
8	6.22 d, <i>J</i> = 1.5 Hz	94.71
9	-	158.42
10	-	105.60
1'	-	122.78
2'	7.70 brs	117.31
3'	-	145.92
4'	-	149.88
5'	6.87 d, <i>J</i> = 8.4 Hz	116.01
6'	7.62 dbr, <i>J</i> = 7.9 Hz	123.34
Sucre		
1''	5.36 d, <i>J</i> = 7.2 Hz	104.26
2''	3.55 dd, <i>J</i> = 8.6 ; 7.8 Hz	75.38
3''	3.50 t, <i>J</i> = 8.5 Hz	77.66
4''	3.61 subr	(x)
5''	3.76 subr	77.66
6''	-	(x)

(x) signal non observé

A.2.2/ Informations répertoriées sur ces flavonoïdes

Nous n'avons pas pu faute de quantités suffisantes tester les éventuelles activités antibiotiques de ces molécules. Cependant, il semble que la quercétine et l'hyperoside aient déjà fait leur preuve dans ce domaine (Van der Watt & Pretorius, 2001 ; Xu & Lee, 2001). Il serait important dans le cadre de la poursuite de ce travail de vérifier leur effet sur les souches bactériennes et fongiques à notre disposition.

A.3/ Bilan du travail chimique réalisé sur l'espèce *Cunonia macrophylla*

L'ensemble du travail chimique réalisé sur l'espèce *Cunonia macrophylla* nous a permis de mettre en évidence la présence d'une grande quantité d'ellagitanins et de flavonoïdes dérivant tous de la quercétine. Nos résultats confirment ceux obtenus par Bate-Smith (1977) quant à la présence d'acide ellagique et de quercétine. L'acide ellagique serait un caractère évolutif primitif qui permet de classer cette espèce donc la famille des Cunoniaceae dans la classe des Magnolopsida. Les autres molécules purifiées pour la première fois chez l'espèce *Cunonia macrophylla*, seule espèce du genre dont l'étude chimique a été aussi approfondie, devraient à leur tour permettre d'émettre des hypothèses quant à la position de la famille des Cunoniaceae et à son rapprochement avec d'autres familles mieux connues.

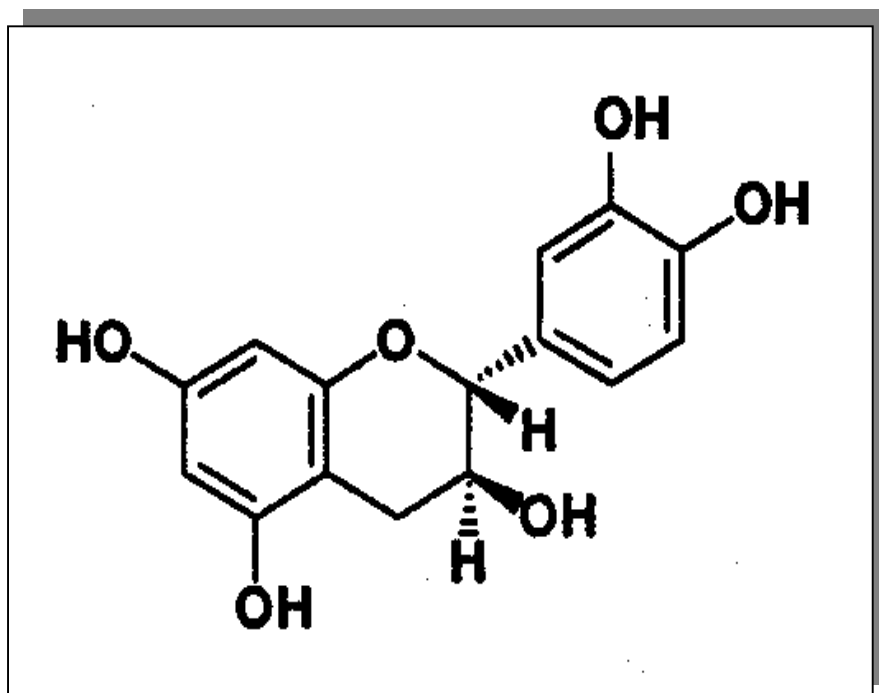
Certaines des molécules isolées ne sont que peu connues et ont été identifiées pendant ces 10 dernières années, en particulier l'acide ellagique xylose. C'est pourquoi une attention toute particulière sera apportée à l'étude de ses capacités bioactives. Cette dernière a d'ores et déjà été isolée de deux espèces appartenant toutes deux à la classe des Magnolopsida. Cependant l'une d'entre-elles, *Agrimonia pilosa* (Pei *et al.*, 1990) est plus proche de la famille des Cunoniaceae puisqu'elle appartient à la famille des Rosaceae du même ordre Rosales. La seconde est quant à elle taxonomiquement plus éloignée puisque l'espèce *Platycarya strobilicea* (Tanaka *et al.*, 1998) appartient à la sous-classe des Hamamelidae distante de celle des Rosidae. La mallorépanine fait également partie de ces molécules encore peu détectées chez différentes familles de plantes puisqu'elle est essentiellement connue chez des espèces de la famille des Euphorbiaceae. Il serait intéressant de la purifier de nouveau en quantité plus abondante pour en faire une étude biologique plus approfondie. Les autres molécules sont quant à elles plus connues et semblent avoir été détectées chez de nombreuses espèces, il s'agit de molécules ubiquistes.

Les potentialités bioactives des molécules synthétisées par l'espèce *Cunonia macrophylla* ont été largement prouvées au cours de cette étude. Plus encore, certaines des activités détectées au cours des tests préliminaires autres que les capacités antimicrobiennes pourraient être attribuées à certains des produits isolés. En effet, la quercétine (Cos *et al.*, 1998) est réputée pour ses effets inhibiteurs de la xanthine oxydase et ses propriétés de piègeur de radicaux libres. Quant à l'hypéroside et l'acide ellagique, ils inhiberaient l'élastase (Melzig *et al.*, 2001).

B/ Etude des molécules purifiées de l'extrait acétate d'éthyle d'écorce de *Weinmannia dichotoma*

Les analyses structurales ont été réalisées pour 1 seule des 4 molécules purifiées. Il s'agit d'un flavan-3-ol.

Catéchol WD3



$C_{15}H_{13}O_6$

Poudre blanche

$289 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solubilité : Méthanol

UV : (eau + acétonitrile): $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$

Tableau XXXIX : RMN ^1H et RMN ^{13}C de la molécule WD3, le Catécol ou catéchine.

Carbone	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin & Lin, 1999 Acetone-d ₆	Résultats Expérimentaux CD ₃ OD	Données bibliographiques Lin & Lin, 1999 Acetone-d ₆
2	4.54 d, $J= 7.5$ Hz	4.52 d, $J= 7.9$ Hz	82.84	81.2
3	3.96 td, $J= 7.8 ; 5.4$ Hz	3.96 m	68.81	66.5
4	2.49 dd, $J= 16.1 ; 8.2$ Hz 2.83 dd, $J= 16.1 ; 5.4$ Hz	2.48 dd, $J= 16.1 ; 8.5$ Hz 2.86 dd, $J= 16.1 ; 5.6$ Hz	28.55	28.0
5	-	-	157.59	156.4
6	5.83 d, $J= 2.2$ Hz	5.83 d, $J= 2.1$ Hz	96.20	95.4
7	-	-	157.78	156.6
8	5.91 d, $J= 2.2$ Hz	5.99 d, $J= 2.1$ Hz	95.43	94.3
9	-	-	157	155.7
10	-	-	100.76	99.5
1'	-	-	132.15	131.0
2'	6.82 d, $J= 1.7$ Hz	6.86 d, $J= 1.7$ Hz	115.20	114.8
3'	-	-	146.25*	145.0
4'	-	-	146.23*	145.0
5'	6.75 d, $J= 8.1$ Hz	6.77 d, $J= 8.1$ Hz	116.21	115.5
6'	6.70 dd, $J= 8.1 ; 1.7$ Hz	6.70 dd, $J= 8.1 ; 1.7$ Hz	120.07	118.9

* valeurs pouvant être inversées

L'étude consacrée à cette espèce mérite d'être approfondie. En effet, même s'il est vrai que le catéchol est bien connu et répertorié depuis de nombreuses années, la présence de produits dont l'allure spectrale est proche nous laisse entrevoir la possibilité de purifier des molécules de même type qui pourraient s'avérer plus intéressantes.

L'activité inhibitrice de la xanthine oxydase à l'origine de son isolement lui a déjà été octroyée (Cos *et al.*, 1998), cependant la valeur de l'IC₅₀ qui lui est attribué (>100 μm) ne saurait refléter celle obtenue pour l'extrait brut. On peut donc aisément penser que d'autres molécules plus actives restent à découvrir au sein de cette espèce.

Notre résultat permet cependant de montrer que cette molécule déjà détectée chez l'espèce *Weinmannia racemosa* présente uniquement en Nouvelle-Zélande, l'est également chez *Weinmannia dichotoma* endémique à la Nouvelle-Calédonie.

Conclusion sur les études chimiques effectuées sur *Cunonia macrophylla* et *Weinmannia dichotoma*

Quel que soit le cas considéré, il apparaît clairement que les activités biologiques d'une espèce végétale n'est pas à attribuer à une seule molécule mais à une multitude dont chacune joue au sein de cet organisme un rôle bien défini. Cette vision de la biosynthèse des produits naturels laisse entrevoir les possibilités de découvertes dans le cadre de recherches sur le monde végétal.

Il est à noter que la majeure partie des molécules purifiées sont connues pour de nombreuses autres activités qui ne faisaient pas partie de notre panel de tests (cf. synthèse bibliographique). Ceci prouve plus encore s'il en était besoin que la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie mérite d'être étudiée plus en profondeur dans le cadre de la valorisation des substances naturelles.

Notre approche limitée par le temps et les moyens a cependant permis de montrer que les espèces de cette famille possèdent des potentialités bioactives non négligeables. Nous ne pouvons qu'espérer que les recherches futures donneront des résultats plus valorisables. Quoi qu'il en soit le but fondamental de notre travail qui consistait à compléter les connaissances trop limitées sur cette famille est largement atteint.



PARTIE IV

Voies et moyens
de pérennisation

des espèces

Cunonia macrophylla

et

Geissois pruinosa



Graine de *C. macrophylla* x50 (en haut), cals différenciés (en bas) de *G. pruinosa* x10 (2002)

INTRODUCTION : CHOIX DES ESPECES

De part les activités biologiques détectées au sein des espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie, nombre d'entre-elles auraient pu être sélectionnées. Cependant certaines contraintes s'imposaient à nous. L'une des plus importantes était la disponibilité en quantité suffisante de matériel végétal (semences ou partie de plante) à une distance raisonnable du laboratoire (dans un rayon de 100 km autour de Nouméa).

Notre premier choix, réalisé dès le début de nos recherches, s'est porté sur l'espèce *Geissois pruinosa* Brongniart et Gris dont la collecte est facilement réalisable dans le Grand Sud et dans la région du Mont Dzumac. Celle-ci présente une capacité fongicide ainsi qu'une toxicité à l'encontre d'*Artemia salina* non négligeable. *G. pruinosa* pourrait également présenter un intérêt économique puisque certaines espèces du même genre sont exploitées pour la production de bois (Timber Research & Development Association, 1979 ; Lazarides & Hinces, 1993), mais également en horticulture du fait de leur aspect visuel attrayant avec de grandes feuilles palmées et des inflorescences d'un rouge intense. Enfin, elle présente un attrait certain pour la recherche scientifique puisqu'elle montre une capacité d'hyper-accumulatrice de nickel (Jaffre *et al.*, 1979).

La seconde espèce, *Cunonia macrophylla* Brongniart et Gris, a tout naturellement été choisie suite aux nombreux résultats biologiques et chimiques qu'elle a fournis. Rappelons qu'elle présente des propriétés antibiotiques importantes sur cinq souches bactériennes, dont quatre pathogènes de l'homme, mais également une activité inhibitrice contre la xanthine oxydase. L'étude chimique a permis de purifier les molécules d'intérêt à l'origine de ces activités. La collecte de cette espèce a pu se faire aux Monts Koghis.

L'objectif de l'étude des voies et moyens de multiplier ces deux espèces s'inscrit dans une logique de pérennisation de ces individus afin d'éviter l'utilisation des végétaux naturellement présents dans les forêts néo-calédoniennes. Ainsi, dans le cas d'une exploitation des espèces d'intérêt afin d'en extraire les molécules chimiques actives, nous serions en mesure de fournir des protocoles pré-établis pour leur multiplication. Ces résultats permettraient d'envisager des cultures à grande échelle fournissant une quantité de plants suffisante.

Un autre aspect, non négligeable, est la contribution au travers de ces travaux, à la connaissance des divers aspects physiologiques des végétaux de cette famille qui croissent sur des sols particuliers à la Nouvelle-Calédonie.

Les deux grands modes de multiplication du végétal seront abordés, la multiplication sexuée via la semence, et la multiplication asexuée ou multiplication végétative.

La première permettra de connaître la structure intime de ces semences et de déterminer les conditions les plus favorables à leur germination. Ce qui nous apportera des renseignements essentiels sur ce qui se passe *in situ*. Plus encore, les mécanismes de la germination de ces semences de type sub-tropical, encore peu connues, seront mieux appréhendés.

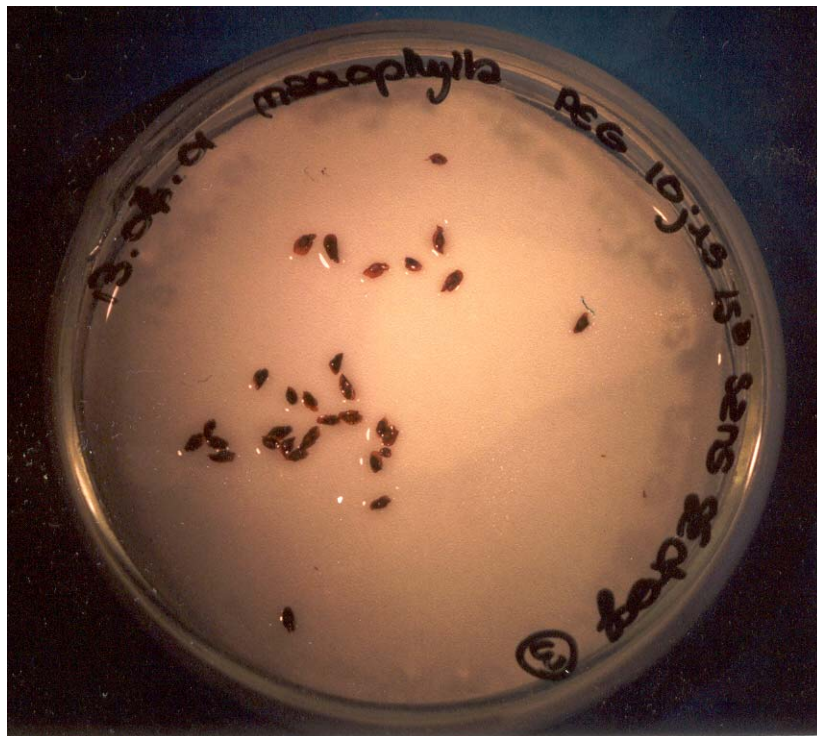
La seconde fournira des informations sur les équilibres internes qui régissent le développement de ces espèces et sur la capacité qu'elles ont de produire *in vitro* des molécules bioactives.

PARTIE IV

Chapitre 1 :

Multiplication par voie sexuée :
Etude de la capacité germinative
et optimisation de la germination
des semences de deux espèces
de Cunoniaceae :

Cunonia macrophylla et *Geissois pruinosa*



Test de germination sur boîte de Pétri (semences de *C. macrophylla*)

CHAPITRE 1 :
MULTIPLICATION PAR VOIE SEXUEE :
ETUDE DE LA CAPACITE GERMINATIVE ET
OPTIMISATION DE LA GERMINATION DES SEMENCES
DE DEUX ESPECES DE CUNONIACEAE :

CUNONIA MACROPHYLLA ET GEISSOIS PRUINOSA

Introduction

L'étude de la germination des deux espèces de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie, *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*, s'est réalisée en plusieurs étapes. Nous avons dans un premier temps collecté les fruits de chacune d'entre-elles dans la région proche de Nouméa. Ensuite, ceux-ci ont été traités de manière à récupérer les semences utilisées pour les différents tests. Plusieurs aspects de cette germination ont été envisagés. Il a fallu déterminer en premier lieu les conditions optimales de développement de ces semences, puis chercher les moyens d'optimiser ce phénomène. Cependant, peu de données ont été rapportées sur l'effet de la température ou de la luminosité sur les graines de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa* et peu d'éléments sont connus sur leur comportement par rapport à l'eau. En dehors de l'intérêt économique à peine soupçonné que suscitent les Cunoniaceae, d'origine tropicale et subtropicale, la compréhension approfondie des mécanismes de leur germination, étape importante de leur cycle de développement, apportera à coup sûr des renseignements d'un grand intérêt pour leur utilisation. C'est pourquoi nous avons entrepris ce travail sur certains aspects de la dynamique de la germination des semences de ces deux espèces de *Cunoniaceae* en conditions contrôlées au laboratoire, en vue d'une optimisation de leur capacité germinative.

I/ De la collecte du fruit à la semence d'aspect fertile

Cette première partie sera consacrée au travail réalisé en amont des expériences de germination proprement dite. Il s'agit de la collecte, puis du traitement des fruits, de la récupération des semences et du tri effectué sur ces semences afin de n'étudier que des semences d'aspect fertile. Enfin, la structure des deux types de semences sera développée.

A/A

I
(Figure
fruits m

Dzumac
ecte des

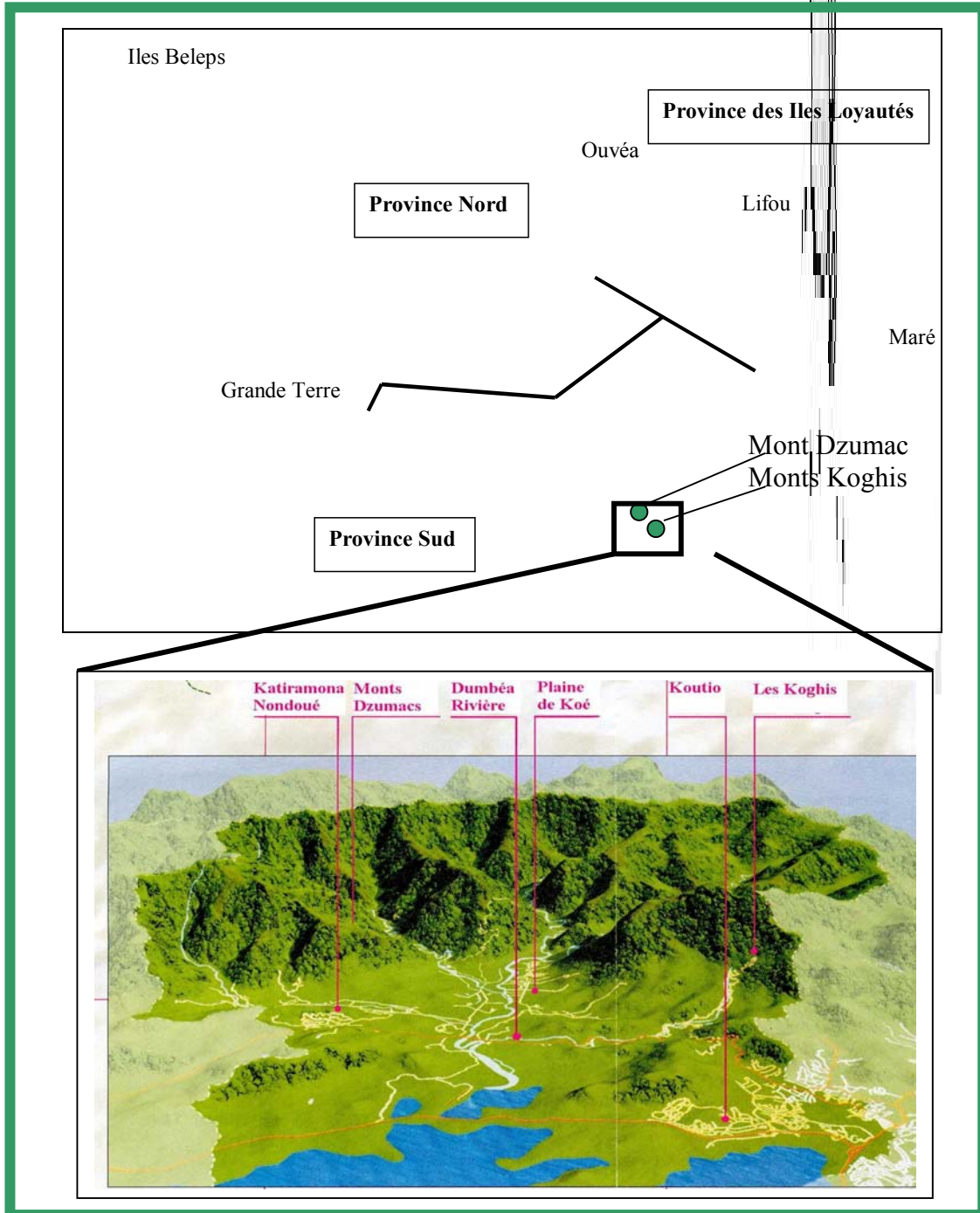


Figure 69 : Positionnement géographique des lieux de collecte des espèces de Cunoniaceae; *Geissois pruinosa* (Mont Dzumac) et *Cunonia macrophylla* (Monts Koghis).

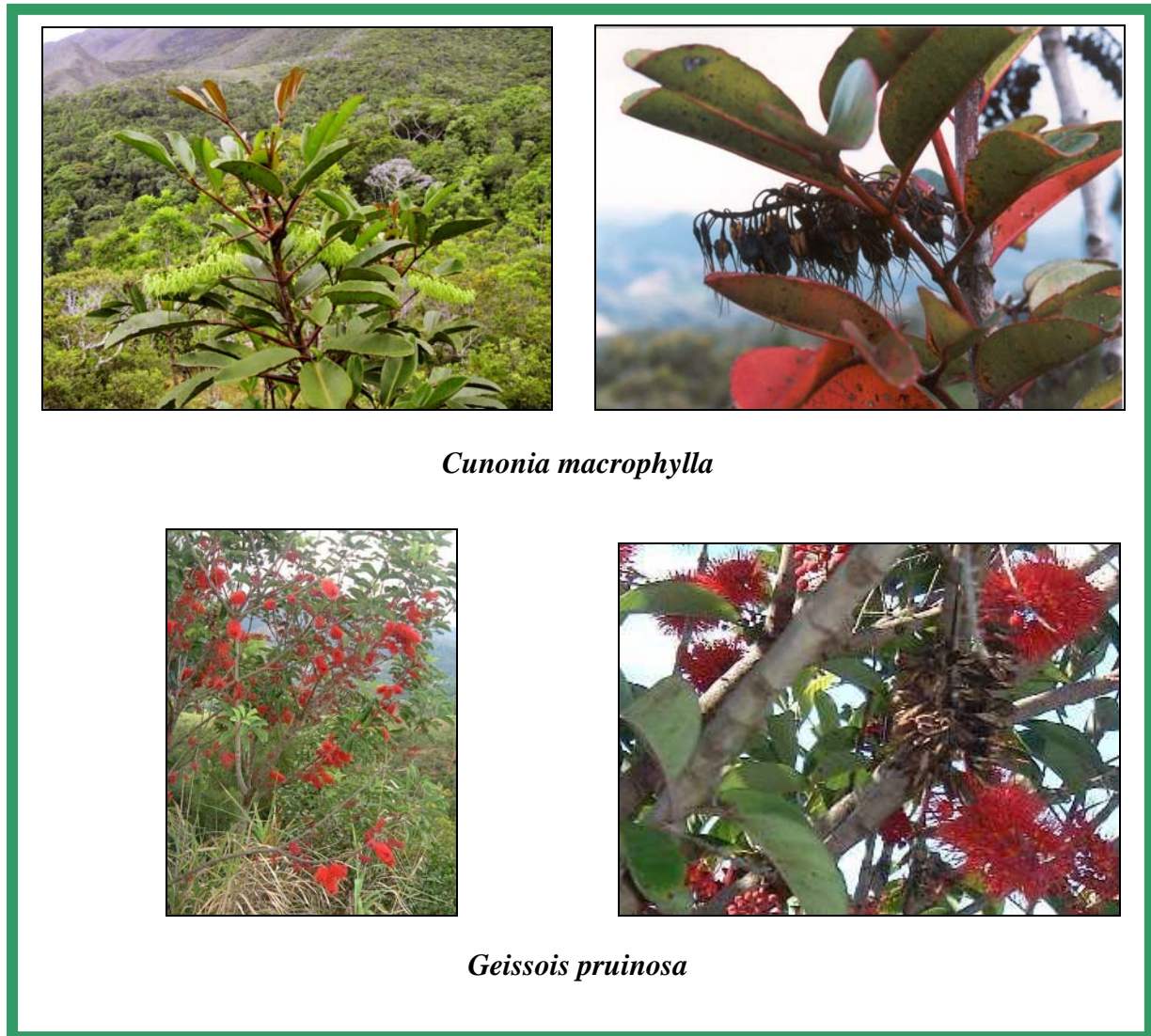


Figure 70 : Morphologie du pied mère et infrutescences de *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.

Les infrutescences récoltées sont placées dans des sacs plastiques puis transportées au sein du laboratoire où elles sont mises à sécher à l'atmosphère sous des lampes néons type Mazda fluor (30W) pendant une semaine. Les graines obtenues après leur ouverture sont conservées à température ambiante dans des boîtes de Pétri en verre fermées hermétiquement, jusqu'au jour des tests.

A.2/ Analyse de la structure des fruits et des semences

Les fruits et les semences de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa* ont été observés et disséqués sous une loupe binoculaire. Ils ont ensuite été analysés pour leur contenu dans le cas des fruits et pour leur structure interne dans le cas des semences. Les graines ont enfin été triées d'après leur aspect fertile caractérisé par un embryon bombé.

B/ Résultats et Discussion

B.1/ Résultats des collectes

Plusieurs collectes ont pu être effectuées, au mois de mars 1999 pour *G. pruinosa*, puis 2000 et 2001 pour les deux espèces. Dans le cas de *G. pruinosa*, deux lieux de collectes ont été testés au cours de l'année 2000, le premier au Mont Dzumac et le second dans le Grand Sud, aux abords du lac de Yaté. Pour *C. macrophylla*, seul le site des Monts Koghis a été exploité. Quelle que soit l'espèce considérée, chaque collecte a permis de prélever plusieurs milliers de graines utilisées tant pour les expériences de germination que pour des essais de croissance.

B.2/ Structure de l'infrutescence

Les infrutescences des deux espèces obtenues après fécondation des inflorescences sont de même type; il s'agit de grappes de fruits (Figure 70) organisées de manière étagée, chaque étage étant représenté par un verticille de 3, 4 ou 5 fruits.

B.3/ Structure du fruit (Figure 71)

Chaque espèce possède un type de fruit sec déhiscent différent, même si dans les deux cas, il s'agit d'une capsule à déhiscence septicide. En effet, le fruit de *Cunonia macrophylla* mesure entre 3 et 3.5 cm de long pour une largeur de 1-1.2 cm avec un pédicelle de 1.2-1.5 cm. L'ouverture du fruit à maturité se fait selon deux fentes longitudinales du haut vers le bas laissant apparaître deux cavités contenant les semences fertiles et infertiles.

Par contre, le fruit de *Geissois pruinosa* mesure 0.5-0.8 x 3-3.5 cm avec un pédicelle de 1.8-2 cm. L'ouverture du fruit à maturité se fait selon deux fentes longitudinales du bas vers le haut laissant apparaître deux cavités contenant les semences fertiles et infertiles. Cette structure est à rapprocher de celle observée chez l'espèce *Weinmannia sylvicola* (cult. Lincoln) (Godley, 1983).

Quel que soit le type de fruit considéré, ceux-ci contiennent une certaine proportion de graines fertiles et infertiles. Un dénombrement du nombre de graines d'aspect fertile par rapport au nombre total de graines observées donne un pourcentage de 35% chez *G. pruinosa*, et de 20% chez *C. macrophylla*. Pour la réalisation des tests de germination, seules les semences d'aspects fertiles obtenues après un tri ont été utilisées. Celles-ci sont caractérisées par la présence d'un embryon bombé (Figure 71).

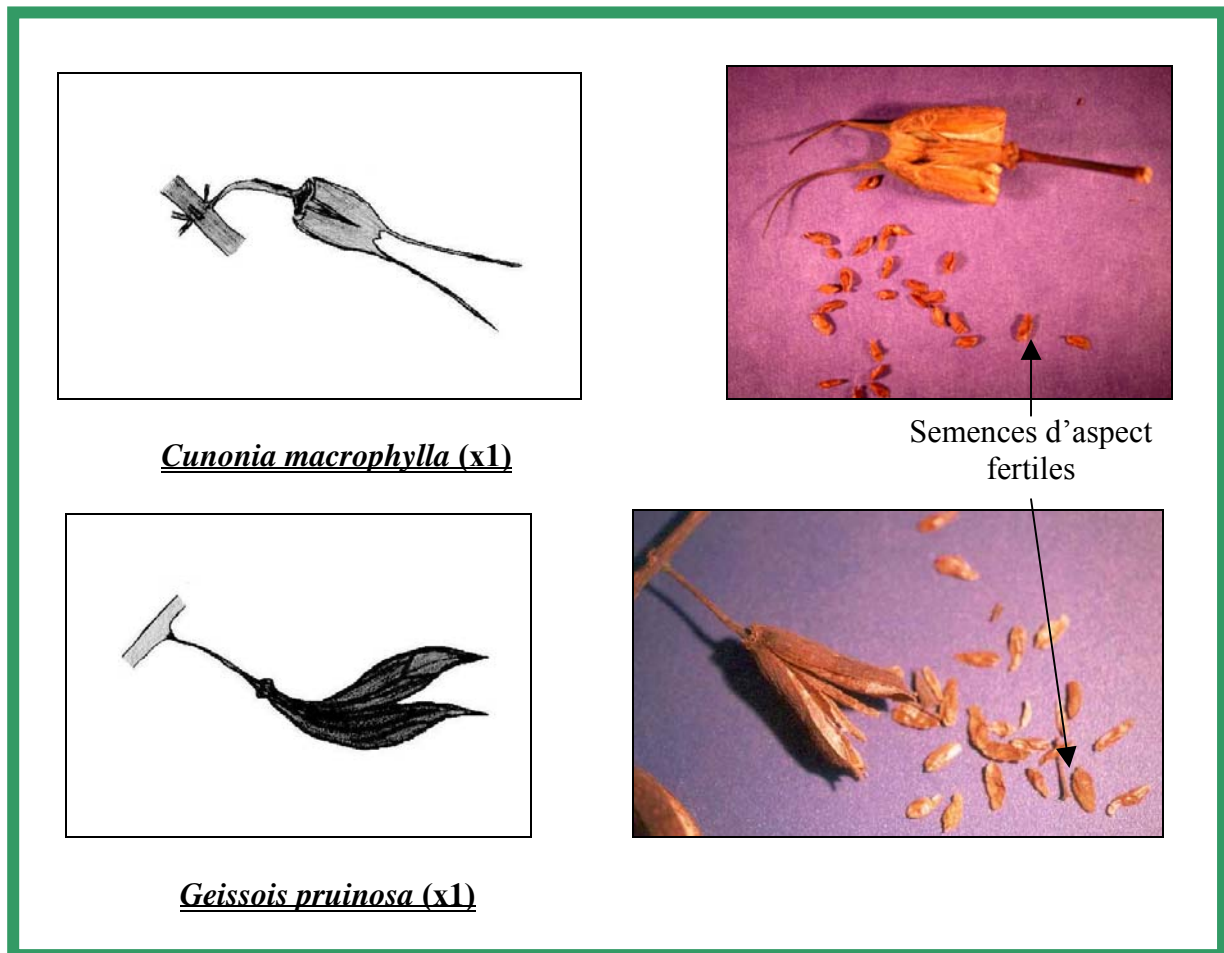


Figure 71 : Dessins de la structure d'un fruit de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa* ; photos du fruit et du type de semences qu'il contient.

B.4/ Structure de la graine (Figure 72)

L'aspect général des semences de chaque espèce est identique mais l'examen de détail révèle de nombreuses différences. Tout d'abord, leur taille est de 0.25-0.3 x 0.5-0.7 cm et 0.1-0.15 x 0.25-0.3 cm, respectivement pour *G. pruinosa* et *C. macrophylla*. La partie ailée de la semence de *G. pruinosa* est plus importante, permettant certainement une dissémination par le vent plus aisée. Autre point à noter, la couleur des graines, qui sont plus foncées dans le cas de *C. macrophylla*, ce qui pourrait être dû à la présence d'un plus grand nombre de polyphénols au sein de la semence. Enfin, la surface de tégument entourant l'embryon est plus importante pour les semences de *G. pruinosa*.

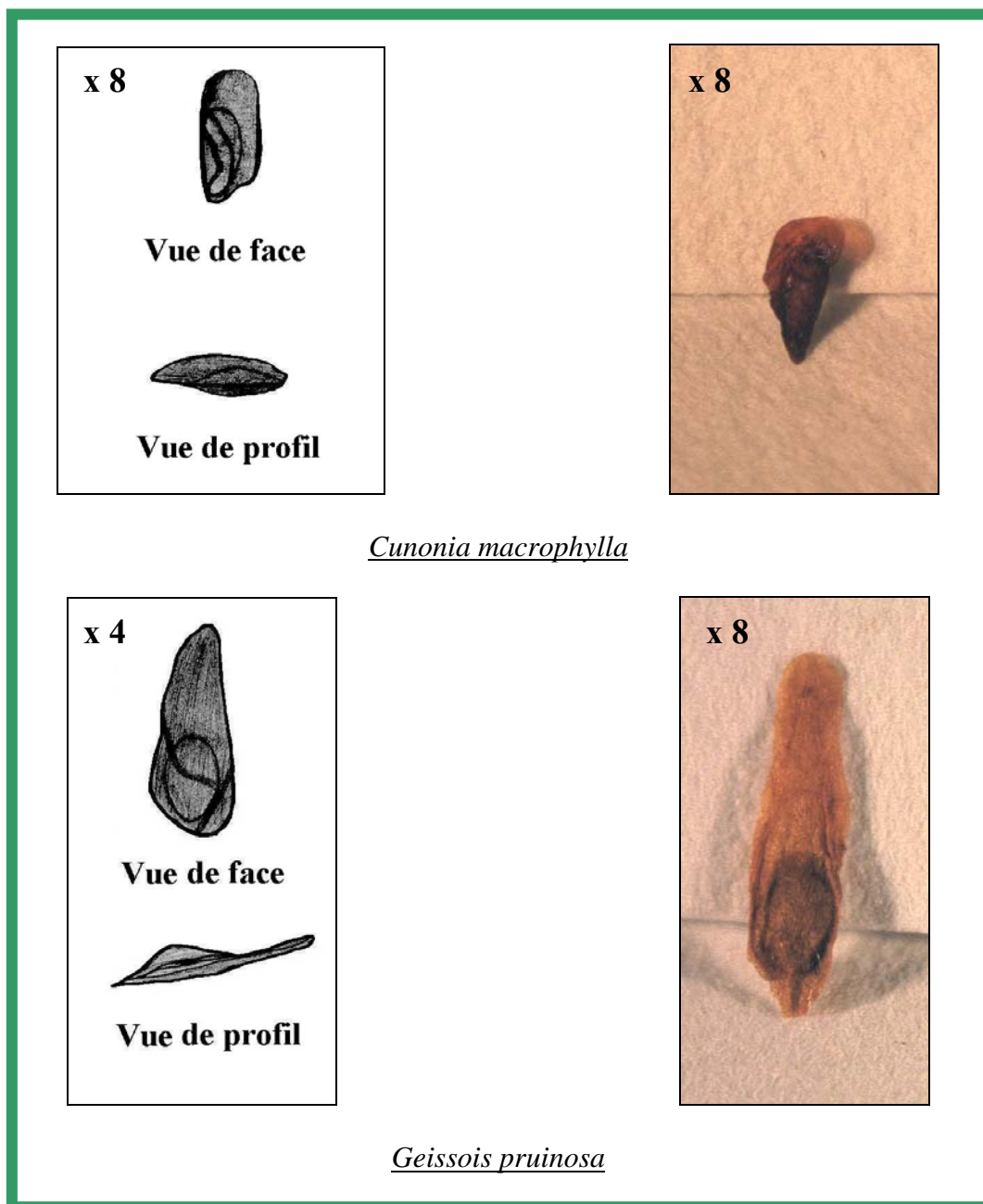


Figure 72 : Dessins et photos des semences de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa*.

Une dissection des semences a permis de déterminer la présence de différentes couches cellulaires entourant l'embryon. Ainsi, quelle que soit l'espèce considérée, il est à noter la présence d'une couche tégumentaire externe suivie d'une couche tégumentaire interne. L'amande de la graine est constituée d'un albumen de volume important dans lequel est contenu l'embryon (Figure 73). Nos semences seraient donc des graines albuminées (Côme, 1975). Cette observation permet d'ores et déjà d'émettre une hypothèse concernant la difficulté d'accessibilité à l'eau pour l'embryon.

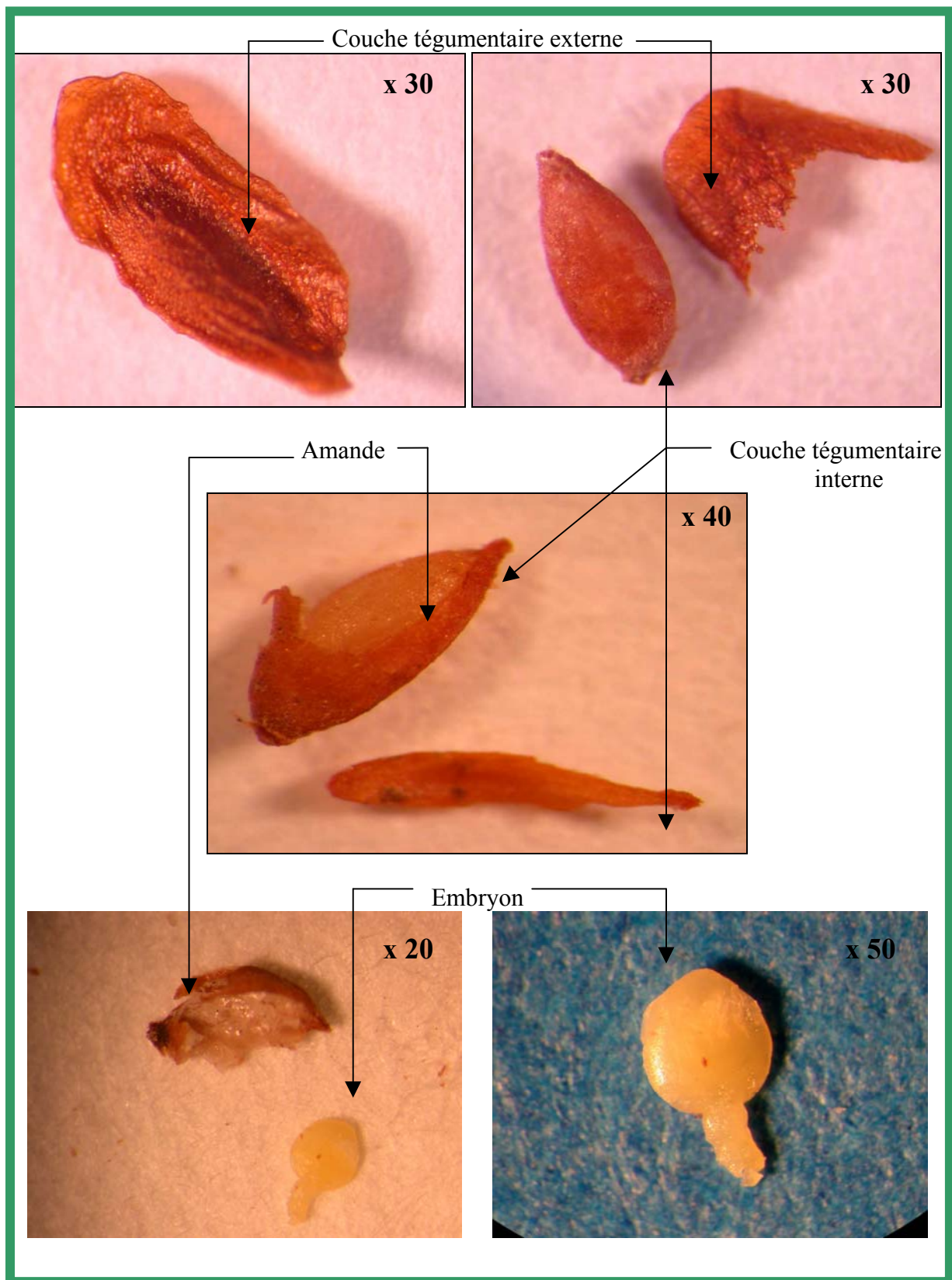


Figure 73 : Photos à la loupe binoculaire de dissection d'une semence de *Cunonia macrophylla* mettant en évidence les différentes couches constitutives de la semence entourant l'embryon.

II/ Etude de l'impact de différents facteurs abiotiques sur la germination des semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*.

Cette recherche avait pour but de déterminer l'effet de différents facteurs abiotiques essentiels à la germination des semences. Ainsi, la température, l'humidité et la lumière qui sont trois éléments fondamentaux interdépendants (Thévenot & Côme, 1973 ; Corbineau *et al.*, 1989a ; Corbineau *et al.*, 1995) ont été étudiés.

A/ Matériel et méthodes

A.1/ Test de Germination

En premier lieu, les graines sont triées d'après leur aspect fertile caractérisé par un embryon bombé (Figure 72). Elles sont ensuite mises à germer après une désinfection à l'hypochlorite de sodium à 4% (eau de Javel à 48° chloré pure) pendant 5 minutes suivie de 2 rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile. Cette désinfection permettant de diminuer les contaminations est retenue pour l'ensemble des tests. Ceux-ci sont réalisés dans des boîtes de Pétri en verre de 9 cm de diamètre garnies de trois épaisseurs de papier filtre Wattman 540 préalablement stérilisées à l'autoclave. Après ajout d'eau distillée stérile, un lot de 60 graines est réparti sur 4 boîtes (soit 15 graines/boîte), les boîtes sont fermées hermétiquement avec du parafilm, avant d'être incubées à la température désirée. Les graines ont une de leur face au contact du papier filtre, position admise comme la plus idéale à la germination (Côme, 1975). La germination est considérée comme effective dès l'observation de l'émergence de la radicule sur une longueur de 1 mm (Istambouli, 1976 ; Aissa, 1981).

A.2/ Recherche de la température optimale de germination

Pour la recherche de la température optimale, le taux d'humidité est fixé à 12 mL d'eau distillée stérile et les boîtes sont mises à incuber à 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C. La germination est suivie pendant 40 jours.

A.3/ Recherche du degré d'imbibition optimum

La détermination de ce degré d'imbibition est réalisée à une température de 25°C avec des quantités de 4, 6, 8, 10 et 12 mL d'eau distillée stérile. La durée de l'essai est de 40 jours.

A.4/ Effet de la lumière sur la germination

Pour déterminer l'effet de la lumière sur la germination de nos semences, le taux d'humidité est fixé à 12 mL et la température à 25°C. Un lot est placé à l'obscurité et un second à la lumière dans une étuve éclairée par deux tubes néons blancs de type Philips TL 8W/33 avec une photopériode de 12 heures. La durée de l'observation est de 40 jours.

A.5/ Germination au hasard

Cette expérience est réalisée directement sur un lot de graines non trié après récolte, afin d'avoir une idée sur ce qu'il se passerait *in situ*. Ce test est effectué à une température de 25°C, avec une quantité d'eau stérile de 12 mL et suivi pendant 40 jours.

B/ Résultats

B.1/ Effet de la température sur la germination

La réponse des semences de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla* à la température est différente. En effet, dans le cas de *G. pruinosa*, (Figure 74A), celles-ci germent au plus tôt entre le 10^{ème} et le 24^{ème} jour pour des températures comprises entre 15 et 35°C. Les meilleurs taux de germinations cumulées, de l'ordre de 31%, se retrouvent aux températures de 25 et 30°C. A ces températures, les graines germent à partir du 10^{ème} jour et le maximum de germination est atteint dès le 19^{ème} jour. Aux températures de 15 et 30°C, le début de germination plus tardif se situe vers le 15^{ème} jour. A 10°C, il est repoussé au 24^{ème} jour. Dans ces trois derniers cas, le taux maximal de germination diminue de plus de la moitié, à des valeurs comprises entre 11 et 13%. Aucune germination n'est constatée après 40 jours d'observation aux températures de 5°C et 40°C. Le tracé du taux de germination (exprimé comme l'inverse du temps nécessaire pour obtenir 50% de germination : T50) en fonction de la température montre une relation linéaire positive entre ces deux facteurs à des températures comprises entre 0 et 25°C et une relation linéaire négative à des températures comprises entre 30 et 40°C. Ce tracé permet d'établir un optimum thermique de germination à l'intersection des deux droites de régression linéaires (Özbingöl *et al.*, 1998), qui est compris entre 27 et 28°C pour l'espèce *G. pruinosa* (Figure 74C). De plus, l'extrapolation de ces mêmes droites jusqu'à l'axe des abscisses (températures) permet de déterminer les températures minimales et maximales de germination de cette espèce, qui sont respectivement d'environ 9° et 40°C.

Une analyse similaire des résultats obtenus pour l'espèce *C. macrophylla* montre de nombreuses différences (Figure 74B). La germination est plus tardive, comprise entre le 15^{ème} et le 24^{ème} jour pour des températures comprises entre 15 et 30°C. Les meilleurs taux de germination cumulées, de l'ordre de 53%, sont obtenus pour les températures de 20 et 25°C, températures auxquelles les graines germent à partir du 15^{ème} jour, mais contrairement à l'espèce *G. pruinosa*, les germinations s'étalent de manière progressive jusqu'au 38^{ème} jour. La gamme de température permettant à *C. macrophylla* de germer est plus restreinte puisque aucune germination n'a été détectée en dessous de 15°C et au-dessus de 30°C. A ces deux températures, la germination ne débute qu'à partir du 25^{ème} jour et s'étale jusqu'au 37^{ème} jour pour atteindre des taux de germinations cumulées plus faibles, de l'ordre de 20% à 15°C et de 10% à 30°C. La Figure 74C permet en utilisant la même approche que pour l'espèce précédente de déterminer un optimum thermique de germination compris entre 22 et 23°C et des températures minimales et maximales de germination d'environ 10° et 35°C pour l'espèce *C. macrophylla* respectivement.

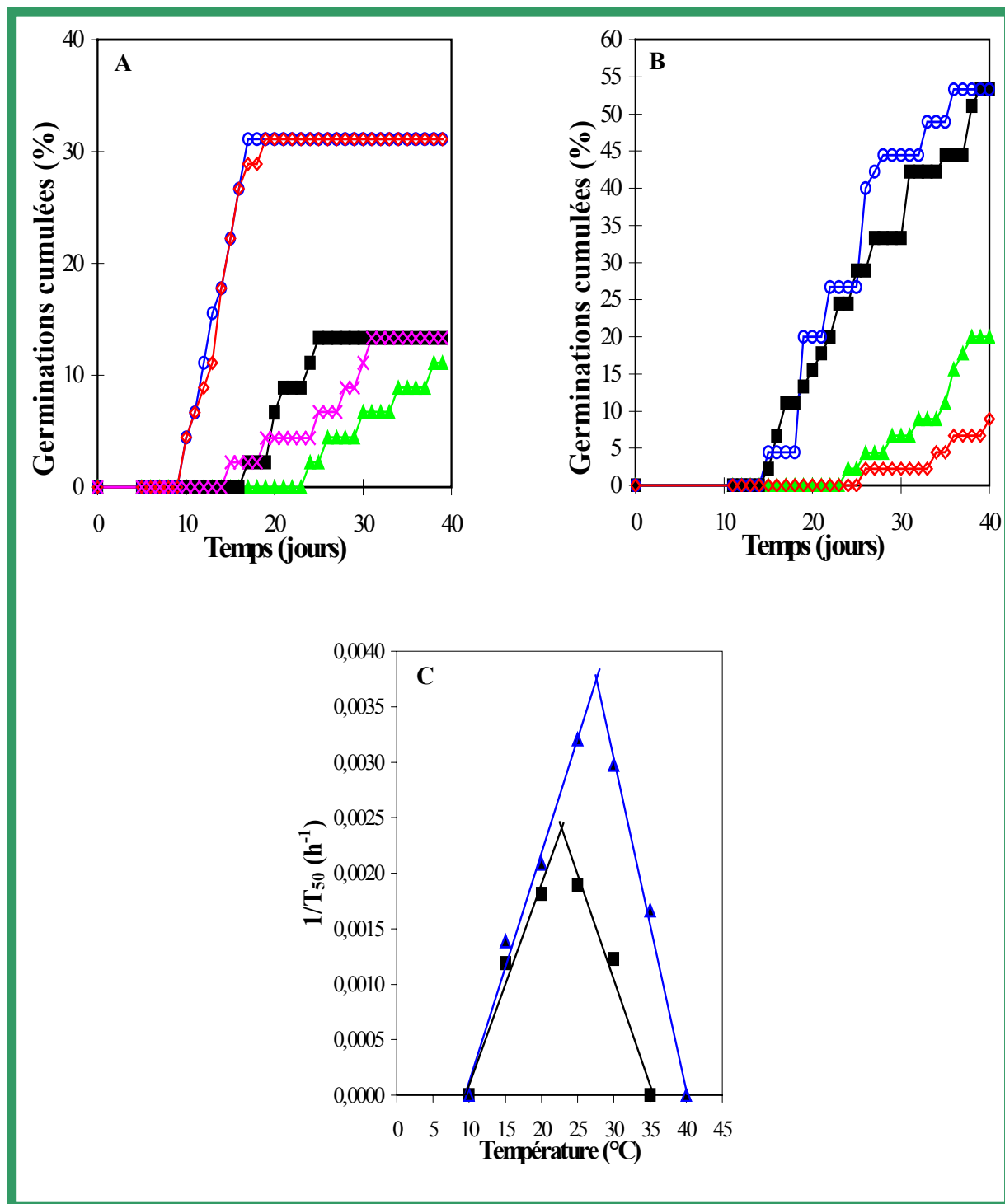


Figure 74 : Effets de la température sur la germination de *Geissos pruinoso* (A, C) et *Cunonia macrophylla* (B, C). A et B : Pourcentages de germination cumulées en fonction du temps à 15°C (▲), 20°C (■), 25°C (○), 30°C (◇), 35°C (✱). C : Effet de la température sur le taux de germination exprimé sous forme de l'inverse du temps nécessaire pour l'obtention de 50% de germination (T_{50}) pour *G. pruinoso* (▲) et *C. macrophylla* (■) ; les coefficients de régression linéaire sont de 0.985 et 0.995 pour *G. pruinoso* et de 0.968 et 0.972 pour *C. macrophylla* (respectivement pour les pentes ascendantes et descendantes).

B.2/ Effet du taux d'humidité sur la germination

Dans les conditions expérimentales choisies, à savoir une température de 25°C, la quantité d'eau influe peu le temps de latence pour l'espèce *G. pruinosa* puisque la germination débute entre le 10 et le 11^{ème} jour (Figure 75A). Au contraire, dans le cas de l'espèce *C. macrophylla*, plus la quantité d'eau diminue plus le temps de latence augmente passant de 12 jours avec 12 mL d'eau à 21 jours avec 4 mL d'eau (Figure 75B).

En ce qui concerne la capacité germinative des semences de *G. pruinosa*, excepté pour le volume de 4 mL qui paraît insuffisant conduisant à un taux maximal de 24%, les autres apports d'eau étudiés conduisent tous à un maximum de germination de l'ordre de 31%. Dans le cas de *C. macrophylla*, le taux maximal de germination apparaît nettement proportionnel à la quantité d'eau puisqu'il passe de 33% pour 4 mL à 53 % pour 12 mL, avec des comportements intermédiaires de 40 % avec 6 mL, 49 % avec 8 mL et 51% avec 10 mL.

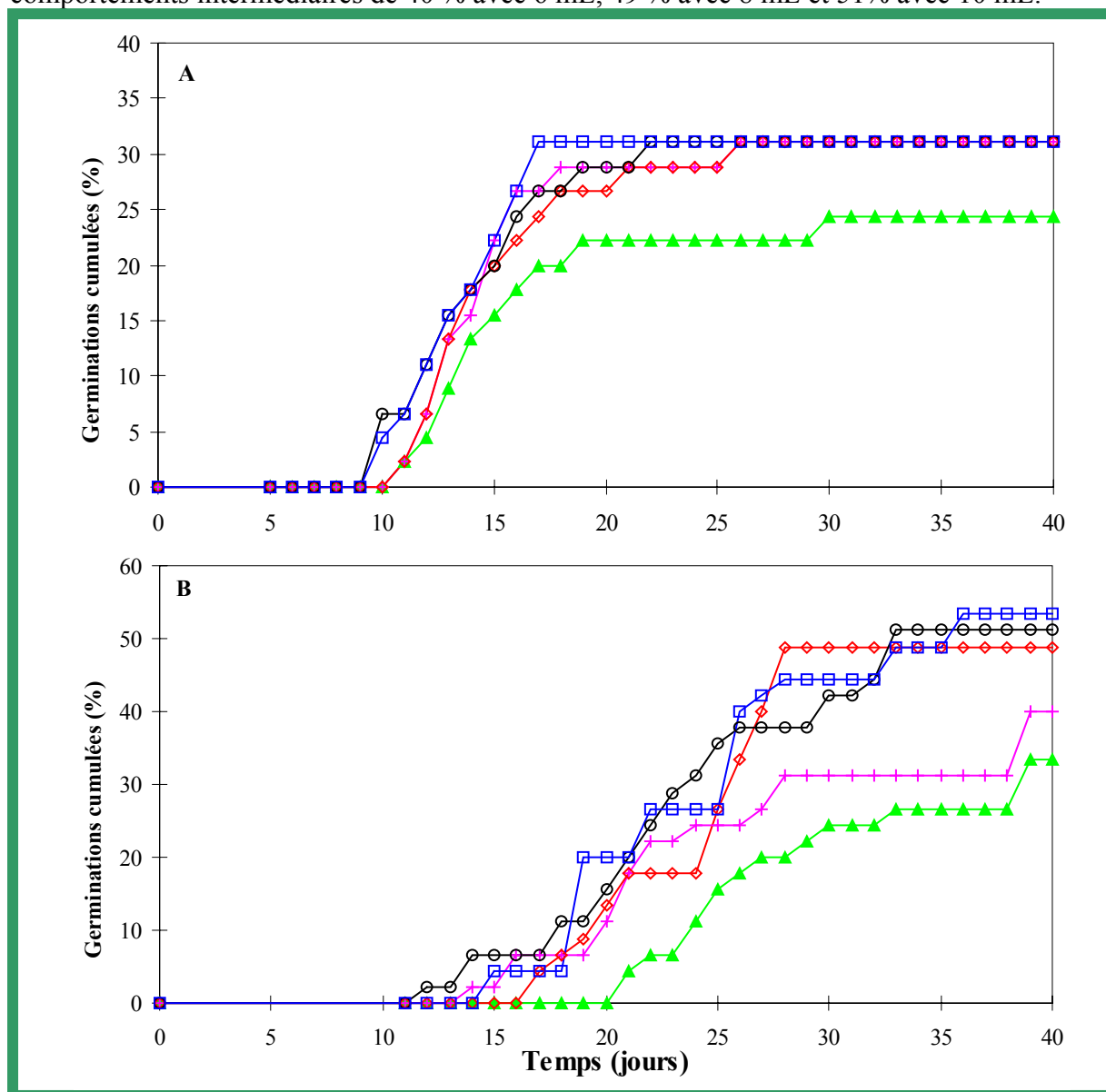


Figure 75 : Effets du taux d'humidité sur la germination de *Geissois pruinosa* (A) et *Cunonia macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec 4 mL (▲), 6 mL (+), 8 mL (◇), 10 mL (○) et 12 mL(□) d'eau distillée stérile à 25 °C.

B.3/ Effet de la lumière

L'expérimentation réalisée à l'obscurité d'une part et à la lumière d'autre part, n'a pas montré de différences significatives.

B.4/ Germination au hasard

La présence au sein du fruit de chacune des espèces d'une grande quantité de graines d'aspect non fertile, nous a conduit à réaliser ce test afin de déterminer le taux maximal de germination susceptible d'être obtenu *in situ*. Ce taux est de 10.9 % pour l'espèce *G. pruinosa* et de 11.25% pour l'espèce *C. macrophylla*.

C/ Discussion

Cette étude portant sur deux espèces de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie appartenant à deux genres différents montre combien les réponses des semences à différents traitements peuvent être variables au sein d'une même famille. Les semences de *G. pruinosa* germent pour des températures comprises entre 15° et 35°C, avec un optimum déterminé compris entre 27° et 28°C alors que celles de *C. macrophylla* germent à des températures comprises entre 15° et 30°C, avec un optimum compris entre 22° et 23°C. Au-dessous de 25°C et au-dessus de 30°C, le taux maximal de germination est fortement réduit et ceci pour les deux espèces. Aucune germination n'a été décelée aux températures de 5° et 40°C dans les deux cas. Les températures minimales de germination des deux espèces ont été déterminées comme proches de 9-10°C. Les températures maximales sont elles différentes puisque celle de *G. pruinosa* est estimée à 40°C contre 35°C pour les semences de *C. macrophylla*.

Leur attitude vis-à-vis de l'eau est là encore différente. Même s'il apparaît nettement que pour les deux espèces ce sont des volumes compris entre 8 et 12 mL d'eau distillée stérile qui conduisent au meilleur taux de germination, on constate malgré tout que les semences de *C. macrophylla* sont plus sensibles à une variation de la quantité d'eau. En effet, plus cette quantité est faible plus le taux maximal de germination diminue et plus le temps de latence augmente alors que pour *G. pruinosa*, ces deux facteurs ne sont que très peu affectés. Seul un volume très faible, de 4mL, paraît insuffisant pour une bonne germination quelle que soit l'espèce considérée. Ceci constitue un argument supplémentaire en faveur d'un degré d'imbibition et d'un régime thermique convenable pour que s'accomplisse la germination d'un lot de semences.

Dans ces conditions favorables déterminées, à 25°C avec 12 mL d'eau distillée stérile, il nous a paru intéressant de déterminer le taux de germination maximal obtenu en exposant des semences non triées provenant directement d'une grappe de fruits collectée sur le pied mère. Un dénombrement du nombre de graines d'aspect fertile par rapport au nombre total de graines observées donne un pourcentage de 35% chez *G. pruinosa*, contre 20% chez *C. macrophylla*. Cependant, il apparaît clairement que le nombre plus faible de graines d'aspect fertile déterminé chez *C. macrophylla* est compensé par un taux de germination plus élevé conduisant ainsi à une quasi-égalité des chances de voir lever autant de plants de *G. pruinosa* que de *C. macrophylla* dans le milieu naturel, avec des taux de germinations proches de 10.9% et 11.25% respectivement. Il s'agit là d'une remarquable adaptation.

L'observation des courbes de germinations cumulées de ces deux espèces révèle qu'elles appartiennent à deux types de courbes théoriques de germination (Côme, 1982). En effet, les semences de *G. pruinosa* germent rapidement et de manière regroupée alors que celles de *C. macrophylla* ont une germination étalée dans le temps avec dans les deux cas une partie des graines qui ne germent pas. Ceci est une preuve de l'hétérogénéité de ces semences non fixées et sous-entend que les graines non germées pourraient avoir un degré d'inaptitude à la germination plus élevé. Ce degré de non germination pourrait être attribué en partie à la richesse exceptionnelle de ces graines en tanins et autres composés phénoliques, surtout chez *C. macrophylla* (Fogliani, 1997), ce qui limiterait l'approvisionnement en oxygène de l'embryon. Il est bien admis que l'inaptitude à germer d'une semence met fréquemment en cause plusieurs phénomènes qui ne sont vraisemblablement pas totalement indépendants (Côme, 1970). Quelle que soit l'espèce considérée, le nombre non négligeable de semences non germées, nous a conduit à tenter d'éliminer d'éventuelles inhibitions tégumentaires ou dormances embryonnaires afin d'optimiser la germination.

III/ Tentatives d'optimisation de la germination des semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*.

Plusieurs aspects ont été considérés afin de tenter d'améliorer la germination des semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*.

Il nous fallait dans un premier temps nous assurer de l'effet de l'eau de Javel utilisée pour la désinfection des semences afin de déterminer si elle améliorait ou non le taux de germination.

Nous avons également constaté la présence de différentes couches entourant l'embryon, il nous a donc paru intéressant de lever une éventuelle inhibition tégumentaire. En effet, la présence d'une enveloppe séminale épaisse et/ou imperméable, rendant l'accès à l'eau difficile pour l'embryon ou l'empêchant de percer, existe chez de nombreuses familles de plantes. On y remédie le plus souvent par l'élimination d'une partie ou de la totalité de cette enveloppe, par scarification mécanique ou par attaque acide (Baskin *et al.*, 1998 ; Burrows, 1999 ; El-Siddig *et al.*, 2001 ; Tibagu & Odén, 2001). Une autre méthode utilisée, en particulier chez les légumineuses (Tibagu & Odén, 2001), consiste à pré-traiter les semences en les plongeant dans un bain d'eau chaude.

Enfin, même si les espèces étudiées sont d'origine sub-tropicale, il nous paraissait intéressant d'observer l'effet du froid sur de telles semences. Il faut rappeler que durant la saison fraîche, les températures dans certaines régions de Nouvelle-Calédonie peuvent descendre sous la barre des 10°C.

A/ Impact de la désinfection, de la scarification et du froid sur la capacité germinative des semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*.

A.1/ Matériel et méthodes

A.1.1/ Effet de la désinfection à l'hypochlorite de sodium

Ce test a pour but de déterminer si l'hypochlorite de sodium à 4% (eau de Javel à 48° chloré pure) utilisé pour désinfecter les graines a un effet important sur la capacité germinative des semences. Il est réalisé en plaçant un lot de graines non désinfecté et un second désinfecté dans les mêmes conditions : t°=25°C, humidité=12 mL d'eau distillée stérile pendant 40 jours.

A.1.2/ Effet de la scarification mécanique

L'effet de la scarification est observé après avoir minutieusement ôté la partie tégumentaire de la graine par un mouvement circulaire entre les doigts. Les graines sont ensuite désinfectées puis mises à germer à 25°C dans 12 mL d'eau distillée stérile pendant 40 jours.

A.1.3/ Effet d'un traitement à l'eau chaude

Pour déterminer l'effet de l'eau chaude sur la capacité germinative des graines, celles-ci sont au préalable placées dans de petites poches de gaze, désinfectées puis trempées dans l'eau distillée stérile préalablement chauffée à la température de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100°C et laissées pendant 12 heures jusqu'à refroidissement à la température ambiante. Elles sont ensuite mises à germer à 25 °C avec 12 mL d'eau distillée stérile pendant 40 jours.

A.1.4/ Effet d'un traitement à l'acide sulfurique

Les graines sont mises à tremper pendant 5 minutes dans de l'acide sulfurique concentré (95-97%) ou dilué au 1/2, au 1/4, au 1/8, au 1/16. Après ce traitement, elles sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile avant d'être mises à germer sur boîtes à 25°C avec 12 mL d'eau distillée stérile pendant 40 jours.

A.1.5/ Effet d'un traitement par le froid

L'effet du froid est déterminé par trempage des graines, préalablement désinfectées, dans 10 mL d'eau distillée stérile placées au réfrigérateur à 4°C pendant 2, 4, 7, 10, 14, 21 et 28 jours. Elles sont ensuite mises à germer à 25°C avec 12 mL d'eau distillée stérile pendant 40 jours.

A.2/ Résultats

A.2.1/ Effet de la désinfection à l'hypochlorite de sodium

L'observation des courbes de germinations cumulées en fonction du temps pour les deux espèces de Cunoniaceae (Figure 76) montre que la désinfection à l'hypochlorite de sodium à 4%, n'a pas d'effet notable sur la capacité germinative des semences puisque le taux maximum de germination varie de 31 à 33 % pour *G. pruinosa* et de 51 à 53 % pour *C. macrophylla*. Seul le temps de latence, pour l'espèce *C. macrophylla* est affecté par ce traitement puisqu'il diminue de 19 à 15 jours, alors que pour l'espèce *G. pruinosa* celui-ci ne varie que d'un jour.

En revanche, l'observation au cours de la manipulation montre un effet notable de ce traitement sur la diminution du nombre de contaminations par des bactéries ou des champignons.

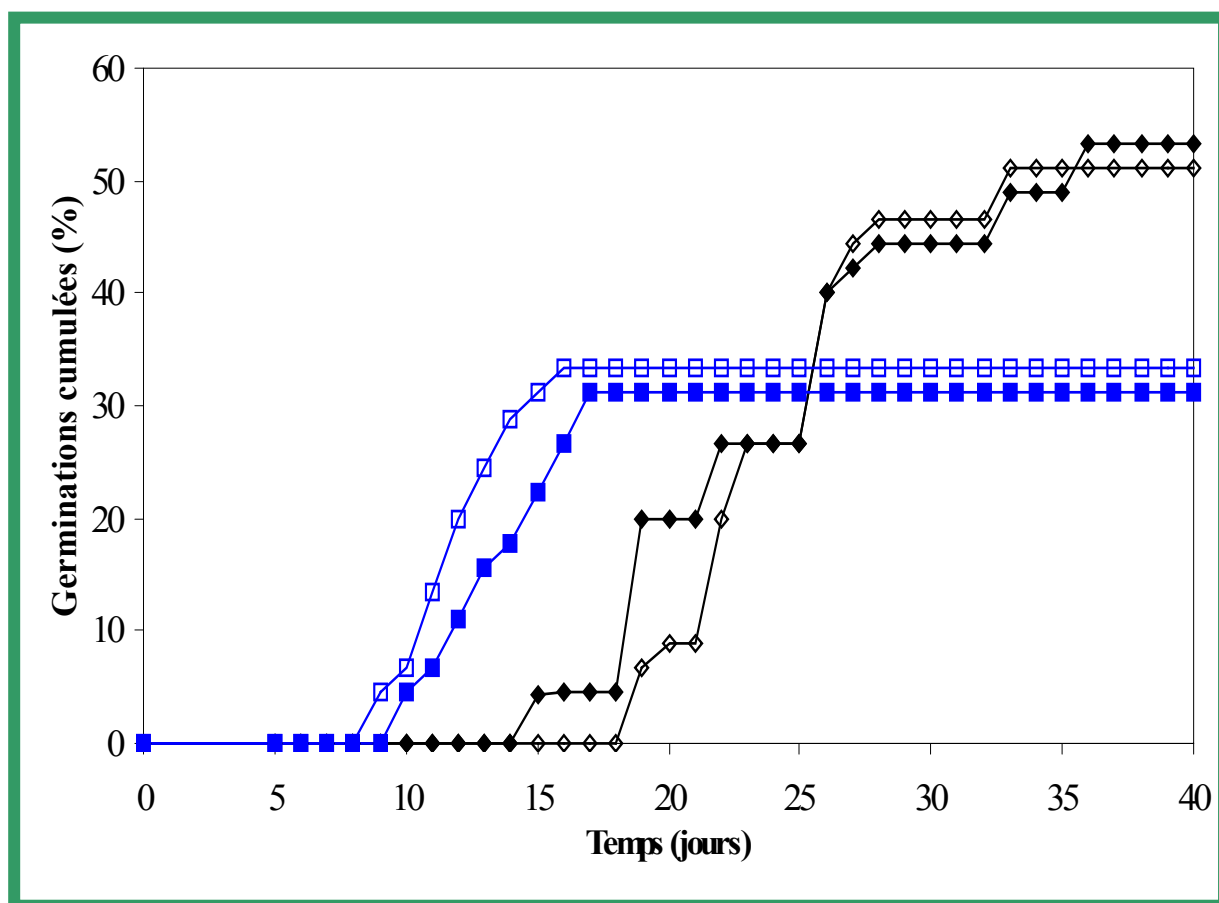


Figure 76 : Effets d'une désinfection à l'hypochlorite de sodium à 4% (eau de Javel, 48°chloré pure) sur la germination de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*. Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps après désinfection à l'eau de Javel 4% pour *G. pruinosa* (■) et *C. macrophylla* (◆) ou sans désinfection pour *G. pruinosa* (□) et *C. macrophylla* (◇) à 25°C.

A.2.2/ Effet de la scarification mécanique

La scarification mécanique permet d'augmenter considérablement le taux maximal de germination des semences de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla* qui passe de 31.1% à 40% et de 53.3% à 82.2% respectivement (Figure 77). Ceci est une preuve de l'efficacité d'un tel traitement. Le temps de latence n'est, quant à lui, que très faiblement affecté.

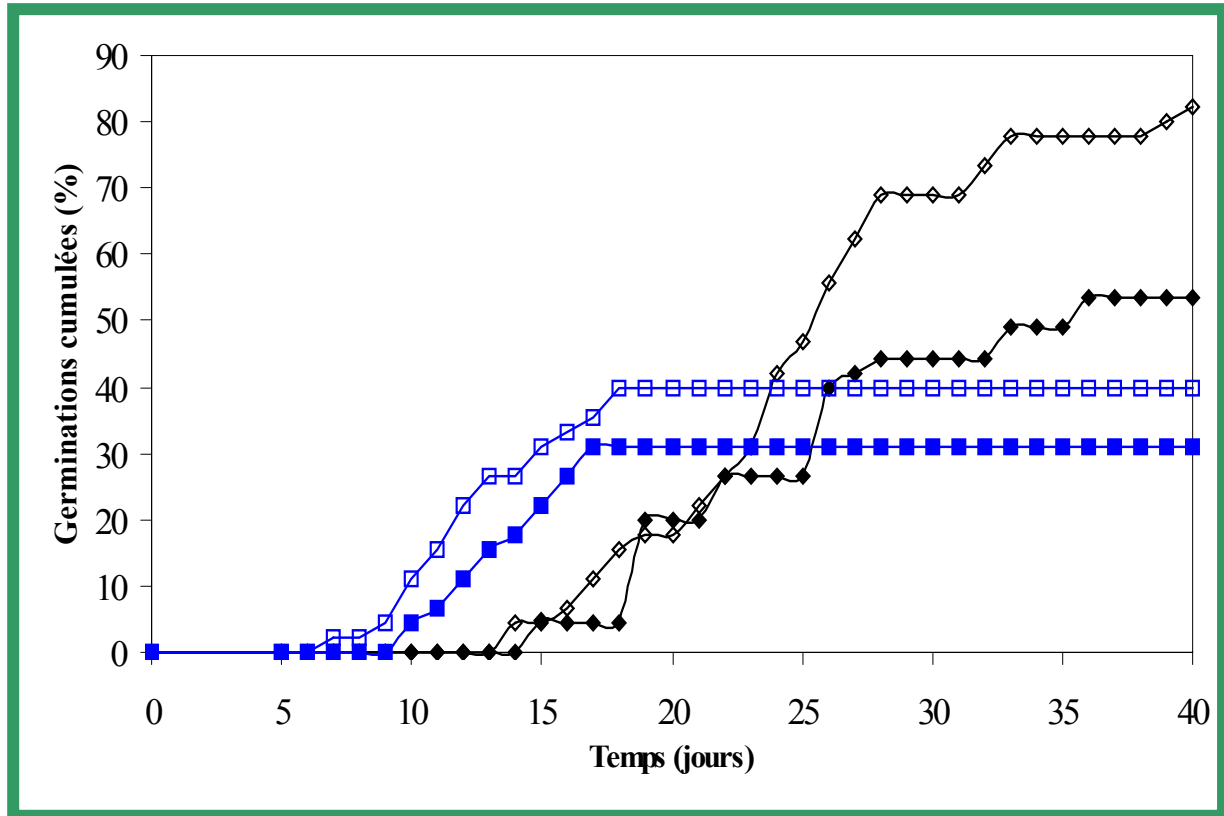


Figure 77 : Effets d'une scarification mécanique sur la germination de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla*. Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec scarification mécanique pour *G. pruinosa* (□) et *C. macrophylla* (◇) ou sans scarification pour *G. pruinosa* (■) et *C. macrophylla* (◆).

A.2.3/ Effet d'un traitement à l'eau chaude

Un traitement préalable à l'eau chauffée de 30° à 60°C sur des semences de *G. pruinosa* a pour effet d'augmenter le taux maximal de germination et de diminuer le temps de latence de façon notable (A). En effet, avec de l'eau chauffée à 30°, 50° ou 60°C, le taux de germination maximal passe de 31.1% au niveau du témoin à 37.6% pour les échantillons traités. Plus encore, une eau à 40°C permet d'atteindre un taux de 43%. Quant au temps de latence, il se trouve diminué de 2 à 4 jours. Enfin, il est important de constater que le temps nécessaire pour atteindre le taux maximal de germination augmente proportionnellement avec la température de l'eau puisqu'il faut entre 15 et 16 jours pour une eau à 30° ou 40°C contre 27 à 29 jours pour une eau à 50° ou 60°C. Aucune germination n'est constatée dans le cas d'un traitement à l'eau dont la température excède 60°C.

Contrairement aux semences de *G. pruinosa*, le taux maximal de germination pour *C. macrophylla* n'est optimisé qu'avec des traitements à l'eau chauffée entre 30° et 50°C (B). Ce taux passe de 53.3% chez le témoin à 54.8% pour un traitement dont l'eau est à 30° ou 50°C, mais surtout il atteint 70.4% pour une eau à 40°C. Pour des températures d'eau supérieures à 50°C, ce taux diminue puisqu'il passe à 50.8% pour une eau à 60°C puis à 3.9% pour une eau à 70°C avant d'être nul à des températures plus élevées. Le temps de latence est quant à lui peu affecté pour des températures d'eau comprises entre 30°C et 40°C puisqu'il est de 14 à 16 jours. Par contre, il augmente proportionnellement avec la température de l'eau lorsqu'elle est chauffée à plus de 40°C. Ainsi pour une eau à 50°C, il est de 20 jours, jusqu'à 37 jours pour une eau à 70°C avec un intermédiaire de 23 jours pour une eau à 60°C.

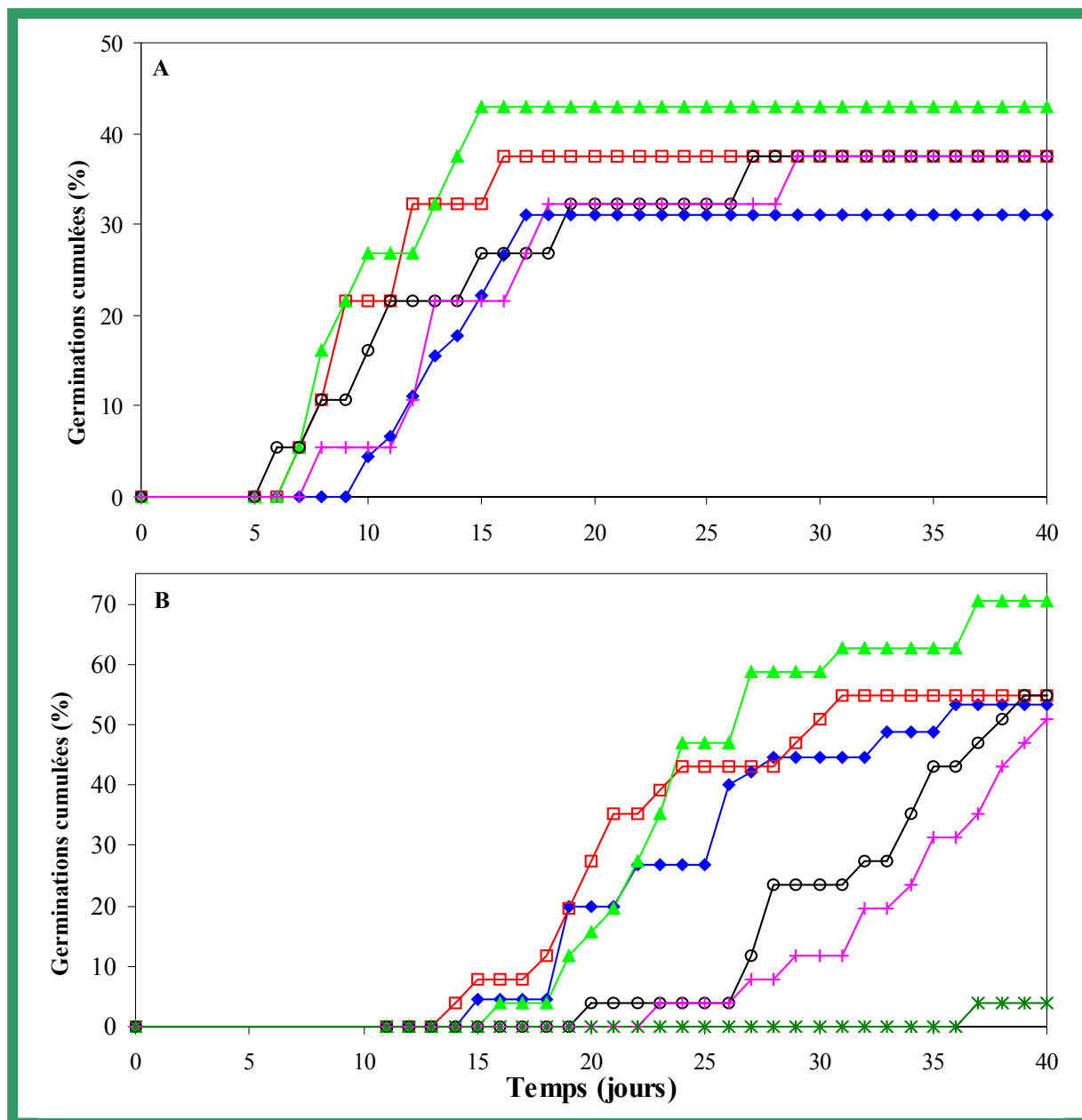


Figure 78 : Effets d'un traitement à l'eau chaude sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement à l'eau distillée stérile chauffée à une température de 30°C (□), 40°C (▲), 50°C (○), 60°C (+), 70°C (※) ou sans traitement (◆).

A.2.4/ Effet d'un traitement à l'acide sulfurique

Quelle que soit l'espèce considérée, il apparaît clairement que le type de traitement à l'acide sulfurique que nous avons appliqué aux semences de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla* est défavorable à leur germination. Dans les deux cas, le taux maximal de germination est affecté (Figure 79). Pour *G. pruinosa*, il diminue de 31.1% chez le témoin à 10.7% pour les semences traitées à l'acide sulfurique dilué au 1/2, au 1/4 ou au 1/8, avec un taux de 26.7% atteint avec une dilution au 1/16^{ème}. Pour *C. macrophylla*, ce taux est moins affecté puisqu'il est de 43% pour une dilution au 1/16 et de 35,2% à des dilutions de 1/4 et 1/8 contre 53.3% pour le témoin. Seul le traitement à l'acide dilué au 1/2 fait baisser ce taux à 3.9%. Pour ce qui est du traitement à l'acide sulfurique pur pendant 5 minutes, aucune germination n'est décelée quelle que soit l'espèce.

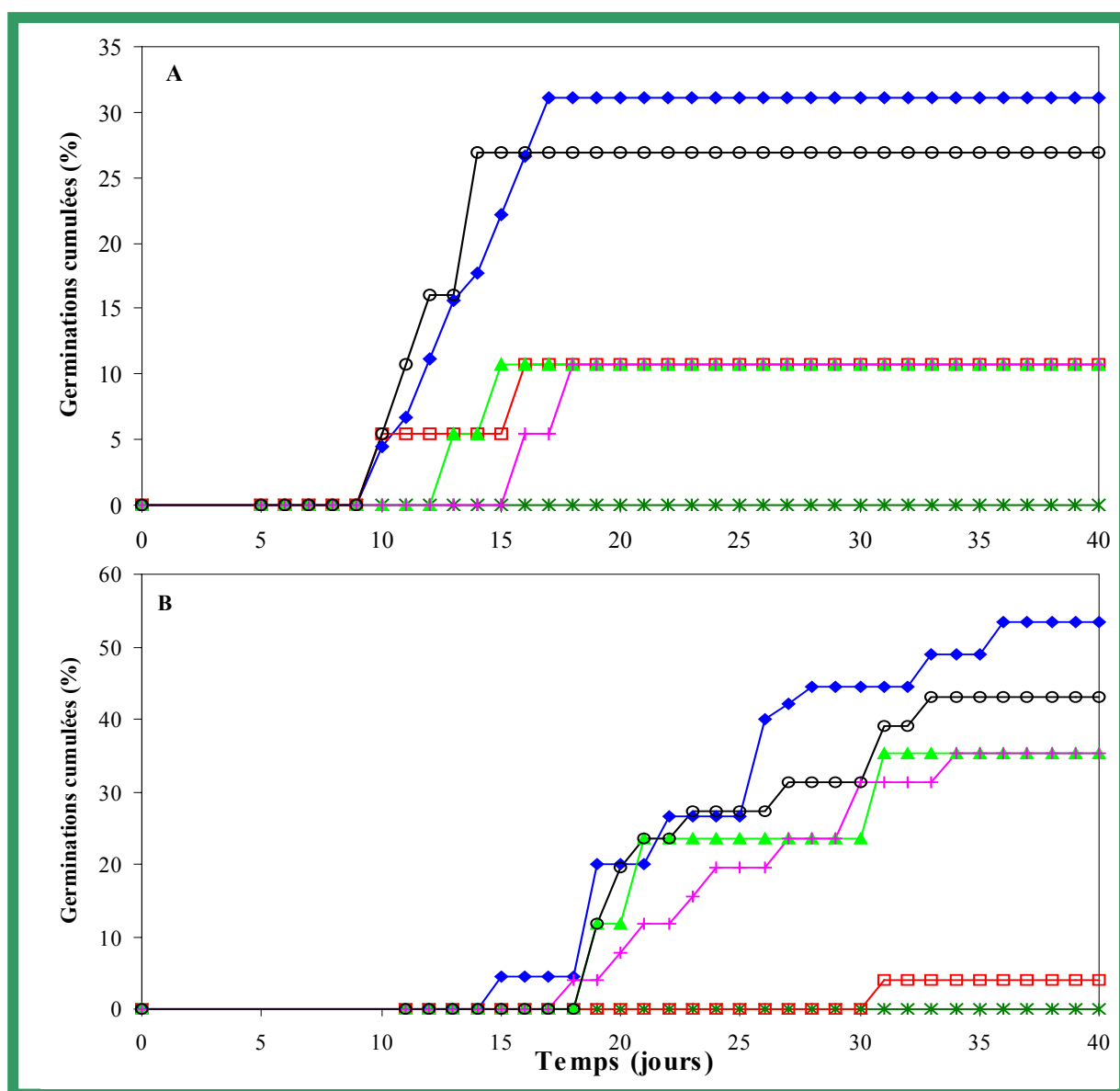


Figure 79 : Effets d'un traitement à l'acide sulfurique sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement à l'acide sulfurique concentré 95-97% (*), dilué au 1/2 (□), dilué au 1/4 (▲), dilué au 1/8 (+), dilué au 1/16 (○) ou sans traitement (◆).

A.2.5/ Effet d'un traitement par le froid

Les semences de *G. pruinosa* qui possèdent un taux de germination maximal de 31.1% à 25°C avec 12 mL d'eau distillée stérile, voient ce taux diminué lorsqu'on les traite préalablement à une température de 4°C pendant une période de temps comprise entre 2 et 14 jours (Figure 80A). Si cette période est de 21 ou 28 jours, ce taux augmente considérablement par rapport au témoin puisqu'il passe à 37.8% et 42.2% respectivement. Le temps de latence est également affecté par ces traitements longs et diminue ainsi de 3 jours.

En ce qui concerne les semences de *C. macrophylla*, seul un traitement de 14 jours au froid permet d'améliorer le taux de germination maximum qui n'augmente cependant que de 4% (Figure 80B). Toutes les autres périodes d'exposition au froid testées ont un effet négatif sur la germination de ces semences qui présente des taux maximums compris entre 17.8% et 35.6% contre 53.3% pour le témoin.

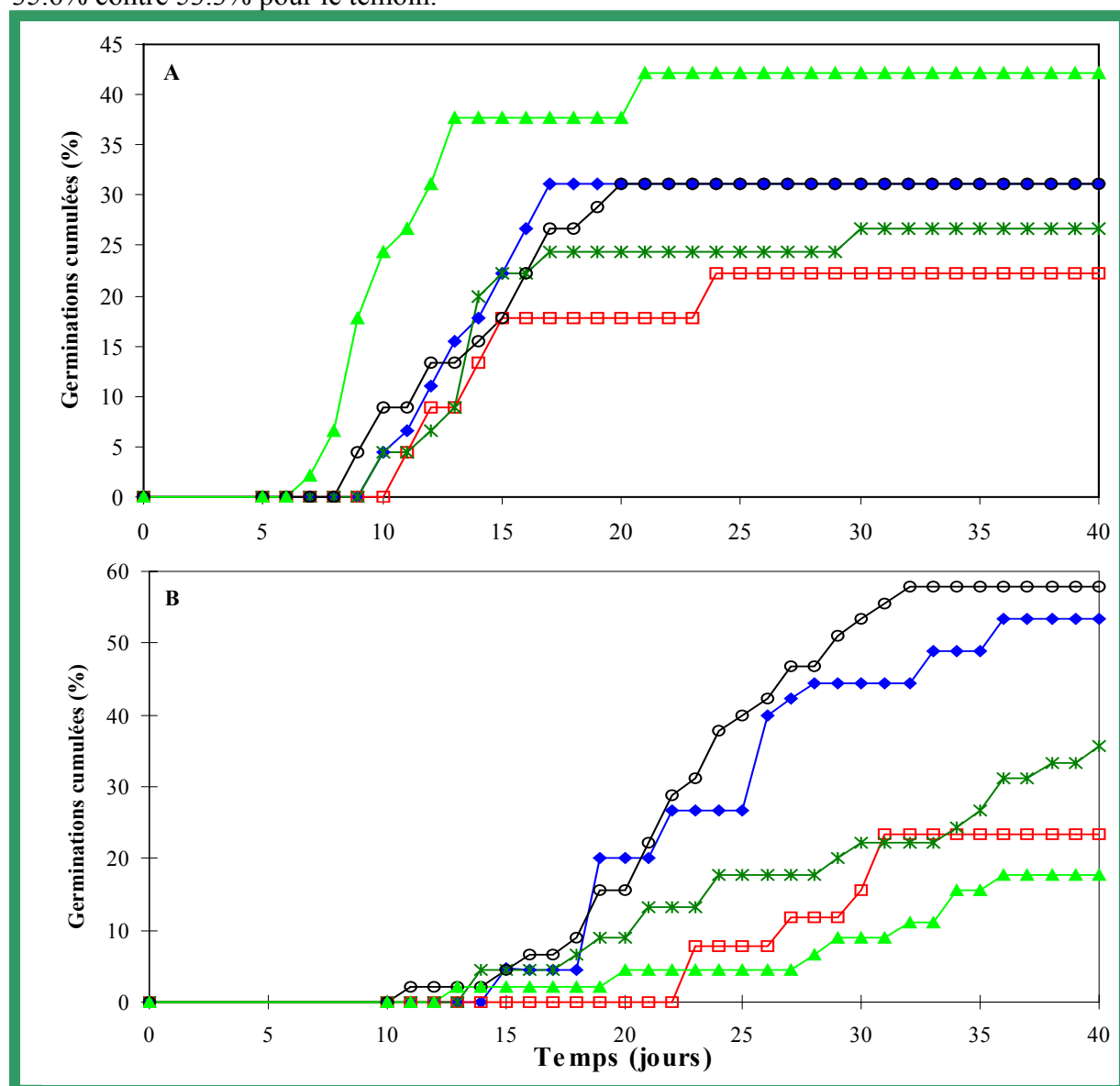


Figure 80 : Effets d'un traitement par le froid sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement par le froid à 4°C pendant 2 jours (□), 7 jours (※), 14 jours (○), 28 jours (▲) ou sans traitement (◆).

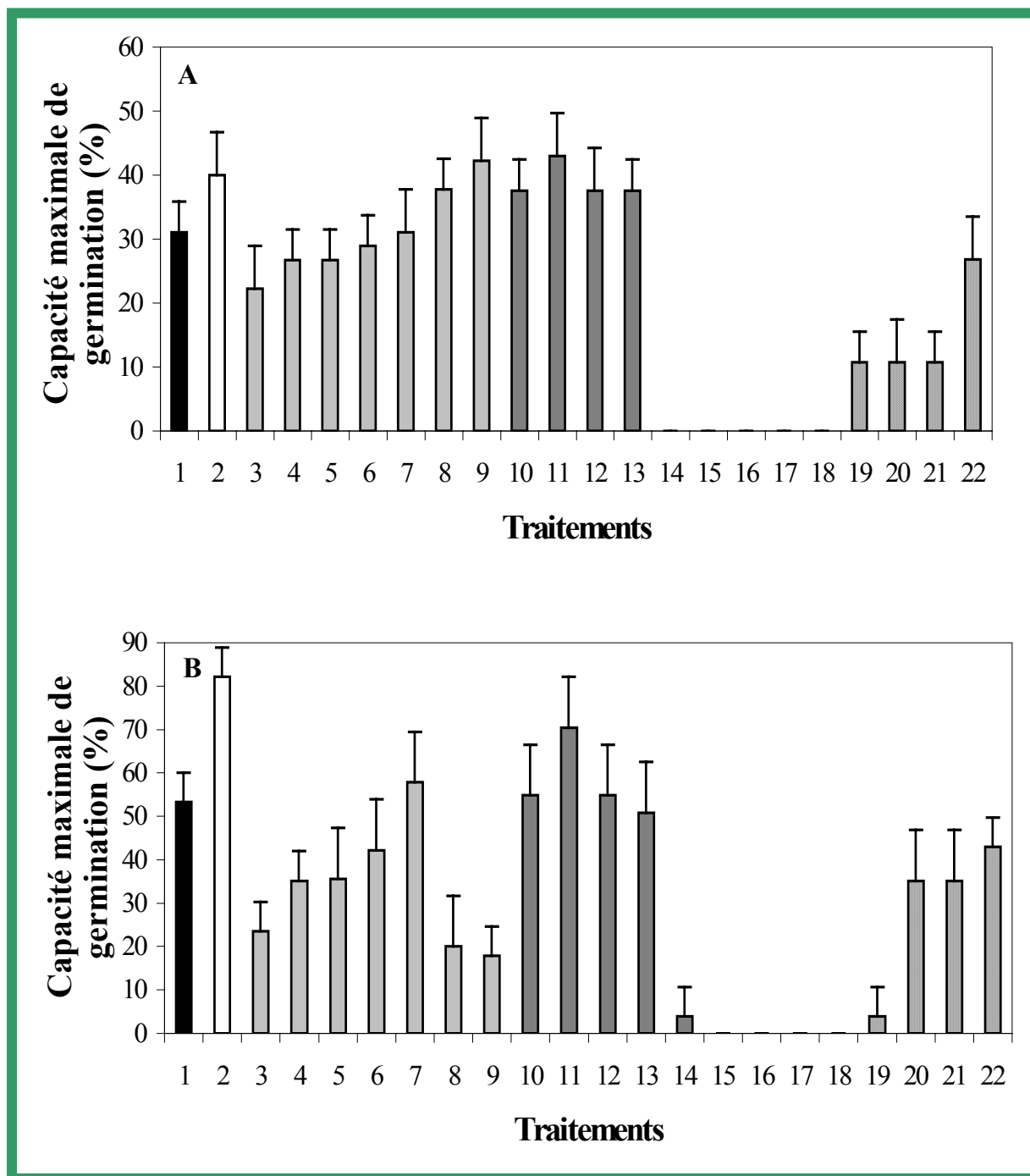


Figure 81 : Capacité maximale de germination des semences de *Geissois pruinosa* (A) et de *Cunonia macrophylla* (B) à 25°C en réponse à différents pré-traitements. Traitements : 1 = Témoin. 2 = Scarification mécanique. 3 = Froid à 4°C, 2j. 4 = Froid à 4°C, 4j. 5 = Froid à 4°C, 7j. 6 = Froid à 4°C, 10j. 7 = Froid à 4°C, 14j. 8 = Froid à 4°C, 21j. 9 = Froid à 4°C, 28j. 10 = Eau chaude à 30°C. 11 = Eau chaude à 40°C. 12 = Eau chaude à 50°C. 13 = Eau chaude à 60°C. 14 = Eau chaude à 70°C. 15 = Eau chaude à 80°C. 16 = Eau chaude à 90°C. 17 = Eau chaude à 100°C. 18 = Acide sulfurique pur, 5 min. 19 = Acide sulfurique dilué au 1/2, 5 min. 20 = Acide sulfurique dilué au 1/4, 5 min. 21 = Acide sulfurique dilué au 1/8, 5 min. 22 = Acide sulfurique dilué au 1/16, 5 min.

A.3/ Discussion

Il apparaît très clairement que la scarification mécanique est une méthode simple et efficace qui conduit tant chez *G. pruinosa* et plus encore chez *C. macrophylla* à une augmentation importante de la capacité germinative (Figure 81). Ceci est d'autant plus intéressant que les semences de ces deux espèces ne possèdent pas, à proprement parler, une couche tégumentaire épaisse, mais une superposition de couches fines, qui justifie l'utilisation de cette méthode souvent employée pour des semences présentant cette propriété (Tibagu & Odén, 2001, El-Siddig *et al.*, 2001). Ce fait est confirmé par l'effet néfaste d'un pré-traitement à l'acide sulfurique, pur ou dilué, qui semble provoquer des lésions irréversibles à l'embryon, puisqu'il conduit à un taux de germination inférieur à celui du témoin (Figure 81). La scarification mécanique permettrait donc une meilleure accessibilité à l'eau des semences de même qu'elle faciliterait une émergence de la radicule par fragilisation des structures de l'enveloppe séminale. On peut également penser qu'elle permet l'élimination de substances inhibitrices de la germination ou de substances perturbant l'alimentation en oxygène de l'embryon (cas des polyphénols abondant au sein de ces semences).

L'utilisation d'eau chaude comme traitement préalable a été reconnue comme améliorant la germination chez des espèces de légumineuses à enveloppe épaisse (Tibagu & Odén, 2001). Notre étude montre qu'elle permet également d'optimiser le taux de germination maximal chez les deux espèces de Cunoniaceae mais ceci à des températures plus basses que celles utilisées par ces auteurs, en particulier à 40°C. Dans le cas de *G. pruinosa*, ce traitement est équivalent voire meilleur que la scarification mécanique alors que chez *C. macrophylla*, il apparaît moins favorable. A des températures d'eau supérieures à 60°C, la germination des semences de *G. pruinosa* est nulle et très faible pour celles de *C. macrophylla* qui ne germent plus au-delà. Ces températures élevées causent vraisemblablement des dommages à l'embryon. Comparativement aux semences de légumineuses qui ne germent plus pour des températures d'eau supérieures à 80°C et dont l'enveloppe est très épaisse, résistante à des attaques acides et nécessitant une scarification mécanique importante, les semences de Cunoniaceae dont l'enveloppe est fine semblent proportionnellement résistantes à de fortes températures (jusqu'à 60°C).

Un traitement par le froid semble paradoxal pour des semences dont les espèces sont d'origine subtropicale, cependant des températures avoisinant 5 à 10°C sont relevées en Nouvelle-Calédonie pendant la nuit durant les mois de juillet et août. Dans le cas de *G. pruinosa*, plus le temps d'exposition au froid est élevé, plus le taux de germination maximal est important, mais seuls des traitements dont la période excède 21 jours permettent de l'améliorer comparativement au témoin (Figure 81). Ce taux est équivalent à celui obtenu par une scarification mécanique ou un pré-traitement à l'eau chauffée à 40°C. Au contraire chez *C. macrophylla*, ce traitement ne présente pas d'avantages notables puisque même pour 14 jours d'exposition au froid, le taux obtenu de 57.8% est quasiment équivalent à celui du témoin avec 55.5%.

L'ensemble de ces résultats valorisé sous forme d'article est actuellement soumis pour publication.

B/ Effet de la prégermination sur les semences de *G. pruinosa* et *C. macrophylla*

L'observation des courbes de germinations cumulées, essentiellement pour *C. macrophylla*, montre un étalement du processus germinatif. Ceci, nous a conforté dans l'idée d'utiliser la méthode de prégermination qui présente l'avantage d'une germination plus rapide et plus homogène des semences. Mais plus encore, elle permet de diminuer l'impact d'une mauvaise oxygénation et fournit une plage thermique de germination plus large (Corbineau *et al.*, 1994 ; Côme *et al.*, 1998 ; Özbingöl *et al.*, 1998). « La prégermination fait appel aux particularités de la germination *sensu stricto*. Ce traitement consiste à assurer le démarrage de la germination en plaçant les semences en présence d'eau (hydropriming) ou plus généralement d'une solution de polyéthylèneglycol (PEG) (osmopriming) dont le potentiel hydrique dépend de l'espèce considérée. Le choix judicieux de la température d'incubation, de la durée du traitement et du potentiel hydrique de la solution de PEG permet d'assurer la germination *stricto sensu* de toutes les semences du lot traité sans que leur radicule s'allonge. Les semences peuvent alors être séchées et conservées avant d'être semées. » (Côme *et al.*, 1998). Ce procédé présente un avantage considérable dans le cadre de restauration de site. En effet, des essais menés lors de revégétalisation de maquis miniers par hydro-seeding en Nouvelle-Calédonie ont montré un étalement de germination sur plusieurs années pour certaines semences (résultats non publiés). Un prétraitement permettrait sans aucun doute de fournir des semences qui germent toutes, qui germent vite et donnant des plantules normales et vigoureuses, dont la germination est peu sensible aux facteurs du milieu et qui se conservent bien (Corbineau *et al.*, 1996).

B.1/ Matériel et méthodes

Le principe du test de germination est le même que précédemment, seul le prétraitement réalisé en amont diffère.

Quelle que soit l'espèce considérée, les semences subissent dans un premier temps une désinfection à l'eau de Javel, puis sont disposées dans 10 mL d'une solution de Polyéthylèneglycol 6000 à 342 g/L, préparée avec de l'eau distillée stérile. Le tout est mis à la température de 15°C pendant 2, 7, 10, 14, 21 ou 28 jours. Après cette période, les semences sont rincées rapidement à l'eau distillée stérile puis mises à germer sur boîte de Pétri à 25°C dans 12 mL d'eau distillée stérile. Le phénomène est suivi pendant 40 jours.

B.2/ Résultats

L'analyse des courbes de germinations cumulées en fonction de périodes de prétraitement dans du PEG 6000 à 15°C montre des différences notables selon les semences considérées. Dans le cas de *G. pruinosa*, des périodes courtes allant de 2 à 10 jours augmentent proportionnellement le taux de germination qui passe de 31.1% chez le témoin à 44.4% pour un prétraitement de 10 jours, avec des intermédiaires de 35.6 et 42.2% pour des périodes de 2 et 7 jours respectivement (Figure 82A). En ce qui concerne le temps de latence, il est à peine réduit passant de 10 à 9 jours, en revanche le temps nécessaire à la germination du même nombre de semences que le témoin est plus réduit puisqu'il ne suffit plus que de 15 jours contre 17 chez le témoin pour l'atteindre avec des prétraitements de 7 et 10 jours. Cependant, le temps nécessaire pour atteindre la moitié du taux de germination maximal apparaît nettement indépendant de la durée du prétraitement.

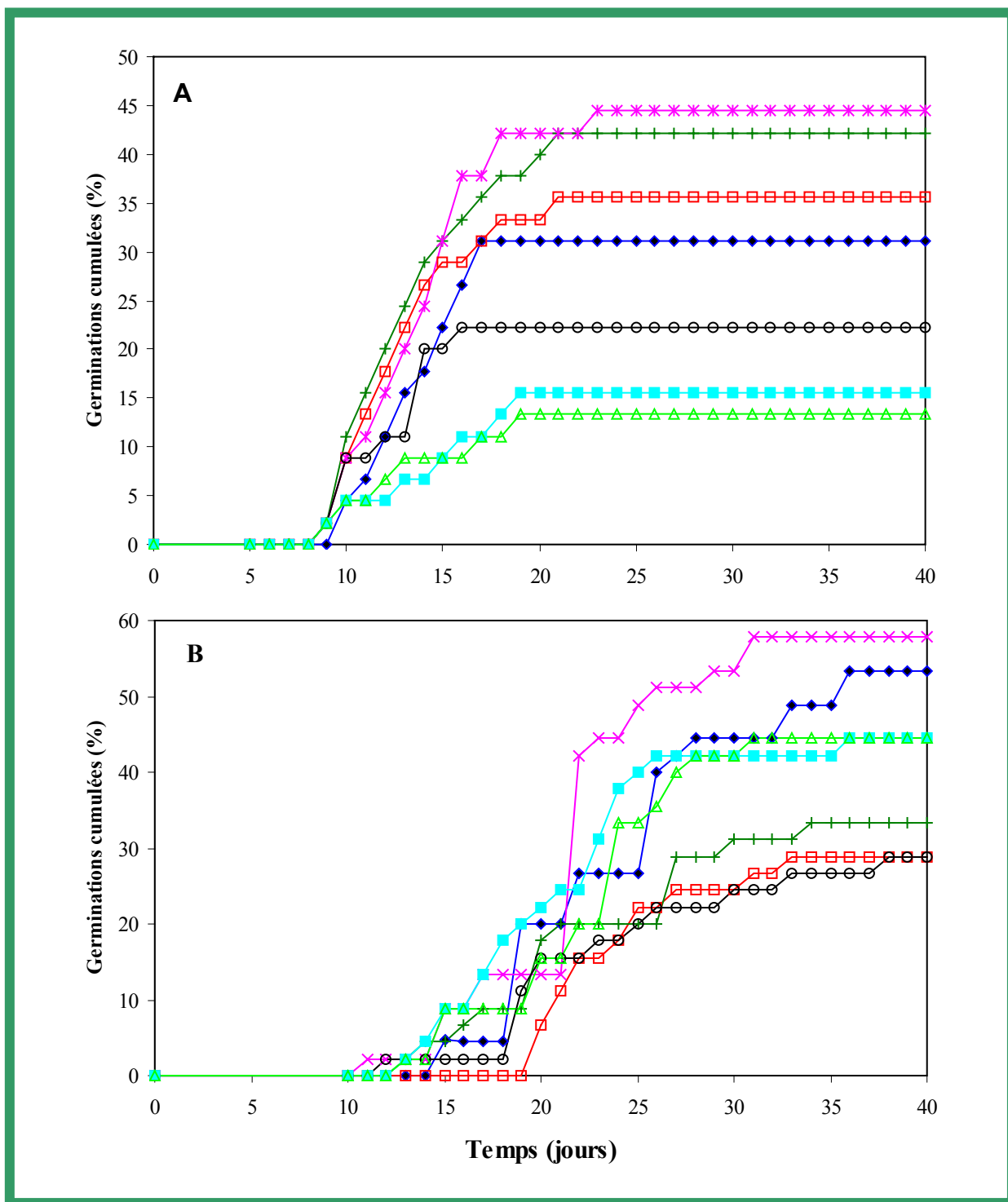


Figure 82 : Effets d'un prétraitement par le PEG 6000 sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un prétraitement par le PEG 6000 à 15°C pendant 2 jours (□), 7 jours (+), 10 jours (✱), 14 jours (○), 21 jours (■), 28 jours (△) ou sans traitement (◆).

Pour *C. macrophylla*, contrairement aux résultats escomptés, le prétraitement au PEG 6000 ne permet pas de réduire l'étalement des germinations au cours du temps, car dans le meilleur des cas pour un prétraitement de 10 ou 28 jours, le maximum de germination est obtenu après 31 jours (Figure 82B). Malgré tout le prétraitement de 10 jours semble intéressant puisque non seulement il réduit cet étalement de 5 jours par rapport au témoin (31 jours contre 36), mais plus encore il augmente le taux de germination maximum à 57.8% contre 53.3% chez le témoin. Il est à noter également qu'au bout de 22 jours, le taux de germination avec ce même prétraitement est double de celui du témoin avec près de 40% des graines germées. Là encore, le temps nécessaire pour atteindre la moitié du taux maximum de germination est quasi identique pour tous les traitements ; il est compris entre le 20^{ème} et le 22^{ème} jour.

B.3/ Discussion

Cette expérience initialement réalisée dans le but de réduire le temps nécessaire à la germination des semences de *C. macrophylla*, nous permet de tirer des enseignements importants sur la réaction des deux types de semences à ces prétraitements. Il nous faut dans un premier temps indiquer que la pression osmotique créée par une solution de PEG 6000 placée à 15°C est de -1.5 MPa, valeur obtenue par le calcul selon Burlyn *et al.* (1973). L'abaissement du potentiel hydrique extérieur permet de simuler les difficultés que rencontrent les semences *in situ* pour accéder à l'eau puisque la différence de potentiel hydrique entre l'intérieur et l'extérieur est moindre.

Dans nos conditions expérimentales, on constate clairement que ce prétraitement favorise pour des périodes courtes de 2 à 10 jours, le taux maximal de germination des semences de *G. pruinosa* sans pour autant permettre une germination plus rapide. Des temps plus longs sont défavorables, ce qui pourrait être dû à l'absence d'oxygénation du milieu dans lequel est effectué ce prétraitement. Les semences de *C. macrophylla* donnent quant à elles des résultats variables. Aucune tendance réelle ne se dégage pour la période de prétraitement. Si celle-ci est trop courte (2 à 7 jours) ou trop longue (14 à 28 jours), la germination s'en trouve affectée. Contrairement à *G. pruinosa*, les périodes courtes sont plus défavorables que les périodes longues. On peut donc penser que le temps nécessaire à l'imbibition des semences et à leur prégermination est plus long. Puis, au delà de 14 jours, le manque d'oxygène du milieu semble avoir le même effet que chez *G. pruinosa*. En fait, seul un prétraitement de 10 jours dans le PEG 6000 à 15°C, permet d'améliorer chez les deux espèces, le taux maximal de germination. Pour l'espèce *C. macrophylla*, ceci est d'autant plus intéressant, qu'il permet d'obtenir un meilleur rendement sur une période plus courte. En effet, le maximum de germination de 57.8% (contre 53.3% chez le témoin) est atteint après 30 jours (contre 35 chez le témoin). Plus encore entre le 21^{ème} et le 22^{ème} jour, le pourcentage de germinations cumulées fait un bond de 13.3% à 42.2%, ce qui indique la tendance vers une harmonisation de la germination de nos semences caractérisées par une hétérogénéité importante.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives pour l'étude de tels prétraitements. Il serait en particulier intéressant d'étudier l'impact de cette prégermination sur la sensibilité à la température et à l'oxygénation de nos semences. D'autres tests, avec différentes concentrations de PEG et à différentes températures devraient permettre là aussi d'améliorer considérablement le taux de germination de ces semences, de réduire le temps de latence et le temps nécessaire à la germination de la totalité des semences (Özbingöl *et al.*, 1998).

IV/ Impact des éléments du syndrome serpentinique sur la germination des semences de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla*

Les deux espèces considérées, *C. macrophylla* et *G. pruinosa*, présentent la particularité de ne pousser exclusivement que sur substrat ultrabasique à l'état naturel. Plus encore, *C. macrophylla* est entièrement inféodée au maquis miniers alors que *G. pruinosa* peut se développer au niveau d'autres formations (Morat *et al.*, 1986). Les sols ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie sont caractérisés par une forte toxicité métallique due à une concentration importante en éléments sidérophiles (Fe, Cr, Ni, Co, Mn et Mg), ainsi que par une faible teneur en matière organique et en éléments nutritifs tels que N, P, Ca et K. Les teneurs en métaux peuvent excéder 80%, cependant seule une faible partie est accessible sous forme extractible et est susceptible d'être toxique. Ainsi les teneurs extractibles en Ni, Co et Fe varient de 1 à 100 ppm (Brooks, 1987). Tous ces faits constituent par définition le syndrome serpentinique. A la lumière de ces données, il nous semblait essentiel de déterminer l'impact de quelques uns de ces éléments sur la germination des semences de nos deux espèces. Notre choix s'est porté en premier lieu sur le nickel, le magnésium et le calcium.

A/ Matériel et méthodes

Le principe du test de germination est le même que celui décrit dans les paragraphes précédents, à l'exception du fait qu'à la place de l'eau distillée stérile, ce sont 12 mL des solutions contenant les différents éléments étudiés qui sont ajoutés dans les boîtes de Pétri contenant les semences préalablement désinfectées. Ces boîtes sont alors incubées à une température de 25°C et ceci pendant 40 jours.

Les solutions utilisées ont été les suivantes :

- Chlorure de Nickel à 10, 100 ou 1000 ppm
- Chlorure de Magnésium à 10, 100 ou 1000 ppm
- Chlorure de Calcium à 25, 50 ou 75 ppm.

B/ Résultats

B.1/ Impact du nickel

L'observation des courbes de germinations cumulées concernant l'impact du nickel sur la germination des deux espèces de Cunoniaceae, montre une différence notable entre *G. pruinosa* et *C. macrophylla*. En effet, il est intéressant de constater que pour *G. pruinosa*, le nickel aux concentrations de 10 et 100 ppm est favorable, améliorant même de manière importante le taux de germination maximum (44.4% contre 31.1% chez le témoin) pour une concentration à 10 ppm de nickel (Figure 83A). Cependant à cette même concentration le temps nécessaire pour atteindre le taux maximal de germination est plus important (25 jours contre 17 chez le témoin) malgré une vitesse de germination voisine pendant les 15 premiers jours. La courbe pour la concentration de 100 ppm est voisine de celle du témoin avec un taux maximal de germination proche de 33.3%. Enfin, pour une concentration de 1000 ppm, la germination s'en trouve légèrement affectée puisque le taux maximum passe de 31.1% chez le témoin à 26.7% pour le lot traité. La vitesse de germination est plus faible puisqu'il faut 35 jours aux semences pour atteindre le taux maximal contre 15 pour le témoin. Par contre, le temps de latence est allongé passant de 9 à 12 jours.

Dans le cas de *C. macrophylla*, les résultats sont à l'opposé, puisque quelle que soit la concentration considérée, le traitement au nickel est défavorable à la germination (Figure 83B). En effet, même pour une concentration faible de 10 ppm, le taux maximal de germination est diminué (44.4% contre 53.3% pour le témoin), le temps de latence est rallongé (16 jours contre 14 pour le témoin). Cette tendance se confirme pour des concentrations croissantes de nickel, puisque le lot traité par 100 ppm de nickel voit son taux maximal réduire à 20% et son temps de latence augmenter à 27 jours. Ce temps est de 28 jours pour le traitement avec 1000 ppm avec un taux maximal de 4.4%.

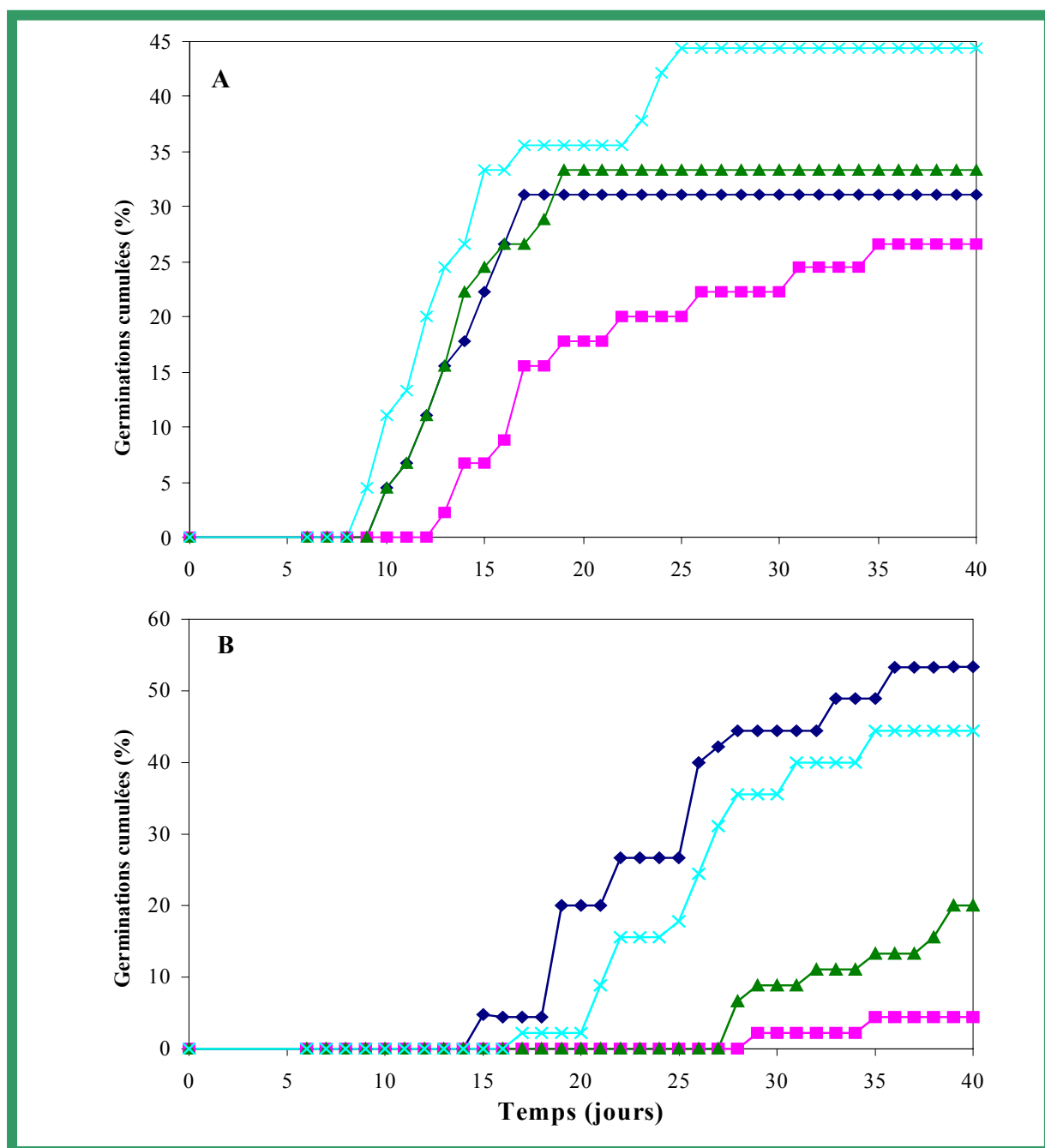


Figure 83 : Effets d'un traitement par le nickel sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement à 25°C par le nickel aux concentrations de 10 ppm (※), 100 ppm (▲), 1000 ppm (■), ou sans traitement (◆).

B.2/ Impact du magnésium

Les résultats obtenus avec le magnésium sont comparables à ceux du nickel pour les deux espèces puisque les concentrations de 10 et 100 ppm améliorent la germination de *G. pruinosa* (35.6% contre 31.1% pour le témoin) avec une vitesse de germination analogue, pendant les 15 premiers jours (Figure 84A). Seul le traitement à 1000 ppm affecte le taux maximal de germination réduit à 20%, et la vitesse de germination avec un temps de latence de 13 jours (contre 9 pour le témoin). Ceci s'accompagne d'un allongement du temps nécessaire à la germination de toutes les semences de 17 à 26 jours par rapport au témoin.

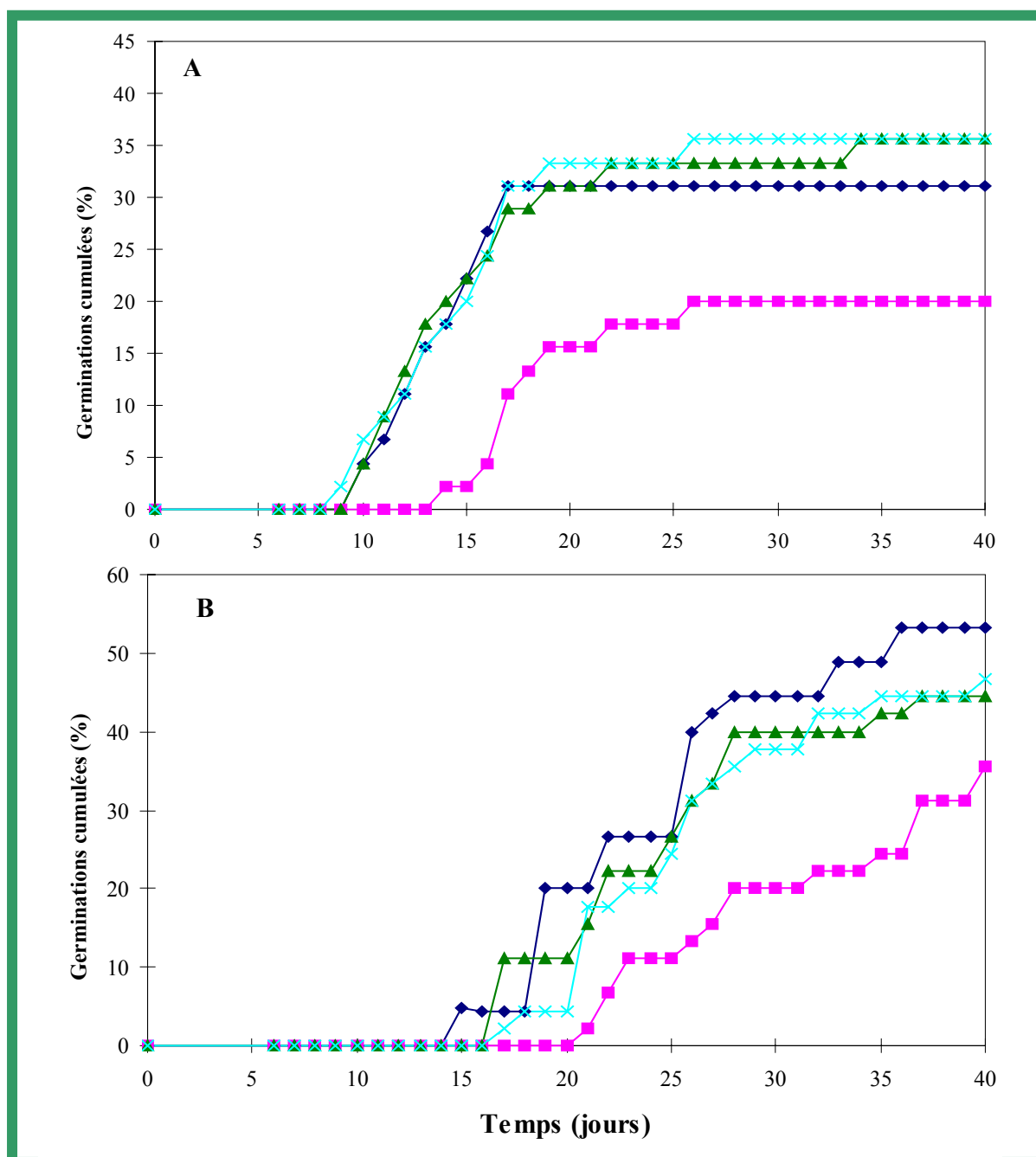


Figure 84 : Effets d'un traitement par le magnésium sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement à 25°C par le magnésium aux concentrations de 10 ppm (※), 100 ppm (▲), 1000 ppm (■), ou sans traitement (◆).

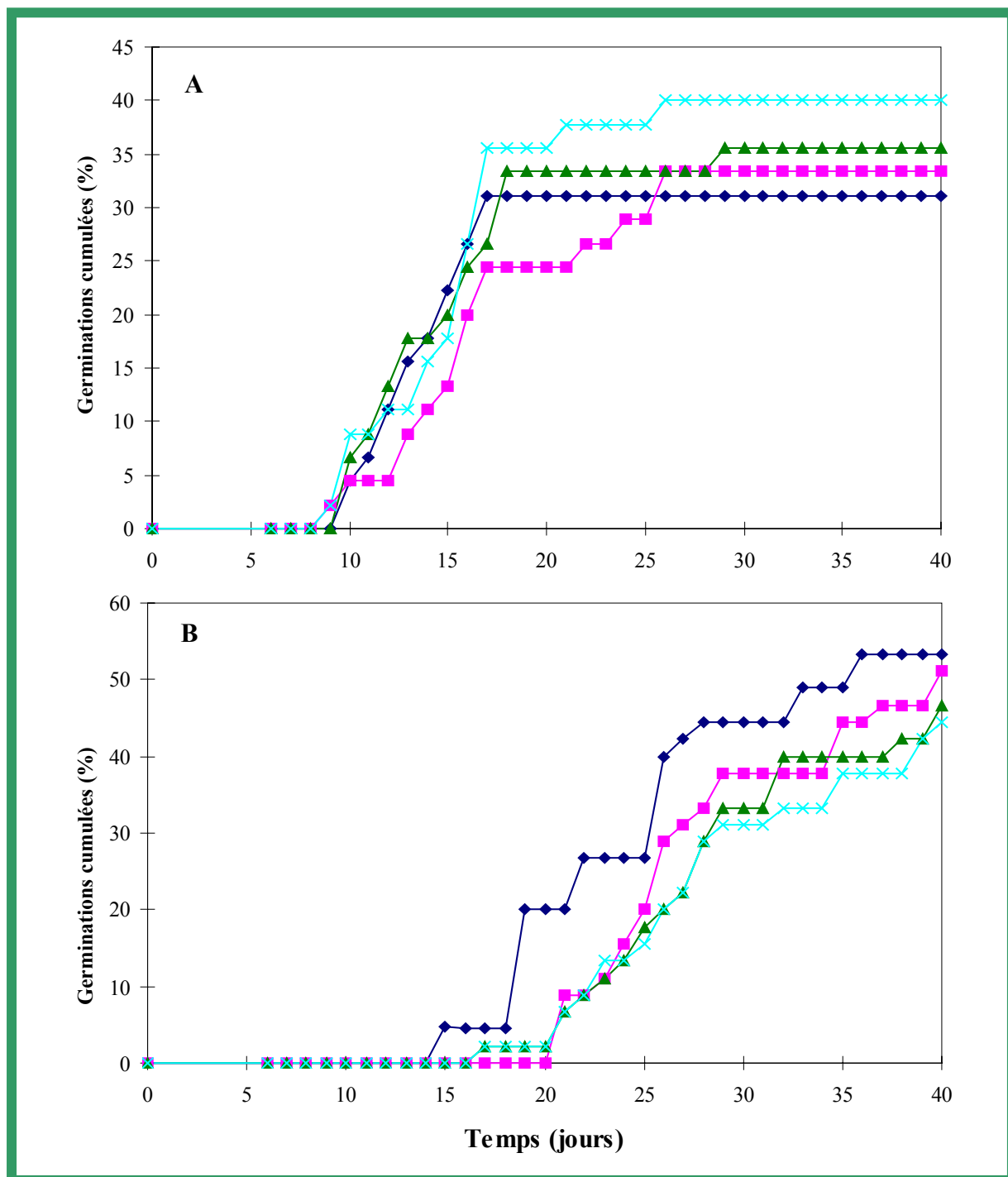


Figure 85 : Effets d'un traitement par le calcium sur la germination de *G. pruinosa* (A) et *C. macrophylla* (B). Pourcentages de germinations cumulées en fonction du temps avec un traitement à 25°C par le calcium aux concentrations de 25 ppm (*), 50 ppm (▲), 75 ppm (■), ou sans traitement (◆).

Pour *C. macrophylla*, quelle que soit la concentration considérée, le taux de germination maximal est réduit (46.6% pour 10 ppm, 44.4% pour 100 ppm, 35.6% pour 1000 ppm contre 53.3% pour le témoin), et le temps de latence rallongé (16 jours pour 10 et 100 ppm, 20 jours pour 1000 ppm contre 14 pour le témoin). Il est cependant intéressant de noter que pour la concentration importante de 1000 ppm de magnésium, l'impact est moindre que celui du nickel puisque 35.6% des graines germent encore contre 4.4% pour le nickel (Figure 84B).

B.3/ Impact du calcium

Là encore, la réaction des semences au contact du calcium est différente. L'apport de calcium favorise la germination de *G. pruinosa* alors qu'elle défavorise celle de *C. macrophylla*. Dans le cas de *G. pruinosa*, la mise en germination des semences dans un milieu enrichi à 25 ppm de calcium augmente le taux maximum (40% contre 31.1% pour le témoin), cependant le temps nécessaire pour atteindre ce taux est rallongé à 25 jours (contre 17 pour le témoin) sans modification du temps de latence. A la concentration de 50 ppm, le calcium est toujours favorable à l'augmentation de ce taux (35.6% contre 31.1% pour le témoin), pour un même temps de latence mais avec une période totale de germination plus longue (29 jours). Enfin, pour 75 ppm de calcium, l'observation est identique et la valeur du taux maximal (33.3%) s'approche de celle du témoin (Figure 85A).

Quant à *C. macrophylla*, le phénomène est inverse. En effet, puisque le calcium semble défavorable à la germination même si les taux maxima sont proches de ceux du témoin (44.4% pour 25 ppm, 46.7% pour 50 ppm, 51.1% pour 75 ppm contre 53.3% pour le témoin). Dans tous les cas, le temps nécessaire pour atteindre ce taux est rallongé puisque les dernières observations correspondent à la fin du temps choisi pour nos manipulations de 40 jours (Figure 85B). Il se pourrait qu'au delà, certaines semences germent encore et finalement que le taux maximum du témoin soit atteint. Quoiqu'il en soit, ce traitement rallonge le délai de germination ainsi que le temps de latence (16 jours pour 25 et 50 ppm, 20 jours pour 75 ppm contre 14 jours pour le témoin).

C/ Discussion

L'analyse des résultats montrent une tendance opposée pour les deux espèces. En effet, les semences de *G. pruinosa* supportent bien l'apport important de nickel ou de magnésium, à des concentrations largement plus importantes que celles qu'accepteraient une plante plus classique. Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus récemment pour une espèce de graminée se développant sur sol enrichi en nickel et chrome après exploitation minière en Inde, on constate des analogies mais aussi de grandes différences (Rout *et al.*, 2000). En effet, des semences de *Echinochloa colona*, obtenues sur des plants poussant sur de tels milieux, voient leur taux de germination augmenter en présence de l'un ou de l'autre de ces éléments, dans le milieu de germination, avec un taux passant de 76.2% à 92.3% dans le cas du Nickel. Cependant, cette augmentation n'est obtenue qu'avec une concentration de 1.25 mg/L de Nickel. Si celle-ci est doublée, le taux devient inférieur au témoin (75.1%). Cette tendance est la même dans le cas de *Geissois pruinosa* à la différence près que les concentrations en nickel sont 10 fois plus importantes ; avec 10 mg/L le taux passe de 33.1% chez le témoin à 44.4 % et avec 100 mg/L il rejoint une valeur proche du témoin (33.3%). On peut émettre l'hypothèse que les caractères d'hyper-accumulation du nickel détectés chez la plante adulte seraient également intrinsèques à la semence. Ceci est une preuve de l'adaptation du végétal à son milieu de développement.

Par contre, les semences de *C. macrophylla* sont affectées par une dose trop importante de nickel et de magnésium dans le milieu de germination. Ceci indique que les stratégies développées par ces deux espèces pour vivre sur le même type de milieu sont différentes, prouvant s'il était nécessaire que chaque espèce connaît au cours du temps des divergences évolutives. L'ensemble de ces points est confirmé par leur attitude vis à vis du calcium, là encore opposée. A ce stade de l'étude, il nous paraît prématuré d'émettre des hypothèses sur les phénomènes physiologiques mis en jeu au cours de la germination de ces deux types de semences au contact de ces éléments du syndrome serpentinique. Des expériences complémentaires permettront de mieux appréhender le phénomène.

Conclusion

Cette étude originale sur deux espèces de Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie a permis de déterminer en conditions contrôlées en laboratoire, l'impact de certains facteurs exogènes sur le développement germinatif des semences de *G. pruinosa* et de *C. macrophylla*. D'autres facteurs comme l'oxygène restent à analyser. Cette étude révèle également la présence de dormances tant tégumentaires qu'embryonnaires qu'il conviendra d'étudier de manière plus approfondie. Mais il est d'ores et déjà possible de sélectionner les pré-traitements les plus efficaces à l'optimisation de la germination de ces deux types de semences et ceci dans le cadre d'une valorisation à grande échelle de ces espèces pour leurs propriétés biologiques ou leur exploitation horticole. Ainsi, la scarification mécanique ou encore un traitement préalable à l'eau chauffée à 40°C apparaissent comme des méthodes très avantageuses puisqu'elles permettent, sans coût excessif, d'augmenter de manière considérable le taux maximal de germination de nos semences. Cependant, si nous appréhendons mieux quels traitements appliquer pour rendre les semences des deux espèces étudiées plus aptes à germer, les raisons profondes de cette amélioration devraient être recherchées dans les événements métaboliques induits. Nous pourrions dès lors espérer qu'elles permettront de mieux comprendre les mécanismes intimes impliqués dans le passage décisif de l'embryon de ces semences de la vie ralentie à une croissance active. Une investigation d'autres types de pré-traitements peut s'avérer d'un intérêt certain, en particulier dans le cas de *C. macrophylla* dont le temps nécessaire pour atteindre le maximum de germination est long et qu'il conviendrait de réduire. Aussi, la confrontation de ces semences aux substances bioactives extraites (Fogliani *et al.*, 2001), pourra permettre de leur attribuer en partie, peut-être, un rôle physiologique dans les conditions de l'habitat naturel de ces végétaux. Enfin, les conditions particulières de développement, sur sols ultrabasiques, de ces deux espèces nous conduiront sans aucun doute à mieux préciser l'impact profond des éléments métalliques sur la germination de leurs semences. La poursuite de ce travail sur ces deux espèces de Cunoniaceae, d'origine subtropicale, présentant un intérêt économique contribuera sans aucun doute à améliorer l'état des connaissances encore réduit sur les semences de ce type et en particulier au sein de cette famille.

PARTIE IV

Chapitre 2 :

Multiplication par voie asexuée :

Bouturage et culture *in vitro*

de deux espèces de Cunoniaceae :

Cunonia macrophylla et *Geissois pruinosa*



Bouture de *Geissois pruinosa* âgée de 6 mois.

CHAPITRE 2 :
MULTIPLICATION PAR VOIE ASEXUEE :
BOUTURAGE ET CULTURE *IN VITRO*
DE DEUX ESPECES DE CUNONIACEAE :
CUNONIA MACROPHYLLA* ET *GEISSOIS PRUINOSA

Introduction

La multiplication par voie asexuée, si particulière aux végétaux, permet d'éliminer de nombreuses difficultés. En effet, ce « clonage » réduit fortement les variations génétiques rencontrées au cours de l'utilisation des graines. L'espèce *Ceratopetalum gummiferum*, de la famille des Cunoniaceae, exploitée en Australie en est une preuve vivante. Cette plante cultivée pour sa fleur coupée a longtemps été produite à partir de graines. Cependant la variation de la couleur des inflorescences (Worrall *et al.*, 1999) a conduit les exploitants vers la multiplication végétative qui évite ces désagréments (Dalley, 1997).

Cette remarque est encore plus importante dans le cadre de la valorisation d'espèces reconnues pour leur capacité à produire une substance chimique d'intérêt. C'est pourquoi, nous avons tenté de déterminer des conditions idéales au bouturage de deux espèces de la famille des Cunoniaceae : *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.

Deux types de bouturage sont à notre disposition, le bouturage dit classique et le microbouturage. Selon l'espèce, l'un ou l'autre peut s'avérer plus ou moins efficace. Ainsi, l'espèce *Ceratopetalum gummiferum* peut être obtenue par multiplication classique mais son enracinement est difficile et long (Dalley, 1997), c'est pourquoi, la culture *in vitro* a récemment été envisagée (Armstrong & Johnson, 2001).

Enfin, dans le cadre d'une valorisation de substances naturelles, la culture de cellules végétales en milieu liquide paraît être une solution intéressante qui permet d'obtenir rapidement une biomasse importante productrice de la dite molécule (Zhao *et al.*, 2001).

I/ Le macrobouturage de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa*

De nombreux facteurs interviennent dans la réussite d'un bouturage. L'explant lui-même, en fonction de sa taille, de son âge, du nombre de nœuds le constituant, est l'élément le plus important. Viennent ensuite, le substratum d'enracinement, l'arrosage, l'aération de la bouture, la température, la période de l'année et beaucoup d'autres éléments insoupçonnés. C'est pourquoi, nous avons décidé de fixer certains de ces éléments et d'observer la variation de certains autres sur la réussite et l'efficacité du bouturage de nos deux espèces.

A/ Matériel et méthodes

A.1/ Origine et type d'explants

Les explants utilisés proviennent de pieds mères situés dans la même zone que ceux exploités pour la récolte de graines. Il s'agit du Mont Dzumac pour *G. pruinosa* et des Monts Koghis pour *C. macrophylla*. La collecte a lieu au mois de juillet dans des conditions d'humidité importante (averses pluvieuses) à une température extérieure de 21°C. La taille est réalisée à l'aide d'un matériel préalablement désinfecté afin d'éviter toutes contaminations au niveau de la section.

Les explants de *G. pruinosa* d'un diamètre compris entre 0.6 et 1 cm sont prélevés aux extrémités des branches sur un seul arbre. Alors que l'architecture monocaule de *C. macrophylla*, nous conduit à collecter des explants d'un diamètre compris entre 1.3 et 2 cm, à l'extrémité apicale de différents plants.

A.2/ Stérilisation des explants

La collecte terminée, tous les explants sont transportés jusqu'au laboratoire dans des conditions d'humidité maintenues constantes. Dès l'arrivée, les boutures sont mises à tremper dans de l'eau de Javel à 10% (48° chloré à l'état pur) pendant 20 minutes pour diminuer les contaminations importées du milieu de collecte. Un rinçage abondant à l'eau distillée stérile est ensuite effectué pendant 20 minutes.

A.3/ Ensemencement des explants : jour $i=0$

L'ensemencement est réalisé comme suit :

- Les boutures sont dans un premier temps taillées de manière à n'avoir que deux niveaux de nœuds, les plus bas sont débarrassés de leurs feuilles, celles du second sont réduites aux 2/3, et le bourgeon apical est gardé pour une bouture sur deux (Figure 86).
- Deux milieux sont testés, un milieu liquide constitué d'eau et un milieu solide constitué d'un mélange terreau-vermiculite (1/1) préalablement saturé en eau.

Les boutures ensemencées en pot plastique de 7x7x7 cm sont placées dans des mini-serres, elles mêmes disposées en serre (Figure 87).

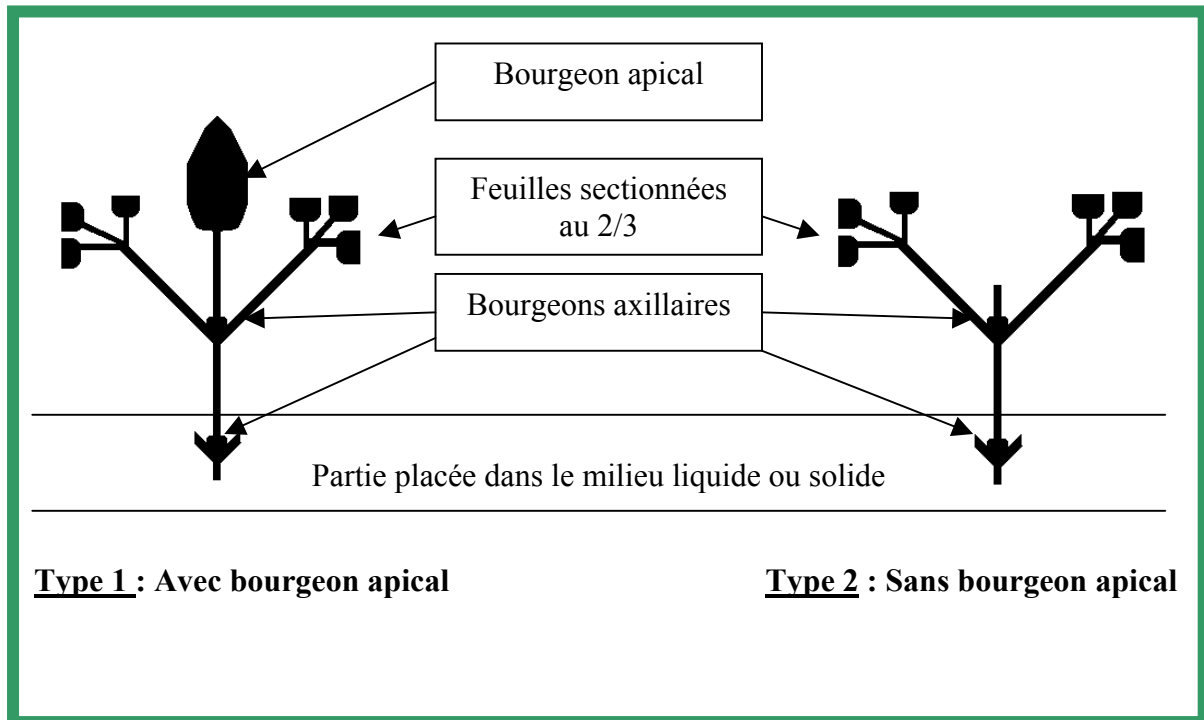


Figure 86 : Schémas des deux types de boutures préparées pour l'ensemencement sur milieu liquide ou solide de *C. macrophylla* et *G. pruinosa*.



Figure 87 : Disposition des boutures de *C. macrophylla* en mini-serres.

A.4/ Traitements appliqués aux boutures ensemencées

- Sur milieu solide

- Divers traitements liquides sont appliqués pour augmenter les chances de réussite du bouturage et pour déterminer l'impact des phytohormones sur l'enracinement à l'instar de ce qui est régulièrement fait au sein du L.B.P.V.A. (Trilles, 1999):

A j+5 jours : trempage dans une solution de saccharose à 3% pendant 2 heures

A j+11 jours : trempage dans une solution de phytohormones pendant 18 heures

A j+15 jours : trempage dans une solution de saccharose à 3% pendant 2 heures

L'échantillon témoin est mis à tremper au 11^{ème} jour dans une solution d'eau distillée.

Ces traitements nécessitent l'extraction délicate et la remise en place des boutures dans leur milieu d'enracinement.

Les différents traitements hormonaux utilisés sont les suivants :

Auxine seule : ANA 5 mg/L, 50 mg/L, ou 500 mg/L

Auxine associée à une cytokinine : ANA 5 mg/L + BAP 2 mg/L

ANA 50 mg/L + BAP 20 mg/L

ANA 500 mg/L + BAP 200 mg/L

ANA : Acide naphthalène acétique

BAP : Benzyl-amino-purine

- Un traitement avec les hormones de bouturage en poudre du commerce (composition ci-dessous) est également appliqué sur la base de quelques explants.

Acide β -indole butyrique 0.056%

Acide 2-méthyl 1-naphtylacétique 0.032%

A-naphtyl acétamide 0.065%

2-méthyl 1-naphtyl acétamide 0.013%

L'arrosage des milieux solides est effectué de manière régulière tous les 6 jours pendant les trois premiers mois de l'expérience afin d'éviter un pourrissement des boutures. Puis un arrosage automatique par brumisation chaque jour pendant 5 minutes, vers 11h 00 du matin, est mis en place dès le 3^{ème} mois.

- Sur milieu liquide

Deux types de milieux liquides sont employés, l'un ne contenant que de l'eau et le second constitué d'eau supplémentée en sucre (saccharose 3%).

Les milieux liquides sont renouvelés tous les trois jours du fait de l'apparition de phénols mais aussi pour réduire les risques de développement de contaminants.

Pour chaque test, 4 explants subissent le même traitement. Le tableau XL récapitule les différents tests effectués.

Tableau XL : Récapitulatif des différents traitements appliqués aux boutures de *C. macrophylla* et *G. pruinosa*.

Milieu		Type de bouture (X 4)	5 ^{ème} jour	11 ^{ème} jour	15 ^{ème} jour
Liquide	Eau seule	Avec bourgeon apical			
		Sans bourgeon apical			
	Eau + Sucre	Avec bourgeon apical			
		Sans bourgeon apical			
Solide	Terreau	Avec bourgeon apical	Saccharose 3%	Eau	Saccharose 3%
			”	ANA 5	”
			”	ANA 50	”
			”	ANA 500	”
			”	ANA 5 + BAP 2	”
			”	ANA 50 + BAP 20	”
			”	ANA 500 + BAP 200	”
	+	+hormones du commerce			
	Vermiculite	Sans bourgeon apical	Saccharose 3%	Eau	Saccharose 3%
			”	ANA 5	”
			”	ANA 50	”
			”	ANA 500	”
			”	ANA 5 + BAP 2	”
			”	ANA 50 + BAP 20	”
”			ANA 500 + BAP 200	”	
(1/1)	+hormones du commerce				

B/ Résultats et discussion

Le suivi de l'évolution des boutures au cours du temps s'est fait sous plusieurs angles :

- le temps correspondant à la chute des feuilles laissées en place
- l'apparition de la 1^{ère} feuille et sa position axiale ou apicale
- l'évolution de la partie racinaire pour les explants placés en milieu liquide, et après différents temps pour les explants sur substrat solide.

Avant même de considérer ces observations, il nous paraît important d'établir les taux de réussite pour chaque type de traitement. Ceci afin de définir les seuls explants qui ont pu être observés au cours du temps. Il nous faut pour cela étudier séparément les deux espèces dont le comportement diffère.

B.1/ Bouturage de *Cunonia macrophylla*

Dans le cas de *C. macrophylla*, les expérimentations sur sol n'ont donné que de faibles résultats avec 25% de réussite à la fois dans le cas du témoin sans hormones et pour le traitement par hormone de bouturage du commerce. Au contraire, l'essai sur milieu liquide est plus que concluant puisque la totalité des explants se développent. Cependant, la présence de sucre induit à long terme le développement de champignons qui finissent par tuer les explants. L'observation de ces explants montre une chute des feuilles à partir du 20^{ème} jour même si certains d'entre eux en conservent une partie après 6 mois d'expérimentations.

Après un mois et demi d'observation, il est à noter que seuls les bourgeons axillaires des explants (type 2) dont le bourgeon apical a été supprimé, ont débourré pour donner une petite feuille simple et ce quel que soit le milieu considéré (Figure 88). Rappelons que cette espèce a été récoltée à un stade adulte où les feuilles sont composées en pennes de 3 ou 5 folioles. En ce qui concerne le développement racinaire des explants placés dans le milieu liquide, seuls ceux dont le bourgeon apical a été éliminé, mis dans de l'eau sans sucre, présentent une ébauche plus avancée.

Après 6 mois, les mêmes explants ont évolués de manière très différente. Ceux placés sur sol sont extraits délicatement afin d'en observer le système racinaire. On note pour les explants sans bourgeon apical un effet de stagnation ; la partie aérienne évolue normalement chez l'explant placé dans l'eau ou le témoin sur sol, alors que les jeunes feuilles périssent dans le milieu liquide avec saccharose (Figure 89A). Quant au système racinaire, son évolution est beaucoup plus lente que pour les explants dont le bourgeon apical a été conservé (Figure 89B). Si l'on considère ces derniers, on constate un équilibre plus grand entre la partie racinaire et la partie aérienne toutes deux bien développées. Seule la bouture placée dans l'eau additionnée de saccharose a un système racinaire quasiment nul (Figure 89 C,D). Les boutures témoins sur substrat solide et les boutures avec hormones du commerce présentent des boursouffures, plus importantes chez les secondes, alors que les boutures placées dans l'eau possèdent déjà un certain nombre de racines.

Les explants jusque là placés dans de l'eau sans sucre ont été transplantés sur sol. Six mois après, 75% d'entre eux ont survécu.

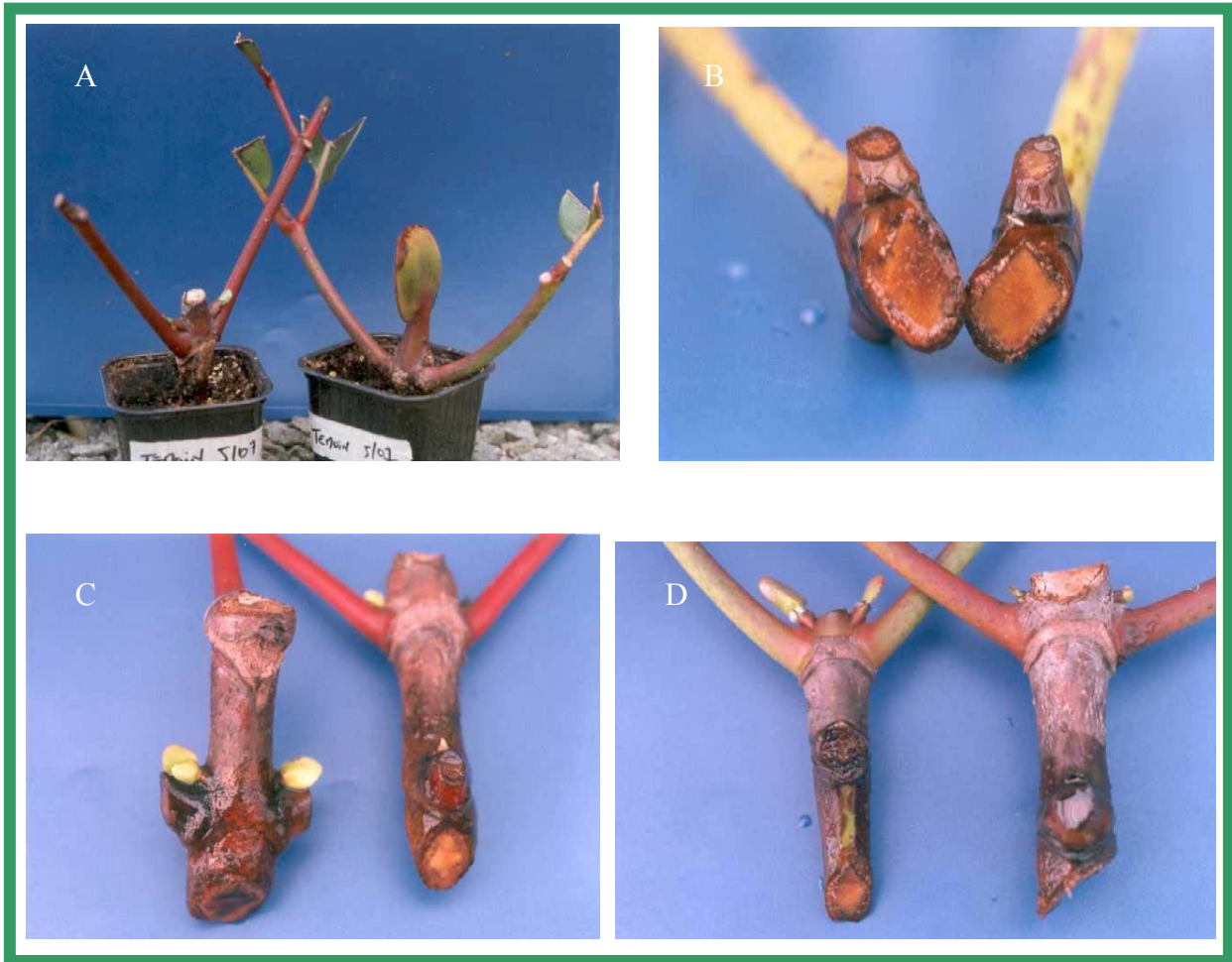


Figure 88 : Aspect des boutures de *C. macrophylla* après 1 mois et demi de traitement. A/ Photo des explants sur sol avec ou sans bourgeon apical ; B/ Photo de la base des explants avec bourgeon apical dans l'eau ; c/ Photo des explants sans bourgeon apical dans l'eau + saccharose ; d/ Photo des explants sans bourgeon apical dans l'eau.

L'ensemble de ces résultats, nous indique que le milieu solide choisi de manière arbitraire ne semble pas le plus idéal au bouturage de l'espèce *C. macrophylla* tant le taux de réussite est faible. De nombreuses raisons pourraient l'expliquer, à commencer par une difficulté d'aération des boutures ou encore par le maintien d'une humidité trop importante conduisant au pourrissement de l'explant.

L'apport supplémentaire d'hormones ne semble pas favoriser un meilleur enracinement, du moins dans les conditions choisies.

Ce travail, nous permet cependant de constater que la présence du bourgeon apical favorise le développement du système racinaire quel que soit le milieu considéré, en limitant celui de la partie aérienne pendant près de 4 mois. Plus encore, un bouturage dans de l'eau seule apparaît comme étant le plus efficace puisqu'il montre après 6 mois d'expérimentations, un équilibre entre la partie aérienne et la partie racinaire très favorable à la croissance du futur pied. De plus la transplantation dans le milieu solide s'avère réalisable sans trop de perte.



Figure 89 : Aspect des boutures de *C. macrophylla* après 6 mois de traitement. A/ Photo des explants sans bourgeon apical sur milieu liquide avec (gauche) ou sans (droite) saccharose ; B/ Photo des explants avec bourgeon apical sur sol (gauche), ou dans l'eau avec saccharose (centre) ou sans (droite) ; c/ Photo de la base d'un explant sans bourgeon apical (droite) ou avec bourgeon apical (gauche) dans l'eau ; d/ / Photo zoomée du développement du système racinaire des explants de la photo B.

B.2/ Bouturage de *Geissois pruinosa*

Pour *G. pruinosa*, le bouturage semble plus aisé même si le développement du système racinaire paraît tout aussi délicat.

En ce qui concerne les boutures placées sur milieu solide, le taux de réussite global est supérieur à celui de *C. macrophylla*. Il est à noter une différence importante dans la réponse des explants dont le bourgeon apical a été conservé (type 1), qui représentent la majeure partie des boutures réussies, comparativement aux seconds sans bourgeons (type 2) (Figure 90A). Si l'on ne considère que ce type de boutures, le sol sélectionné semble propice puisque 75% des boutures témoins et autant de boutures traitées par des hormones de bouturage du commerce se développent. Plus encore, des boutures traitées avec de l'auxine seul (ANA 5 mg/L) ou avec un mélange auxine-cytokinine (ANA 5 mg/L + BAP 2 mg/L ou ANA 50 mg/L + BAP 20 mg/L), semblent supporter le bouturage. Cependant si l'on considère le système racinaire obtenu, de grandes différences apparaissent.

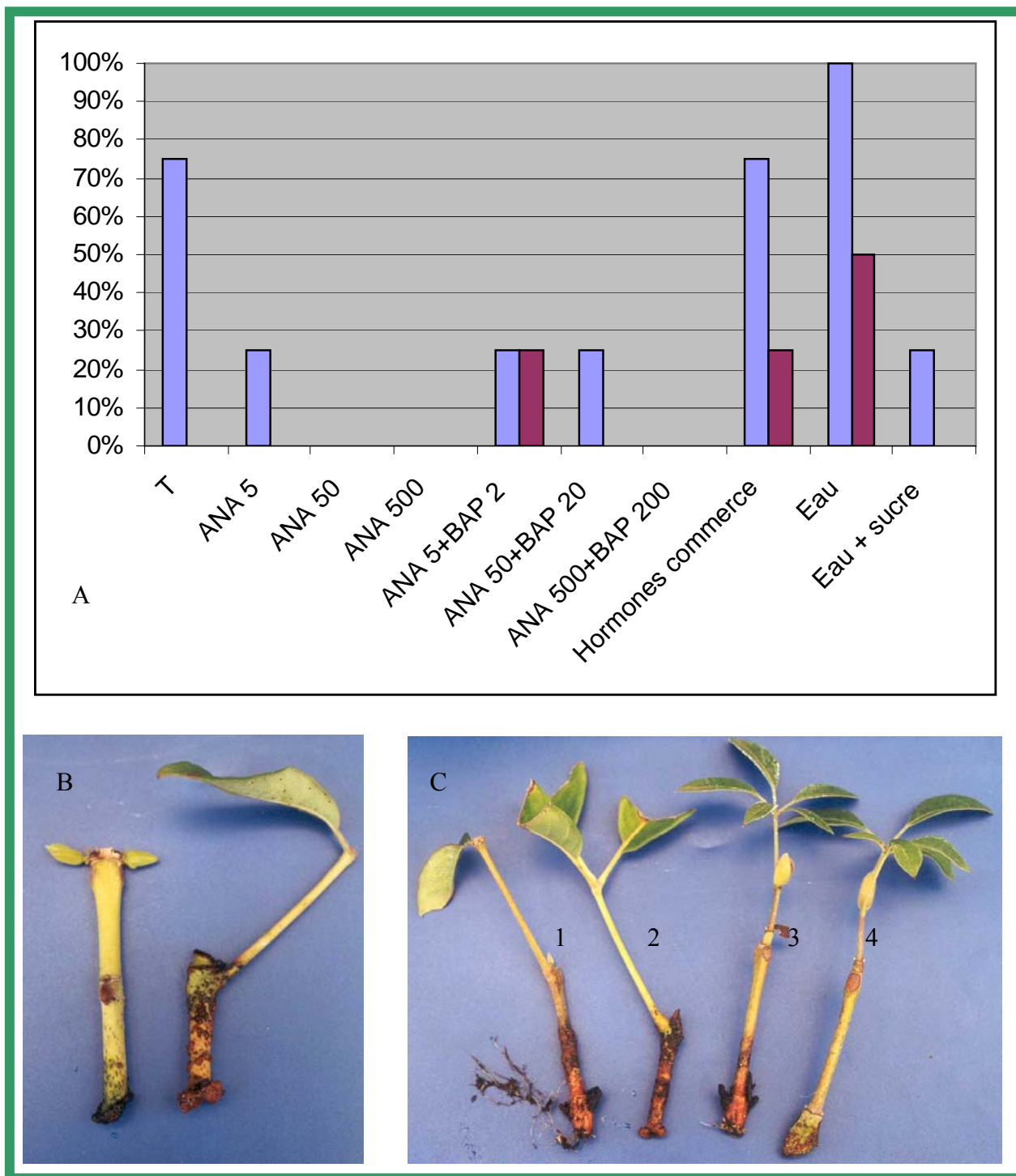


Figure 90 : Bilan du bouturage de l'espèce *G. pruinosa*. A/ Pourcentage de réussite en fonction du type de bouture, avec bourgeon apical (barres de gauche) ou sans bourgeon apical (barres de droite), et du type de traitement ; B/ Aspect des boutures sans bourgeon apical après 6 mois de traitement sur milieu liquide (gauche) ou sur milieu solide avec ANA 5 mg/L + BAP 2 mg/L (droite) ; C/ Aspect des boutures avec bourgeon apical après 6 mois sur milieu solide, témoin (1), ANA 5 mg/L (2), ANA 5 mg/L + BAP 2 mg/L (3), et sur milieu liquide (4).

Les boutures placées dans l'eau réagissent quasiment comme celle de *C. macrophylla*, la présence de sucre en supplément provoquant une déperdition importante due à des contaminations.

En ce qui concerne la chute des feuilles, elle a été observée à partir du 10^{ème} jour. Cependant certains explants en conservent une ou plusieurs après 6 mois d'expérimentations. On ne peut donc pas établir de règle générale.

Après 1 mois et demi d'observation, il est à noter que seuls les explants, dont le bourgeon apical a été supprimé, ont débourré au niveau des bourgeons axillaires pour donner une petite feuille simple, quel que soit le milieu considéré. Observation analogue à celle faite chez *C. macrophylla*, avec pour *G. pruinosa* un stade adulte où les feuilles sont composées en palmes de 5 folioles. En ce qui concerne le développement racinaire des explants placés dans le milieu liquide, seuls ceux dont le bourgeon apical a été éliminé, mis dans de l'eau sans saccharose, présentent une ébauche plus avancée tout comme chez *C. macrophylla*.

Après 6 mois, les mêmes explants ont évolué de manière très différente. Ceux placés en substrat solide sont extraits délicatement afin d'en observer le système racinaire. On note une perte importante des explants sans bourgeon apical, seuls deux échantillons placés dans l'eau et sol avec ANA 5 mg/L et BAP 2 mg/L subsistent. Les premiers voient leurs premières feuilles stagner, les seconds n'ont pas débourré. Quant à leur système racinaire, il consiste en un amas boursoufflé sans développement de vraies racines (Figure 90B). Si l'on considère les explants dont le bourgeon apical a été conservé, seuls ceux placés dans l'eau ou sur milieu solide avec ANA 50 mg/L et BAP 20 mg/L montrent une partie aérienne. Quant à leur système racinaire, seul le second possède de vraies racines bien moins importantes cependant que celles présentes sur la bouture témoin. La bouture sur milieu liquide présente quelques boursoufflures, plus développées sur l'explant placé sur sol avec ANA 5 mg/L (Figure 90C). Les boutures avec hormones du commerce (non présentées) possèdent également des boursoufflures équivalentes à l'explant en substrat solide avec ANA 5 mg/L.

Les explants jusque là placés dans de l'eau ont été transplantés en sol. Six mois après, 50% d'entre-eux ont survécu. Cependant, si l'on ne considère que les explants avec bourgeon apical, ce taux atteint 66.6%.

L'ensemble de ces résultats, nous indique que le milieu solide choisi de manière arbitraire semble être plus favorable au bouturage de *G. pruinosa* que de *C. macrophylla*. Cependant, une investigation plus approfondie d'autres milieux pourra s'avérer utile pour améliorer le taux maximal de réussite qui reste encore faible pour une exploitation à grande échelle.

Si l'on considère les traitements hormonaux appliqués, il est difficile d'établir si le taux de réussite faible est du à leur présence ou au milieu lui même. Cependant, il est à noter comparativement au témoin qu'un traitement à l'ANA 5 mg/L additionné de BAP à 2 mg/L permet d'obtenir un équilibre favorable entre la partie aérienne et la partie racinaire rendant la bouture plus viable à long terme.

Plus encore que chez *C. macrophylla*, les résultats montrent combien la présence du bourgeon apical est nécessaire à la mise en place d'un système racinaire compatible avec le développement d'un nouveau pied.

C/ Conclusion

Cette étude restreinte du fait de la difficulté d'obtention d'explants en particulier chez l'espèce monocaulaire *C. macrophylla*, impliquant la taille de nombreux pieds, permet malgré tout de tirer des informations non négligeables sur le macrobouturage de ces deux espèces de Cunoniaceae. L'élément apparaissant comme le plus essentiel est la présence du bourgeon apical qui favorise le développement du système racinaire. Ce renseignement devrait permettre par des études plus approfondies de déterminer les équilibres hormonaux internes à chacune de ces espèces, qui régissent le développement de leur partie aérienne et racinaire.

Dans l'optique d'une valorisation à grande échelle de ces espèces, les résultats obtenus sont encourageants puisque l'utilisation de l'eau seule comme substrat d'enracinement, pourtant considérée comme asphyxiante (Trilles, 1999) rend leur multiplication plus aisée. La seule difficulté sera son renouvellement permanent du fait de la présence de polyphénols conduisant à la mort de l'explant. Les conditions idéales à envisager dans ce cadre est l'utilisation d'explants prélevés en position terminale sur les branches qui seraient placés en milieu liquide à renouvellement continu, comme dans le cas de la culture hydroponique, puis remis sur sol après six mois. Le sol de transplantation reste à définir, mais les résultats obtenus dans le cadre de notre expérimentation montrent qu'un terreau classique est assez efficace. De nombreuses recherches peuvent être envisagées pour améliorer ces conditions, en particulier une étude sur milieu liquide additionné d'hormones de croissance afin d'accélérer l'obtention de racines. Un bouturage direct sur sol est aussi à approfondir avec différents substrats plus ou moins aérés et dont la rétention en eau est plus ou moins importante.

Dans la lignée directrice de notre étude, les feuilles de *C. macrophylla* obtenues sur les boutures enracinées après 1 an ont fait l'objet d'une micro-extraction au méthanol, afin de déterminer la présence de l'activité antibiotique pour laquelle cette espèce a été retenue. Il est intéressant de constater que celle-ci est détectée dès les premières feuilles simples avec des valeurs quasi identiques à celles déterminées sur les feuilles prélevées sur l'arbre adulte. La potentialité bioactive des boutures est donc confirmée. Ce résultat est fondamental pour permettre une valorisation de l'espèce par culture à grande échelle.

III/ La culture *in vitro* de *C. macrophylla* et de *G. pruinosa*

Les espèces *C. macrophylla* et *G. pruinosa* ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des substances bioactives et pour leur intérêt horticole. C'est pourquoi l'utilisation de la culture *in vitro* nous est apparue comme un moyen essentiel pour leur multiplication. En effet, ce mode de multiplication devrait permettre de reproduire de manière conforme l'explant d'origine en possession de l'activité biologique. Dans le domaine horticole, cette propriété est non négligeable comme le montre les travaux réalisés sur l'espèce de Cunoniaceae *Ceratopetalum gummiferum* utilisée pour sa fleur coupée. En effet, la variabilité de ces semences conduisait à une inflorescence dont la couleur pouvait être différente de celle du pied d'origine, alors que celle-ci se trouvait conserver en culture *in vitro* (Armstrong & Johnson, 2001). Cette méthode présente de plus l'intérêt de produire en conditions optimales de grandes quantités de plants à partir de micro-explants.

Notre étude a été réalisée en parallèle sur les deux espèces et a consisté dans un premier temps à tenter de travailler à partir d'explants prélevés sur le terrain, de déterminer les conditions optimales de désinfection puis dans un deuxième temps de définir un milieu de propagation satisfaisant pour la vitroculture. Malheureusement, deux difficultés se sont présentées, la première et la plus importante se trouve être la contamination que nous avons eu beaucoup de difficultés à enrayer du fait de la présence d'un champignon endophyte, la seconde étant dans le cas de *C. macrophylla*, le type d'explants. En effet, de par sa morphologie monocaulé et sa structure épaisse et lignifiée (cf. figure 70), il nous a été impossible d'obtenir des explants dont le diamètre était inférieur à 0.8 cm. De plus, leur mise en place sur milieu gélosé provoquait la libération de composés phénoliques en abondance et ceci pendant plusieurs semaines malgré des repiquages rapprochés. Nous avons donc décidé de travailler sur des plants beaucoup plus jeunes en notre possession, soit en tube stérile soit en serre, obtenus par germination de semences collectées (cf. chapitre 1 partie IV) et suivis pour leur croissance (cf. partie V). Pour rendre plus clairs les résultats obtenus, nous avons choisi de séparer les deux espèces en deux chapitres.

A/ Culture in vitro de *Cunonia macrophylla*

L'espèce *C. macrophylla* nous intéressait essentiellement pour sa capacité à produire des molécules antibiotiques. C'est la raison pour laquelle les plants cultivés en serre ont fait systématiquement l'objet d'une extraction au méthanol de leurs feuilles afin de vérifier cette potentialité. Une fois ce fait confirmé, nous avons pu réaliser notre microbouturage. Plusieurs étapes sont alors nécessaires. La première consiste en la désinfection des explants qui sont prélevés dans un milieu où ils sont soumis à des attaques fongiques et bactériennes. Ces contaminants ont un effet néfaste en culture *in vitro* puisque leur développement y est plus rapide que le végétal, qu'ils submergent. Vient ensuite le choix du milieu de culture dont les composants sont variables :

- milieu de base (macro et micro éléments)
- apport en vitamines
- apport en matière carbonée (sucres)
- apport hormonal
- type de gel
- choix du pH

A.1/ Matériel et méthodes

A.1.1/ Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour le prélèvement des explants est obtenu par germination de semences prélevées sur un pied mère au Monts Koghis, et est âgé de 6 mois (cf. partie V). Cependant, le nombre réduit de plants nous a limité dans notre étude. Le prélèvement est effectué à l'aide d'un matériel stérile. Les feuilles sont collectées entières, et les explants de tiges toujours plus longs que leur taille de mise en culture (4 cm).

A.1.2/ Désinfection du matériel végétal

La désinfection par voie chimique des différents explants s'effectue comme suit :

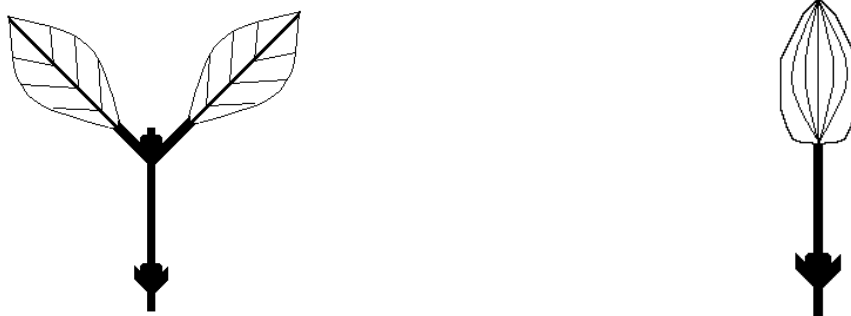
- 1/ trempage de 20 minutes dans le benlate (désinfectant fongique) à 2g/L
- 2/ trempage de 10 minutes dans l'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 48° chloré pur) à 10%
- 3/ trempage de 5 minutes dans l'éthanol 70° GL
- 4/ trempage de 30 minutes dans l'eau distillée stérile pour éliminer les polyphénols

Ce choix de désinfection fait suite à des résultats obtenus sur les explants prélevés sur le terrain, que nous ne développerons pas, mais qui montrent une efficacité plus grande de l'eau de Javel par rapport à l'hypochlorite de calcium, qui a en plus pour effet de brûler plus rapidement les tissus. Le trempage dans l'eau s'avère nécessaire pour éliminer une grande partie des polyphénols produits par les explants. Une tentative au PVP (Polyvinylpyrrolidone) 0.7% a été effectuée, mais elle a eu pour conséquence visible d'affaiblir les explants.

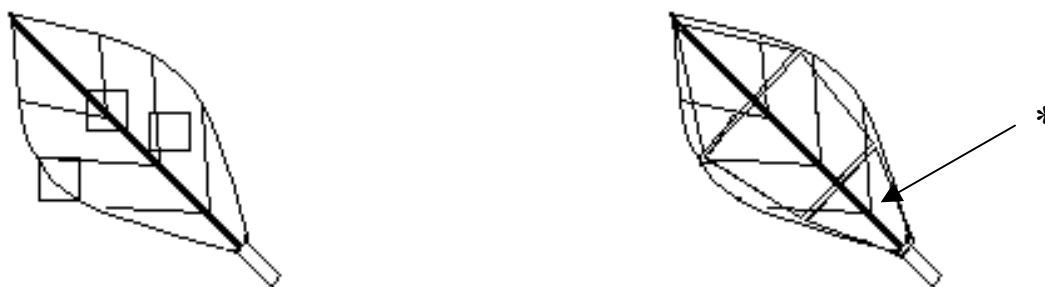
A.1.3/ Mise en culture des explants

Une fois désinfectés, les différents explants sont taillés de différentes manières.

Explants de tiges : La taille est réalisée de façon à obtenir deux niveaux de bourgeons, soit deux niveaux de bourgeons axillaires dans le cas de boutures intermédiaires, soit un niveau de bourgeons axillaires et un bourgeon terminal dans le cas de boutures prélevées en position terminale, pour une longueur finale comprise entre 5 et 10 mm. Ce principe suit celui du macrobouturage développé précédemment.



Explants de feuilles : Les feuilles sont découpées de plusieurs façons, soit en carrés contenant la nervure principale ou pas, soit en trois dans le sens transversal.



A.1.4/ Milieux de culture

Selon le type d'explant, plusieurs milieux sont expérimentés. Du fait du petit nombre d'explants, de nombreux facteurs sont fixés, seule la composition hormonale varie. Ainsi la composition sans hormones du milieu référencé M1 est :

- Milieu de base : Murashige et Skoog (MS)
 - Vitamines de Morel
 - Saccharose 20 g/L
 - Phytigel 3 g/L
 - pH = 5.8
- } (Tableau XLI)

Une seule auxine, l'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et une seule cytokinine, la Benzyle Amino Purine (BAP) sont utilisées pour cette étude. Le but étant d'obtenir à partir des explants de tiges dans un premier temps une partie aérienne développée et ramifiée, le rapport auxine/cytokinine est fixé à une valeur inférieure ou égale à 1 soit ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L ou bien ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L. Les mêmes équilibres sont fixés pour l'obtention de cals à partir des feuilles avec en plus le rapport inverse soit ANA 0.5 mg/L + BAP 0.2 mg/L.

Tableau XLI : Composition minérale du milieu Murashige et Skoog (MS), composition des vitamines de Morel, teneur en saccharose, phytigel et pH du milieu de culture des explants de *C. macrophylla*.

Constituants	Concentration finale (mg/L)
Macro-éléments	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₂ , H ₂ O	170
Oligo-éléments	
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.3
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	8.6
Na ₂ Mo O ₄ , 2H ₂ O	0.25
Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0.025
Co Cl ₂ , 6H ₂ O	0.025

Constituants	Concentration finale (mg/L)
Fe-EDTA	
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27.85
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	27.25
Vitamines de Morel	
Thiamine-HCl	0.1
Acide nicotinique	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2
Myo-inositol	100
Saccharose	
Saccharose	20 g/L
Phytigel	
Phytigel	3 g/L
pH	
pH	5.8

Le milieu est préparé par addition de tous les éléments puis le pH ajusté. L'ensemble est chauffé, distribué dans des tubes à raison de 20 mL par tube avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

Une fois les explantsensemencés, les tubes sont placés dans un premier temps à l'obscurité pendant 3 jours puis en chambre de culture à 25°C ± 1°C avec un éclairage fourni par des lampes néons ORSAM L30W/77 Fluor et Mazdafluor blanc industrie TF30/BI dont le cycle photopériodique est de 12H/12H (jour/nuit).

A.1.5/ Culture en milieu liquide de cals et extraction de molécules bioactives

Les cals obtenus à partir des feuilles de *C. macrophylla*, font l'objet, après 6 mois de développement en tubes stériles, d'une culture sur milieu liquide. Celle-ci a pour objet de déterminer leur potentialité à produire des molécules antibiotiques. Elle consiste à placer l'équivalent d'un cm³ de cals dissociés provenant d'un même tube dans un Erlenmeyer de 50 mL obturé par un bouchon de coton préalablement autoclavé avec 10 mL d'un milieu favorable au développement de ces cals soit :

- Milieu de base : Murashige et Skoog (MS)
- Vitamines de Morel
- Saccharose 20 g/L
- pH = 5.8
- ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L

L'ensemble (3 répétitions) est placé sur table d'agitation (150 trs/min) pour une bonne aération du milieu, en salle de culture dans les mêmes conditions contrôlées que pour les tubes.

Un renouvellement du milieu est effectué toutes les 3 semaines par transfert dans un Erlenmeyer de taille plus importante et ajout de milieu neuf pour un rapport final 1/5 (volume de milieu/ volume du contenant), soit :

Date de repiquage	Volume de l'Erlenmeyer	Volume de milieu
J + 3 semaines	100 mL	20 mL
J + 6 semaines	250 mL	50 mL
J + 9 semaines	500 mL	100 mL
J + 12 semaines	1000 mL	200 mL

Après 15 semaines de culture, chaque Erlenmeyer de 1000 mL est traité en parallèle selon le même protocole. L'ensemble est centrifugé à 10 000 trs/min pendant 10 minutes afin d'obtenir un culot de cellules. Le surnageant (milieu de culture) est récupéré, filtré sur papier filtre Whatman 540 (125 mm de diamètre), puis concentré sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-114. Le culot de cellules est quant à lui, lysé par addition de dichlorométhane et passage aux ultrasons. Le surplus de dichlorométhane est évaporé à l'atmosphère. Le résidu obtenu est extrait au méthanol (20 mL) pendant 24 heures puis filtré. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite à 45°C puis pesé.

Ces deux extraits sont alors testés pour déterminer leur potentialité antibiotique par la méthode des disques sur deux souches bactériennes, *Erwinia carotovora* et *Staphylococcus aureus*. L'extrait provenant du culot de cellules est testé à une concentration de 500 µg/pastille, alors que celui provenant du milieu de culture l'est sans connaissance de sa concentration par dépôt de volume croissant du concentré sur pastille (10, 25, 50 µL).

A.2/ Résultats et discussion

Le trop petit nombre d'explants à notre disposition ne nous a pas permis de déterminer l'impact des hormones sur les explants de tiges dont la contamination a été très importante (jusqu'à 80%). A ce niveau de l'étude, il nous a donc été impossible de produire de nouveaux plants de *C. macrophylla* à partir de bouts de tiges.

Cependant, les résultats acquis sur les feuilles sont très prometteurs. En effet, nous avons pu obtenir des cals dont les potentialités de production de molécules antibiotiques ont pu être prouvées. Voyons les résultats obtenus étape par étape :

A.2.1/ Etape de désinfection

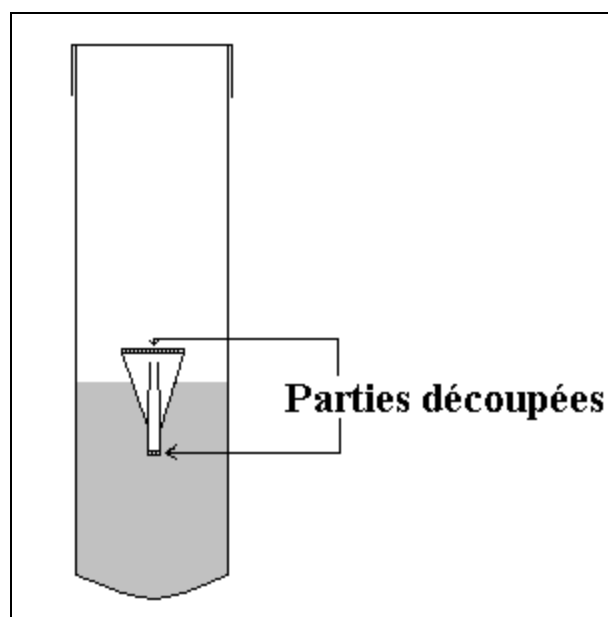
La désinfection telle que nous l'avons réalisée permet de récupérer près de 70% des explants foliaires mis en culture quelle que soit la façon dont la feuille a été découpée et la façon dont l'explant a été positionné sur le milieu.

A.2.2/ Impact du type d'explant et de son positionnement dans le milieu de culture

Au cours de notre expérience, nous avons constaté l'effet néfaste des phénols sur l'obtention de cals à partir de feuilles.

Les explants préparés présentaient deux à quatre coupes franches. Nous les avons disposés soit à plat sur le milieu soit à moitié dans le gel. L'observation de la quantité de phénols libérés montre clairement que celle-ci augmente avec le nombre de couches franches placées à l'intérieur du gel et plus encore si l'explant est positionné à plat puisque toutes les coupes sont à son contact.

En fait, l'explant idéal consiste en une découpe du pétiole à la base du limbe que l'on place dans le milieu et une coupe au tiers ou au demi de la feuille en fonction de sa taille (cf matériel et méthode *):



A.2.3/ Repiquages et délai d'obtention des cals

Afin de contourner l'apparition des phénols, de nombreux repiquages ont été effectués. Dans notre cas, il nous a fallu repiquer l'explant sur le même milieu toutes les 48 heures pendant la 1^{ère} semaine puis tous les 3 jours la 2^{ème} semaine, faute de quoi l'explant se nécrosait. Après deux semaines, les phénols sont quasiment épuisés et un repiquage tous les 15 jours à trois semaines suffit.

Les cals ont pu être obtenus après deux mois de culture sur un milieu contenant un mélange hormonal ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L. Ils se caractérisent par une déformation de la feuille qui présente des protubérances finissant par donner des amas de cellules (Figure 91).

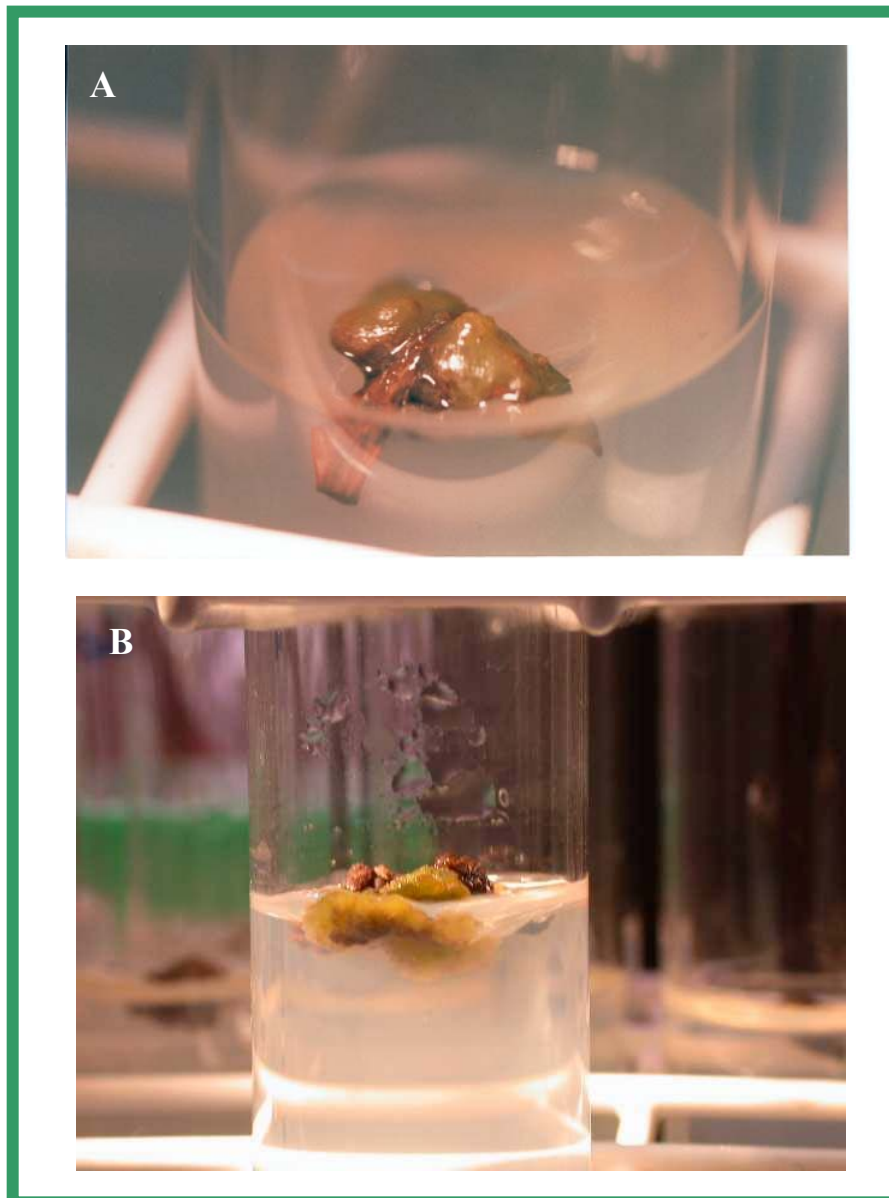


Figure 91 : Photos d'un explant de feuille boursoufflé après deux mois de culture (A) à l'origine de la formation d'un cal après 6 mois (B).

Les cals ainsi obtenus après 6 mois de culture sont soit subdivisés soit utilisés pour une culture en milieu liquide. La subdivision consiste en l'obtention de 10 à 12 fragments de cals à partir d'un tube contenant un explant de feuille transformé. Chacun donnera après 3 mois une masse de cals qu'il est possible de fragmenter de nouveau.

La culture sur milieu liquide à partir d'un cm³ de cal dissocié nous a permis après 15 semaines, pendant lesquels des apports en milieu neuf ont eu lieu, d'obtenir une biomasse suffisante à la réalisation d'une micro-extraction, du milieu d'une part et du contenu cellulaire des cals d'autre part (Figure 92). Ainsi, nous avons pu constater après un test d'antibiogramme sur les souches *Erwinia carotovora* et *Staphylococcus aureus* que la potentialité bioactive était bien présente dans ces cals. Plus précisément, l'expérience démontre que les molécules bioactives ne sont pas excrétées dans le milieu de culture, dont l'extrait ne donne aucune activité, mais sont contenues dans le milieu intracellulaire. L'efficacité antibiotique observée est équivalente à celle obtenue à la même concentration à partir d'un extrait méthanolique de feuilles adultes.

Nous avons pu démontrer au cours des travaux chimiques que les molécules responsables de l'activité antibiotique étaient des tanins hydrolysables. Des études cytochimiques réalisées sur cellules différenciées traitées de façon à fixer les tanins et observées en microscopie photonique ont permis de localiser ce type de molécules, le plus souvent, dans les vacuoles. Cependant, on peut en trouver également dans le protoplasme ou, plus rarement, sous forme d'imprégnation de la paroi (Dumas & Charriere-Ladreix, 1979). Dans tous les cas, il s'agit de sécrétions intracellulaires. Nos résultats observés sur des cals vont dans le sens de ces hypothèses. Il serait intéressant de les confirmer en réalisant cette étude cytochimique sur nos cellules. Autre point important, il nous reste à vérifier qu'il s'agit des mêmes molécules que celles purifiées à partir des feuilles prélevées sur l'arbre adulte ou éventuellement de précurseurs. Une chose est sûre, un test de révélation de la présence de tanins réalisé par ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer dans l'extrait obtenu à partir des cals confirme leur présence.

Dans le cadre d'une exploitation industrielle des molécules bioactives, ces premiers résultats devraient permettre d'orienter les choix de culture. Cependant, un long chemin reste à effectuer et il consisterait à déterminer des conditions de cultures encore plus favorables à la production des substances voire à la sélection d'une lignée de cellules plus productrice comme cela est déjà réalisé pour de nombreuses espèces à forte valeur ajoutée (El Badaoui *et al.*, 1996 ; Zhao *et al.*, 2001).

Au cours de ces derniers mois, la différenciation caulogène de certains des cals nous laisse espérer la possibilité d'obtenir des plants de *Cunonia macrophylla* à partir de ces cals (Figure 92) et ouvre la voie à de nombreuses perspectives d'exploitation des résultats de culture en milieu liquide pour obtenir une biomasse de cellules importante. Celles-ci pourraient être par la suite réimplantées sur milieu gélifié afin d'en obtenir dans un premier temps la différenciation d'une partie aérienne puis dans un deuxième temps de la partie racinaire par ajustement des équilibres hormonaux comme cela est souvent pratiqué pour d'autres espèces moins récalcitrantes (El Badaoui *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2001). Ceci permettrait la production en quantité importante de nouveaux plants producteurs de molécules bioactives qui après sevrage pourraient être plantés en champs et permettre une exploitation agricole avec récolte mécanisée des feuilles.

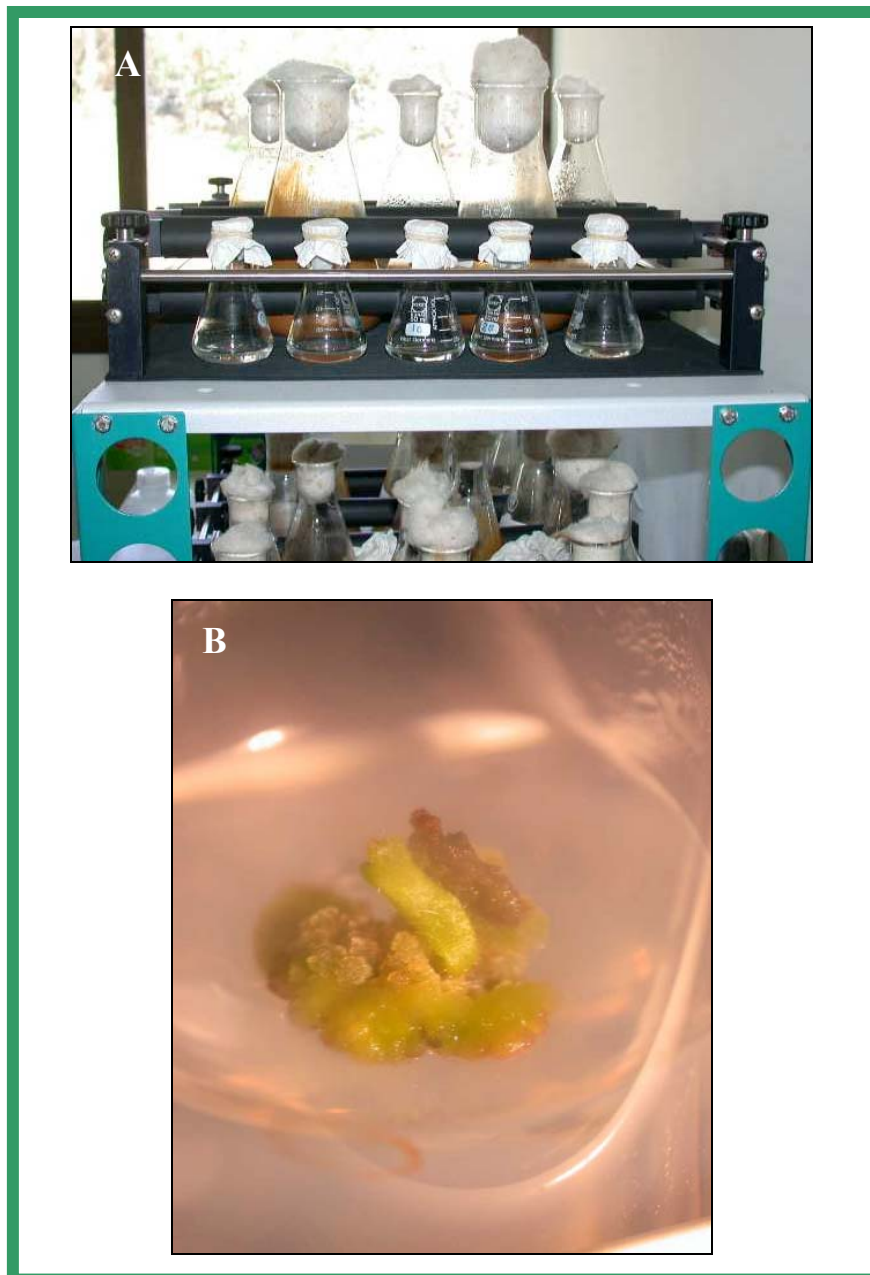


Figure 92 : Photos d'une culture de cals de *Cunonia macrophylla* en milieu liquide (A) et d'un cal en cours de différenciation vers une partie aérienne (B).

B/ Culture in vitro de *Geissois pruinosa*

L'espèce *G. pruinosa* sélectionnée arbitrairement dans un premier temps pour ses capacités d'hyper-accumulatrice de nickel et pour son éventuelle valorisation horticole, s'est également révélée d'un intérêt pharmaceutique non négligeable. C'est pourquoi des travaux similaires à ceux effectués sur *C. macrophylla* ont été réalisés.

B.1/ Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes utilisées sont voisines de celles employées pour l'espèce *C. macrophylla*, nous ne rappellerons pas chacune des compositions mais ferons référence à celles développées précédemment.

B.1.1/ Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est de deux types :

- certains explants (feuilles uniquement) sont prélevés sur des plants de *G. pruinosa* obtenus par germination de semences prélevées sur un pied mère au Mont Dzumac, et cultivés en serre . Ils sont âgés de 9 mois (Figure 93A ; cf. partie 5).
- d'autres explants (feuilles, racines et tiges) sont obtenus à partir de plants de *G. pruinosa* cultivés en tube stérile pendant 6 mois en chambre de culture $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Figure 93B). Ces plants proviennent de la germination de semences préalablement stérilisées à l'eau de Javel (10% pendant 20 minutes) et à l'alcool à 70°GL (5 minutes) puis placés sur tubes contenant de la vermiculite saturée en eau distillée et autoclavés.

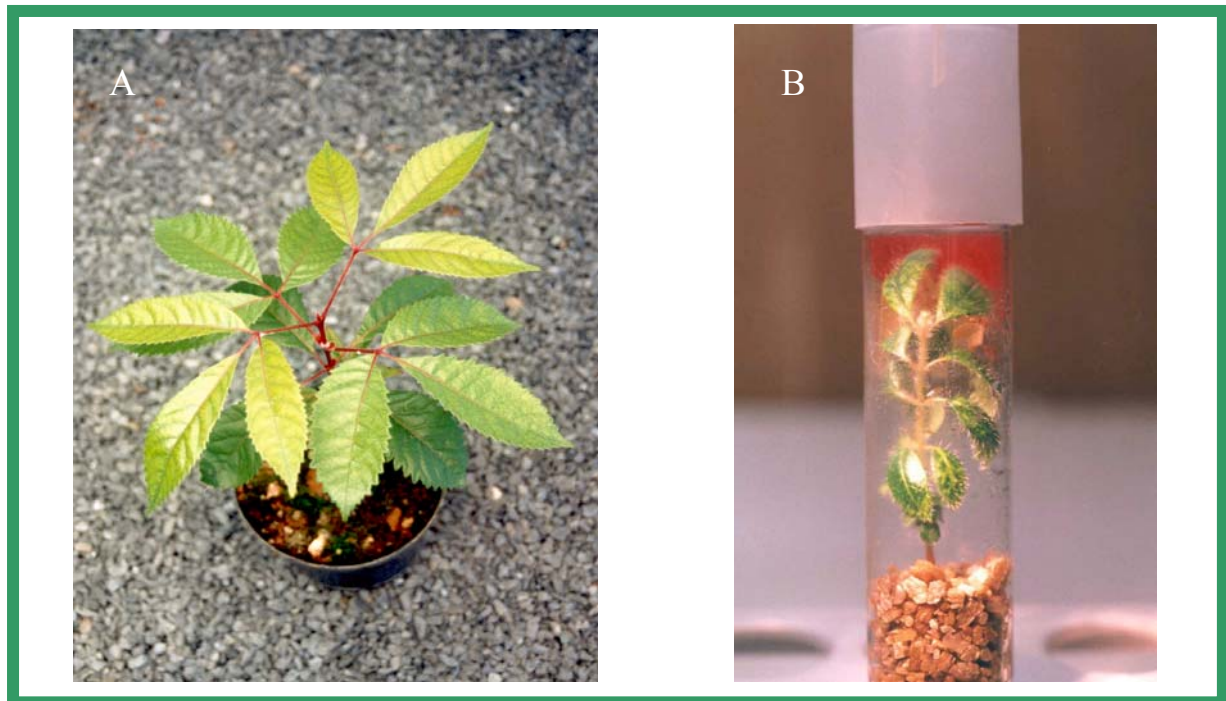


Figure 93 : Photos des plants sur lesquels ont été prélevés les explants de *G. pruinosa* utilisés pour la culture *in vitro*.

Le prélèvement est effectué à l'aide d'un matériel stérile. Les feuilles sont collectées entières, et les explants de tiges toujours plus longs que leur taille de mise en culture (4 cm).

B.1.2/ Désinfection du matériel végétal

La désinfection par voie chimique des différents explants s'effectue comme suit :

- cas des explants provenant de la serre

- 1/ trempage de 20 minutes dans le benlate (désinfectant fongique) à 2g/L
- 2/ trempage de 10 minutes dans l'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 48° chloré pur) à 10%
- 3/ trempage de 5 minutes dans l'éthanol 70° GL
- 4/ trempage de 30 minutes dans l'eau distillée stérile pour éliminer les polyphénols

- cas des explants provenant des tubes stériles

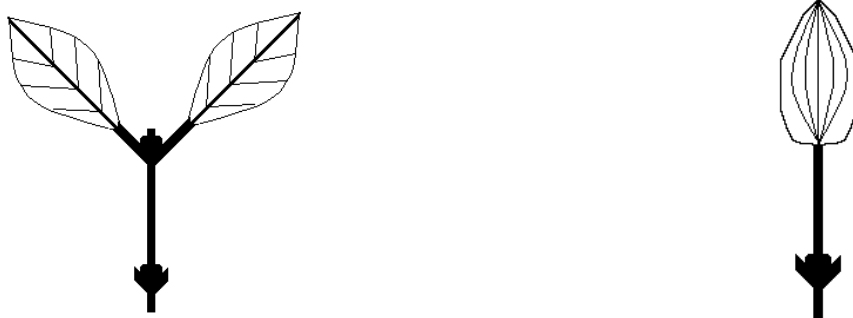
- 1/ trempage dans l'eau distillée stérile pour éliminer la vermiculite
- 2/ trempage de 30 secondes dans l'éthanol 70° GL
- 3/ trempage de 5 minutes dans l'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 48° chloré pur) à 4%
- 4/ 3 rinçages de 5 minutes dans l'eau distillée stérile

Ce choix de désinfection fait suite de nouveau à des résultats obtenus sur les explants prélevés sur le terrain qui montraient une efficacité plus grande de l'eau de Javel par rapport à l'hypochlorite de calcium. La désinfection des explants provenant des tubes stériles est réalisée en prévision de la présence de contaminations invisibles à l'œil nu et pouvant avoir comme origine une infection des couches tégumentaires externes de la graine.

B.1.3/ Mise en culture des explants

Une fois désinfectés, les différents explants sont taillés de différentes manières.

Explants de tiges prélevés sur plants en tubes stériles : La taille est réalisée de façon à obtenir deux niveaux de bourgeons, soit deux niveaux de bourgeons axillaires dans le cas de boutures intermédiaires, soit un niveau de bourgeons axillaires et un bourgeon terminal dans le cas de boutures prélevées en position terminale, pour une longueur finale comprise entre 5 et 10 mm.



Explants de feuilles prélevés en serre ou sur tubes stériles : Les feuilles sont découpées en carrés de 1cm de côté pour les explants provenant de la serre. Quant aux feuilles provenant des tubes stériles, leur petite taille nous conduit à les utiliser entières ou coupées en deux dans le sens transversal.

Explants de racines prélevés sur tubes stériles : Après élimination de la vermiculite, des extrémités racinaires d'environ 1 à 1.5 cm sont obtenues.

B.1.4/ Milieux de culture

- pour les explants de tiges

De nombreux facteurs sont fixés, seule la composition hormonale varie. Ainsi la composition du milieu sans hormones référencé M1 est :

- Milieu de base : Murashige et Skoog (MS)
- Vitamines de Morel
- Saccharose 20 g/L
- Agar 8 g/L
- pH = 5.8

Une seule auxine, l'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et une seule cytokinine, la Benzyle Amino Purine (BAP) sont étudiées. Le but étant d'obtenir à partir des explants de tiges une partie aérienne développée, le rapport auxine/cytokinine est fixé inférieur ou égal à 1 soit ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L soit ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

- pour les explants de feuilles

L'effet de plusieurs facteurs est étudié :

- le saccharose testé à 20 ou 30 g/L
- le milieu de base Murashige et Skoog utilisé comme décrit (MS) ou dilué de moitié (MS/2)
- les phytohormones fixées soit à ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L, soit à ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L, soit 2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

Les autres éléments restent inchangés.

- pour les explants de racines

Un seul test est effectué dans les conditions suivantes :

- Milieu de base : Murashige et Skoog (MS)
- Vitamines de Morel
- Saccharose 20 g/L
- Agar 8 g/L
- pH = 5.8
- ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L

Le milieu est préparé par addition de tous les éléments puis le pH ajusté. L'ensemble est chauffé, distribué dans des tubes à raison de 20 mL par tube avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 minutes sous une pression de 1 bar.

Une fois les explants ensemencés, les tubes sont placés à l'obscurité pendant 3 jours puis en chambre de culture à 25°C ± 1°C avec un éclairage fourni par des lampes néons ORSAM L30W/77 Fluor et Mazdafluor blanc industrie TF30/BI dont le cycle photopériodique est de 12H/12H (jour/nuit).

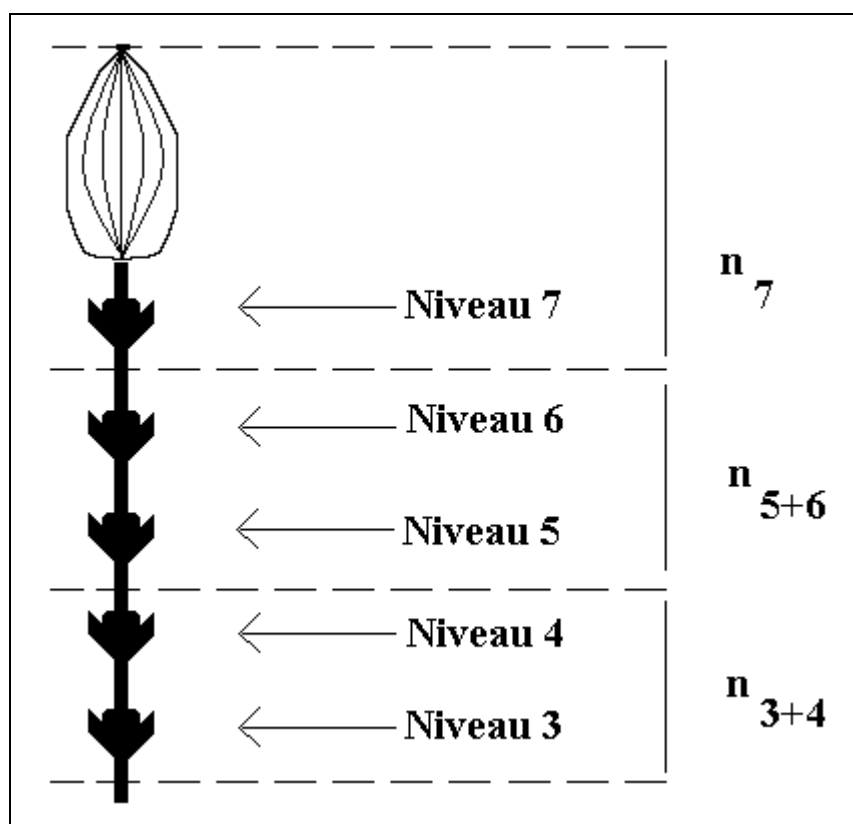
B.2/ Résultats et discussion

Pour mieux appréhender la diversité des résultats obtenus, il nous semble plus adéquat de les traiter en fonction du type d'explant étudié.

B.2.1/ Explants de tiges

Ces explants ayant pour origine les plants de *G. pruinosa* élevés en tube stérile sont apparus comme n'étant pas exempt de toutes contaminations. En effet, près de 20% d'entre eux ont été atteints après mise en culture sur milieu gélatinisé par des bactéries. Cependant le taux de réussite important nous a permis d'obtenir un grand nombre de résultats.

En tout premier lieu, la mise en culture de trois niveaux de feuilles différents, n_{3+4} , n_{5+6} et n_7 a mis en évidence l'intérêt de l'utilisation du niveau n_{5+6} .



En effet, au cours d'une première expérimentation pour laquelle l'équilibre hormonal a été fixé à ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L dans le milieu M1, nous avons pu constater après 2 mois, différents phénomènes pour chaque niveau étudié :

- le niveau n_{3+4} n'a montré aucun développement de feuille mais présente un renflement cellulaire important à sa base (Figure 94C)
- le niveau n_{5+6} est le plus équilibré puisqu'il présente un système aérien plus ou moins développé avec un premier bourgeonnement au niveau 6 après 1 mois puis au niveau 5. On constate également la présence d'un amas cellulaire de couleur rosée à l'interface avec le gel et un renflement à la base positionnée dans le gel (Figure 94B)
- le niveau n_7 débouresse après 1 mois au niveau du bourgeon terminal laissé en place. Un léger renflement de la base de la tige placée dans le gel est observé (Figure 94A).

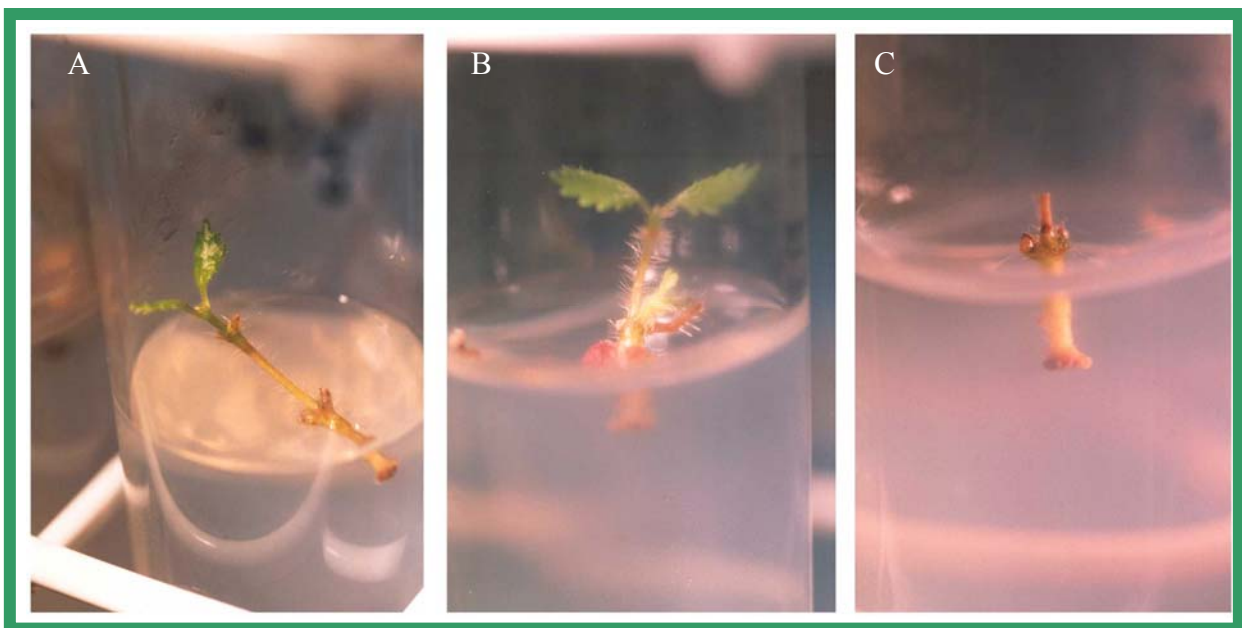


Figure 94 : Evolution des explants de *G. pruinosa* mis en culture *in vitro* sur le milieu M1 additionné d'un mélange hormonal ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L. A/ Niveau n_7 ; B/ Niveau n_{5+6} ; C/ Niveau n_{3+4} .

Comme le montre la Figure 94, nous avons en parallèle observé l'effet du positionnement de l'explant sur le milieu en le plaçant soit verticalement soit incliné. Au final, aucune différence notable n'a été constatée. Il semble cependant plus judicieux de placer l'explant verticalement pour éviter le contact des feuilles néoformées avec la paroi du tube.

Ce résultat a été utilisé pour réaliser une seconde série d'expériences en prélevant cette fois uniquement les niveaux n_{5+6} et n_7 pour les placer dans un milieu M1 dont l'équilibre hormonal a été fixé à ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L. Quel que soit le niveau testé, de nombreuses tiges ramifiées apparaissent après 4 mois de culture. Cependant, comparativement aux explants placés sur ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L, la longueur des tiges néoformées est plus courte (environ 0.5 cm contre 0.9 dans le premier cas) et les feuilles ont une surface plus petite (0.2 x 0.5 cm contre 0.4 x 0.8 cm en moyenne) mais sont en nombre plus important (Figure 95).

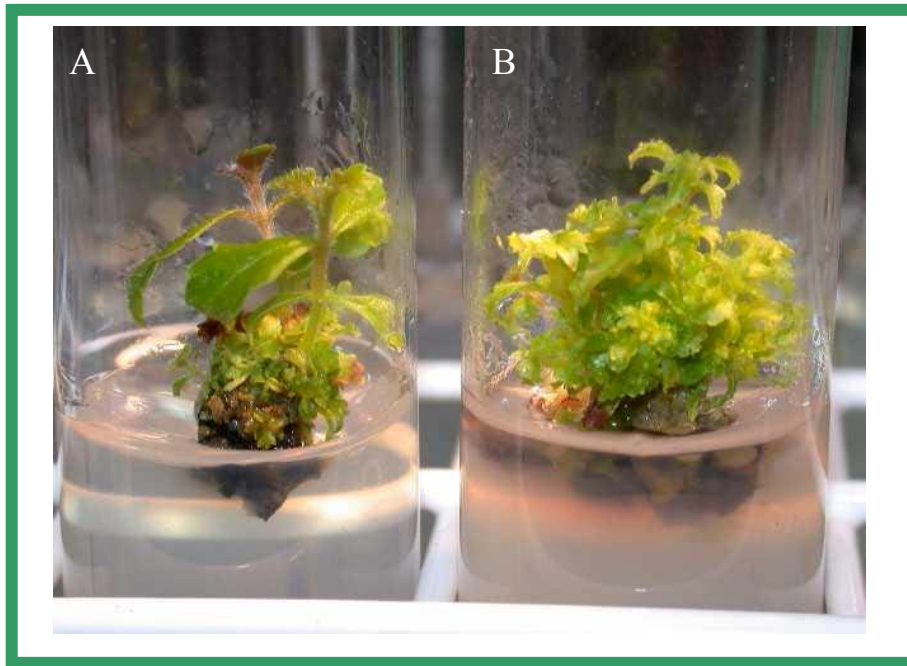


Figure 95 : Comparaison de la morphologie d'un explant de tige après 4 mois de culture *in vitro* sur le milieu M1 supplémenté par deux compositions hormonales différentes. A/ ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L ; B/ ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

Ce dernier traitement semble donc plus approprié pour l'obtention sur une même période d'un plus grand nombre de tiges feuillées aptes à être elles mêmes replacées après séparation dans de nouveaux tubes. Un délai de 6 mois paraît nécessaire afin d'avoir des rameaux de composition assez résistante pour une subdivision.

Quel que soit le traitement appliqué nous avons pu observer, au niveau de l'interface avec le gel, le développement d'une masse cellulaire rosée qui doit au cours du temps être éliminée, faute de quoi elle envahit une grande surface de l'explant le réduisant après 6 mois à une masse cellulaire accompagnée d'une dégénérescence des feuilles néoformées.

Enfin, quelques expérimentations ponctuelles sans valeur statistique montrent qu'une culture des explants sur le milieu M1 enrichi en ANA seul (0.5 , 1 ou 2 mg/L) conduit systématiquement à la formation de masses cellulaires et ce quel que soit le niveau considéré.

Très récemment, nous avons tenté d'obtenir à partir de ces tiges feuillées une partie racinaire en les plaçant sur un milieu favorable à l'enracinement. L'auxine utilisée est l'IAA (acide β -indolyacétique) à des doses croissantes (de 0.5 à 5 mg/L) ajoutée au BAP à 0.5 mg/L dans le milieu M1. A ce jour aucune modification notable n'est apparue, si ce n'est la perte de nombreux explants qui présentent une partie aérienne nécrosée et l'apparition de masses cellulaires sur le milieu M1 supplémenté en IAA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

Cette dernière étape nécessite d'être approfondie. Il semble en particulier nécessaire d'effectuer cet essai sur un milieu neutre sans addition de phytohormones.

B.2.2/ Explants de racines

L'unique traitement appliqué sur les racines de *G. pruinosa* provenant des tubes stériles a conduit à la formation de cals de couleur blanchâtre après 2 mois de culture (Figure 96). Ces résultats très récents n'en sont qu'à la phase de croissance en masse de ces amas cellulaire qui pourraient être étudiés par la suite, cependant leur développement apparaît beaucoup plus lent.

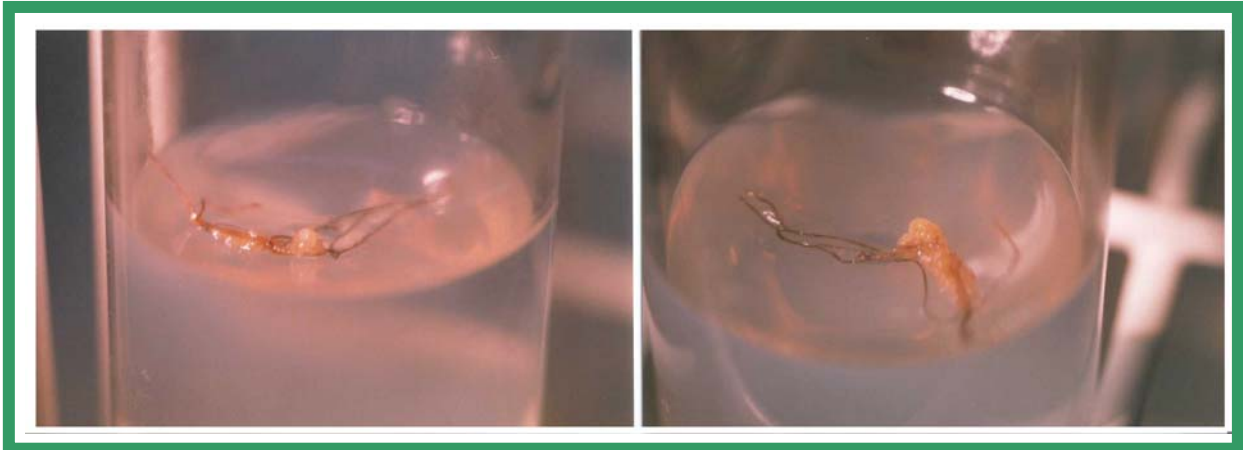


Figure 96 : Cals obtenus à partir d'un explant racinaire de *G. pruinosa* mis en culture *in vitro* sur le milieu M1 supplémenté en ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

B.2.3/ Explants de feuilles

- Obtention de cals

Les explants de feuilles qu'ils proviennent du plant de *G. pruinosa* en serre ou sur tube ont donné des résultats analogues pour les mêmes types de traitements. La différence la plus importante entre ces deux types d'explants se trouvait être le pourcentage de contamination au moment de la mise en culture. En effet, les explants provenant de la serre présentent un taux de contamination proche de 70% beaucoup plus important que celui obtenu pour les explants issus des tubes stériles (de l'ordre de 20%).

La première série d'expérience réalisée l'a été sur le milieu M1 supplémenté de différents mélanges hormonaux : ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L, ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L ou 2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L. Ces trois types de mélanges conduisent à une callogénèse. Cependant, l'aspect général des cals est différent. Le mélange ANA 0.2 mg/L + BAP 0.5 mg/L donne des cals de couleur verte après trois mois de culture, mais leur maintien sur le même milieu renouvelé conduit à leur mort. Les deux autres types de mélange fournissent des cals de couleur rosée qu'il est possible de maintenir pendant de longues périodes par repiquages successifs. Il est à noter que le mélange 2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L permet d'obtenir ces cals sur une période beaucoup plus courte de 2 mois contre 2 mois et demi pour le mélange ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L avec de surcroît une multiplication cellulaire plus importante pour un même temps de culture.

Une deuxième série d'expérience n'utilisant que le mélange hormonal 2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L, a permis de déterminer l'effet du saccharose et de la concentration du milieu de base sur l'obtention des cals et leur prolifération. Les résultats sont reportés dans le Tableau XLII.

Tableau XLII : Impact du saccharose et de la concentration du milieu de base (Murashige et Skoog) sur le délai d'obtention de cals en culture *in vitro* à partir des feuilles de *G. pruinosa* et sur leur prolifération.

<p align="center">Milieu gélifié : -2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L - Vitamines de Morel - Agar 8 g/L - pH = 5.8 additionné de :</p>	<p align="center">MS</p>	<p align="center">MS/2</p>
<p align="center">Saccharose 20 g/L</p>	Délai : 2 mois Prolifération : faible	Délai : 1 mois et demi Prolifération : moyenne
<p align="center">Saccharose 30 g/L</p>	Délai : 2 mois Prolifération : moyenne	Délai : 1 mois et demi Prolifération : forte

Il apparaît clairement que tous les traitements sont favorables à la callogénèse avec un délai plus court et une prolifération plus importante pour le milieu MS/2 avec 30 g/L de saccharose.

En conclusion, le milieu le plus favorable à la callogénèse semble être celui composé comme suit et que nous référencerons milieu L :

- Milieu de base Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2)
- Vitamines de Morel
- Saccharose 30 g/L
- 2-4 D 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L
- Agar 8 g/L
- pH = 5.8

Ce milieu a été par la suite utilisé pour l'obtention de nouveaux cals, pour leurs repiquages, leur prolifération et leur fragmentation.

C'est ainsi que des explants de feuilles provenant soit de plants de la serre, soit de plants en tubes stériles ont été étudiés afin de déterminer le meilleur positionnement dans le gel le plus favorable à la callogénèse.

Nous avons pu constater que pour les feuilles provenant des plants les plus jeunes (6 mois) en tubes stériles, dont la taille est petite, le positionnement le plus propice était analogue à celui observé pour l'espèce *Cunonia macrophylla*. Il s'agit d'une coupe au niveau du pétiole à la frontière avec le limbe, partie positionnée dans le gel, et d'une coupe transversale du limbe à la moitié de la feuille, partie positionnée hors du gel. Il est à noter que la coupe transversale est facultative, la feuille pouvant être entière. Nous avons également remarquer que les feuilles prélevées dans la partie la plus haute du plant, donc les plus jeunes, étaient plus aptes à la callogénèse. Dans tous les cas, la masse cellulaire s'est développée à la base de la feuille, à l'interface entre le limbe et la partie coupée du pétiole (Figure 97A).

En ce qui concerne les explants prélevés sur les plants en serre (1 an) au niveau des folioles appartenant à des feuilles composées palmées, diverses positions ont été données aux carrés découpés, soit à moitié immergé dans le gel (verticalement ou obliquement), soit déposé sur le gel. Cette dernière est apparue comme la plus avantageuse du fait d'une libération de phénols moins importante. Des repiquages réguliers sur des périodes courtes de 4 à 5 jours ont été nécessaires pour éviter une nécrose des tissus due aux phénols. L'apparition d'amas cellulaires s'est caractérisée par une déformation du limbe qui a donné des boursouflures aboutissant à une masse de cellules de couleur rosée (Figure 97B).

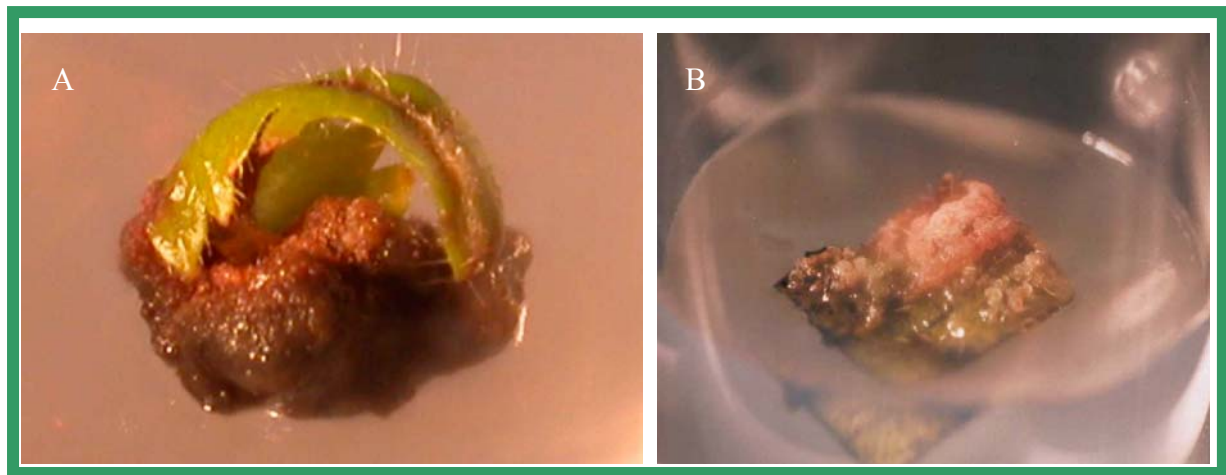


Figure 97 : Aspect des cals obtenus à partir de feuilles de *G. pruinosa* dont l'origine de prélèvement et l'âge différent . A/ Feuilles prélevées sur un plant de 6 mois cultivé en tube stérile, B/ Explant prélevé sur une feuille dont le plant âgé de 1 an a été cultivé en serre.

- Accroissement des cals

Une fois les cals obtenus (après 2 mois), ceux-ci ont été subdivisés une première fois en plusieurs tubes, un cal permettant de préparer environ une douzaine de tubes sur le milieu L utilisé comme milieu d'accroissement pendant 6 mois avec un repiquage toutes les 3 semaines. Après cette période, la masse cellulaire de couleur rosée à blanchâtre atteint pratiquement les parois du tube. Certaines sont alors uniquement taillées sur les bords et réimplantées sur milieu L alors que d'autres sont utilisées pour une nouvelles série d'expériences consistant à étudier l'impact de différents mélanges hormonaux sur leur accroissement et plus tard sur leur différenciation caulogène.

Dans le cadre de cette manipulation, les cals ont été subdivisés en carrés de 2 mm de côté et placés sur un milieu de type M1 avec ajout de différentes concentrations de BAP et d'IAA ou sur un milieu L. Après 9 mois de culture, des différences notables apparaissent au niveau de leur accroissement, de leur coloration et de leur différenciation. Les résultats sont reportés dans le Tableau XLIII .

Tableau XLIII : Impact des phytohormones après 9 mois de culture *in vitro* sur l'accroissement, la coloration et la différenciation des cals obtenus à partir de feuilles de *G. pruinosa*.

<i>Type de milieu</i>	Accroissement	Couleur	Différenciation
Milieu M1+			
BAP 0.5 mg/L	43 mm ²	Cals dégénérescents mi-rosé mi-noirci	Aucune
BAP 1 mg/L	53 mm ²	Cals rosés	Aucune
BAP 2 mg/L	53 mm ²	Cals rosés	Aucune
BAP 4 mg/L	4 mm ²	Cals noircis	Aucune
BAP 0.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L	212 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 1 mg/L + IAA 0.1 mg/L	241 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 2 mg/L + IAA 0.1 mg/L	166 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 4 mg/L + IAA 0.1 mg/L	25 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L	345 mm ²	Cals rosés avec de grandes zones vertes	Début de différenciation
BAP 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L	380 mm ²	Cals rosés avec de grandes zones vertes	Début de différenciation
BAP 2 mg/L + IAA 0.5 mg/L	212 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 4 mg/L + IAA 0.5 mg/L	141 mm ²	Cals rosés à blanchâtre	Aucune
BAP 1 mg/L + IAA 1 mg/L	225 mm ²	Cals rosés avec quelques punctuations verdâtres	Début de coloration verdâtre
BAP 4 mg/L + IAA 1 mg/L	141 mm ²	Cals rosés à blanchâtres	Aucune
BAP 4 mg/L + IAA 2 mg/L	160 mm ²	Cals rosés à blanchâtres	Aucune
Milieu L BAP 0.5 mg/L + 2-4 D 0.5 mg/L	Cal volumineux occupant toute la surface du gel (≈ 400 mm ²)	Blanche à rosée avec des zones vertes dont certaines différenciées	Bourgeons de tiges foliaires

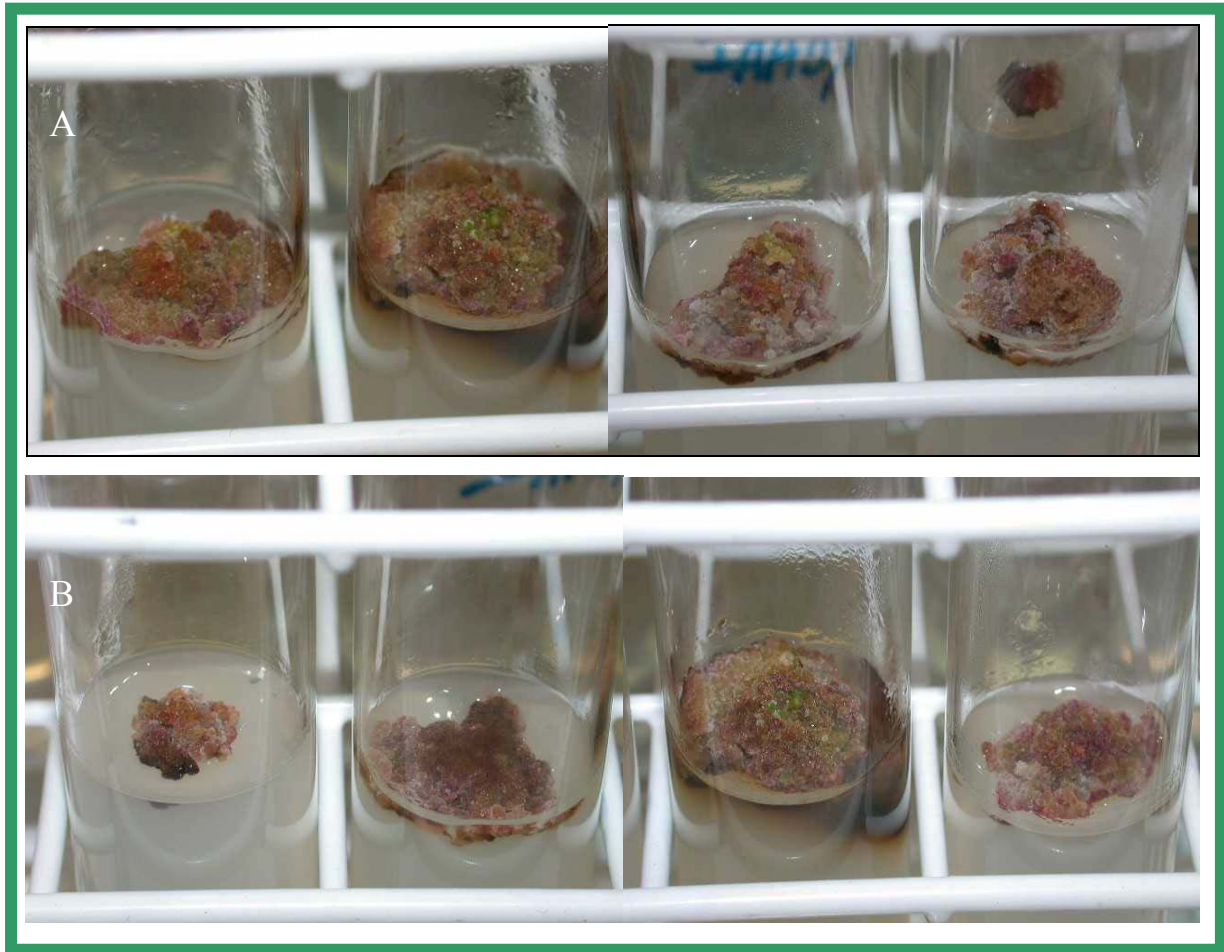


Figure 98 : Impact des phytohormones après 9 mois de culture *in vitro* sur l'accroissement, la coloration et la différenciation des cals obtenus à partir de feuilles de *G. pruinosa*. A/ De gauche à droite : BAP 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L, BAP 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L, BAP 2 mg/L + IAA 0.5 mg/L, BAP 4 mg/L + IAA 0.5 mg/L ; B/ De gauche à droite : BAP 1 mg/L, BAP 1 mg/L + IAA 0.1 mg/L, BAP 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L, BAP 1 mg/L + IAA 1 mg/L.

Les résultats obtenus montrent qu'une dose trop importante de la cytokinine BAP est défavorable à son accroissement. En effet, le maximum de surface, pour une même concentration d'auxine IAA, est atteint avec des concentrations de 0.5 et 1 mg/L de BAP (Figure 98A). Plus encore, en absence totale d'IAA, les cals placés sur un milieu riche en BAP (4 mg/l) dégénèrent rapidement. L'effet de l'IAA pour une même concentration de BAP (1 mg/L) est tout aussi important (Figure 98B) puisque la surface est d'autant plus grande que sa concentration est forte jusqu'à un maximum de 0.5 mg/L au delà duquel cette surface diminue.

En ce qui concerne le niveau de différenciation, on constate que la proximité de l'équilibre des concentrations auxine et cytokinine lui est favorable puisque le meilleur résultat est obtenu pour les mélanges BAP 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L et BAP 1 mg/L + IAA 0.5 mg/L qui présentent tous deux un début de différenciation. Leurs surfaces, de surcroît les plus importantes, laisse présager de l'obtention d'une plus grande quantité de tiges feuillées.

- Différenciation des cals

Les résultats du Tableau XLIII, montrent très nettement que le milieu L est tout aussi efficace pour l'obtention des cals, que pour leur accroissement et pour leur induction en bourgeons foliaires. Cependant, une fois les tiges obtenues, leur transfert après séparation du cal sur ce même milieu L conduit à la formation d'une nouvelle masse cellulaire qui l'envahit. Nous avons donc tenté, il y a peu de temps de transférer ces tiges néoformées sur un milieu neutre ou enrichi en auxine pour provoquer leur enracinement.

- Régénération d'un plant entier

Les tiges néoformées ont été placées sur un milieu M1 tel quel ou additionné de concentrations croissantes d'IAA (de 0.1 mg/L à 10 mg/L). A la date d'aujourd'hui, soit trois mois après leur transfert sur ce milieu d'enracinement, seules les tiges néoformées placées sur le milieu neutre M1 ont donné des racines adventives. L'expérimentation est encore en cours.

B.3/ Récapitulatif des résultats obtenus pour la culture in vitro de l'espèce *G. pruinosa*

L'ensemble des expériences que nous avons pu réaliser sur *G. pruinosa* nous permet d'établir plusieurs modes de multiplication *in vitro* de cette espèce : soit une multiplication par bourgeonnement axillaire en utilisant des explants de tiges qui fourniront de nouvelles tiges feuillées ramifiées qui pourront être fragmentées pour l'obtention de nouvelles tiges ou bien de nouvelles plantules en les plaçant sur un milieu favorable à l'enracinement (cette étape reste encore à explorer), soit une multiplication par l'intermédiaire de cals obtenus à partir d'explants foliaires. Dans ce cas les cals sont subdivisés, leur accroissement optimisé et lorsqu'ils sont volumineux, ils sont utilisés pour l'obtention de nouvelle masse de cal ou bien laissés tels quels pour un bourgeonnement foliaire. Une fois les tiges néoformées développées, celle-ci sont repiquées sur un milieu favorable à l'enracinement pour obtenir de nouvelles plantules (cette dernière étape est en cours de réalisation). On peut aussi imaginer les utiliser pour l'obtention de nouvelles tiges ramifiées (Figure 99).

Les nouvelles plantules néoformées pourront alors être acclimatées en terre. Il conviendra à ce moment de vérifier que la capacité antimicrobienne de l'espèce a été conservée.

C/ Conclusion

Les résultats obtenus sur *Geissois pruinosa* dont la fourniture en explants était plus aisée montrent que la multiplication *in vitro* des espèces ligneuses de la famille des Cunoniaceae est réalisable sans trop de difficultés. Elle nécessite cependant un temps important qui rend l'exploitation par cette voie apparemment coûteuse. Il faudrait réduire au moins de moitié les délais et pour cela rechercher des milieux favorables à un développement plus rapide des différentes parties obtenues. Une des difficultés à surmonter reste l'enracinement des différentes tiges feuillées néoformées. Les nombreux essais réalisés se sont avérés infructueux, cependant la plantule entière obtenue sur milieu neutre ces derniers jours laisse la porte ouverte à de nouvelles expérimentations afin de résoudre ce problème.

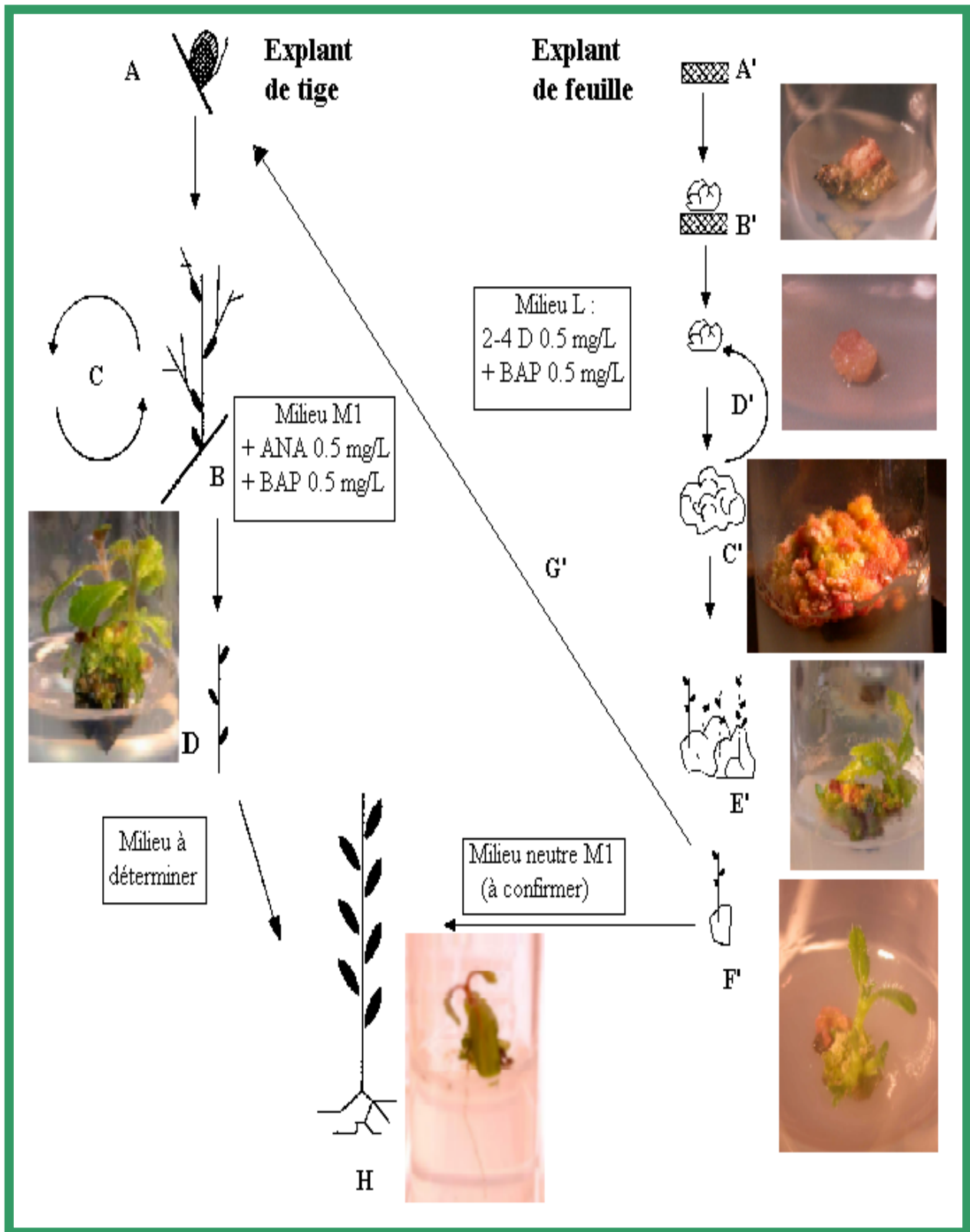


Figure 99 (légende page de droite) : Schéma récapitulatif des conditions optimales déterminées pour la culture *in vitro* de *Geissois pruinoso*.

De nombreux points positifs ressortent malgré tout de cette étude. En premier lieu dans le cas de *Cunonia macrophylla*, l'obtention de cals pour lesquels les potentialités bioactives sont conservées permet d'envisager aisément une culture cellulaire en masse pour la production des molécules antibiotiques dont la production est intracellulaire. La recherche des conditions optimales de cette culture reste à établir en cas de poursuite de l'étude, ainsi que d'une lignée cellulaire hyper productrice. Enfin, comme nous avons pu le faire pour l'espèce *Geissois pruinosa*, l'obtention en nombre important de nouvelles plantules pourrait s'avérer essentiel dans l'optique d'une culture à grande échelle, même s'il est vrai que la multiplication par bouturage classique est plus rentable malgré les délais importants qu'elle nécessite.

D'un point de vue fondamental, les résultats obtenus sont d'un grand intérêt. En effet, très peu d'études ont été réalisées sur les espèces de la famille des Cunoniaceae en culture *in vitro*. Seule l'espèce *Ceratopetalum gummiferum* en a fait l'objet et ceci très récemment (Armstrong & Johnson, 2000). Nos expérimentations sur *Geissois pruinosa* fournissent deux voies de multiplication, l'une plus directe et apparemment plus rapide utilisant des explants de tiges, la seconde passant par le stade de cals. Bien que la complexité d'une réaction organogène à partir de cellules différenciées nécessite l'activation de nombreux processus métaboliques, l'approche « cals » apparaît comme le moyen efficace susceptible de déprimer certains contrôles momentanément réprimés.

Figure 99 (page de gauche) : Schéma récapitulatif des conditions optimales déterminées pour la culture *in vitro* de *Geissois pruinosa*. A : L'explant initial est un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire ; B : Sur le milieu M1 additionné de ANA 0.5 mg/l et BAP 0.5 mg/L, le(s) bourgeon(s) débourre et se développe en une tige feuillée plus ou moins ramifiée ; C : Cette tige peut être découpée en fragments qui remis sur le même milieu vont redonner autant de tiges feuillées ; D : Les tiges peuvent alors être transférées sur un milieu neutre ou enrichi en auxine (à déterminer) ; H : Les plantules complètes peuvent alors être acclimatées en terre ; A' : L'explant initial est un fragment de feuille ; B' : Les cellules de l'explant initial se divisent et forment de manière désorganisée un cal primaire rattaché à l'explant de départ sur un milieu L ; C' : Le cal primaire est subcultivé sur un milieu d'accroissement L ; D' : Après subdivision le cal peut redonner par accroissement de nouveaux cals sur un milieu L ; E' : Le cal forme des bourgeons foliaires sur le milieu d'induction L ; F' : La subdivision des tiges néoformées conduit soit vers de nouvelles tiges par ramification, cas G', soit vers une nouvelle plantule par culture sur un milieu neutre M1 (à confirmer) cas H.

Bilan et perspectives sur les voies et moyens de multiplier les espèces *Geissois pruinosa* et *Cunonia macrophylla*

Notre étude qui s'est voulue la plus complète possible ouvre la voie à de nombreuses perspectives. Nous avons pu prouver que malgré les nombreuses difficultés rencontrées, la multiplication des deux espèces de Cunoniaceae étudiées était réalisable dans l'optique de la valorisation de leurs potentialités bioactives.

L'utilisation des semences en particulier donne des résultats plus que probants puisque avec près de 82.2% de germination pour l'espèce *Cunonia macrophylla*, la scarification mécanique, procédé peu coûteux, s'avère la plus efficace. Cependant, le temps nécessaire pour atteindre ce taux maximal est long. Quelques expériences de prégermination, qu'il faut approfondir, ont permis de montrer qu'il était possible de réduire cette période. Les mêmes conclusions sur l'effet de la scarification sont applicables à l'espèce *Geissois pruinosa*, cependant le taux maximal de germination reste faible proche de 40%. Il nous reste à déterminer pourquoi ces semences ont plus de difficultés à germer. Outre ces constatations sur les capacités germinatives de ces semences et sur les moyens d'optimiser leur germination, les expériences menées ont d'un point de vue fondamental apporté de nombreux enseignements sur la physiologie de ce type de semences dont les pieds mères se développent sur des milieux extrêmes. Les observations faites sur l'effet de quelques éléments du syndrome serpentinique conduisent à de nombreuses questions auxquelles il conviendra de répondre dans le cadre de la poursuite de ce travail. En effet, pourquoi les semences de deux espèces de la même famille localisées sur des milieux proches ont des réponses si opposées lorsqu'elles sont exposées à des éléments tels que le nickel, le magnésium ou le calcium ? Au niveau de quel processus de la germination ces éléments interviennent-ils ? Autant de questions qui nous laissent à penser qu'un programme de recherches sur les semences des espèces des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie doit être activement engagé. Le L.B.P.V.A. s'y attachera au cours des prochaines années.

La multiplication par voie végétative de ces deux espèces de Cunoniaceae fournit également des informations sur les méthodologies à employer pour optimiser le bouturage.

Le macrobouturage en particulier a démontré que la présence du bourgeon apical était un élément essentiel au développement d'un bon système racinaire. L'eau y joue également un rôle important puisque le meilleur résultat a été obtenu pour des boutures placées en milieu totalement liquide. Ainsi, il nous semble qu'un bouturage en milieu hydroponique avec un renouvellement nécessaire de l'eau dû à la libération de nombreux polyphénols serait le moyen le plus rentable et le plus rapide d'obtenir de nouveaux plants quelle que soit l'espèce considérée. Des essais de vérification de cette hypothèse devraient être engagés.

La culture *in vitro* a quant à elle quasiment permis d'obtenir de nouvelles plantules à partir d'explants de feuilles ou de tiges de l'espèce *Geissois pruinosa*. La méthodologie employée pourra être appliquée à l'espèce *Cunonia macrophylla*. Des explants de feuilles de cette dernière ont cependant fourni des cals qui à ce jour s'orientent vers un bourgeonnement foliaire. L'expérience devra être poursuivie.

Enfin, une culture cellulaire en milieu liquide des cals de *Cunonia macrophylla* a montré la conservation de la potentialité bioactive et permet d'envisager des essais en bioréacteur afin de vérifier si cette activité est liée aux mêmes molécules que celles purifiées chez la plante adulte.



PARTIE V

Contribution à la
connaissance du
développement de
deux Cunoniaceae:
Cunonia macrophylla
et
Geissois pruinosa

Photo de *Geissois pruinosa* élevée dans la serre du LBPVA (stade 18 mois, 2001)

**CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DU
DEVELOPPEMENT DE DEUX CUNONIACEAE :
CUNONIA MACROPHYLLA ET *GEISSOIS PRUINOSA***

Introduction

Si l'on s'attache à détailler la chronologie des expérimentations réalisées au cours de l'ensemble de ce travail, on constate que la première année a été consacrée essentiellement à la détection des espèces pouvant présenter un intérêt d'ordre pharmaceutique ou cosmétique. Malgré tout, dans un souci d'avancement des recherches purement physiologiques, nous avons en parallèle décidé arbitrairement d'étudier l'espèce *Geissois pruinosa*. Ce choix a été essentiellement orienté par des résultats antérieurs la définissant comme hyper-accumulatrice de nickel (Jaffré *et al.*, 1979), mais également par quelques pistes d'activités biologiques détectés antérieurement (Fogliani, 1997) et enfin du fait de son accessibilité aisée à proximité de Nouméa. Ainsi des expériences ont été menées sur l'impact de différents types de sol sur sa germination/levée et sa croissance.

Les résultats obtenus ont été utilisés durant la seconde année de recherche. En effet, au cours de ces manipulations, nous avons pu constater des différences morphologiques importantes au cours du développement des plants en serre. C'est pourquoi des observations ont été effectuées en fonction du temps sur un sol permettant un accroissement rapide du végétal. Dans le même temps, nous nous sommes attaché à observer l'impact d'un apport à concentrations croissantes de nickel sur sa croissance. En cours d'année, l'espèce *Cunonia macrophylla* s'est présentée comme un candidat idéal pour une étude chimique approfondie. Sa morphologie monocaule particulière apparaissait comme un défi pour sa multiplication végétative. C'est pourquoi la recherche des voies et moyens permettant d'assurer la pérennisation de ces deux espèces a été entreprise. Dans un souci de comparaison de ces deux espèces appartenant à deux genres différents, nous avons suivi au cours du temps sur le même sol, la morphologie de *Cunonia macrophylla*. Enfin, cette dernière n'étant pas connue à ce jour comme hyper-accumulatrice de nickel, il nous a paru essentiel d'observer l'effet du nickel sur son développement. Ces travaux se sont étalés sur la troisième et dernière année.

Trois grandes parties seront donc développées. La première sera consacrée à l'effet de différents types de sols sur la germination et la croissance de l'espèce *Geissois pruinosa*, seule étudiée dans ce cadre. La seconde concernera l'effet du nickel sur la croissance des deux espèces. Enfin, la troisième décrira l'évolution morphologique de ces deux espèces de la graine à l'état adulte sur un sol favorable à une croissance rapide.

I/ Croissance de *Geissois pruinosa* sur différents types de sols.

L'espèce *Geissois pruinosa* présente la particularité de ne pousser exclusivement que sur substrat ultrabasique, à l'état naturel. Cependant, elle peut se développer au niveau d'autres formations que celle de maquis minier (Morat *et al.*, 1986).

Les sols ultrabasiques de Nouvelle-Calédonie sont caractérisés par une forte toxicité métallique due à une concentration importante en éléments sidérophiles (Fe, Cr, Ni, Co, Mn et Mg), ainsi que par une faible teneur en matière organique et en éléments nutritifs tels que N, P, Ca et K. Les teneurs en métaux peuvent excéder 80%, cependant seule une faible partie est accessible sous forme extractible et est susceptible d'être toxique. Ainsi les teneurs extractibles en Ni, Co et Fe varient de 1 à 100 ppm. Tous ces faits constituent par définition le syndrome serpentinique (Brooks, 1987). A la lumière de ces données, il nous semblait utile de déterminer l'effet de quelques uns de ces éléments sur la germination/levée des semences et la croissance de l'espèce *Geissois pruinosa*.

A/ Matériel et méthodes

Trois types de sols miniers sont étudiés correspondant à différents niveaux d'un faciès type de maquis minier, la couche supérieure étant la latérite rouge, la couche intermédiaire la latérite jaune, et la couche inférieure la saprolite (Figure 100). Un quatrième type de substrat à visées plus horticoles est testé et est composé d'un mélange égal de terreau végétal et vermiculite.

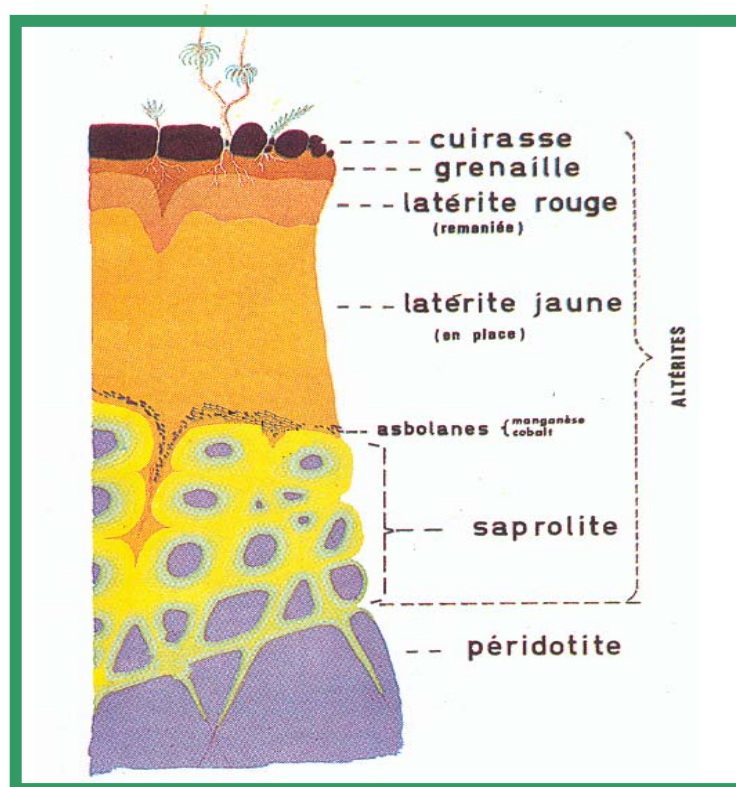


Figure 100: Profil d'altération des péridotites en Nouvelle-Calédonie (d'après Pelletier, 1990).

Les trois types de sols miniers sont supplémentés ou pas d'éléments leur faisant défaut par définition :

- le calcium sous forme de poudre de CaCO_3
- le potassium sous forme de poudre de KHCO_3
- la matière organique sous forme de terreau végétal

Les éléments poudreux sont mélangés à la terre en proportion de 2% (2 g de poudre pour 100 g de terre). Le terreau végétal est quant à lui utilisé à raison de 1/3 pour 2/3 de sol.

Les semis sont réalisés sur des pots de 9x9x9 cm préalablement remplis des différents substrats, pesés, saturés en eau puis pesés de nouveau pour la détermination de la capacité de rétention. Des graines de *Geissois pruinoso*, sont préalablement triées d'après leur aspect fertile (cf. partie IV chapitre 1) et stérilisées à l'eau de Javel à 5% (pure à 48°chloré) pendant 5 minutes suivi de deux rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite disposées sur les pots à raison de 5 par pot et 5 pots sont préparés pour chaque traitement.

L'arrosage est effectué par capillarité pendant le premier mois puis une brumisation de 5 minutes par jour pendant le midi a pris le relais les mois suivants ; l'ensemble du matériel est disposé en serre (Figure 101). Après 3 mois de développement, les plants sont transplantés dans des pots ronds de plus grande taille de diamètre 15 cm et de hauteur 12 cm.

Le suivi de la croissance consiste à mesurer la longueur de la tige développée, du sol à l'extrémité apicale pendant une période de 8 mois.



Figure 101 : Présentation de la serre de culture et des stèles dans lesquelles sont disposés les différents plants cultivés.

B/ Résultats et discussion

B.1/ Capacité de rétention des sols

L'analyse de la figure 102 montre que les trois types de sols miniers possèdent des capacités de rétention différentes, proches de 25% pour la latérite rouge, la saprolite et plus importante de 36% pour la latérite jaune. L'ajout de CaCO_3 et KHCO_3 n'affecte que très peu ce taux alors que le terreau a tendance quel que soit le sol considéré à l'augmenter d'environ 10%.

Des observations faites au cours de l'expérimentation ont montré un compactage important de la latérite jaune laissant présager de la difficulté pour les plantes d'y développer un système racinaire. Plus encore, l'ajout de CaCO_3 a pour effet d'augmenter ce compactage. A contrario, l'ajout de terreau permet un allègement du sol, d'où une meilleure aération plus favorable à un développement racinaire.

Le mélange terreau-vermiculite semble être un intermédiaire favorable à la résolution de ces différentes difficultés. Cependant, il ne reflète en aucun cas la réalité du terrain.

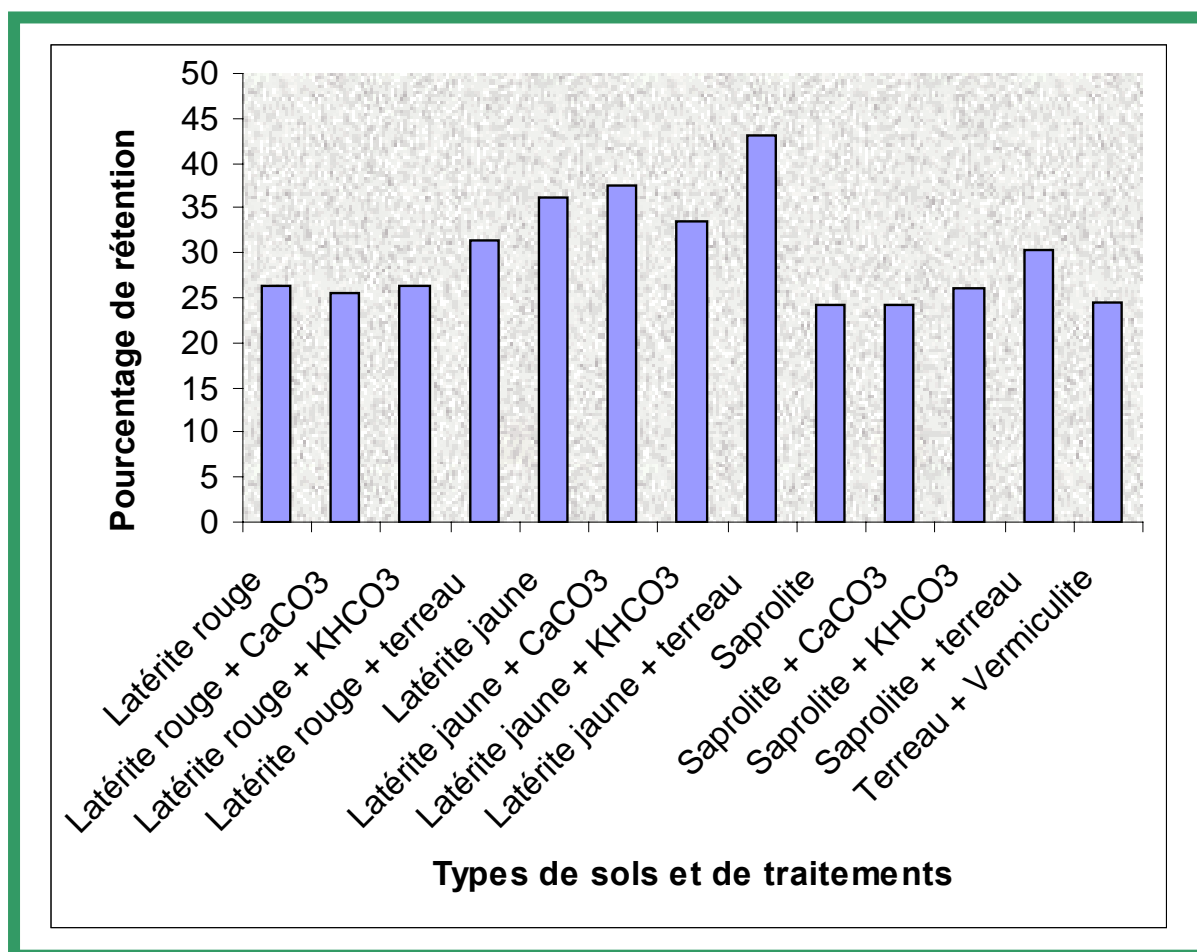


Figure 102 : Histogramme des pourcentages de capacité de rétention des différents types de sols et de traitements.

B.2/ Taux de germination/levée

La figure 103 montre que les pourcentages de germinations/levées (de l'ordre de 20%) sont voisins si l'on considère les sols sans traitements. Ce chiffre est inférieur à celui obtenu pour la même espèce en conditions contrôlées au laboratoire (33%), cependant de nombreuses variations peuvent l'expliquer. L'humidité ambiante, les variations de températures et d'autres facteurs insoupçonnés pourraient en être responsables.

On constate également que le traitement au carbonate de calcium réduit ce taux, ce qui va dans le sens des résultats obtenus en conditions contrôlées montrant un effet négatif de la présence de calcium dans le milieu sur la germination de ces semences.

La même observation peut être faite mais à un moindre degré avec l'ajout de terreau qui abaisse le taux aux alentours de 10%.

Quant à l'hydrogénocarbonate de potassium, sa présence a un effet néfaste sur la germination/levée, puisque aucune semence n'y a vu le jour. Ce résultat devra être confirmé par des expériences en conditions contrôlées. Quoiqu'il en soit, aucun suivi de croissance n'a pu être effectué sur ce milieu.

Enfin, le mélange terreau-vermiculite (1/1) donne le meilleur taux de germination/levée avec un chiffre de 25%.

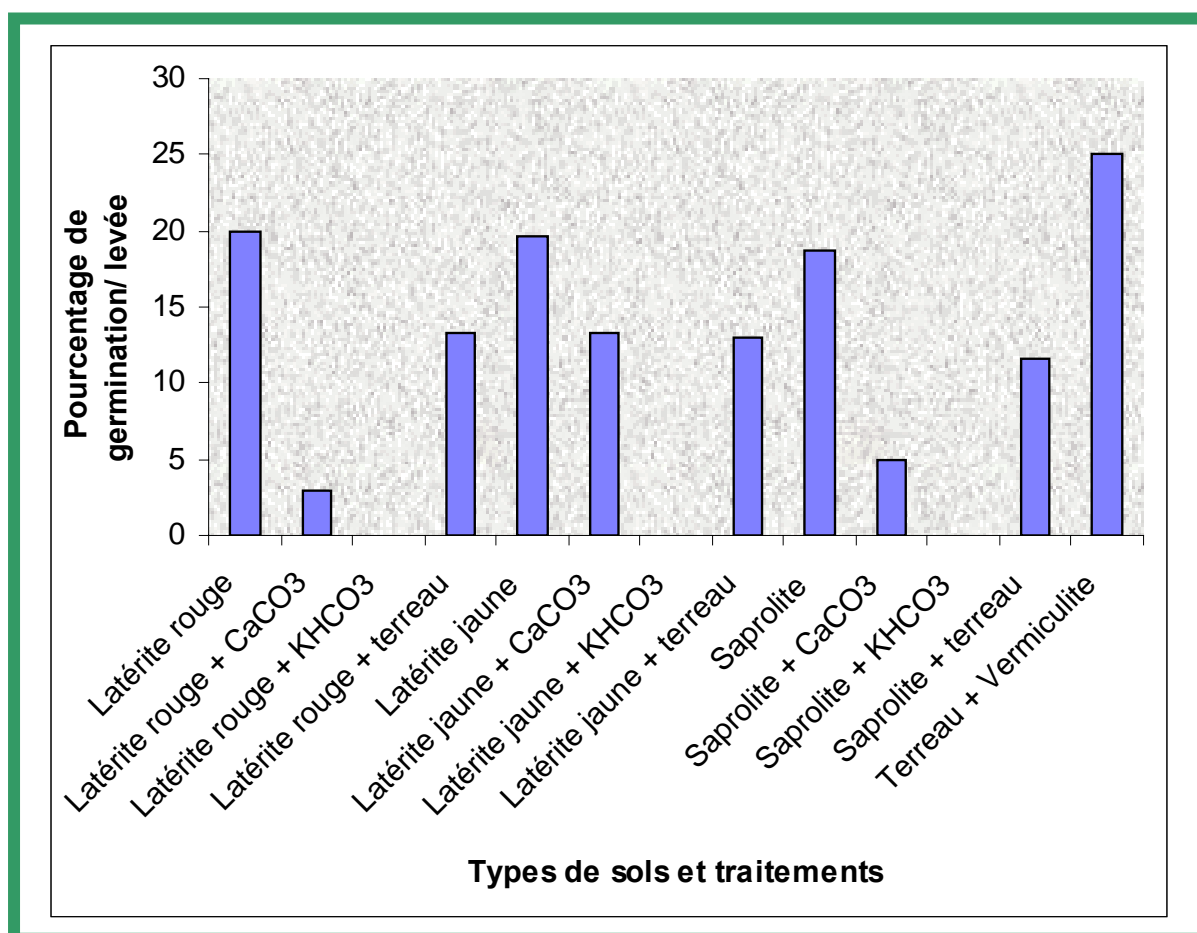


Figure 103: Histogramme des pourcentages de germination/levée en fonction des différents types de sols et de traitements.

B.3/ Croissance des plants

Le graphique représentant la croissance de tiges en fonction du temps pendant les trois premiers mois (Figure 104) montre quel que soit le sol considéré, des courbes à allure sigmoïde à deux phases mises en évidence par une zone d'inflexion.

- la première phase entre le 15^{ème} et le 21^{ème} jour correspondrait à une phase de croissance régulée par les organes de réserve de la semence
- le point d'inflexion compris entre le 21^{ème} et le 40^{ème} jour correspondrait à la « mise en service » des organes assimilateurs que sont les feuilles
- la seconde phase au delà du 40^{ème} jour correspondrait à la phase de croissance régulée par les organes assimilateurs. Cette phase de croissance étant irrégulière, elle pourrait correspondre au début de la phase de décélération pouvant avoir pour cause principale l'assimilation par la plante de substances nutritives externes contenues dans le sol. Cette phase refléterait donc principalement l'effet du sol sur la croissance.

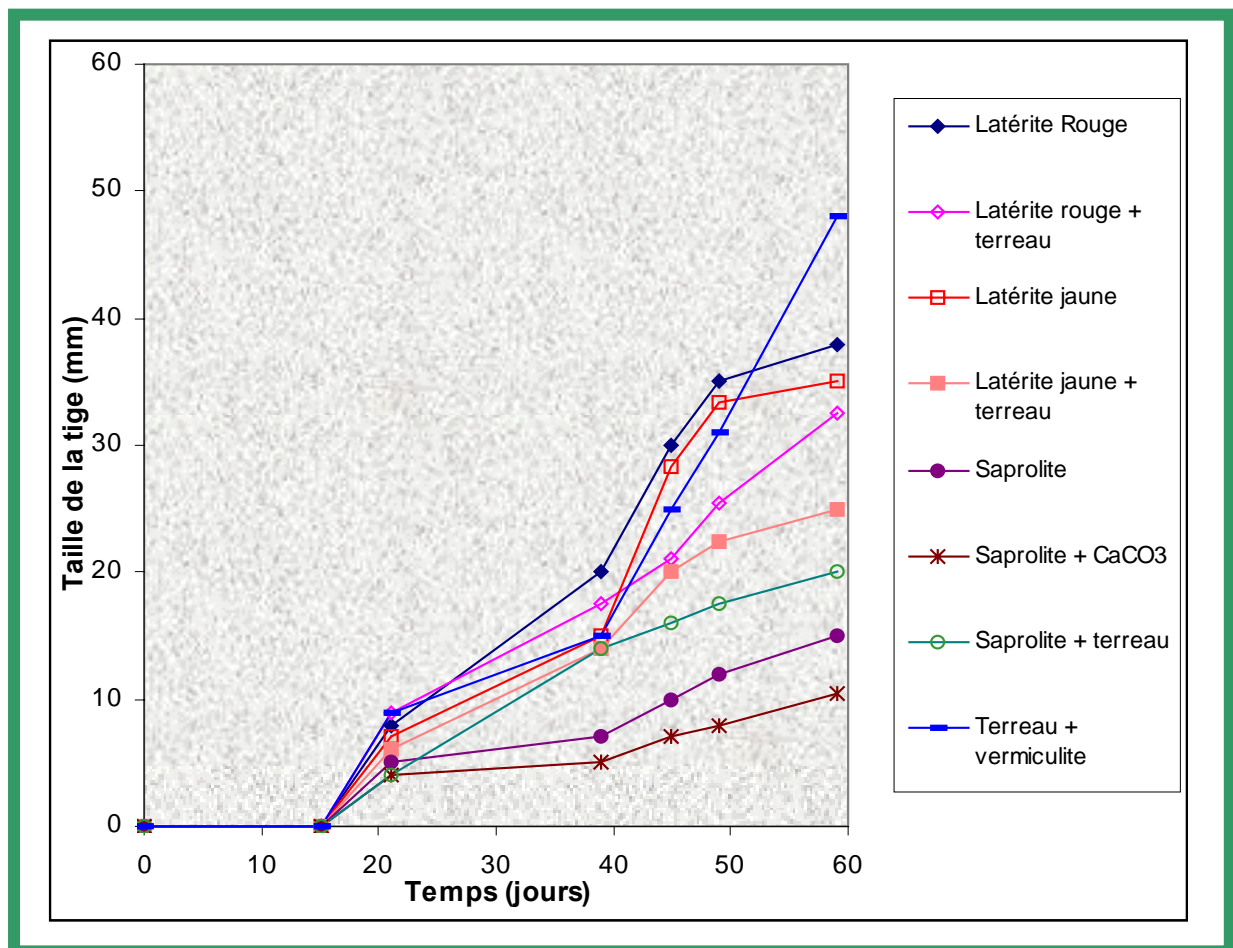


Figure 104 : Courbes de croissance des tiges de *Geissos pruinoso* en fonction du temps pendant les trois premiers mois.

Afin de mieux appréhender l'effet des différents types de sols et de traitements, le suivi de croissance a été effectué jusqu'au 240^{ème} jour soit 8 mois (Figure 105).

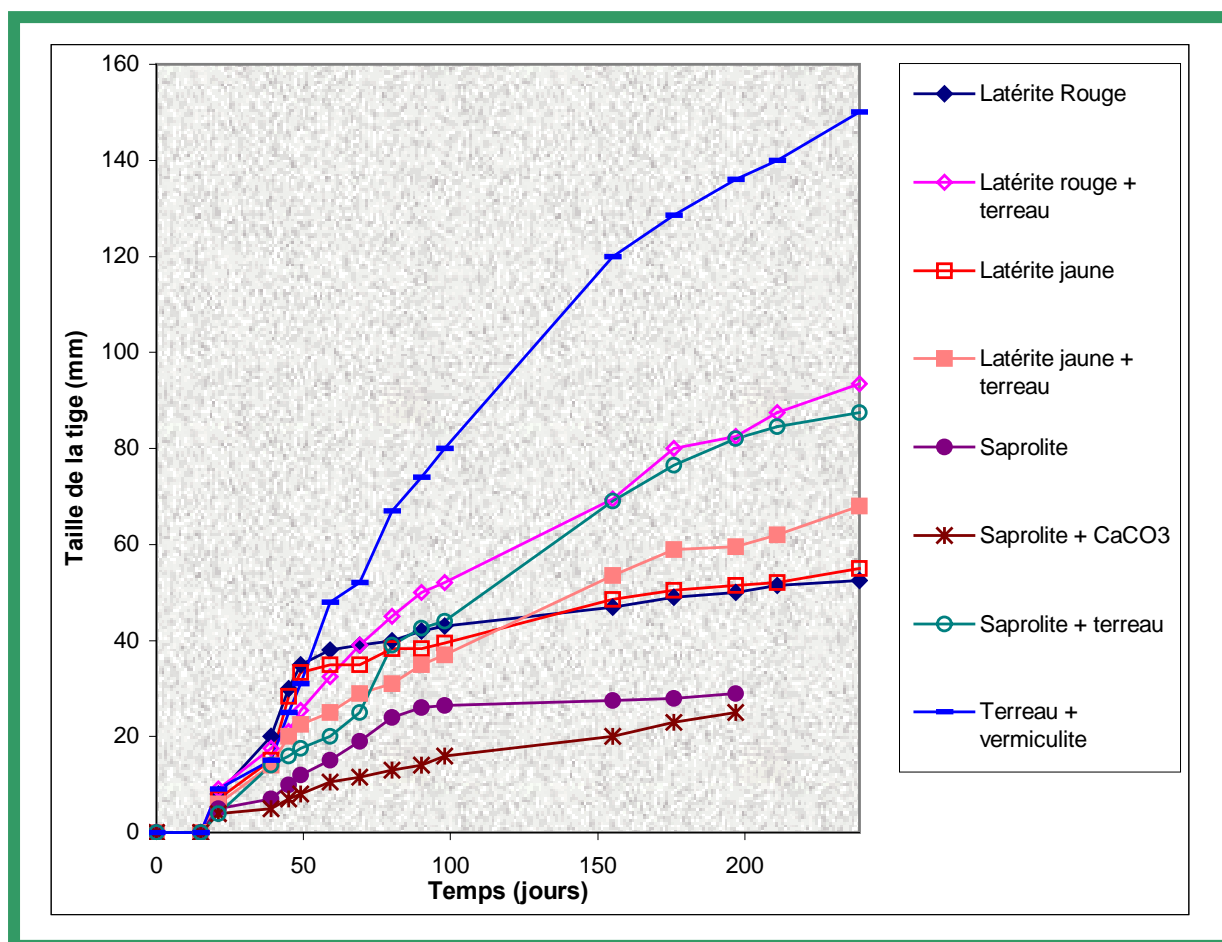


Figure 105 : Courbes de croissance des tiges de *Geissois pruinoso* en fonction du temps pendant 8 mois de culture.

Les sols additionnés de carbonate de calcium ne sont pas très favorables au développement de la plante puisqu'après 1 mois pour les sols latéritiques et 6 mois pour le sol saprolitique, celle-ci périclite. La difficulté rencontrée semble être la compaction du sol qui empêche le développement d'un système racinaire indispensable à la croissance du végétal.

La saprolite seule peut faire l'objet de la même remarque et il est aisé de constater que la présence du terreau en supplément favorise l'enracinement en allégeant la terre et en apportant sans aucun doute des éléments indispensables à un bon développement. Ainsi, après 6 mois, la taille des tiges sur saprolite additionnée de terreau est double par rapport à celle des plants poussant sur saprolite seule. Plus encore, ces derniers finissent par mourir.

Nous pouvons remarquer que d'une manière générale, quel que soit le sol considéré, l'apport de terreau permet une croissance plus importante que sur les sols seuls. Les deux facteurs à l'origine de ce fait semblent être une meilleure aération du sol et un apport essentiel en éléments nutritifs.

La latérite rouge la plus proche du sol de surface apparaît comme la plus favorable dans le cadre d'une revégétalisation des sites miniers dégradés. En effet, prise seule elle permet tout autant que la latérite jaune un développement moyen de l'individu mais plus encore l'addition de terreau y permet une plus forte exaltation de la croissance. Cependant, quel que soit le sol considéré, la pousse de l'espèce *Geissois pruinosa* y est très lente car après 8 mois d'expérimentation, les plants atteignent en moyenne 8 cm. Il semble donc que cette espèce ne soit pas la candidate idéale pour une revégétalisation qui se veut rapide, le plus souvent assurée par des Cypéracées. Cependant, elle pourra être utilisée comme colonisatrice de deuxième rang.

Au contraire, cette espèce des maquis ultrabasiques accepte sans trop de difficultés, un sol plus classique et y connaît une croissance aisée deux fois plus importante que sur les sols dont elle est originaire. Elle apparaît donc idéale dans le cadre d'une valorisation horticole soutenue par un aspect visuel attrayant avec de grandes feuilles palmées et des inflorescences d'un rouge intense. L'étude de l'impact du nickel sur la croissance de cette espèce développée dans les prochains paragraphes a permis de suivre l'évolution des plants sur ce même mélange terreau/vermiculite par observation du témoin. Après 15 mois, ils mesuraient en moyenne 82 cm, taille plus que raisonnable dans le cas d'une vente commerciale.

III/ Effet du nickel sur la croissance de *Geissois pruinosa* et *Cunonia macrophylla*

Cette étude s'est voulue ponctuelle et avait pour but de déterminer de manière globale l'effet d'une addition de nickel (NiCl_2) dans le milieu de croissance des espèces *Geissois pruinosa* et *Cunonia macrophylla*. Elle est le point de départ d'expérimentations plus approfondies menées par Virgine Léon dans le cadre d'un travail de thèse débuté au sein du L.B.P.V.A. en 2001 dont le thème est l'étude physiologique de plusieurs espèces végétales de maquis minier de Nouvelle-Calédonie.

A/ Matériel et méthodes

Quelle que soit l'espèce considérée, les plants utilisés pour cette expérimentation sont âgés de 9 mois. Les conditions de leur obtention sont celles exposées précédemment pour *Geissois pruinosa* sur un sol composé d'un volume égal de terreau et vermiculite (cf. I).

Au 9^{ème} mois ces plants sont repiqués dans des contenants de taille plus grande. *Cunonia macrophylla* est placée dans des pots ronds de diamètre 15 cm et *Geissois pruinosa* dans des sacs plastiques noirs de diamètre 20 cm. Dans chaque cas la capacité de rétention du sol est mesurée. Le volume calculé est fixé comme volume d'arrosage hebdomadaire des plants. Celui-ci est réalisé une fois par semaine et une brumisation de 5 minutes trois jours plus tard est assurée pour éviter un dessèchement (Figure 106A).

Six concentrations sont testées: 5, 10, 50, 100, 500 et 1000 ppm de nickel et pour chacune 3 répétitions sont réalisées. Un témoin sans nickel (eau seule) est également testé.

Une mesure de la taille des tiges au début de l'expérience et après 6 mois d'arrosage est effectuée.

B/ Résultats et discussion

La réponse des deux espèces à un arrosage à concentrations croissantes de nickel est différente. En effet, la croissance de *Geissois pruinosa* est accélérée par la présence de nickel avec un optimum pour 50 ppm de nickel (Figure 107A). Elle est proportionnelle à la concentration pour des valeurs inférieures à 50 ppm et inversement proportionnelle pour des valeurs comprises entre 50 et 1000ppm. Cependant, elle reste supérieure à celle du témoin, excepté pour 1000 ppm qui en reste cependant très proche. A cette concentration des observations visuelles ont permis de constater une nécrose des jeunes feuilles après 2 mois de culture caractérisée dans un premier temps par un rougissement puis une nécrose progressive de l'extérieur du limbe vers le centre (Figure 106B). Après 4 mois de traitement, la plante reprend le dessus et donne de nouveau de jeunes feuilles qui résistent pendant des périodes plus ou moins longues. Seules les vieilles feuilles persistent en présentant cependant une coloration rouge sur leur bordure dont la surface est proportionnelle au stade de la feuille.



Figure 106 : Impact du nickel sur la croissance de *Geissois pruinosa*. A : expérimentation en serre avec de gauche à droite les témoins suivis des concentrations croissantes de nickel (5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppm). B : plant de *G. pruinosa* après 3 mois d'arrosage avec une solution de 1000 ppm.

L'espèce *Cunonia macrophylla* donne un résultat inverse avec un ralentissement de la croissance quelle que soit la concentration considérée. Elle est proportionnelle à la teneur en nickel pour des valeurs inférieures ou égales à 100 ppm et inversement proportionnelle pour des valeurs supérieures, tout en étant toujours plus faible que le témoin (Figure 107B). Pour 1000 ppm de nickel, après 6 mois de traitement, deux des plants sont quasiment nécrosés et les feuilles qui persistent présentent toutes un aspect brûlé.

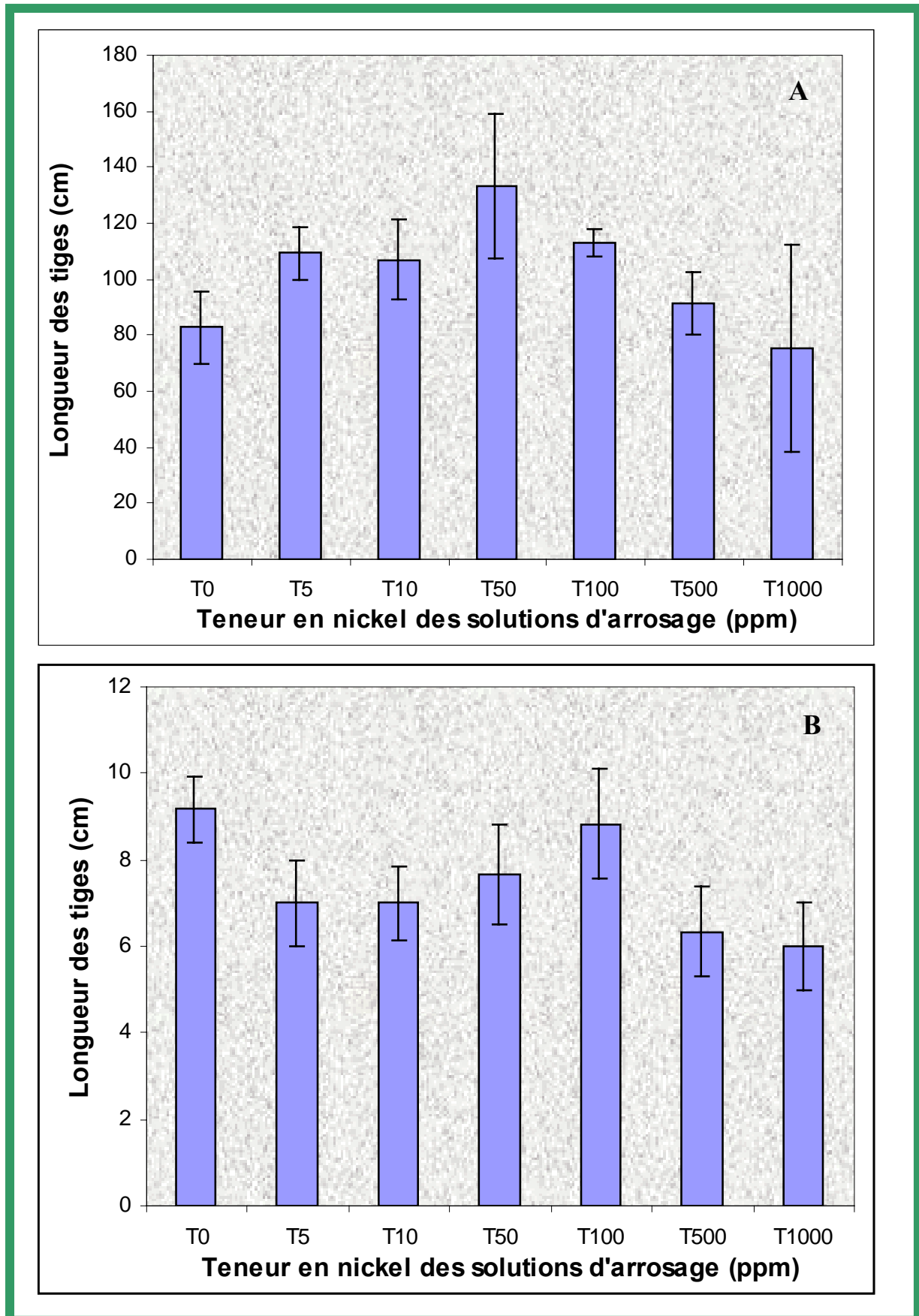


Figure 107 : Histogrammes de l'effet d'un arrosage à concentrations croissantes de nickel sur la croissance de *Geissois pruinosa* (A) et de *Cunonia macrophylla* (B)

Ces résultats permettent par recoupement avec ceux obtenus au cours de l'étude sur la germination de confirmer les propriétés particulières qu'a l'espèce *Geissois pruinoso*. En effet, en plus du fait que la présence de nickel favorise, pour des concentrations de 10 et 100 ppm la germination de ses semences, sa croissance y est elle aussi sensible puisque accélérée. A ce stade de développement, cette espèce hyper-accumulatrice semble avoir tourné à son avantage la présence dans son milieu naturel d'un élément considéré comme toxique pour des plantes plus classiques. Tout comme pour la germination des concentrations plus importantes proches de 1000 ppm sont défavorables mais ne conduisent pas pour autant à la mort de l'individu, elles ne font que freiner les processus.

Au contraire, il semble que ces milieux ne soient pas si favorables à l'espèce *Cunonia macrophylla* qui cependant connaît un développement quasi identique à celui du témoin pour une concentration de 100 ppm. Ces résultats sont là encore transposables à la germination qui se trouve défavorisée par une présence de nickel pour des concentrations de 10 et 100 ppm voire quasiment inhibée pour 1000 ppm.

Il est clair que les stratégies adaptatives mises en place par ces deux espèces pour croître sur les milieux extrêmes que sont les sols de maquis miniers sont différentes et qu'elles méritent d'être étudiées de manière approfondie. D'autres aspects restent à élucider, en particulier la quantité de nickel accumulée par la plante, sous quelle forme et à quel niveau (feuilles, racines). Les réponses à ces questions devraient être apportées dans le cadre du travail de Virginie Léon qui après ces 6 mois de traitement a sacrifié les différents plants et récupéré les sols afin d'en faire une analyse minérale.

III/ Suivi morphologique de *Geissois pruinoso* et *Cunonia macrophylla*

Cette étude a été décidée suite à des observations effectuées au cours des deux expériences précédentes qui ont montré des différences morphologiques importantes au cours du temps de nos deux espèces de Cunoniaceae. Les résultats obtenus sont d'un grand intérêt botanique puisque leur description dans ce domaine est essentiellement réalisée à partir d'un pied adulte capable de fournir une inflorescence. Il est difficile de trouver des références bibliographiques associant une description botanique et morphologique d'une espèce au cours du temps de la graine à l'état adulte. Cet état de fait rend difficile la reconnaissance et la récolte sur le terrain de jeunes pieds.

A/ Matériel et méthodes

A.1/ Récolte et stockage des graines

Les graines exploitées sont les mêmes que celles employées pour les expériences de germination (cf. Partie IV chapitre 1).

A.2/ Conditions standards de germination

L'observation des premiers stades suivant la germination jusqu'au 1^{er} niveau de feuilles est réalisée en boîte de Pétri dans lesquelles sont mises à germer les graines selon le protocole établi dans le chapitre IV chapitre 1. La quantité d'eau est de 12 mL et la température de 25°C.

A.3/ Conditions standards sélectionnées pour le développement de la plantule

Pour les stades suivants, les ensemencements sont réalisés sur des pots de 7x7x7 cm préalablement remplis du mélange terreau-vermiculite (1/1) saturé en eau. Les graines sont triées d'après leur aspect fertile (cf partie IV chapitre 1) et stérilisées à l'eau de Javel à 5% (pure à 48°chloré) pendant 5 minutes suivie de deux rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite disposées sur les pots à raison de 5 par pot et ceci pour une vingtaine de pots. Chaque pot est recouvert d'un film transparent pour diminuer l'évaporation et placé à une température de 25°C, déterminée comme proche de la température optimale de germination (cf partie IV chapitre 1), en bâti de culture sous lampes néons (12 heures d'éclairage). L'arrosage est réalisé par capillarité par le fond du pot pendant le premier mois.

Après 15 jours pour *G. pruinosa* et 30 jours pour *C. macrophylla*, le film transparent est ôté et les pots sont transférés en serre où l'arrosage se fait par brumisation à raison de 2 arrosages de 3 minutes journalier (1 matin et 1 le soir). Un repiquage régulier, en fonction de chaque espèce, est effectué dans des conteneurs de taille croissante, des pots ronds de diamètre 15 cm et hauteur 12 cm (à 3 mois pour *Geissois pruinosa* et à 9 mois pour *Cunonia macrophylla*) suivi de sacs en plastique noirs de diamètre 20 cm et de hauteur 20 cm (à 9 et 18 mois respectivement).

A.4/ Relevés et dessins effectués

A différents stades de l'évolution de la graine puis de la plantule, trois d'entre-elles sont sacrifiées, mesurées, photographiées, observées, décrites puis dessinées.

B/ Résultats et Discussion

B.1/ Description de l'état adulte

L'observation de l'évolution morphologique de ces deux espèces de Cunoniaceae depuis la graine à l'état adulte nous montre qu'elle passe par de nombreux stades. Il nous paraît essentiel avant de décrire ces différentes étapes de rappeler la morphologie de ces deux espèces déjà établie par leur descripteur ou par nous même et de l'illustrer.

B.1.1/ *Geissois pruinosa*

Guillaumin (1948) la décrit comme une espèce à feuilles composées palmées. Les « folioles normalement 6, glauques en dessous » à inflorescence en grappe.

La collecte que nous avons effectuée est décrite comme :

« Arbre de 3 à 6 mètres. Feuilles opposées, composées palmées, à 5 folioles, pétiole net de 4-5 cm. Folioles pétiolulées de 6-7 x 3-5 cm, à marge entière, à pétiolule de 4 cm. Stipule velue de 0.5 cm. Inflorescence en grappe de couleur rouge de 10-15 cm, cauliflore. Fleurs pédicellées (0.5-1 cm), à 4 sépales, pas de pétales, 10 étamines, à ovaire garni de poils épars à style à deux branches. Fruits verts à l'état jeune puis rouges et enfin bruns à maturité. »

B.1.2/ *Cunonia macrophylla*

Hoogland *et al.* (1997), décrit *Cunonia macrophylla* comme étant une espèce à « feuilles grandes, généralement pennées, quelquefois trifoliolées ou rarement simples (unifoliolées), à pétiole long de 3 cm ou plus et à folioles coriaces pétiolulées de plus de 6 x 2 cm. La stipule est glabre ou presque en dessous. Les inflorescences sont en pseudo-grappes, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Les fleurs de grandes tailles pour le genre sont de couleur verte. Le pistil et la valve du fruit sont glabres. »

La collecte que nous avons effectuée est décrite comme :

« Arbre de 3 à 4 mètres le plus souvent monocaule. Feuilles opposées, composées pennées à 2-3 paires de folioles latérales et une foliole terminale, parfois trifoliolées, à pétiole net long de 3-5 cm. Folioles coriaces légèrement dentelées, de 5-15 x 2-6 cm, pétiolulées. Stipule cordiforme de 1-3 cm, glabre sur la face inférieure. Inflorescence en pseudo-grappes, en paires opposées sur des branches portant aussi des feuilles en paires opposées. Rachis de la partie florifère plus long que le pédoncule. Fleurs de couleur verte à jaune, grandes pour le genre (5 sépales, 5 pétales, 10 étamines, ovaire supère, style à deux branches). Fruits déhiscents de couleur verte à l'état jeune virant au brun. Valve du fruit glabre. »

B.2/ *Description morphologique au cours du temps*

Quelle que soit l'espèce considérée, la description botanique de l'état adulte nous révèle la présence de feuilles composées. Or l'observation de l'évolution morphologique de ces deux espèces montre le passage par différents stades intermédiaires allant de feuilles simples à des feuilles composées. De la même façon, des caractères tels que la présence de poils ont été détectés à l'état juvénile avant de disparaître au cours du temps. Les données obtenues dans cette étude l'ont été dans des conditions standards pré-établies permettant un développement plus rapide des deux espèces.

B.2.1/ *Geissois pruinosa*

B.2.1.1/ De la graine à la plantule (Figure 108)

Les semences fertiles de *Geissois pruinosa* sont caractérisées par la présence d'un embryon ovale bombé de 1.5-2x 2.5-3 mm de couleur brun-foncé, entouré d'un tégument ailé de 2.5-3x 6-7 mm de couleur brune claire.

La germination, caractérisée par la percée de la radicule sur une longueur de 1 mm (Aissa, 1981) obtenue dans nos conditions standards commence dès le 9^{ème} jour après le semis. Après 12 jours, on distingue clairement la radicule longue de 2 mm et le début de la tige fortement poilue longue de 2 mm. C'est au 15^{ème} jour qu'a lieu l'expulsion de la partie tégumentaire permettant ainsi aux cotylédons de s'épanouir. La radicule mesure alors 3 mm, la tige 3.5 mm, et les cotylédons 1-1.5 x 2.5-3 mm. Aucune stipule n'est réellement visible à ce stade. Les cotylédons apparaissent glabres.

L'apparition des deux premières feuilles est effective après 1 mois. La longueur de la tige est en moyenne de 1.1 cm. Les feuilles sont simples ovales à elliptiques, le limbe est denté. De nombreux poils éparses recouvrent la partie supérieure et inférieure du limbe. Les feuilles mesurent 0.4-0.5 x 0.7-0.9 cm.

B.2.1.2/ De la plantule à l'état adulte (Figures 109 et 110)

La caractéristique de pilosité est encore visible sur les feuilles de 2^{ème} et 3^{ème} ordre au bout de trois mois de développement. Celles-ci mesurent 0.7-0.8 x 1.3-1.5 cm et 0.9-1.1 x 2.3-2.5 cm respectivement. Leur forme est elliptique et le pétiole est de plus en plus prononcé de 0.3 et 0.5 cm respectivement. Les stipules qui jouent le rôle de protecteur des nouvelles feuilles au nombre de quatre sont de plus en plus apparentes et mesurent de 0.2 à 0.3 cm. Elles sont velues et présentent une forme linéaire. La tige s'est allongée en moyenne de 3 cm.

Après 6 mois de culture, des feuilles de 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} ordre sont apparues, elles mesurent respectivement 1.3-1.5 x 2.5-2.8 cm, 1.5-1.8 x 4.5-5 cm et 2.5-3 x 7-7.5 cm avec des pétioles de 0.6-0.7 cm, 0.7-0.8 cm et 0.9-1 cm. La pilosité conserve les mêmes caractéristiques sur ces feuilles simples dentées. Les stipules protégeant les feuilles de 7^{ème} ordre se soudent pour ne former en définitive que deux stipules velues de forme plus elliptique. Les plants mesurent en moyenne 8.5 cm de haut et les feuilles les plus anciennes ont tendance à être caduques.

Pendant ces 6 premiers mois, le système racinaire s'est développé de pair avec la partie aérienne à la fois en longueur et en densité. Au delà du 6^{ème} mois, seule la partie aérienne a été mesurée et décrite.

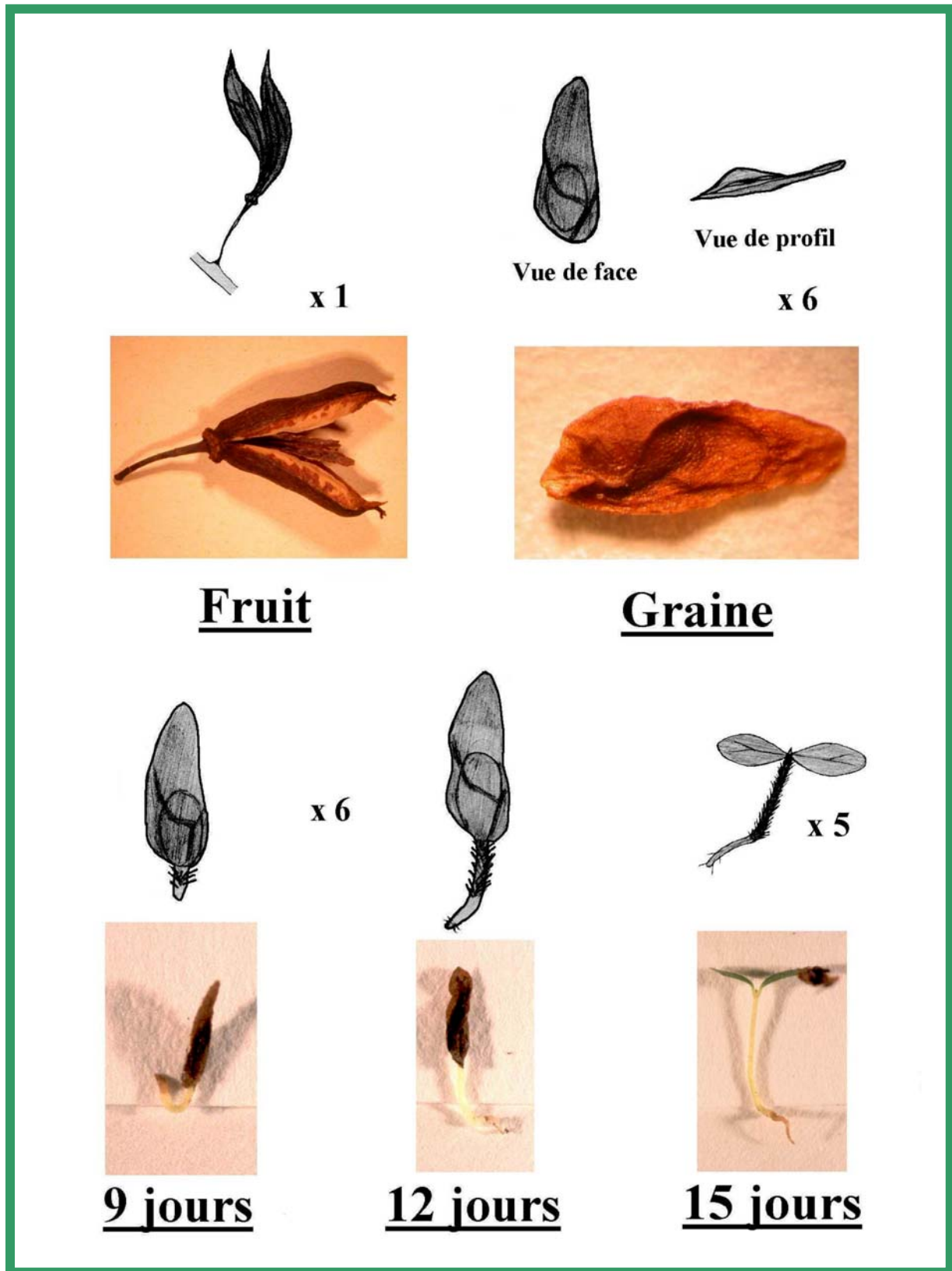


Figure 108 : Dessins et photos des différents stades de développement de *Geissois pruinoso* de la graine à la plantule.

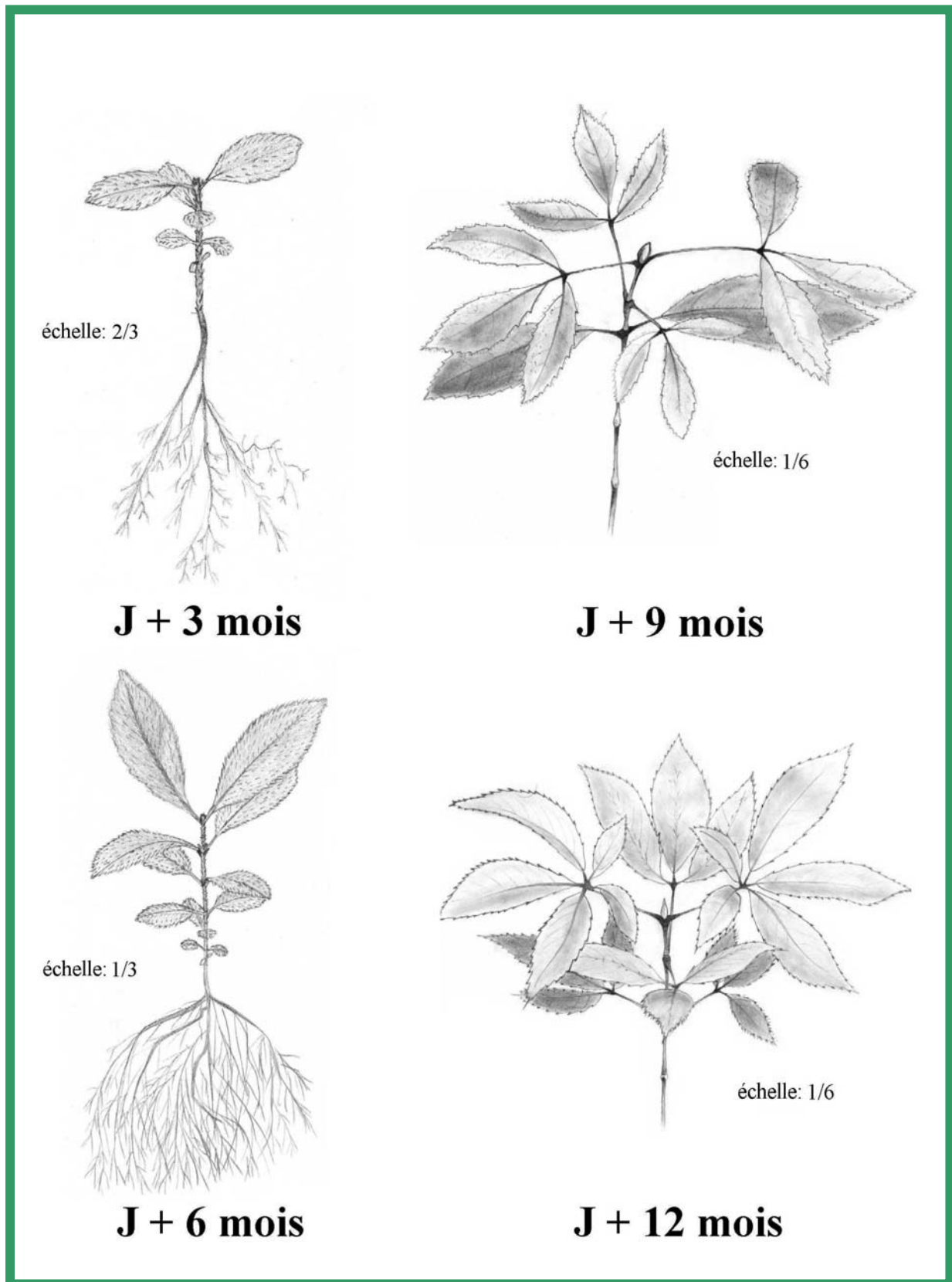


Figure 109 : Dessins des différents stades de développement de *Geissos pruinosa* du 3^{ème} au 12^{ème} mois.



J + 3 mois



J + 9 mois



J + 6 mois



J + 12 mois

Figure 110 : Photos des différents stades de développement de *Geissois pruinosa* du 3^{ème} au 12^{ème} mois.

Au 9^{ème} mois, les plants observés montrent une différenciation importante puisque d'une manière générale, les feuilles de 8^{ème} ordre deviennent composées trifoliolées. Les folioles sont grandes de 4-4.5 x 11.5-12 cm et la pilosité devient de plus en plus éparse à chaque niveau de feuilles, les poils se localisant sur les bordures du limbe et le long de la nervure principale. Les folioles sont dentées et de forme elliptique tout comme les feuilles simples plus âgées. Les deux latérales présentent un limbe en coin à la base et semblent sessiles alors que la centrale est décurrente sur le pétiole. Les poils localisés sur la tige et la stipule se font plus rares. Cette dernière prend une forme elliptique de 0.3-0.4 x 0.9-1 cm. La tige atteint une longueur moyenne de 16 cm.

Après 12 mois, un nouveau degré est franchi puisque les feuilles de 11^{ème} ordre deviennent composées palmées à 5 folioles comme décrit pour le stade adulte, leur taille est importante de 4.8-7 x 16.5-19 cm, chacune ayant une taille variable. Les poils ont quasiment tous disparu tant sur le limbe que le long de la nervure, ainsi que sur la tige. Seule la stipule conserve une pilosité éparse. Les feuilles de 12^{ème} ordre sont totalement glabres. On peut estimer que la plante a atteint à ce stade sa forme adulte. Il ne lui manque plus que la capacité à fleurir et à se reproduire. Les plants mesurent à ce stade en moyenne 50 cm de haut.

Cela fait maintenant 2 ans que ces plantes sont suivies, plus aucun caractère n'a évolué, et chacune a connu une croissance normale. Certaines ont été taillées afin d'en observer l'impact sur la ramification. Nous avons pu constater que les bourgeons débouffés juste au dessous du niveau de la coupe et que les premières feuilles obtenues étaient des feuilles simples puis trifoliolées et enfin pentafoliolées. Nous avons voulu vérifier ce fait sur un pied adulte sur le terrain et le résultat obtenu a été identique. La plante conserve donc la potentialité de développer des feuilles simples.

L'espèce *Geissois pruinoso* ayant été étudiée sur des sols de maquis miniers, il nous paraît intéressant de croiser les résultats obtenus pour montrer combien leur développement sur le milieu naturel est lent. En effet, un plant dont la croissance est réalisée sur un sol de type latérite rouge, le plus proche du sol de surface ne mesure après 12 mois que 5 cm contre 50 cm sur le terreau et son stade d'évolution n'atteint que les feuilles de 4^{ème} ordre. Plus encore, la comparaison morphologique de l'individu adulte sur lequel ont été prélevées les semences, avec celui considéré comme adulte sur terreau-vermiculite montre de nombreuses variations reflétant sans aucun doute l'impact du milieu de développement. En effet, globalement la taille des folioles ou de la stipule est toujours plus petite chez l'individu du terrain, leur consistance est également opposée puisque les feuilles du plant en serre sont souples alors que celles du terrain sont coriaces. On peut estimer que les conditions particulières rencontrées par le végétal sur maquis minier, forte température, faible humidité, sont à l'origine de ces différences. La plante doit réduire au maximum la surface de chaque feuille et constituer une cuticule épaisse afin d'éviter une trop grande perte en eau, ce qui n'est pas le cas de nos plants qui se sont développés dans des conditions d'arrosage plus idéales à humidité constante. Il est bien admis que la morphogenèse est le résultat des interactions complexes entre la potentialité génétique et le milieu où se développe l'espèce. Nos observations constituent une preuve supplémentaire.

B.2.2/ *Cunonia macrophylla*

B.2.2.1/ De la graine à la plantule (Figure 111)

Les semences fertiles de *Cunonia macrophylla* sont caractérisées par la présence d'un embryon ovale bombé de 1-1.2 x 2-2.5 mm de couleur brun noir, entouré d'un tégument faiblement ailé de 1.5-2 x 4-4.5 mm de couleur brun foncé.

La germination débute au 14^{ème} jour après le semis. Après 20 jours, on distingue la racicule longue de 2 mm et le début de la tige avec des poils apprimés longue de 5 mm. C'est au 25^{ème} jour qu'a lieu l'expulsion de la partie tégumentaire permettant ainsi aux cotylédons de s'épanouir. La racicule mesure alors 4 mm, la tige 7.5 mm, et les cotylédons 0.8-1 x 1.8-2 mm. Aucune stipule n'est réellement visible à ce stade. Les cotylédons apparaissent glabres.

L'apparition des deux 1^{ère} feuilles est effective après un mois et demi. La longueur de la tige est en moyenne de 1.25 cm. Les feuilles sont simples elliptiques, le limbe est denté dans les deux tiers supérieurs et décurrent à la base. Des poils éparses sont localisés sur sa bordure externe et le long de la nervure principale. Le pétiole n'est pas très net. Les feuilles mesurent 0.2-0.3 x 0.5-0.6 cm.

B.2.2.2/ De la plantule à l'état adulte (Figures 112 et 113)

Après 3 mois de développement, nous sommes en présence des feuilles de 2^{ème} et 3^{ème} ordre. Celles-ci mesurent 0.4-0.5 x 1-1.1 cm et 0.6-0.7 x 1.5-1.6 cm respectivement. Leur forme est elliptique et le pétiole est de plus en plus prononcé. Cependant le limbe est toujours très décurrent à la base, son aspect denté est de plus en plus visible, les dents étant larges et espacées. Sa pilosité reste la même. Les stipules apparentes dès les premières feuilles sont au nombre de deux et mesurent de 0.15 à 0.25 cm. Elles sont velues et présentent une forme linéaire. La tige s'est allongée en moyenne de 2.8 cm.

Au bout de 6 mois de culture, des feuilles de 4^{ème} et 5^{ème} ordre se sont développées, elles mesurent respectivement 1.2-1.3 x 2.5-2.6 cm, 1.5-1.8 x 4-4.2 cm avec des pétioles plus légèrement apparents de 0.2-0.3 cm. La pilosité conserve les mêmes caractéristiques. Les feuilles changent et s'orientent vers une forme plus ovale, le réseau de nervure secondaire devient plus visible. Les stipules quant à elles prennent une forme plus elliptique et mesurent 0.2-0.3 x 0.6-0.7 mm. Les plants mesurent en moyenne 5.5 cm de haut et les feuilles les plus anciennes ont tendance à devenir caduques.

Au 9^{ème} mois, les plants observés sont composés de feuilles de 6^{ème} et 7^{ème} ordre toujours simples dont la tendance vers l'ovale se confirme. Elles mesurent 2.5-3 x 5-5.5 cm et la pilosité y est de moins en moins importante. Le limbe est denté sur une plus grande distance. Les poils localisés sur la tige et la stipule se font plus rares. La tige atteint une longueur moyenne de 8 cm. Les cotylédons ainsi que les feuilles de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} ordre sont totalement nécrosés alors que celles de 4^{ème} et 5^{ème} ordre connaissent un début de nécrose.

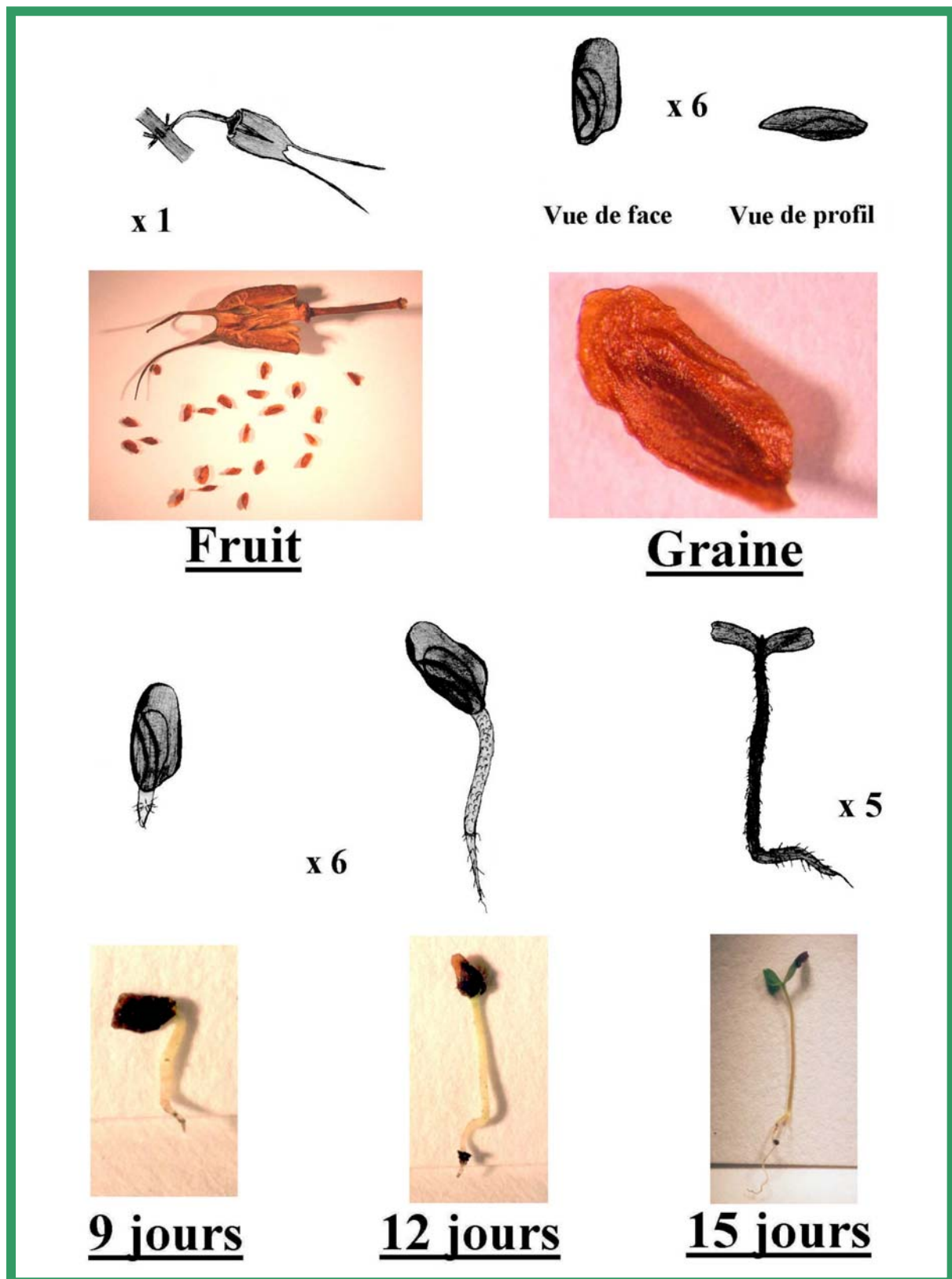


Figure 111: Dessins et photos des différents stades de développement de *Cunonia macrophylla* de la graine à la plantule.

Pendant ces 9 premiers mois, le système racinaire s'est développé de pair avec la partie aérienne à la fois en longueur et en densité. Au delà du 9^{ème} mois, seule la partie aérienne a été mesurée et décrite.

Après 12 mois, nous ne constatons que très peu d'évolution si ce n'est la confirmation du caractère caduque des feuilles puisqu'on ne retrouve pour chaque plant que deux ou trois niveaux de feuilles. Celles de 8^{ème} et 9^{ème} ordre bien développées sont ovales et mesurent 4-4.5 x 8-8.5 cm. Leur limbe est denté très largement et est décurrent à la base sur un pétiole plus apparent de 0.8 à 1.5 cm selon le niveau. La stipule glabre sur la face inférieure tend également vers une forme ovale et mesure 1-1.2 x 1-1.2 cm. La croissance de la tige connaît un ralentissement et atteint une longueur de 10 cm en moyenne.

Ce n'est qu'au bout de 18 mois qu'une différenciation notable apparaît à savoir l'apparition de feuilles trifoliolées de 11^{ème} ordre. Celles-ci sont caractérisées par un pétiole net de 1.8-2 cm. Les folioles sont sessiles, les deux latérales (2-2.5 x 4-4.5 cm) présentant un limbe en coin à la base et la terminale (3.5-4 x 6-6.5 cm) un limbe décurrent. Dans les deux cas, il apparaît légèrement denté et il est plus large dans la partie supérieure. La stipule prend un aspect cordiforme et mesure 1-1.2 x 1-1.2 cm. Cette observation très récente ne date que de ce dernier mois et le suivi du développement de cette espèce jusqu'au stade adulte reste à poursuivre.

C/ Comparaison des deux espèces

Il apparaît nettement que la croissance de *Cunonia macrophylla* est beaucoup plus lente que celle de *Geissois pruinosa*. Dans l'état actuel de nos recherches, nous ne pouvons affirmer que le sol utilisé soit le seul responsable de cette différence. Des expériences complémentaires de croissance sur d'autres types de substrats sont en cours, en particulier sur le sol de surface et sur les sols latéritiques et saprolitiques utilisés pour *Geissois pruinosa*.

En ce qui concerne la morphologie évolutive de ces deux espèces appartenant à deux genres différents de nombreuses analogies sont observées. En particulier, le passage d'une forme de jeunesse où les feuilles sont simples et velues à une forme adulte avec des feuilles composées palmées ou pennées, glabres dans les deux cas. Il semblerait intéressant d'étudier le même phénomène pour des espèces du même genre dont les formes adultes sont poilues et/ou à feuilles simples. La poursuite d'un tel travail passe également par l'étude d'espèces des trois autres genres, en particulier les deux genres endémiques *Codia* et *Pancheria*.

L'observation des stipules montre des différences plus importantes, en effet chez *Geissois pruinosa*, elles sont au nombre de quatre dès le départ et finissent par se souder pour n'en donner que deux, forme sous laquelle elles sont dès les premiers stades chez *Cunonia macrophylla*. Leur pilosité est inverse car conservée à l'état adulte pour *Geissois pruinosa*. Leur disposition alterne par rapport aux nouvelles feuilles est semblable chez les deux espèces.

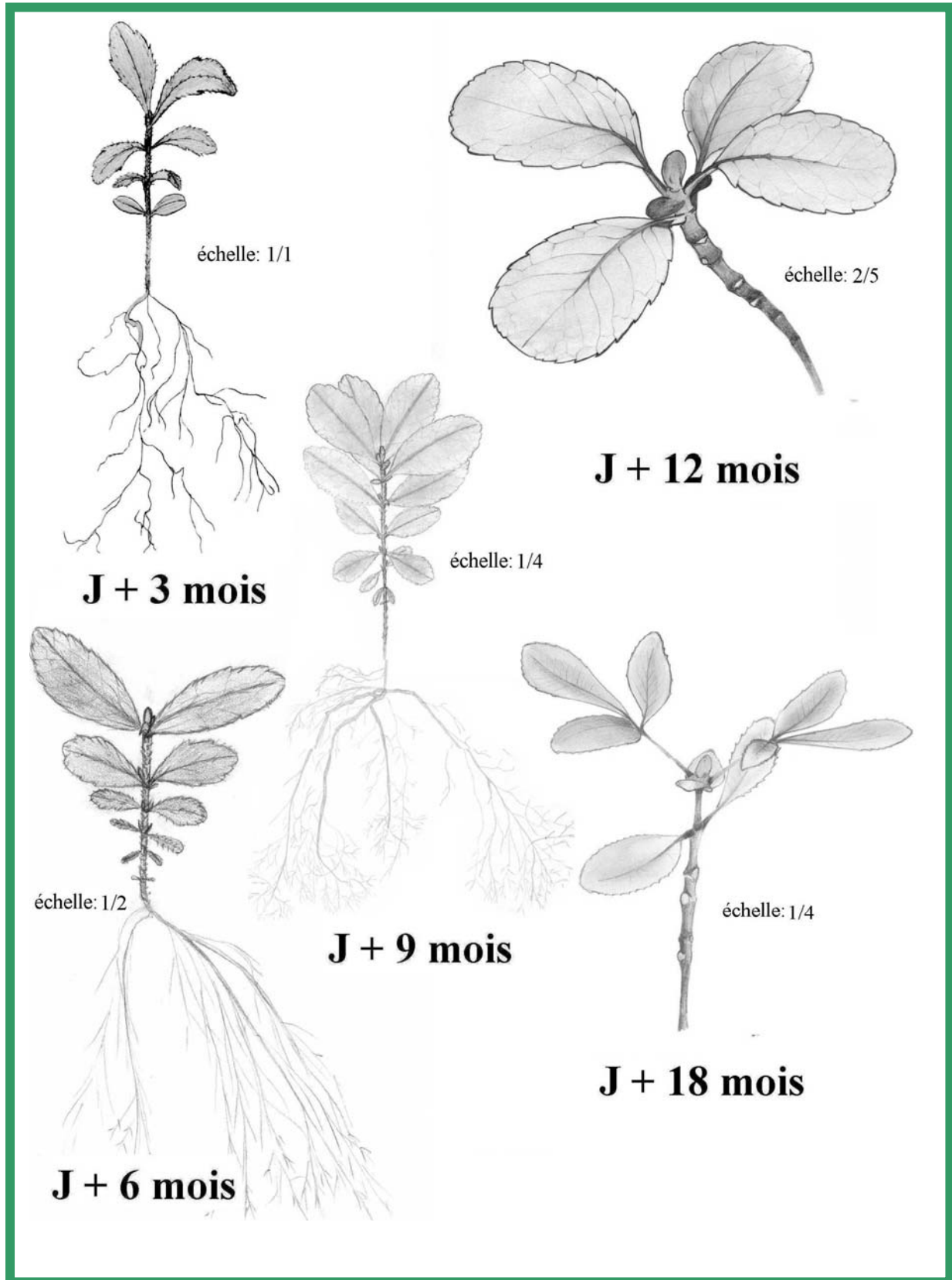


Figure 112 : Dessins des différents stades de développement de *Cunonia macrophylla* du 3^{ème} au 18^{ème} mois.



J + 3 mois



J + 12 mois



J + 6 mois



J + 18 mois



J + 9 mois

Figure 113 : Photos des différents stades de développement de *Cunonia macrophylla* du 3^{ème} au 12^{ème} mois.



Chutes de la Madeleine (Grand Sud, 2001)

CONCLUSION GENERALE

Ce travail original par l'étendue des domaines de recherche impliqués se voulait une contribution à la connaissance de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie. Il visait à évaluer les potentialités bioactives du plus grand nombre d'espèces afin de les sélectionner pour une étude chimique approfondie. En parallèle et dans l'optique de leur valorisation, les voies et moyens de multiplier ces espèces ont été abordés permettant en particulier de mieux appréhender certains aspects de la physiologie de ces plantes.

Ces différents buts ont été largement atteints puisque nous avons pu collecter, herboriser, décrire et identifier 50 espèces de cette famille, sur 91 répertoriées, appartenant aux six genres connus en Nouvelle-Calédonie. Plus encore, une espèce de *Weinmannia*, *W. parviflora* a pu être prélevée à Tahiti en Polynésie Française. En Nouvelle-Calédonie, les différents lieux de récolte sur toute la Grande Terre ont permis de confirmer voire d'étendre les zones de collecte déjà répertoriées. Nous avons ainsi pu conforter le fait que les espèces de cette famille se retrouvent sur de nombreux types de milieux comme les forêts denses humides, les zones marécageuses et surtout sur les maquis miniers à des altitudes basses ou moyennement élevées voire au-dessus de 1200 mètres. Certaines possèdent même une endémicité régionale caractérisée par une localisation restreinte. Nous avons pu repérer dans la zone de Port Boisé dans le Grand Sud calédonien une espèce nouvelle du genre *Codia* qui sera prochainement décrite et qui fera l'objet d'une publication.

Les travaux préliminaires chimiques et biologiques nous ont conforté dans l'idée que la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie était en possession d'un matériel moléculaire bioactif potentiellement riche. En effet, de très nombreuses activités biologiques ont pu être détectées. Des potentialités antimicrobiennes existent chez la plupart des espèces puisque 48 des 50 testées ont montré tant des activités antibiotiques qu'antifongiques. Six d'entre-elles en particulier pourraient faire l'objet d'étude chimique approfondie : *Cunonia macrophylla*, *C. vieillardii*, *Pancheria alaternoides*, *P. elegans*, *Acsmithia meridionalis* et *A. pedunculata*. En ce qui concerne les effets inhibiteurs des différents extraits préparés, 104 au total, 95% d'entre-eux sont inhibiteurs de la xanthine oxydase et/ou piègeurs de radicaux libres. Ainsi 5 espèces sont apparues comme de bonnes candidates à la purification de composés actifs sur la xanthine oxydase : *Codia incrassata*, *Cunonia linearisepala*, *Weinmannia dichotoma*, *W. monticola* et *Pancheria brunhesii*. Ces travaux ont fait l'objet de publications dont l'une est parue et la seconde est sous presse (Fogliani *et al.*, 2002a ; 2002b). Plusieurs des espèces étudiées montrent également une activité inhibitrice de l'élastase à un moindre degré. Enfin, des activités toxiques sur *Artemia salina* et cytotoxiques sur une souche de cellules cancéreuses Kb ont été mises à jour et sont plus qu'encourageantes.

Deux des espèces sélectionnées pour leur intérêt pharmacologique ou cosmétique ont fait l'objet d'une étude chimique plus ou moins approfondie. Celle-ci a permis en particulier chez *Cunonia macrophylla* de confirmer la présence en quantité non négligeable de polyphénols. Ce sont essentiellement des ellagitanins qui ont été reconnus comme responsables des capacités antimicrobiennes de cette espèce. Ainsi, après différentes étapes de purification sept tanins hydrolysables ont pu être caractérisés : la corilagine, l'acide mallotinique, la mallorépanine, l'acide chébulagique, l'acide gallique, l'acide ellagique et l'acide ellagique xylose. Dans le même temps, cinq flavonoïdes ont pu être isolés et caractérisés, ce sont des hétérosides flavonoïdiques tous dérivés de la quercétine, elle-même détectée : l'hypéroside, l'isoquercitroside, la quercétine-3-O- β -D-glucopyranosyl méthyle ester et l'acide quercétine-3-O- β -D-glucopyranose. Un travail tout aussi complexe n'a permis de caractériser, faute de temps, qu'une seule molécule active de flavonoïde, le catéchol pour l'espèce *Weinmannia dichotoma* retenue pour sa capacité à inhiber la xanthine oxydase. Toutes ces molécules sont d'ores et déjà connues et certaines d'entre-elles le sont également pour les activités biologiques étudiées. Cependant, de nombreux renseignements sont apportés par ces différents travaux. En effet, quelle que soit la molécule considérée, aucune n'avait été caractérisée chez l'espèce *Cunonia macrophylla* qui apparaît aujourd'hui comme l'une des Cunoniaceae la plus étudiée chimiquement suite à nos résultats. Leur caractérisation permettra sans aucun doute de tirer des enseignements quant au rapprochement de la famille des Cunoniaceae avec d'autres familles botaniques. Enfin, certaines des molécules isolées ont été identifiées pendant ces dix dernières années, en particulier l'acide ellagique xylose et la mallorépanine pour lesquelles peu d'activités biologiques sont connues. Nous avons pu prouver les capacités antimicrobiennes de l'acide ellagique xylose et soupçonnons une activité inhibitrice de la xanthine oxydase.

L'ensemble des recherches effectuées sur les potentialités de la famille n'aurait eu de sens si nous n'avions tenté de déterminer les voies et moyens de multiplier les espèces reconnues comme intéressantes pour leur valeur pharmaceutique ou cosmétique. C'est pourquoi nous avons en parallèle étudié les deux espèces *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.

Une étude de leurs semences respectives a permis de caractériser leur structure et de définir en conditions contrôlées de laboratoire, l'impact de différents facteurs abiotiques sur leur capacité germinative. Ainsi, la température optimale de germination a été déterminée comme comprise entre 27 et 28°C et entre 22 et 23°C pour *Geissois pruinosa* et *Cunonia macrophylla* respectivement, avec un apport en eau fixé à 12 mL. Par la suite, nous avons tenté par différents moyens d'optimiser cette germination en exposant les semences à différents prétraitements, par scarification, par le froid, par de l'eau chaude, par action de l'acide sulfurique ou encore par prégermination dans le polyéthylène glycol 6000. Il en ressort très clairement que la scarification mécanique apparaît comme le moyen le plus simple et le plus rapide pour améliorer considérablement le taux maximal de germination. Cependant de nombreux enseignements sur la physiologie des semences de ces deux espèces ont pu être tirés suite à toutes ces expérimentations en particulier lors de l'étude de l'effet de certains éléments du syndrome serpentinique caractérisant les sols miniers de Nouvelle-Calédonie (nickel, magnésium et calcium). Une publication réunissant l'ensemble de ces données est actuellement soumise.

La multiplication végétative de ces deux espèces a mis en évidence de nombreuses difficultés pour l'obtention d'un système racinaire. Nous avons cependant pu montrer que cette multiplication était réalisable mais qu'elle nécessitait de longues périodes de culture.

Les expériences de macrobouturage ont révélé le rôle décisif de la présence du bourgeon apical pour l'obtention d'un bon système racinaire. L'eau joue également un rôle non négligeable puisqu'il apparaît clairement que les boutures témoins placées dans de l'eau sont celles dont les résultats sont les plus probants.

La culture *in vitro* de *Geissois pruinosa* nous a quasiment permis d'obtenir de nouvelles plantules tant à partir de feuilles que de tiges, mais là encore le délai est important. Le passage par l'intermédiaire de cals semble être une solution plus que favorable puisqu'elle permettrait pour un même laps de temps de régénérer un plus grand nombre de plantules. Plus encore, chez *Cunonia macrophylla*, la potentialité bioactive antimicrobienne a pu être détectée au niveau de cals obtenus à partir de feuilles, ce qui permet d'envisager une culture cellulaire en bioréacteur.

Toutes ces données seront d'une grande utilité dans l'optique d'une culture mécanisée à grande échelle de l'une ou de l'autre de ces espèces pour leur exploitation et pour la valorisation de leur potentialité pharmaceutique, cosmétique ou horticole.

Enfin, des études d'ordre écophysiologique ont révélé des stratégies de développement différentes pour les espèces *Geissois pruinosa* et *Cunonia macrophylla* qui croissent pourtant sur le même type de milieu. En effet, le nickel abondant sur maquis minier favorise tant la germination que la croissance de *Geissois pruinosa* pour des doses comprises entre 0 et 100 ppm alors qu'il inhibe celles de *Cunonia macrophylla*, sans pour autant lui être fatal. Le suivi morphologique de ces deux espèces a de surcroît permis de caractériser les formes de jeunesse quasiment inconnues pour la plupart des espèces de la famille, laissant apparaître dans les deux cas des formes intermédiaires à feuilles simples puis trifoliolées et enfin pentafoliolées dont la pilosité abondante au départ va en s'estompant jusqu'à l'état adulte. Ces résultats seront valorisés sous forme de publications.

L'ensemble de ce travail permet donc de mieux appréhender la physiologie des Cunoniaceae endémiques de la Nouvelle-Calédonie et les caractéristiques physico-chimiques de certaines de leurs substances bioactives d'intérêt. Cependant, s'il apporte de nombreuses réponses, les questions qu'il soulève sont toutes aussi importantes. Ainsi de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Il reste encore près de 40 espèces qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leur potentialité dans les domaines étudiés. Il est également envisageable d'élargir le panel de tests biologiques à notre disposition, en particulier les tests sur la tique du bétail, *Boophilus microplus* ou encore contre le virus de la Dengue mais aussi sur d'autres cibles pour tenter de trouver par exemple des anti-inflammatoires, des immunostimulants et immunosuppresseurs, des pesticides, etc.

La chimie des Cunoniaceae jusque là peu considérée devra être approfondie afin de permettre de caractériser d'éventuelles nouvelles molécules ou de trouver des molécules déjà connues qui pourront être utilisées pour des études chimiotaxonomiques.

Quant à la physiologie des Cunoniaceae, elle n'est qu'à ses débuts et se doit d'être poursuivie sous divers angles à commencer par une étude approfondie des mécanismes intimes induits lors de la germination de leurs semences. Les premiers résultats obtenus montrent des particularités propres à ces espèces de maquis miniers qui ont su s'adapter à leur milieu de vie extrême. Il faudra donc s'attacher à déterminer les voies métaboliques mises en jeu au cours du processus germinatif mais aussi à trouver les moyens développés par ces espèces pour permettre une conservation de la capacité germinative sur de longues périodes. L'identification des réserves séminales (glucides, lipides, protides, polyphénols, etc.), et le rôle joué par chacune d'entre-elles apporteront des réponses quant aux stratégies d'adaptation mise en place. L'étude des semences d'autres espèces de genres différents, *Codia*, *Pancheria*, *Acsmithia* ou *Weinmannia* donnera un aperçu du panel existant pour les espèces de la famille en Nouvelle-Calédonie.

Un autre aspect de leur physiologie, dont les travaux ont d'ores et déjà été engagés au sein du L.B.P.V.A., concerne leurs réponses à différents facteurs extrêmes rencontrés sur maquis miniers, stress hydrique, présence d'éléments toxiques (nickel, magnésium, cobalt, etc.) et absence d'autres (calcium, matière organique, etc.). L'espèce *Geissois pruinosa*, hyper accumulatrice de nickel sera en particulier analysée afin de déterminer son mode de stockage du nickel, sous quelle forme et dans quelle partie de la plante.

La multiplication par bouturage et microbouturage devra faire l'objet d'investigations plus approfondies afin de réduire les délais nécessaires à l'obtention de nouvelles plantules. Des essais de culture hydroponique en particulier pourrait apporter une réponse adaptée dans le cadre d'une culture à grande échelle d'espèces de la famille pour leur commercialisation sous forme pharmaceutique, cosmétique et surtout horticole.

Enfin, l'étude des formes de jeunesse d'autres espèces de la famille permettra de mieux connaître les états intermédiaires de chacune et contribuera à une meilleure connaissance des Cunoniaceae.

En conclusion, il apparaît clairement que la connaissance de la famille des Cunoniaceae, en particulier celle de Nouvelle-Calédonie nécessitera encore beaucoup de temps mais elle permettra sans aucun doute d'apporter de nombreuses réponses concernant ces espèces de type sub-tropical. Il est à parier que d'une manière ou d'une autre les espèces de la famille des Cunoniaceae feront l'objet de valorisations soit pour leurs potentialités bioactives soit pour leur intérêt horticole ou encore pour leur capacité à recoloniser les milieux extrêmes que sont les maquis miniers de Nouvelle-Calédonie qui font aujourd'hui l'objet d'attentions toutes particulières pour leur exploitation minière.



BIBLIOGRAPHIE

Inflorescence de *Cunonia macrophylla* (Photo de Jason Bradford)

BIBLIOGRAPHIE

Adenisa, S.K., Idowu, O., Ogundaini, A.O., Oladimeji, H., Olugbade, T.A., Onawunmi, G.O., Pais, M., 2000. Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14 (5), 371-374.

Aissa, D., 1981. Etude expérimentale de la germination du chêne vert (*Quercus ilex* L.). Thèse de 3^{ème} cycle, Aix-Marseille III, France, 72 pp.

Amir, H., Pineau, R., 2001. Relationships between extractable metals and some characteristics of different ultramafic soils from New Caledonia. *Australian Journal of Soil Research*. Sous presse.

Armstrong, G., Johnson, K., 2001. Micropropagation of *Ceratopetalum gummiferum*, an important Australian cut flower crop. *In vitro* cellular and Developmental Biology Plant 37 (2), 173-177.

Aucamp, J., Gaspar, A., Hara, Y., Apostolides, Z., 1997. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer research* 17 (6D), 4381-4385.

Avery, J.D., Beyl, C.B., 1991. Propagation of Peach cuttings using foam cubes. *HortScience* 26(9), 1152-1154.

Barnes, R.W., 1999. Paleobiogeography, extinctions and evolutionary trends in the Cunoniaceae. A synthesis of the fossils record. Ph.D. thesis. University of Tasmania.

Barnes, R.W., Hill, R.S., 1999. Macrofossils of *Callicoma* and *Codia* (Cunoniaceae) from Australian Cainozoic Sediments. *Australian Systematic Botany* 12, 647-670.

Barnes, R.W., Rozefelds, A.C., 2000. Comparative morphology of *Anodopetalum* (Cunoniaceae). *Australian Systematic Botany* 13, 373-394.

Barret, D.J., Ash, J.E., 1992. Growth and carbon partitioning in rainforest and eucalypt forest species of south coastal New South Wales, Australia. *Australian Journal of Botany* 40 (1), 13-25.

Bassil, N.V., Proebsting, W.M., Moore, L.W., Lightfoot, D.A., 1991. Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience* 26(8), 1058-1060.

Baskin, J.M., Nan, X., Baskin, C.C., 1998. A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (Fabaceae). *Seed Science Research* 8, 501-512.

Bate-Smith, E.C., 1977. Chemistry and Taxonomy of the Cunoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 5, 95-105.

Bauer, A.W., Kirby, M.D.K., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.

Bernardi, L., 1964. Revisio generis *Weinmanniae*. Pars III : Sectiones III – IV – V – VI. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 83, 126-221.

Biloni, J.S., 1965. Notas preliminares a una revisión de las Cunoniáceas Argentinas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 10, 292-301.

Bors, W., Heller, W., 1989. *In* : Packer L, Glazer AN (Eds.), Oxygen radicals in biological systems, Part B : Oxygen radicals and antioxidants. *Methods in Enzymology* 186, 855 pp.

Bosisio, E., Mascetti, D., Cabalion, P., 2000. Screening of plants from New Caledonia and Vanuatu for inhibitory activity of xanthine oxidase and elastase. *Pharmaceutical Biology* 38 (1), 18-24.

Bouquet, A., 1972. Plantes médicinales du Congo-Brazzaville. *Travaux et documents de l'ORSTOM* 13, 8-10.

Bourgin, J.P., Nitsch, J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Annales de Physiologie Végétale* 9, 377-383.

Bradford, J.C., 1998. A cladistic analysis of species-groups in *Weinmannia* (Cunoniaceae) based on morphology and inflorescence architecture. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85, 565-593.

Bradford, J.C., Barnes, R.W., Fortune Hopkins, H.C.F., in prep. Cunoniaceae. The families and genera of vascular plants. Vol 4 Rosidae. K. Kubitzki (Ed.) Heidelberg, Springer-verlag.

Brongniart, A.T., Gris, A., 1862. *Bulletin de la Société Botanique de France* 9, 74.

Brongniart, A.T., Gris, A., 1869. Description de quelques plantes remarquables de la Nouvelle-Calédonie. *Nouv. Arch. Muséum National d'Histoire Naturelle* 4, 1-48.

Brooker, S.G., Cambie, R.C., Cooper, R.C., 1987. *New Zealand medicinal plants*. New Zealand, Heinemann, 119-122.

Brooks, R.R., 1987. *Serpentine and its vegetation. A multidisciplinary approach. Ecology, Phytogeography & Physiology series, vol. 1.* Dudley, T.R. (Ed.) . Dioscorides press, Portland Oregon, 454 pp.

Broom, S.J., Wilkins, A.L., Ede, R.M., Yinrong, L.U., 1992. Isolation and structural characterisation of kamahine C: An unusual spiroketal found in a native New Zealand honey. *Tetrahedron Letters* 33 (42), 6201-6204.

Bruneton, J., 1993. *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales.* Tec et Doc, Lavoisier (Ed.), Paris, 915 pp.

- Burapadaja, S., Bunchoo, A.,** 1995. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica* 61, 365-366.
- Burlyn, E., Kaufmann, M., Kaufmann, M.R.,** 1973. The Osmotic potential of Polyéthylène Glycol 6000. *Plant Physiology* 51, 914-916.
- Burrows, C.J.,** 1999. Germination behaviour of seeds of the New Zealand woody species *Beilschmiedia tawa*, *Dysoxylum spectabile*, *Griselinia lucida*, and *Weinmannia racemosa*. *New Zealand Journal of Botany* 37, 95-105.
- Cambie, R.C., Ash, J.,** 1994. Flowering plants. Dicotyledons. *Weinmannia*. *Fijian Medicinal Plants*. CSIRO, Australia, 135 pp.
- Carter, A., Slee, M.,** 1991. Propagation media and rooting cuttings of *Eucalyptus grandis*. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 41, 36-39
- Carter, A., Slee, M.,** 1992. The effects of shoot age on root formation of cuttings of *Eucalyptus grandis* W. hill ex Maiden. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 42, 43-47.
- Chen Liu, K.C.S, Lee, S.S., Chiou, J.F., Ren, S., Lien, E.J.,** 1999. Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. *Planta Medica* 65, 43-46.
- Cimanga, K., Li, Y., De Bruyne, T., Apers, S., Cos, P., Bakana, P., Kambu, K., Tona, L., Pieters, L., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J.,** 2000. Inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions from *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter (Periplocaceae). *Pharmacy and pharmacology communications* 6 (7), 321-325.
- Coates Palgrave, K.,** 1983. *Trees of Southern Africa*. Struik, C., Publishers, Cape Town.
- Côme, D.,** 1967. L'inhibition de germination des graines de Pommier (*Pirus malus* L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires. *Annales de Sciences Naturelles, Botanique* VIII, 371-478.
- Côme, D.,** 1970. *Les obstacles à la germination*. Masson, Paris.
- Côme, D.,** 1975. Quelques problèmes de terminologie concernant les semences et leur germination. *In*: Chaussat, R., Le Deunff, Y. (Eds.). *La germination des semences*. Bordas, Paris, Bruxelles, Montreal, 11-26.
- Côme, D.,** 1982. Germination. *In* : Mazliac, P. (Ed.). *Physiologie végétale, II. Croissance et développement*, Hermann, Paris, 129-225.
- Côme, D.,** 1991. Conservation à long terme des organes végétaux. *Jardin botanique et arboretums de demain*, 147-156.
- Côme, D., Corbineau, F., Bailly, C., Benamar, A.,** 1998. Intérêt de la prégermination pour l'amélioration de la qualité germinative des semences. *In* : Lefort, P.L., (Ed.), *Biologie et qualité des semences*, Presse de l'Université d'Angers, Angers, 19-25.

Cooper, R.C., Cambie, R.C., 1991. New Zealand's economic native plants. Oxford University Press, Auckland.

Corbineau, F., Neveux, N., Côme, D., 1989. Characteristics of *Cyclamen Persicum* Mill. seed germination. *Acta Horticulturae* 261, 337-346.

Corbineau, F., Côme, D., 1989. Facteurs susceptibles d'influencer la germination des semences et la levée des plantules de carotte. *Les cahiers du CTIFL*, 47 (IV), 1-5.

Corbineau, F., Côme, D., 1991. Seeds of ornamental plants and their storage. *Acta Horticulturae* 298, 313-321.

Corbineau, F., Picard, M.A., Côme, D., 1994. Germinability of leek seeds and its improvement by osmopriming. *Acta Horticulturae* 371, 45-52.

Corbineau, F., Picard, M.A., Bonnet, A., Côme, D., 1995. Effects of production factors on germination responses of carrots seeds to temperature and oxygen. *Seed Science Research* 5, 129-135.

Corbineau, F., Picard, M.A., Bailly, A., Benamar, A., Côme, D., 1996. Amélioration de la qualité des semences par un traitement de prégermination. *Physiologie Végétale et Horticulture, Journées Recherche-Technologie-Industrie, Angers, 20-21 février*, 97-98.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61 (1), 71-76.

Crastes de Poulet, A., Torreilles, J., Cristol, J.P., 1994. Membrane lipids as a preferential target for oxidative processes. *In* : Paoletti, R., Samuelson, B., Catapano, A.L., Poli, A., Rinetti, M. (Eds.), *Oxidative Processes and Antioxidants*. Raven press, New York, USA.

Cribb, A.B., Cribb, J.W., 1981. Useful wild plants in Australia. Collins, Sydney.

Cronquist, A., 1988. Family Cunoniaceae. An integrated System of Classification of Flowering Plants. New York, Columbia University Press, 1262 pp.

C.T.F.T., 1975. Inventaire des ressources forestières de la Nouvelle-Calédonie. Fasc. 2, Nouméa, 227pp.

Dalley, P., 1997. Christmas Bush : cutflower cultivation. Proceedings of the IHM Flower Growers Seminar, Gosford.

Diallo, N., Duhoux, E., 1984. Organogenèse et multiplication *in vitro* chez l'*Eucalyptus camaldulensis*. *Journal of Plant Physiology* 115, 177-182.

Dickinson, W.C., 1998. *Ceratopetalum, Schizomeria, Weinmannia*. *In* : Plant Resources of South-East Asia (PROSEA) 5 (3). Timber trees : Lesser-known timbers, Sosef, M.S., Hong, L.T., Prawirohatmodjo, S. (Eds.). Backhuys Publishers, Leiden, 153-154, 509-511, 580-581.

- Duhoux, E., Davies, D.,** 1985. Caulogénèse à partir des bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse. *Journal of Plant Physiology* 121, 175-180.
- Dumas, C., Charriere-Ladreix, Y.,** 1979. Etude cytochimique des polyphénols : généralités concernant les lignines et les sécrétions de tannins et d'aglycones flavoniques. *Bulletin de la Société Botanique de France* 126, Lettres botaniques 2, 123-142.
- Duncan, R.P.,** 1993. Flood disturbance and the coexistence of species in a lowland podocarp forest, south Westland New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 81 (3), 403-416.
- Dupont, J.F.,** 1981. Localisation et densité de la population, Planche 24-25. Atlas de la Nouvelle-Calédonie, ORSTOM, Paris.
- Ede, R.M., Wilkins, A.L., Yinrong, L.U., Seng To Tan,** 1993. Novel nor-sesquiterpenoids in New Zealand honeys II. Isolation and structural characterisation of meliracemoic acid. *Tetrahedron Letters* 34 (42), 6795-6798.
- El Badaoui, H., Muguet, B., Henry, M.,** 1996. Production of solamargine by *in vitro* cultures of *Solanum paludosum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 45, 123-127.
- El-Siddig, K., Ebert, G., Lüdders, P.,** 2001. A comparison of pretreatment methods for scarification and germination of *Tamarindus indica* L. seeds. *Seed Science and Technology* 29, 271-274.
- Evenari, M.,** 1957. Les problèmes physiologiques de la germination. *Bulletin de la Société Française de Physiologie Végétale* 3 (4), 105-124.
- Ewart, A.J.,** 1908. On the longevity of seeds. *Proceedings Royal Society of Victoria* 21, 1-120.
- Fenning, T.M., Gartland, K.M.A, Brasier, C.M.,** 1993. Micropropagation and regeneration of english elm, *Ulmus procera* Salisbury. *Journal of Experimental Botany* 44 (264), 1211-1217.
- Fereira, J.F.S., Janick, J.,** 1996. Roots as an enhancing factor for the production of artemisin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 44, 211-217.
- Flygh, G., Grönroos, R., Von Arnold, S.,** 1993. Induction, rooting, and growth capacity of adventitious shoots of *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Forestry Research* 23, 1907-1915.
- Fogliani, B.,** 1997. Connaissance et valorisation de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie. Criblage initial et évaluation préliminaire. Mémoire de D.E.A., Science des Agroressources. E.N.S.A.T., I.N.P.T., Toulouse, France, 49 pp.
- Fogliani, B., Bouraïma-Madjebi, S., Cabalion, P.,** 2000. Cunoniaceae bioactives de Nouvelle-Calédonie. Papier présenté au Colloque : Extraction par Solvant pour la Valorisation des Matières Premières Végétales, Toulouse, France, 27-28 avril, 9-16.

Fogliani, B., Bouraïma-Madjebi, S., Cabalion, P., Pineau, R., 2002a. Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties. *New Zealand Journal of Botany* 40, 511-520.

Fogliani, B., Bouraïma-Madjebi, S., Medevielle, V., Pineau, R., 2002b. Screening of Fifty Cunoniaceae Species from New Caledonia for Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions. *Pharmaceutical Biology* 40 (7), 526-533.

Foo, L.Y., 1993. Amarin, a di-dehydrohexahydroxydiphenol hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 33 (2), 487-491.

Forster, G., 1786. *Florulae Insularum Australium Prodomus*. Göttingen.

Fujii, T., Nito, N., 1972. Cultivation of rice anthers. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 41, 1-7.

Galdston, M., Levystka, V., Liener, I.E., Twumasi, D.Y., 1979. Degradation of tropoelastin and elastin substrates by human neutrophil elastase, free and bound to alpha 2-macroglobulin in serum of the M and Z(Pi) phenotypes of alpha 1-antitrypsin. *American Review of Respiratory Disease* 119, 435-441.

Gamborg, O.L., 1970. The effects of amino-acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology* 45, 372-375.

Godley, E.J., 1983. The fruit in *Ackama*, *Caldcluvia*, and *Weinmannia* (Cunoniaceae). *New Zealand Journal of Botany* 21, 455-456.

Gonzales, A.G., Bazzocchi, I.L., Moujir, L., Ravelo, A.G., Correa, M.D., Gupta, M.P., 1995. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 25-29.

Goodman and Gilman's, 1990. *In* : Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*, 8th Edn., Pergamon, New York, 674-681.

Goyal, Y., Arya, H.C., 1984. Effects of sugars, amino acids and vitamins on shoot differentiation from single bud *in vitro* culture of *Prosopis cinearia* L.. *Indian Journal of Experimental Biology* 22, 592-595.

Groutas, W.C., Badger, R.C., Ocain, T.D., Felker, D., Frankson, J., Theodorakis, M., 1980. Mechanism-based inhibitors of elastase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95 (4), 1890-1894.

Guignard, J.L., 1996. *Biochimie végétale*. Edition Masson, Paris, 255 pp.

Guillaumin, A., 1948. Cunoniaceae. *Flore analytique et synoptique de Nouvelle-Calédonie*. Phanérogames. *Flore de la France d'outremer*, 137-143.

Guillon, J.H., 1975. Les massifs péridotitiques de Nouvelle-Calédonie. *Mémoire O.R.S.T.O.M.*, 76-120.

- Hall, D.**, 1964. Elastolysis and Aging. Academic Press, Springfield, Illinois, USA.
- Hannweg, K., Watt, M.P., Brejak, P.**, 1996. A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. Botanical Bulletin of Academia Sinica 37, 1996.
- Harden, G.J.**, 1990. 62. Cunoniaceae. In : Flora of New South Wales 1, Harden, G.J. (Ed.) . New South Wales University Press, Sydney, 517-521.
- Hayashi, T., Nagayama, K., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., Berganza, L.H.**, 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug, Molle I (*Schinus terebinthifolius*). Journal of Natural Products 52, 210-211.
- Hegnauer, R.**, 1964. Chemotaxonomie der Pflanzen 3, 625-628.
- Herbert, J.M., Frehel, D., Rosso, M.P., Seban, E., Castet, C., Pepin, O., Maffrand, J.P., Le Fur, G.**, 1992. Biochemical and pharmacological activities of SR 26831, a potent and selective elastase inhibitor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 260, 809-816.
- Hegnauer, R.**, 1964. Chemotaxonomie der Pflanzen 3, 625-628.
- Heywood, V.H.**, 1985. Rosidae. Flowering Plants of the World, 137-221.
- Hoogland, R.D.**, 1960. Studies in the Cunoniaceae. I. The genera *Ceratopetalum*, *Gilbbaea*, *Aistropetalum* and *Calycomis*. Australian Journal of Botany 8, 318-341.
- Hoogland, R.D.**, 1979. Studies in the Cunoniaceae. II. The genera *Caldcluvia*, *Pullea*, *Acsmithia* and *Spiraeanthemum*. Blumea 25 (2) , 481-505.
- Hoogland, R.D.**, 1981. Studies in the Cunoniaceae. III. Additional notes on *Ceratopetalum* and *Acrophyllum*. Brunonia 4 (25), 213-214.
- Hoogland, R.D.**, 1987. Studies in the Cunoniaceae. IV. Further notes on New Caledonian *Acsmithia*. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia 9 (4), 393-397.
- Hoogland, R.D.[†], Jeremie, J., Hopkins, H.C.F.**, 1997. Le genre *Cunonia* (Cunoniaceae) en Nouvelle-Calédonie. Description de cinq espèces nouvelles. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia 19 (1), 7-20.
- Hoopkins, H.C.F.**, 1998a. A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and the Pacific. 1. Introduction and the account of the species of Western Malesia, the Lesser Sunda Islands and the Moluccas. Adansonia, Sér. 3, 20 (1), 5-41.
- Hoopkins, H.C.F.**, 1998b. A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and the Pacific. 2. Sulawesi and the Philippines. Adansonia, Sér. 3, 20 (1), 43-66

- Hoopkins, H.C.F.**, 1998c. A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and the Pacific. 3. New Guinea, Solomon Islands, Vanuatu and Fiji, with notes on the species of Samoa, Rarotonga, New Caledonia and New Zealand. *Adansonia*, Sér. 3, 20 (1), 67-106.
- Hoopkins, H.C.F., Florence, J.**, 1998. A revision of *Weinmannia* (Cunoniaceae) in Malesia and the Pacific. 4. The society, Marquesas, and Austral Islands. *Adansonia*, Sér. 3, 20 (1), 107-130
- Hsüch-Ching, C., Yen-Yeou, C.**, 1993. Xanthine oxidase inhibitors from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of enzyme inhibition* 7 (3), 225-235.
- Ismail, N., Alam, M.**, 2001. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 72 (6), 676-679.
- Istambouli, A.**, 1976. Etude expérimentale sur la nature des périodes de repos des semences et des bougeons de l'olivier (*Olea europea* L.). Thèse de Doctorat es Science, Aix-Marseille. France.
- Jaffré, T.**, 1976. Composition chimique et conditions de l'alimentation minérale des plantes sur roches ultrabasiques (Nouvelle-Calédonie). *Cahiers ORSTOM, série Biologie* 9 (1), 53-63.
- Jaffré, T., Morat, Ph., Veillon, J.M., MacKee, H.S.**, 1987. Changements dans la végétation de la Nouvelle-Calédonie au cours du Tertiaire : la végétation et la flore des roches ultrabasiques. *Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia* 9 (4), 365-391.
- Jaffré, T., Veillon, J.M.**, 1991. Etude structurale et floristique de deux forêts denses humides sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia* 12 (3-4), 243-273
- Jaffré, T.**, 1993. The relationship between ecological diversity and floristic diversity in New Caledonia. *Biodiversity Letters* 1, 82-87.
- Jaffré, T., Morat, Ph., Veillon, J.M.**, 1994. La flore : caractéristiques et composition floristique des principales formations végétales. *Dossier Nouvelle-Calédonie. Bois et Forêt des Tropiques* 242, 7-30.
- Jaffré, T., Veillon, J.M.**, 1995. Structural and floristic characteristics of a rain forest on schist in New Caledonia : a comparison with an ultramafic rain forest. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia* 17 (3-4), 201-226.
- Jaffré, T., Morat, Ph., Veillon, J.M., Rigault, F., Dagostini, G.**, 2001. Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-calédonie. *Documents Scientifiques et Techniques, Volume spécial II4, Juillet 2001, I.R.D., Centre de Nouméa*, 121 pp.
- Jaiswal, V.S., Amin, M.N.**, 1987. *In vitro* propagation of Guava from shoot cultures of matures trees. *Journal of Plant Physiology* 130, 7-12.

Jane, G.T., Green, T.G.A., 1985. Patterns of stomatal conductance in six evergreen tree species from a New Zealand cloud forest. *Botanical Gazette* 146 (3), 413-420. Chicago.

Janoff, A., 1985. Elastase in tissue injury. *Annual Review of Medicine* 36, 207-216.

Krogstrup, P., Nørgaard, J.V., 1991. Micropopagation of *Psidia coronopus* (Lam.) Benth, a threatened endemic species from the island of Rodrigues. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 27, 227-230.

Kong, L., Wolfender, J.L., Cheng, C.H.K., Hostettmann, K., Ren Xian Tan, 1999. Xanthine oxidase inhibitors from *Brandisia hancei*. *Planta Medica* 65 (8), 744-746.

Lazarides, M., Hinces, B., 1993. CSIRO handbook of economic plants of Australia. CSIRO, East Melbourne.

Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I., 1990. Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*. *Phytochemistry* 29 (11), 3621-3625.

Leifert, C., Pryce, S., Lumsden, P.J., Waites, W.M., 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30, 171-179.

Letouzey, R., 1969. La récolte des échantillons botaniques. Manuel de botanique forestière. Afrique tropicale. Tome n°1, 141-165.

Li, X.C., Elsohly, H.N., Hufford, C.D., Clark, A.M., 1999. NMR assignments of ellagic acid derivatives. *Magnetic resonance in chemistry* 37 (11), 856-859.

Lin, L.C., Kuo, Y.C., Chou, C.J., 2000a. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavonone from the root of *Limonium sinense*. *Planta Medica* 66 (4), 333-336.

Lin, Y.N., Wang, W.Y., Kuo, Y.H., Chen, C.F., 2000b. Nonsteroidal constituents from *Solanum incanum* L. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47, 247-251.

Lin, J.H., Lin, Y.T., 1999. Flavonoids from the leaves of *Loranthus kanoi* (Chao) Kiu. *Journal of Food and Drug Analysis* 7 (3), 185-190.

Luis Diego Gomez, P., 1995. *Weinmannia spp.* (Cunoniaceae) : Fitoquímica básica. *Revista de Biología Tropical* 43 (1-3), 311-312.

MacKee, H.S., 1994. Catalogue de plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 164pp.

Maffei Facino, R., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., Saibene, L., 1995. Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum* and *Ruscus aculeatus* : factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv Der Pharmazie (Weinheim)* 328 (10), 720-724.

Malamug, J.J.F., Inden, H., Yazawa, S., Asahira, T., 1992. Plantlet regeneration from Taro (*Colocasia esculenta* Schoitt) callus. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 60 (4), 935-940.

Melzig, M.F. , Löser, B. , Ciesielski, S., 2001. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. Pharmazie 56 (12), 967–970.

Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography : A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (3), 577-599.

Misra, P., Chaturvedi, H.C., 1984. Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L.. Plant Cell Tissue and Organ Culture 3, 163-168.

Morat, Ph., Jaffré, T., Veillon, J.M., MacKee, H.S., 1981. Végétation. Atlas de la Nouvelle-Calédonie, ORSTOM, Paris.

Morat, Ph., Jaffré, T., Veillon, J.M., MacKee, H.S., 1986. Affinités floristiques et considérations sur l'origine des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Section B, Adansonia 8 (2), 133-182.

Morat, Ph., 1993. Our knowledge of the flora of New Caledonia: endemism and diversity in relation to vegetation types and substrates in The Terrestrial Biota of New Caledonia. Biodiversity Letters 1 (3-4), 72-81.

Morat, Ph., Jaffré, T., Veillon, J.M., 1999. Menaces sur les taxons rares et endémiques de la Nouvelle-Calédonie. Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest. Nouvelle Série. Numéro spécial 19.

Morel, G., Wetmore, R.H, 1951. Tissue culture of Monocotyledons. American Journal of Botany 38, 138-140.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.

Naturales, P.d.C.d.1.R., 1991. Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. CESA, Quito.

Nawwar, M.A.M., Hussein, S.A.M., Merfort, I., 1994. NMR spectral analysis of polyphenolics from *Punica granatum*. Phytochemistry 36 (3), 793-798.

Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., Fukushuma, S., 1983a. Studies of enzyme inhibitors. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 31, 2708-2711.

Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., Fukushuma, S., 1983b. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 31, 3984-3987.

Özbingöl, N., Corbineau, F., Côme, D., 1998. Responses of tomato seeds to osmoconditioning as related to temperature and oxygen. Seed Science Research 8, 377-384.

- Palmer, E., Pitman, N.,** 1961. Trees of South Africa. A.A. Balkema, Cape town.
- Paris, R., Nothis, A.,** 1969. Sur quelques plantes de Nouvelle-Calédonie. Plantes médicinales et phytothérapie III (4), 274-287.
- Pei, Y.H, Li, X., Zhu, T.R.,** 1991. Structure of a new ellagic acid glycoside from the root-sprouts of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Yaoxue Xuebao 25 (10), 798-800.
- Pelletier, B.,** 1990. Techniques minières permettant de préserver l'environnement autour des gisements de nickel Néo-Calédoniens. Proceedings I.S.R.S., Nouméa, 27-34.
- Perumal Samy, R., Ignacimuthu, S., Sen, A.,** 1998. Screening of 34 indian medicinal plants for antibacterial properties. Journal of Ethnopharmacology 62, 173-182.
- Pharmacopée Française,** X^{ème} Edition. Méthodes générales d'analyses: Indice de mousse, 1491-1492.
- Quideau, S., Feldman, K.S.,** 1996. Ellagitannin chemistry. Chemical Reviews 96 (1), 475-503.
- Rageau, J.,** 1957. Plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Nouméa, ORSTOM, 23.
- Rathore, T.S., Deora, N.S., Shekhawat, N.S., Singh, R.P.,** 1993. Rapid micropopagation of a tree of arid forestry *Anogeissus acuminata*. Biologia Plantarum 35 (3), 381-386.
- Raven, P.H.,** 1980. Plate tectonics and southern hemisphere biogeography. *In* : Tropical Botany. Academic Press, Larsen, K., Holm-Nielsen, B. (Eds.). London, New York and San Francisco, 3-24.
- Restrepo Uribe, G., Bellefleur, P.,** 1996. L'aulne des Andes de Colombie : écologie et identification. Bois et Forêts des Tropiques 247, 53-68.
- Reuveni, O., Fanger-Vexler, L., Heth, D.,** 1990. The effect of rooting environment, kind and source of cuttings on rooting of *Eucalyptus camaldulensis* Dhen. cuttings. Commonwealth Forestry Review 69 (2), 181-189.
- Riley, M.,** 1994. Maori healing and herbal. New Zealand, Viking sevenseas, 452 pp.
- Ripetti, V.,** 1993. Bouturage d'*Eucalyptus stellulata*. Influence de l'étiollement sur les capacités rhizogènes des boutures. Medical Faculty Landbouww University of Gent 58/3a, 937-941.
- Ritchie, G.A., Tanaka, Y., Meade, R., Duke, S.D.,** 1993. Field survival and early height growth of Douglas-fir rooted cuttings : relationship to stem diameter and root system quality. Forest Ecology and Management 60, 137-256.
- Robak, J., Gryglewsky, R.J.,** 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochemical Journal 37, 837-841.

Rodríguez, R.R., Mattei, S.O., Quezada, M.M., 1983. Flora arbórea de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción, Concepción.

Romero, J.H.T., 1983. Contribucion al conicimiento de las plantas tanicas/ tinctoreas registradas en Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional, Bogota.

Roos, W., 1997. Recensement de la population de Nouvelle-Calédonie. INSEE Première 506, 1-4.

Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Linck. Chemosphere 40, 855-859.

Saintpierre, D., 2001. Identification de souches originales d'actinomycètes isolées de sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Caractérisation chimique de quelques antibiotiques produits. Thèse soutenue le 7 juin 2001. Sciences des Agroressources. I.N.P.T. France. 211 pp.

Saintpierre, D., Amir, H., Pineau, R., Goodfellow, M., 2001. Streptomyces yatensis sp. nov., a novel streptomycete from a New Caledonian ultramafic soil. Antonie van Leeuwenhoek (soumis).

Schlechter, R., 1906. Engl. Jarh., tome XXIX, 130.

Schmid, M., 2000. Fleurs et plantes de Nouvelle-Calédonie. Editions du Pacifique, 164 pp.

Schmidt, O.T., Mayer, W., 1956. Angewandte Chemie 68 (103).

Schnell, R., 1960. Techniques d'herborisation et de conservation des plantes dans les pays tropicaux. Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée 7 (1-3), 1-48.

Section d'hydrologie de l'ORSTOM et Service Territorial de la Météorologie, 1981. Eléments généraux du climat, Planche 11. Atlas de la Nouvelle-Calédonie, ORSTOM, Paris.

Service météorologique de Nouvelle-Calédonie et dépendances, 1981. Type de temps et cyclones, Planche 10. Atlas de la Nouvelle-Calédonie, ORSTOM, Paris.

Sévenet, T., 1994. Plantes, molécules et médicaments. Dossiers documentaires. CNRS Editions. Nathan, 119 pp.

Snider, G.L., 1981. Pathogenesis of emphysema and chronic bronchitis. The Medical Clinics of North America 65, 647-665.

Sumahara, N., Nogi, K., Yokoagawa, K., 1977. Production of xanthine oxidase inhibitor, 2,8-dihydroxyadenine, by *Alcaligenes aquamarinus*. Agricultural and Biological Chemistry 41, 1103-1109.

Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G.I., Nishioka, I., 1985. Structure and antiherpetic activity among the tannins. Phytochemistry 24 (10), 2245-2250.

- Tanaka, T., Kouno, I., Nonaka, G.I.,** 1996. Glutathione-mediated conversion of the ellagitannin geraniin into chebulagic acid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 44 (1), 34-40.
- Tanaka, T., Jiang, Z.H., Kouno, I.,** 1998. Distribution of ellagic acid derivatives and a diarylheptanoid in wood of *Platycarya stobilacea*. *Phytochemistry* 47 (5), 851-854.
- Thévenot, C., Côme, D.,** 1973a. Influence de la présentation de l'eau et de l'oxygène sur la germination des embryons de Pommier (*Pirus malus* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, série D* 277, 1873-1876.
- Thévenot, C., Côme, D.,** 1973b. Manifestation de la dormance embryonnaire du Pommier (*Pirus malus* L.) en fonction des conditions thermiques de germination. *Physiologie Végétale* 11 (1), 151-160.
- Tibagu, M., Odén, P.C.,** 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Science and Technology* 29, 11-20.
- Timber Research and Development Association,** 1979. *Timbers of the world*. Trada/The Construction Press, Lancaster.
- Trilles, B.,** 1999. Connaissance et valorisation d'une espèce à huiles essentielles de Nouvelle-Calédonie, *Melaleuca quinquenervia* (le Niaouli). Thèse de 3^{ème} cycle, Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Calédonie, 323 pp.
- Vallès, S., Estournès, J.M.,** 2001. Découvertes Calédoniennes. Les arbres. Planète mémo (Ed.), 61 pp.
- Van Der Watt, E., Pretorius, J.C.,** 2001. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of ethnopharmacology* 76 (1), 87-91.
- Verotta, L., Dell'Agli, M., Giolito, A., Guerrini, M., Cabalion, P., Bosisio, E.,** 2001. *In vitro* antiplasmodial activity of *Tristianopsis* species and identification of the active constituents : ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6'-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside. *Journal of Natural Products* 64, 603-607.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L.A.,** 1997. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica* 64, 97-109.
- Wang, W., Cui, S.X., Zhang, C.L.,** 2001. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67, 11-17.
- Wollenweber, E., Dörr, M., Rozefelds, A.C., Minchin, P., Forster, P.I.,** 2000. Variation in flavonoid exudates in *Eucryphia* species from Australia and South America. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 111-118.

Worrall, R., Wade, N., Jonhson, K ., 1999. Improving the quality of NSW Christmas Bush (*Ceratopetalum gummiferum*) flowers. 5th Australian Wild-flower Conference Proceedings, 14-17 April 1999, 126-128.

Xu, H.X., Lee, S.F., 2001. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy Research* 15 (1), 39-43.

Yao, J., Moellering, R., 1995. Antibacterial agents. *In: Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R. (Eds.). Manual of Clinical Microbiology. ASM, Washington, DC, 1281-1290.*

Zhao, J., Zhu, W.H., Hu, Q., Guo, Y.Q., 2001. Compact callus cluster suspension cultures of *Catharanthus roseus* with enhanced indole alkaloid biosynthesis. *In vitro Cellular Development Biology Plant* 37, 68-72.

Zickel, C.S., Leitao Filho, H.F., 1993. Revisão taxônomica de *Lamanonia* Vell. (Cunoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 16, 73-91.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I/ LA NOUVELLE-CALÉDONIE ET SES DÉPENDANCES	5
A/ Présentation générale.....	5
B/ Evolution géologique de ce Pays d’Outre-Mer et types de sols le composant	7
C/ Eléments généraux du climat	9
D/ La flore néo-calédonienne et son originalité	13
D.1/ La végétation autochtone.....	13
D.1.1/ Les forêts denses humides sempervirentes	15
D.1.2/ La forêt sèche ou forêt sclérophylle.....	17
D.1.3/ Les maquis.....	19
D.1.3.1/ Les maquis sur roches ultrabasiques	21
D.1.3.2/ Les maquis sur roches acides.....	21
D.1.4/ La mangrove.....	21
D.1.5/ La végétation palustre ou marécageuse	21
D.2/ La végétation modifiée.....	22
D.3/ Mesures de protection mises en place pour sauvegarder la biodiversité végétale néo-calédonienne	22
II/ LA FAMILLE DES CUNONIACEAE	24
A/ Présentation générale.....	24
B/ La famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie	28
C/ Phytochimie des Cunoniaceae.....	31
D/ Utilisation des Cunoniaceae en médecine traditionnelle.....	31
E/ Intérêt économique des espèces de la famille des Cunoniaceae.....	31
F/ Connaissances physiologiques et écologiques de la famille des Cunoniaceae.....	33
F.1/ La reproduction sexuée	33
F.2/ La reproduction asexuée	40
III/ LES SUBSTANCES NATURELLES VÉGÉTALES ET LEUR VALORISATION 42	
A/ Les Tanins.....	42
A.1/ Classification des tanins	43
A.2/ Biosynthèse et structure des tanins hydrolysables.....	43
A.2.1/ Les gallotanins	44
A.2.2/ Les ellagitanins	44
A.3/ Activités biologiques répertoriées des tanins	48
B/ Les Flavonoïdes	49
B.1/ Biosynthèse et structure des flavonoïdes	49
B.2/ Activités biologiques répertoriées des flavonoïdes.....	51

C/ Activités biologiques d'autres métabolites secondaires	52
C.1/ Autres polyphénols, les quinones	52
C.2/ Terpénoïdes	52

PARTIE I: Récolte et identification d'espèces de la famille des Cunoniaceae de Nouvelle-Calédonie.....53

Chapitre 1: La récolte53

INTRODUCTION 53

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES 53

A/ Equipement de base 53

B/ Reconnaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae 55

C/ Collecte des différentes parties de plante 55

D/ Prélèvement de l'échantillon botanique 55

E/ Réalisation d'une fiche type descriptive de l'espèce 57

F/ Traitement des collectes 57

G/ Séchage et réalisation de l'herbier..... 59

II/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 59

Chapitre 2: Identification des échantillons botaniques et contribution à la connaissance des espèces de la famille des Cunoniaceae en Nouvelle-Calédonie.....61

INTRODUCTION 61

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES 61

II/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 62

A/ Les espèces du genre *Acsmithia* 63

A.1/ *Acsmithia meridionalis* Hoogland inédit 63

A.2/ *Acsmithia collina* Hoogland inédit 65

A.3/ *Acsmithia elliptica* (Vieillard ex Pampanini) Hoogland 65

A.4/ *Acsmithia pubescens* (Pampanini) Hoogland 65

A.5/ *Acsmithia pedunculata* (Schlechter) Hoogland 67

B/ Les espèces du genre *Cunonia* 67

B.1/ Espèces à feuilles simples..... 67

B.1.1/ *Cunonia bullata* Brongniart et Gris 69

B.1.2/ *Cunonia rotundifolia* Däniker..... 69

B.1.3/ *Cunonia balansae* Brongniart et Gris 71

B.2/ Espèces à feuilles composées, à pistil glabre ou valve du fruit glabre, à stipule glabre en dessous	71
B.2.1/ <i>Cunonia montana</i> Schlechter	71
B.2.2/ <i>Cunonia macrophylla</i> Brongniart et Gris	72
B.2.3/ <i>Cunonia vieillardii</i> Brongniart et Gris	72
B.3/ Espèces à feuilles composées, à pistil glabre ou valve du fruit glabre, à stipule poilue en dessous	73
B.3.1/ <i>Cunonia atrorubens</i> Schlechter	73
B.3.2/ <i>Cunonia deplanchei</i> Brongniart et Gris	73
B.3.3/ <i>Cunonia lenormandii</i> Vieillard ex Brongniart et Gris	75
B.3.4/ <i>Cunonia aoupiniensis</i> Hoogland	75
B.4/ Espèces à feuilles composées, trifoliolées ou pennées, 2-4 paires de folioles latérales, à pistil poilu ou valve du fruit poilue	75
B.4.1/ <i>Cunonia linearisepala</i> (Guillaumin) Bernardi	77
B.4.2/ <i>Cunonia purpurea</i> Brongniart et Gris	77
B.4.3/ <i>Cunonia alticola</i> Guillaumin	78
B.4.4/ <i>Cunonia pulchella</i> Brongniart et Gris	78
B.5/ Espèces à feuilles composées, pennées à plus de 5 paires de folioles latérales, à pistil poilu ou valve du fruit poilue	79
B.5.1/ <i>Cunonia austrocaledonica</i> Brongniart et Gris ex Guillaumin	79
B.5.2/ <i>Cunonia pterophylla</i> Schlechter	79
B.5.3/ <i>Cunonia varijuga</i> Hoogland	81
C/ Les espèces du genre <i>Weinmannia</i>	83
C.1/ <i>Weinmannia dichotoma</i> Brongniart et Gris	83
C.2/ <i>Weinmannia monticola</i> Däniker	83
C.3/ <i>Weinmannia parviflora</i> Forster	85
D/ Les espèces du genre <i>Geissois</i>	85
D.1/ Espèces à inflorescence glabre ou presque, feuilles glabres	85
D.1.1/ <i>Geissois racemosa</i> Labillardieri	85
D.1.2/ <i>Geissois montana</i> Vieillard ex Brongniart et Gris	87
D.1.3/ <i>Geissois magnifica</i> Baker	87
D.1.4/ <i>Geissois pruinosa</i> Brongniart et Gris	87
D.1.5/ <i>Geissois polyphylla</i> Lecard ex Guillaumin	89
D.2/ Espèces à inflorescence abondamment velue, feuilles velues au moins sur la face inférieure	89
D.2.1/ <i>Geissois hirsuta</i> Brongniart et Gris	89
D.2.2/ <i>Geissois hippocastaneifolia</i> Guillaumin	89
E/ Les espèces du genre <i>Codia</i>	91
E.1/ Espèces du groupe Eu-Codia	91
E.1.1/ <i>Codia montana</i> Forster et G. Forster	91
E.1.2/ <i>Codia albifrons</i> ou <i>albiflora</i> Vieillard ex Guillaumin	91
E.1.3/ <i>Codia ferruginea</i> Brongniart et Gris	93
E.2/ Espèces du groupe Codiopsis	93
E.2.1/ <i>Codia incrassata</i> Pampanini	93
E.2.2/ <i>Codia discolor</i> Brongniart et Gris	93
E.2.3/ <i>Codia arborea</i> Brongniart ex Guillaumin	94
E.2.4/ <i>Codia nitida</i> Schlechter	94
E.2.5/ <i>Codia sp. nov.</i>	95
F/ Les espèces du genre <i>Pancheria</i>	95
F.1/ Espèces à feuilles composées	97
F.1.1/ <i>Pancheria confusa</i> Guillaumin	97
F.1.2/ <i>Pancheria hirsuta</i> Vieillard ex Pampanini	97
F.1.3/ <i>Pancheria sebertii</i> Guillaumin	98
F.1.4/ <i>Pancheria reticulata</i> Guillaumin	98

F.2/ Espèces à feuilles simples	99
F.2.1/ <i>Pancheria engleriana</i> Schlechter	99
F.2.2/ <i>Pancheria elegans</i> Brongniart et Gris	99
F.2.3/ <i>Pancheria elliptica</i> Pampanini	101
F.2.4/ <i>Pancheria phylliraeoides</i> Brongniart et Gris ex Guillaumin	101
F.2.5/ <i>Pancheria alaternoides</i> Brongniart et Gris	101
F.2.6/ <i>Pancheria communis</i> Baker	103
F.2.7/ <i>Pancheria brunhesii</i> Pampanini	103
F.2.8/ <i>Pancheria obovata</i> Brongniart et Gris	105
F.2.9/ <i>Pancheria vieillardii</i> Brongniart et Gris	105
F.2.10/ <i>Pancheria ferruginea</i> Brongniart et Gris	105
CONCLUSION	106
PARTIE II: Tests préliminaires chimiques et biologiques pour la sélection des espèces de Cunoniaceae néo-calédoniennes d'intérêt.....	107
Chapitre 1: Tests chimiques préliminaires.....	107
INTRODUCTION	107
I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES	107
A/ Recherche de terpénoïdes.....	107
A.1/ Recherche de saponosides	107
A.1.1/ Mise en évidence	107
A.1.2/ Calcul de l'indice mousse	108
A.2/ Recherche de stéroïdes et/ou triterpènes	108
B/ Recherche de polyphénols.....	108
B.1/ Recherche de tanins	108
B.2/ Recherche de flavonoïdes	109
B.3/ Recherche de quinones	109
C/ Recherche d'alcaloïdes	109
III/ RÉSULTATS ET DISCUSSION	110
Chapitre 2: Tests d'activités biologiques pour la sélection des espèces d'intérêt.....	113
INTRODUCTION	113
I/ PRÉPARATION DES EXTRAITS BRUTS	113
A/ Matériel et Méthodes	113
B/ Résultats et Discussion	115

III/ TEST D'ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES	116
A/ Introduction	116
B/ Article paru : Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties. (Fogliani <i>et al.</i> , 2002a)	116
C/ Conclusion	127
III/ TESTS D'INHIBITIONS ENZYMATIQUES	128
A/ Activités inhibitrices à l'encontre de la xanthine oxydase	128
A.1/ Introduction	128
A.2/ Article sous presse : Screening of Fifty Cunoniaceae Species from NewCaledonia for Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions (Fogliani <i>et al.</i> , 2002b)	129
A.3/ Conclusion	137
B/ Activités inhibitrices à l'encontre de l'élastase	137
B.1/ Introduction	137
B.2/ Matériel et méthodes	137
B.3/ Résultats et discussion	138
B.4/ Conclusion	141
C/ Conclusion globale sur les tests enzymatiques	142
IV/ TESTS D'ACTIVITÉS TOXIQUES ET CYTOTOXIQUES	142
A/ Test d'activité cytotoxique	142
A.1/ Introduction	142
A.2/ Matériel et Méthodes	143
A.2.1/ Mise en culture à partir du stock congelé	143
A.2.2/ Comptage des cellules vivantes et entretien de la lignée	143
A.2.3/ Test de cytotoxicité	143
A.3/ Résultats et discussion	145
A.4/ Conclusion	145
B/ Test d'activité toxique	150
B.1/ Introduction	150
B.2/ Rappel des résultats et de la discussion	150
V/ BILAN DES TESTS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES ET CHOIX DES ESPÈCES À ÉTUDIER.	151
PARTIE III: Purification et caractérisation chimique de molécules bioactives synthétisées par quelques espèces de Cunoniaceae	153
Chapitre 1: Purification des molécules d'intérêt.....	153
INTRODUCTION	153

I/ PURIFICATION DE MOLÉCULES ANTIBIOTIQUES CHEZ L'ESPÈCE *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 153

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s).....	154
A.1/ Matériel et méthodes	154
A.1.1/ Extraction	154
A.1.2/ Détermination de la polarité des molécules actives par bioguidage	155
A.1.3/ Purification partielle par bioguidage.....	155
A.1.3.1/ Fractionnement sur colonne de silice.....	155
A.1.3.2/ Fractionnement sur colonne de LH20	155
A.1.4/ Analyse HPLC des fractions actives.....	156
A.2/ Résultats et discussion.....	156
B/ Purification de molécules extraites des feuilles de <i>Cunonia macrophylla</i>	159
B.1/ Matériel et méthodes	159
B.1.1/ Extraction.....	159
B.1.2/ Fractionnement liquide/liquide	159
B.1.3/ Fractionnement sur colonnes	160
B.1.3.1/ Chromatographie flash sur silice.....	160
B.1.3.2/ Chromatographie sur colonne de LH20	160
B.1.3.3/ Chromatographie semi-préparative sur colonne de phase inverse	161
B.1.3.4/ Caractéristiques de l'HPLC et conditions de l'analyse	161
B.2/ Résultats et discussion.....	162
B.2.1/ Traitement de Si Fr1	164
B.2.2/ Traitement de Si Fr2	164
B.2.2.1/ Séparation de Si Fr2-1 sur colonne Sphérisorb ODS2	165
B.2.2.2/ Séparation de Si Fr2	165
B.2.3/ Traitement de Si Fr3	165
B.2.4/ Traitement de Si Fr4-1	166
B.2.5/ Bilan des purifications	166

III/ PURIFICATION DE MOLÉCULES INHIBITRICES DE LA XANTHINE OXYDASE CHEZ L'ESPÈCE *WEINMANNIA DICHOTOMA* 176

A/ Première approche de détection de la ou les molécule(s) active(s).....	176
A.1/ Matériel et méthodes	176
A.1.1/ Extraction	177
A.1.2/ Détermination de la polarité des molécules actives par bioguidage	177
A.1.3/ Purification partielle par bioguidage.....	177
A.1.3.1/ Chromatographie flash sur colonne de silice	177
A.1.3.2/ Analyse HPLC des fractions actives et purification par HPLC semi-préparative.....	178
A.2/ Résultats et discussion.....	178
B/ Purification de molécules extraites d'écorce de <i>Weinmannia dichotoma</i>.....	181
B.1/ Matériel et méthodes	181
B.1.1/ Extraction.....	181
B.1.2/ Fractionnement liquide/liquide	181
B.1.3/ Fractionnement sur colonne de la phase organique	182
B.1.4/ Caractéristiques de l'HPLC et conditions de l'analyse.....	182
B.2/ Résultats et discussion.....	183

Chapitre 2: Identification structurale des molécules purifiées de *Cunonia macrophylla* et *Weinmannia dichotoma*189

I/ MATÉRIEL ET MÉTHODES 189

II/ RÉSULTATS ET DISCUSSION 189

A/ Etude des molécules purifiées de l'extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla* 189

A.1/ Tanins ellagiques et galliques identifiés 190

A.1.1/ Structure 190

A.1.2/ Informations répertoriées sur ces tanins ; analogies et différences observées avec les résultats obtenus sur l'espèce *Cunonia macrophylla* 201

A.2/ Flavonoïdes 202

A.2.1/ Structure 202

A.2.2/ Informations répertoriées sur ces flavonoïdes 208

A.3/ Bilan du travail chimique réalisé sur l'espèce *Cunonia macrophylla* 209

B/ Etude des molécules purifiées de l'extrait acétate d'éthyle d'écorce de *Weinmannia dichotoma* 210

CONCLUSION SUR LES ÉTUDES CHIMIQUES EFFECTUÉES SUR *CUNONIA MACROPHYLLA* ET *WEINMANNIA DICHOTOMA* 212

PARTIE IV: Voies et moyens de pérennisation des espèces d'intérêt *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.....213

INTRODUCTION: CHOIX DES ESPECES 213

Chapitre 1: Multiplication par voie sexuée: Etude de la capacité germinative et optimisation de la germination des semences de deux espèces de Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.....213

INTRODUCTION 215

I/ DE LA COLLECTE DU FRUIT À LA SEMENCE D'ASPECT FERTILE 215

A/ Matériel et méthodes..... 216

A.1/ Collecte et stockage des graines 216

A.2/ Analyse de la structure des fruits et des semences 217

B/ Résultats et Discussion 218

B.1/ Résultats des collectes 218

B.2/ Structure de l'infrutescence 218

B.3/ Structure du fruit..... 218

B.4/ Structure de la graine..... 219

III/ ETUDE DE L'IMPACT DE DIFFÉRENTS FACTEURS ABIOTIQUES SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA*. .. 222

A/ Matériel et méthodes.....	222
A.1/ Test de Germination	222
A.2/ Recherche de la température optimale de germination.....	222
A.3/ Recherche du degré d'imbibition optimum.....	222
A.4/ Effet de la lumière sur la germination	222
A.5/ Germination au hasard.....	223
B/ Résultats	223
B.1/ Effet de la température sur la germination.....	223
B.2/ Effet du taux d'humidité sur la germination.....	225
B.3/ Effet de la lumière	226
B.4/ Germination au hasard.....	226
C/ Discussion.....	226

III/ TENTATIVES D'OPTIMISATION DE LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA*. 227

A/ Impact de la désinfection, de la scarification et du froid sur la capacité germinative des semences de <i>G. pruinosa</i> et <i>C. macrophylla</i>.....	228
A.1/ Matériel et méthodes	228
A.1.1/ Effet de la désinfection à l'hypochlorite de sodium	228
A.1.2/ Effet de la scarification mécanique.....	228
A.1.3/ Effet d'un traitement à l'eau chaude.....	228
A.1.4/ Effet d'un traitement à l'acide sulfurique	228
A.1.5/ Effet d'un traitement par le froid	228
A.2/ Résultats	229
A.2.1/ Effet de la désinfection à l'hypochlorite de sodium	229
A.2.2/ Effet de la scarification mécanique.....	230
A.2.3/ Effet d'un traitement à l'eau chaude.....	230
A.2.4/ Effet d'un traitement à l'acide sulfurique	232
A.2.5/ Effet d'un traitement par le froid	233
A.3/ Discussion	235
B/ Effet de la prégermination sur les semences de <i>G. pruinosa</i> et <i>C. macrophylla</i>.....	236
B.1/ Matériel et méthodes	236
B.2/ Résultats	236
B.3/ Discussion	238

IV/ IMPACT DES ÉLÉMENTS DU SYNDROME SERPENTINIQUE SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE *G. PRUINOSA* ET *C. MACROPHYLLA* ... 239

A/ Matériel et méthodes.....	239
B/ Résultats	239
B.1/ Impact du nickel	239
B.2/ Impact du magnésium.....	241
B.3/ Impact du calcium	243
C/ Discussion.....	243

CONCLUSION 244

Chapitre 2: Multiplication par voie asexuée: Bouturage et culture *in vitro* de deux espèces de Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*245

INTRODUCTION 245

I/ LE MACROBOUTURAGE DE *C. MACROPHYLLA* ET DE *G. PRUINOSA* 245

A/ Matériel et méthodes.....	246
A.1/ Origine et type d'explants	246
A.2/ Stérilisation des explants	246
A.3/ Ensemencement des explants	246
A.4/ Traitements appliqués aux boutures ensemencées	248
B/ Résultats et discussion.....	250
B.1/ Bouturage de <i>Cunonia macrophylla</i>	250
B.2/ Bouturage de <i>Geissois pruinosa</i>	252
C/ Conclusion	255

III/ LA CULTURE *IN VITRO* DE *C. MACROPHYLLA* ET DE *G. PRUINOSA*..... 255

A/ Culture <i>in vitro</i> de <i>Cunonia macrophylla</i>.....	256
A.1/ Matériel et méthodes	256
A.1.1/ Matériel végétal	256
A.1.2/ Désinfection du matériel végétal	257
A.1.3/ Mise en culture des explants.....	257
A.1.4/ Milieux de culture.....	258
A.1.5/ Culture en milieu liquide de cals et extraction de molécules bioactives.....	259
A.2/ Résultats et discussion.....	260
A.2.1/ Etape de désinfection.....	260
A.2.2/ Impact du type d'explant et de son positionnement dans le milieu de culture.....	260
A.2.3/ Repiquages et délai d'obtention des cals	261
B/ Culture <i>in vitro</i> de <i>Geissois pruinosa</i>.....	264
B.1/ Matériel et méthodes	264
B.1.1/ Matériel végétal	264
B.1.2/ Désinfection du matériel végétal	265
B.1.3/ Mise en culture des explants.....	265
B.1.4/ Milieux de culture.....	266
B.2/ Résultats et discussion	267
B.2.1/ Explants de tiges	267
B.2.2/ Explants de racines	270
B.2.3/ Explants de feuilles	270
B.3/ Récapitulatif des résultats obtenus pour la culture <i>in vitro</i> de l'espèce <i>G. pruinosa</i>	275
C/ Conclusion	275

BILAN ET PERSPECTIVES SUR LES VOIES ET MOYENS DE MULTIPLIER LES ESPÈCES *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 278

PARTIE V: Contribution à la connaissance du développement de deux Cunoniaceae: *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*.....279

INTRODUCTION 279

I/ CROISSANCE DE *GEISSOIS PRUINOSA* SUR DIFFÉRENTS TYPES DE SOLS. 280

A/ Matériel et méthodes..... 280

B/ Résultats et discussion..... 282

B.1/ Capacité de rétention des sols..... 282

B.2/ Taux de germination/levée 283

B.3/ Croissance des plants..... 284

II/ EFFET DU NICKEL SUR LA CROISSANCE DE *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA* 286

A/ Matériel et méthodes..... 286

B/ Résultats et discussion..... 287

III/ SUIVI MORPHOLOGIQUE DE *GEISSOIS PRUINOSA* ET *CUNONIA MACROPHYLLA*..... 289

A/ Matériel et méthodes..... 289

A.1/ Récolte et stockage des graines 289

A.2/ Conditions standards de germination 290

A.3/ Conditions standards sélectionnées pour le développement de la plantule 290

A.4/ Relevés et dessins effectués 290

B/ Résultats et Discussion 290

B.1/ Description de l'état adulte..... 290

B.1.1/ *Geissois pruinosa*..... 291

B.1.2/ *Cunonia macrophylla* 291

B.2/ Description morphologique au cours du temps 291

B.2.1/ *Geissois pruinosa*..... 292

B.2.1.1/ De la graine à la plantule..... 292

B.2.1.2/ De la plantule à l'état adulte..... 292

B.2.2/ *Cunonia macrophylla* 297

B.2.2.1/ De la graine à la plantule..... 297

B.2.2.2/ De la plantule à l'état adulte..... 297

C/ Comparaison des deux espèces 299

CONCLUSION GENERALE.....303

BIBLIOGRAPHIE.....307

TABLE DES MATIERES.....	321
--------------------------------	------------

ANNEXES

ANNEXE I: RESULTATS DES TESTS PRELIMINAIRES CHIMIQUES.....	A1
ANNEXE II: RENDEMENTS DES EXTRACTIONS AU METHANOL ET A L'ACETATE D'ETHYLE.....	A13
ANNEXE III: COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE MICROBIENS.....	A24
ANNEXE IV: PROFILS D'ELUTIONS ET SPECTRES ULTRAVIOLETS DES MOLECULES PURIFIEES.....	A25

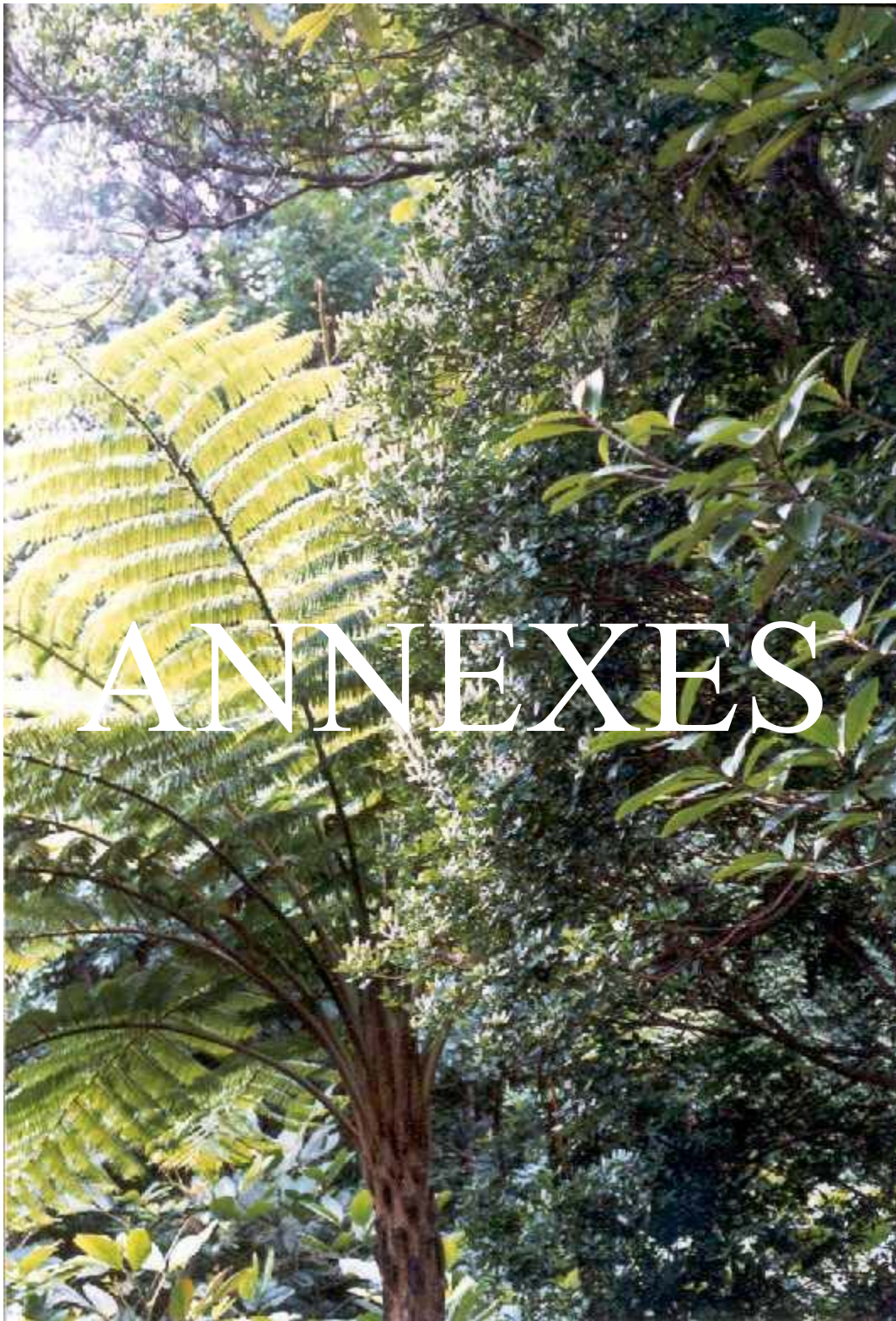


Photo de la forêt du Koghis, au premier plan *Cunonia linearisepala* (2001)

ANNEXE I :
RESULTATS BRUTS DES TESTS PRELIMINAIRES CHIMIQUES

I/ Résultats des tests préliminaires de mise en évidence des terpénoïdes

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Acsmithia</i>					
<i>austrocaledonica</i>	Lit 0114	F	500	Vert	mauve => vert
		E	250	Orange	mauve => vert
<i>collina</i>	Lit 0116	F	>1000	Vert	mauve => vert
		E	>1000	Jaune	mauve => vert
<i>elliptica</i>	BF 058	F	500	Brun	mauve => brun
		E	>1000	Orange	mauve => brun
<i>meridionalis</i>	BF 070	F	500	Jaune orangé	mauve => brun
		E	500	Jaune orangé	rouge => brun rouge
<i>pedunculata</i>	BF 069	F	500	Jaune	brun => brun orangé
		E	>1000	Rose Violet	brun => brun rosé
<i>pubescens</i>	BF 034	F	500	Brun	mauve => brun
		E	>1000	Orange	mauve => brun

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Codia</i>					
<i>albifrons</i>	BF 083	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>arborea</i>	BF 014	F	165	Orange	bleu => mauve
		E	<100	Orange	mauve => brun
<i>discolor</i>	BF 055	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
		Fl	Nd	Nd	Nd
<i>ferruginea</i>	BF 088	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>incrassata</i>	BF 036	F	<100	Brun	mauve => vert
		E	<100	Orange	mauve => rosé
		R	<100	Orange	mauve => rosée
<i>montana</i>	BF 037	F	125	Orange	mauve => brun
		E	100	Orange	mauve => brun
		R	<100	Orange	mauve => brun
<i>nitida</i>	BF 062	F	<100	Orange	mauve => rosée
		E	250	Orange	mauve => brun
<i>sp nov.</i>	BF 084	F	<100	Orange	mauve => brun
		E	250	Orange	mauve => brun

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Cunonia</i>					
<i>alticola</i>	BF 059	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>aoupiniensis</i>	Lit 048	F	165	Vert	mauve => vert
<i>atrorubens</i>	BF 052	F	<100	Vert	brun => vert
		E	<100	Vert	brun => vert
<i>austrocaledonica</i>	BF 079	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>bullata</i>	BF 067	F	100	Violet brun	mauve => brun
		E	<100	Jaune orangé	mauve => brun
<i>balansae</i>	BF 054	F	<100	Orange	brun => vert
		E	<100	Orange	brun => vert
		Fr	<100	Orange	brun => vert
<i>deplanchei</i>	BF 017	F	<100	Orange	mauve => vert
		E	<100	Orange	mauve => vert
<i>lenormandii</i>	BF 066	F	100	Jaune	brun => vert
		E	<100	Orange	brun => vert
<i>linearisepala</i>	BF 081	F	<100	Orange	brun => vert
		E	100	Jaune	brun => vert
<i>macrophylla</i>	BF 075	F	100	Jaune	brun => orange
		E	<100	Jaune	brun => orange
		Fl	100	Jaune	brun => orange

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Cunonia</i>					
<i>montana</i>	BF 057	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>pulchella</i>	BF 035	F	100	Brun	brun => vert
		E	<100	vert-jaune	brun => orange
<i>pteroxylla</i>	BF 013	F	100	Orange	bleu => vert
		E	<100	Orange	bleu => vert
<i>purpurea</i>	BF 048	F	<100	Brun	mauve => rosé
		E	100	Rosé	mauve => vert
<i>rotundifolia</i>	BF 068	F	100	brun	mauve => rosé
<i>varijuga</i>	BF 028	F	200	Vert	bleu => vert
		E	100	Orange	orange => brun
<i>vieillardii</i>	BF 089	F	100	Orange	bleu => vert
		E	200	Orange	bleu => vert
<i>Geissois</i>					
<i>hippocasteinofolia</i>	BF 023	F	<100	Brun	brun => mauve
		E	<100	Brun	brun => mauve
<i>hirsuta</i>	BF 029	F	<100	Brun	mauve => vert
		E	<100	Rosé	mauve => rosé
<i>polyphylla</i>	BF 038	F	100	Vert	brun => vert
		E	<100	Rosé	brun => vert

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Geissois</i>					
<i>pruinosa</i>	BF 015	F	<100	Orange	mauve => vert
		E	<100	Orange	mauve => bleu
<i>magnifica</i>	BF 024	F	<100	Orange	mauve => vert
		E	<100	Orange	mauve => vert
<i>Weinmannia</i>					
<i>dichotoma</i>	BF 040	F	100	Brun	mauve => rosé
		E	125	Brun	mauve => vert
<i>monticola</i>	BF 039	F	100	Brun	mauve => rosée
		E	125	Brun	mauve => vert
<i>Pancheria</i>					
<i>alaternoides</i>	BF 012	F	<100	Orange	mauve => vert
		E	<100	Orange	vert clair => vert foncé
<i>brunhesii</i>	BF 016	F	125	Vert	mauve => vert
		E	<100	Brun	vert clair => vert foncé
<i>communis</i>	BF 082	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST SAPONOSIDES	TEST TRITERPENES ET/OU STEROIDES	
				H ₂ SO ₄	Liebermann-Burchard
<i>Pancheria</i>					
<i>confusa</i>	BF 021	F	125	Orange	bleu => mauve
		E	<100	Vert	bleu => brun
<i>elegans</i>	BF 078	F	100	Orange	mauve => vert
		E	250	Orange	mauve => vert
<i>elliptica</i>	BF 020	F	100	Orange	mauve => bleu
		E	<100	Orange	brun => mauve
<i>engleriana</i>	BF 056	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>ferruginea</i>	BF 061	F	100	Orange	mauve => brun
		E	100	Orange	mauve => brun
<i>hirsuta</i>	BF 022	F	<100	Orange	mauve => vert
		E	<100	Orange	mauve => vert
<i>obovata</i>	BF 051	F	<100	Brun	mauve => brun
		E	<100	Brun	mauve => brun
<i>phylliraeoides</i>	BF 085	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>reticulata</i>	BF 060	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd
<i>sebertyi</i>	BF 086	F	125	Vert	mauve => vert
		E	100	Rosée	mauve => vert
<i>vieillardii</i>	BF 087	F	Nd	Nd	Nd
		E	Nd	Nd	Nd

III/ Résultats des tests préliminaires de mise en évidence des polyphénols

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Acsmithia</i>					
<i>austrocaledonica</i>	Lit 0114	F	+	+	+++
		E	+	+	++
<i>collina</i>	Lit 0116	F	+	+	++
		E	+	+	+
<i>elliptica</i>	BF 058	F	+	++	-
		E	+	+	+
<i>meridionalis</i>	BF 070	F	+	-	+++
		E	+	+	++
<i>pedunculata</i>	BF 069	F	+	+	+
		E	+	+	-
<i>pubescens</i>	BF 034	F	+	+	++
		E	+	+	++
<i>Codia</i>					
<i>albifrons</i>	BF 083	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>arborea</i>	BF 014	F	+	++	++
		E	+	++	+
<i>discolor</i>	BF 055	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
		Fl	+	Nd	Nd

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Codia</i>					
<i>ferruginea</i>	BF 088	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>incrassata</i>	BF 036	F	+	++	++
		E	+	++	+
		Rac	+	++	+
<i>montana</i>	BF 037	F	+	++	++
		E	+	++	+
		Rac	+	++	+
<i>nitida</i>	BF 062	F	+	++	+
		E	+	+	++
<i>sp nov.</i>	BF 084	F	+	+++	++
		E	+	++	+
<i>Cunonia</i>					
<i>alticola</i>	BF 059	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>aoupiniensis</i>	Lit 048	F	+	+++	+
<i>atrorubens</i>	BF 052	F	+	+++	+
		E	+	+++	+
<i>austrocaledonica</i>	BF 079	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Cunonia</i>					
<i>bullata</i>	BF 067	F	+	+++	+
		E	+	++	-
<i>balansae</i>	BF 054	F	+	++	++
		E	+	+	+
		Fr	+	++	++
<i>deplanchei</i>	BF 017	F	+	+	+++
		E	+	++	++
<i>lenormandii</i>	BF 066	F	+	++	++
		E	+	++	+
<i>linearisepala</i>	BF 081	F	+	++	-
		E	+	+	+
<i>macrophylla</i>	BF 075	F	+	+++	++
		E	+	++	+
		Fl	+	+++	++
<i>montana</i>	BF 057	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>pulchella</i>	BF 035	F	+	+	+
		E	+	++	+
<i>pterophylla</i>	BF 013	F	+	++	++
		E	+	+	+
<i>purpurea</i>	BF 048	F	+	++	++
		E	+	+	+

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Cunonia</i>					
<i>rotundifolia</i>	BF 068	F	+	Nd	Nd
<i>varijuga</i>	BF 028	F	+	++	++
		E	+	++	+
<i>vieillardii</i>	BF 089	F	+	+	-
		E	+	+	++
<i>Geissois</i>					
<i>hippocasteinofolia</i>	BF 023	F	+	+	+
		E	+	+	+
<i>hirsuta</i>	BF 029	F	+	+	++
		E	+	+++	+
<i>polyphylla</i>	BF 038	F	+	+++	++
		E	+	+++	+
<i>pruinosa</i>	BF 015	F	+	+	++
		E	+	++	+
<i>magnifica</i>	BF 024	F	+	+	++
		E	+	++	+

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Weinmannia</i>					
<i>dichotoma</i>	BF 040	F	+	+	+++
		E	+	+	++
<i>monticola</i>	BF 039	F	+	+	+++
		E	+	+	++
<i>Pancheria</i>					
<i>alaternoides</i>	BF 012	F	+	+++	++
		E	+	+++	+
<i>brunhesii</i>	BF 016	F	+	+	+++
		E	+	++	++
<i>communis</i>	BF 082	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>confusa</i>	BF 021	F	+	++	++
		E	+	+	+
<i>elegans</i>	BF 078	F	+	+	-
		E	+	+	-

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	TEST TANINS	TEST FLAVONOÏDES	TEST QUINONES
<i>Pancheria</i>					
<i>elliptica</i>	BF 020	F	+	++	+++
		E	+	+++	++
<i>engleriana</i>	BF 056	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>ferruginea</i>	BF 061	F	+	++	+
		E	+	+	+++
<i>hirsuta</i>	BF 022	F	+	+	++
		E	+	+	+
<i>obovata</i>	BF 051	F	+	+	++
		E	+	+	+
<i>phylliraeoides</i>	BF 085	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>reticulata</i>	BF 060	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd
<i>sebertii</i>	BF 086	F	+	++	++
		E	+	+	+
<i>vieillardii</i>	BF 087	F	+	Nd	Nd
		E	+	Nd	Nd

Nd : Résultats non déterminés

**ANNEXE II :
RENDEMENTS DES EXTRACTIONS AU METHANOL
ET A L'ACETATE D'ETHYLE**

I/ Rendements des extractions au méthanol

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Acsmithia</i>						
<i>austrocaledonica</i>	Lit 0114	F	FO 2-3	20	0,49	2,45%
		E	FO 2-4	20	0,46	2,30%
<i>collina</i>	Lit 0116	F	FO 2-5	20	0,93	4,65%
		E	FO 2-6	20	0,38	1,90%
<i>elliptica</i>	BF 058	F	FO 5-16	20	2,89	14,45%
		E	FO 5-17	50	8,53	17,06%
<i>meridionalis</i>	BF 070	F	FO 6-10	20	1,46	7,30%
		E	FO 6-11	20	1,13	5,65%
<i>pedunculata</i>	BF 069	F	FO 6-8	20	1,03	5,16%
		E	FO 6-9	20	0,79	3,94%
<i>pubescens</i>	BF 034	F	FO 4-7	20	2,60	13,00%
		E	FO 4-8	20	3,35	16,75%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Codia</i>						
<i>albifrons</i>	BF 083	F	FO 7-5	5	0,42	8,46%
		E	FO 7-6	10	0,47	4,70%
<i>arborea</i>	BF 014	F	FO 1-13	50	3,62	7,24%
		E	FO 1-14	50	2,08	4,16%
<i>discolor</i>	BF 055	F	FO 5-9	20	2,32	11,60%
		E	FO 5-10	20	3,26	16,30%
		Fl	FO 5-11	20	0,68	3,40%
<i>ferruginea</i>	BF 088	F	FO 7-15	10	0,92	9,25%
		E	FO 7-16	10	0,82	8,20%
<i>incrassata</i>	BF 036	F	FO 4-11	20	3,08	15,40%
		E	FO 4-12	20	2,32	11,60%
		Rac	FO 4-13	20	1,85	9,25%
<i>montana</i>	BF 037	F	FO 4-14	20	1,80	9,00%
		E	FO 4-15	20	0,80	4,00%
		Rac	FO 4-16	20	2,70	13,50%
<i>nitida</i>	BF 062	F	FO 5-24	20	3,20	16,00%
		E	FO 5-25	20	2,04	10,20%
<i>sp nov.</i>	BF 084	F	FO 7-7	5	0,65	12,90%
		E	FO 7-8	5	0,29	5,83%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Cunonia</i>						
<i>alticola</i>	BF 059	F	FO 5-18	20	5,68	28,40%
		E	FO 5-19	20	1,91	9,55%
<i>aoupiniensis</i>	Lit 048	F	FO 1-26	10	0,24	2,38%
<i>atrorubens</i>	BF 052	F	FO 5-1	20	2,50	12,50%
		E	FO 5-2	20	2,60	13,00%
<i>austrocaledonica</i>	BF 079	F	FO 6-22	5	0,45	9,00%
		E	FO 6-23	5	0,03	0,60%
<i>bullata</i>	BF 067	F	FO 6-5	10	0,43	4,30%
		E	FO 6-6	10	0,32	3,20%
<i>balansae</i>	BF 054	F	FO 5-6	20	1,95	9,75%
		E	FO 5-7	20	1,97	9,85%
		Fr	FO 5-8	20	1,07	5,35%
<i>deplanchei</i>	BF 017	F	FO 1-18	10	0,56	5,63%
		E	FO 1-19	10	0,28	2,77%
<i>lenormandii</i>	BF 066	F	FO 6-3	10	0,76	7,60%
		E	FO 6-4	10	0,22	2,15%
<i>linearisepala</i>	BF 081	F	FO 7-1	5	0,44	8,78%
		E	FO 7-2	5	0,19	3,82%
<i>macrophylla</i>	BF 075	F	FO 5-3	50	5,76	11,52%
		E	FO 5-4	50	2,53	5,06%
		Fl	FO 5-5	20	3,60	18,00%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Cunonia</i>						
<i>montana</i>	BF 057	F	FO 5-14	20	2,05	10,25%
		E	FO 5-15	20	3,28	16,40%
<i>pulchella</i>	BF 035	F	FO 4-9	20	1,60	8,00%
		E	FO 4-10	20	2,20	11,00%
<i>pterothylla</i>	BF 013	F	FO 1-11	50	1,95	3,90%
		E	FO 1-12	50	2,35	4,70%
<i>purpurea</i>	BF 048	F	FO 4-23	20	2,00	10,00%
		E	FO 4-24	20	2,00	10,00%
<i>rotundifolia</i>	BF 068	F	FO 6-7	10	0,71	7,10%
<i>varijuga</i>	BF 028	F	FO 4-5	20	1,51	7,55%
		E	FO 4-6	20	1,89	9,45%
<i>vieillardii</i>	BF 089	F	FO 7-17	10	1,06	10,58%
		E	FO 7-18	10	0,30	3,00%
<i>Geissois</i>						
<i>hippocasteinofolia</i>	BF 023	F	FO 4-1	20	3,60	18,00%
		E	FO 4-2	20	2,90	14,50%
<i>hirsuta</i>	BF 029	F	FO 2-17	5	0,15	3,00%
		E	FO 2-18	5	0,17	3,40%
<i>polyphylla</i>	BF 038	F	FO 4-17	20	1,71	8,55%
		E	FO 4-18	20	2,05	10,25%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Geissois</i>						
<i>pruinosa</i>	BF 015	F	FO 1-15	50	2,41	4,82%
		E	FO 1-16	50	2,95	5,90%
<i>magnifica</i>	BF 024	F	FO 4-3	20	1,70	8,50%
		E	FO 4-4	20	2,40	12,00%
<i>Weinmannia</i>						
<i>dichotoma</i>	BF 040	F	FO 4-21	20	2,55	12,75%
		E	FO 4-22	20	2,88	14,40%
<i>monticola</i>	BF 039	F	FO 4-19	20	2,75	13,75%
		E	FO 4-20	20	2,72	13,60%
<i>Pancheria</i>						
<i>alaternoides</i>	BF 012	F	FO 1-9	50	6,47	12,94%
		E	FO 1-10	50	5,66	11,32%
<i>brunhesii</i>	BF 016	F	FO 2-21	20	0,88	4,40%
		E	FO 2-22	20	0,76	3,80%
<i>communis</i>	BF 082	F	FO 7-3	10	0,81	8,13%
		E	FO 7-4	10	0,65	6,47%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (g)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Pancheria</i>						
<i>confusa</i>	BF 021	F	FO 3-17	20	2,73	13,65%
		E	FO 3-18	20	2,43	12,15%
<i>elegans</i>	BF 078	F	FO 6-20	10	1,03	10,31%
		E	FO 6-21	10	0,38	3,80%
<i>elliptica</i>	BF 020	F	FO 3-15	20	2,38	11,90%
		E	FO 3-16	20	2,05	10,25%
<i>engleriana</i>	BF 056	F	FO 5-12	20	1,94	9,70%
		E	FO 5-13	20	2,64	13,20%
<i>ferruginea</i>	BF 061	F	FO 5-22	20	3,07	15,35%
		E	FO 5-23	20	2,27	11,35%
<i>hirsuta</i>	BF 022	F	FO 3-19	20	2,52	12,60%
		E	FO 3-20	20	0,44	2,20%
<i>obovata</i>	BF 051	F	FO 4-25	20	2,00	10,00%
		E	FO 4-26	20	2,00	10,00%
<i>phylliraeoides</i>	BF 085	F	FO 7-9	5	0,56	11,20%
		E	FO 7-10	10	1,27	12,71%
<i>reticulata</i>	BF 060	F	FO 5-20	20	3,95	19,75%
		E	FO 5-21	20	2,68	13,40%
<i>sebertii</i>	BF 086	F	FO 7-11	5	0,46	9,18%
		E	FO 7-12	10	0,55	5,48%
<i>vieillardii</i>	BF 087	F	FO 7-13	10	0,79	7,86%
		E	FO 7-14	10	0,80	8,04%

III/ Rendements des extractions à l'acétate d'éthyle

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (mg)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Acsmithia</i>						
<i>elliptica</i>	BF 058	F	HL 3-17	5	114,20	2,28%
		E	HL 3-18	5	116,40	2,33%
<i>meridionalis</i>	BF 070	F	HL 4-10	5	330,30	6,61%
		E	HL 4-11	5	164,30	3,29%
<i>pedunculata</i>	BF 069	F	HL 4-8	5	92,90	1,86%
		E	HL 4-9	5	73,20	1,46%
<i>pubescens</i>	BF 034	F	HL 2-11	5	140,80	2,82%
		E	HL 2-12	5	189,00	3,78%
<i>Codia</i>						
<i>albifrons</i>	BF 083	F	HL 5-5	5	123,30	2,47%
		E	HL 5-6	10	52,10	0,52%
<i>arborea</i>	BF 014	F	HL 1-13	5	41,80	0,84%
		E	HL 1-14	5	35,30	0,71%
<i>discolor</i>	BF 055	F	HL 3-10	5	91,80	1,84%
		E	HL 3-11	5	86,10	1,72%
		F1	HL 3-12	5	21,80	0,44%
<i>ferruginea</i>	BF 088	F	HL 5-19	5	114,00	2,28%
		E	HL 5-20	10	65,60	0,66%
<i>incrassata</i>	BF 036	F	HL 2-15	5	62,50	1,25%
		E	HL 2-16	5	53,30	1,07%
		Rac	HL 2-17	5	56,60	1,13%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (mg)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Codia</i>						
<i>montana</i>	BF 037	F	HL 2-18	5	86,90	1,74%
		E	HL 2-19	5	87,70	1,75%
		Rac	HL 2-20	5	50,40	1,01%
<i>nitida</i>	BF 062	F	HL 3-25	5	90,50	1,81%
		E	HL 3-26	5	52,90	1,06%
<i>sp nov.</i> petites feuilles	BF 084	F	HL 5-7	5	52,80	1,06%
		E	HL 5-8	5	75,50	1,51%
<i>Cunonia</i>						
<i>alticola</i>	BF 059	F	HL 3-19	5	105,20	2,10%
		E	HL 3-20	5	41,90	0,84%
<i>aoupiniensis</i>	Lit 048	F	HL 5-17	5	147,00	2,94%
<i>atrorubens</i>	BF 052	F	HL 4-1	5	197,10	3,94%
		E	HL 4-2	5	112,00	2,24%
<i>austrocaledonica</i>	BF 079	F	HL 4-22	5	113,50	2,27%
		E	HL 4-23	5	43,10	0,86%
<i>bullata</i>	BF 067	F	HL 4-5	5	200,10	4,00%
		E	HL 4-6	5	84,20	1,68%
<i>balansae</i>	BF 054	F	HL 3-7	5	84,10	1,68%
		E	HL 3-8	5	61,40	1,23%
		Fr	HL 3-9	5	68,80	1,38%
<i>deplanchei</i>	BF 017	F	HL 1-18	5	193,70	3,87%
		E	HL 1-19	5	31,70	0,63%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (mg)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Cunonia</i>						
<i>lenormandii</i>	BF 066	F	HL 4-3	5	67,80	1,36%
		E	HL 4-4	5	208,40	4,17%
<i>linearisepala</i>	BF 081	F	HL 5-1	5	128,30	2,57%
		E	HL 5-2	5	96,70	1,93%
<i>macrophylla</i>	BF 075	F	HL 4-16	10	237,50	2,38%
		E	HL 1-4	5	33,80	0,68%
		Fl	HL 4-17	10	231,30	2,31%
<i>montana</i>	BF 057	F	HL 3-15	5	43,80	0,88%
		E	HL 3-16	5	36,70	0,73%
<i>pulchella</i>	BF 035	F	HL 2-13	5	54,80	1,10%
		E	HL 2-14	5	31,50	0,63%
<i>pterophylla</i>	BF 013	F	HL 1-11	5	42,00	0,84%
		E	HL 1-12	5	29,70	0,59%
<i>purpurea</i>	BF 048	F	HL 3-1	5	66,20	1,32%
		E	HL 3-2	5	69,70	1,39%
<i>rotundifolia</i>	BF 068	F	HL 4-7	5	42,20	0,84%
<i>varijuga</i>	BF 028	F	HL 2-9	5	35,00	0,70%
		E	HL 2-10	5	13,70	0,27%
<i>vieillardii</i>	BF 089	F	HL 5-21	5	217,10	4,34%
		E	HL 5-22	10	50,70	0,51%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (mg)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Geissois</i>						
<i>hippocasteinofolia</i>	BF 023	F	HL 2-5	5	75,30	1,51%
		E	HL 2-6	5	18,20	0,36%
<i>hirsuta</i>	BF 029	F	HL 5-15	5	68,00	1,36%
		E	HL 5-16	5	151,30	3,03%
<i>polyphylla</i>	BF 038	F	HL 2-21	5	70,70	1,41%
		E	HL 2-22	5	19,50	0,39%
<i>pruinosa</i>	BF 015	F	HL 1-15	5	126,60	2,53%
		E	HL 1-16	5	20,60	0,41%
<i>magnifica</i>	BF 024	F	HL 2-7	5	53,40	1,07%
		E	HL 2-8	5	34,70	0,69%
<i>Weinmannia</i>						
<i>dichotoma</i>	BF 040	F	HL 2-25	50	2210,00	4,42%
		E	HL 2-26	50	2932,00	5,86%
<i>monticola</i>	BF 039	F	HL 2-23	50	2605,00	5,21%
		E	HL 2-24	50	3292,00	6,58%
<i>Pancheria</i>						
<i>alaternoides</i>	BF 012	F	HL 1-9	5	81,60	1,63%
		E	HL 1-10	5	41,20	0,82%
<i>communis</i>	BF 082	F	HL 5-3	5	133,50	2,67%
		E	HL 5-4	10	60,80	0,61%

ESPECE	REFERENCE BOTANIQUE	PARTIE TESTEE	REFERENCE DE L'EXTRAIT	POIDS DE POUDRE VEGETALE (g)	POIDS D'EXTRAIT OBTENU (mg)	RENDEMENT D'EXTRACTION
<i>Pancheria</i>						
<i>confusa</i>	BF 021	F	HL 2-1	5	66,20	1,32%
		E	HL 2-2	5	66,10	1,32%
<i>elegans</i>	BF 078	F	HL 4-20	5	197,60	3,95%
		E	HL 4-21	5	56,20	1,12%
<i>elliptica</i>	BF 020	F	HL 1-24	5	194,80	3,90%
		E	HL 1-25	5	62,50	1,25%
<i>engleriana</i>	BF 056	F	HL 3-13	5	89,80	1,80%
		E	HL 3-14	5	33,50	0,67%
<i>ferruginea</i>	BF 061	F	HL 3-23	20	574,00	2,87%
		E	HL 3-24	20	318,00	1,59%
<i>hirsuta</i>	BF 022	F	HL 2-3	5	164,30	3,29%
		E	HL 2-4	5	24,90	0,50%
<i>obovata</i>	BF 051	F	HL 3-3	5	200,90	4,02%
		E	HL 3-4	5	43,80	0,88%
<i>phylliraeoides</i>	BF 085	F	HL 5-9	5	313,10	6,26%
		E	HL 5-10	10	50,70	0,51%
<i>reticulata</i>	BF 060	F	HL 3-21	5	215,50	4,31%
		E	HL 3-22	5	29,20	0,58%
<i>sebertii</i>	BF 086	F	HL 5-11	5	292,20	5,84%
		E	HL 5-12	10	144,00	1,44%
<i>vieillardii</i>	BF 087	F	HL 5-13	5	258,70	5,17%
		E	HL 5-14	10	148,70	1,49%

F : Feuilles ; E : Ecorce ; R : Racines ; Fl : Fleurs ; Fr : Fruits

ANNEXE III : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE MICROBIENS

Composition des milieux

Milieu Mueller-Hinton (MH) :

Extrait de viande	3 g
Hydrolysât de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	qsp 1 litre
pH	7,4

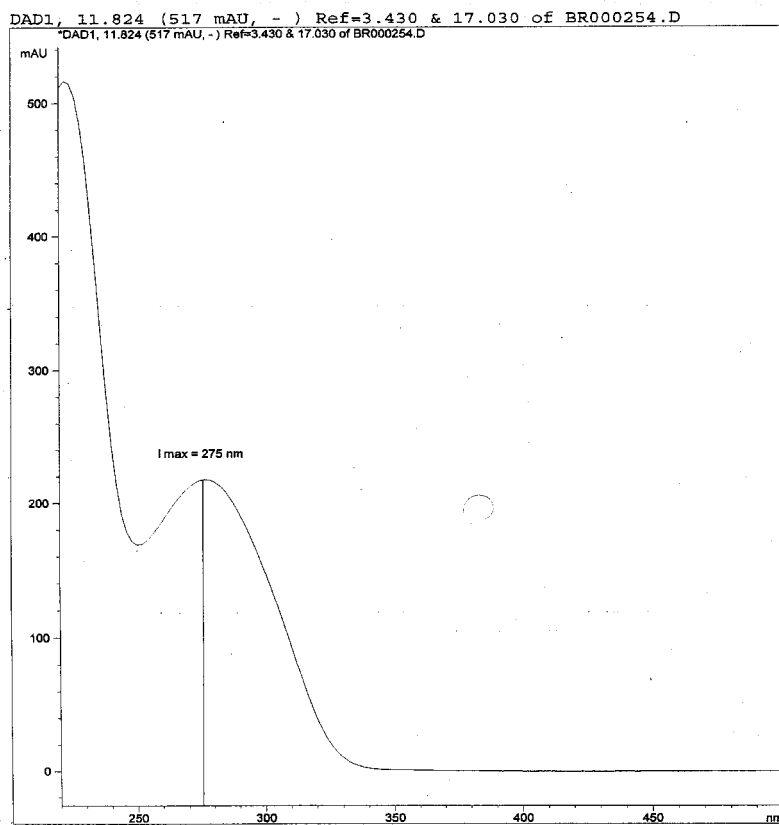
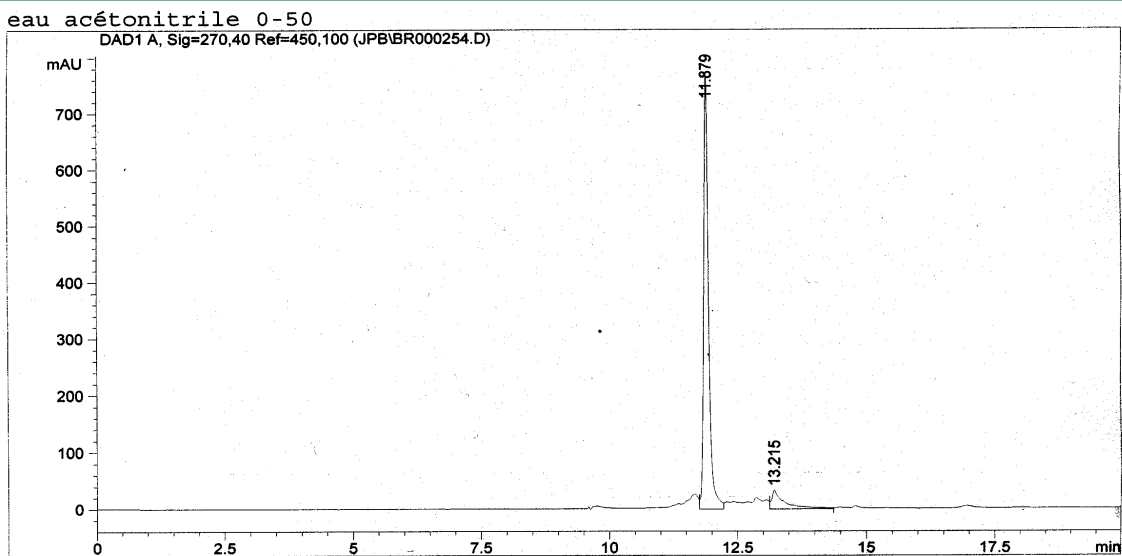
Milieu PELG :

Peptone	5 g
Extrait de levure	2 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1 litre
pH	7

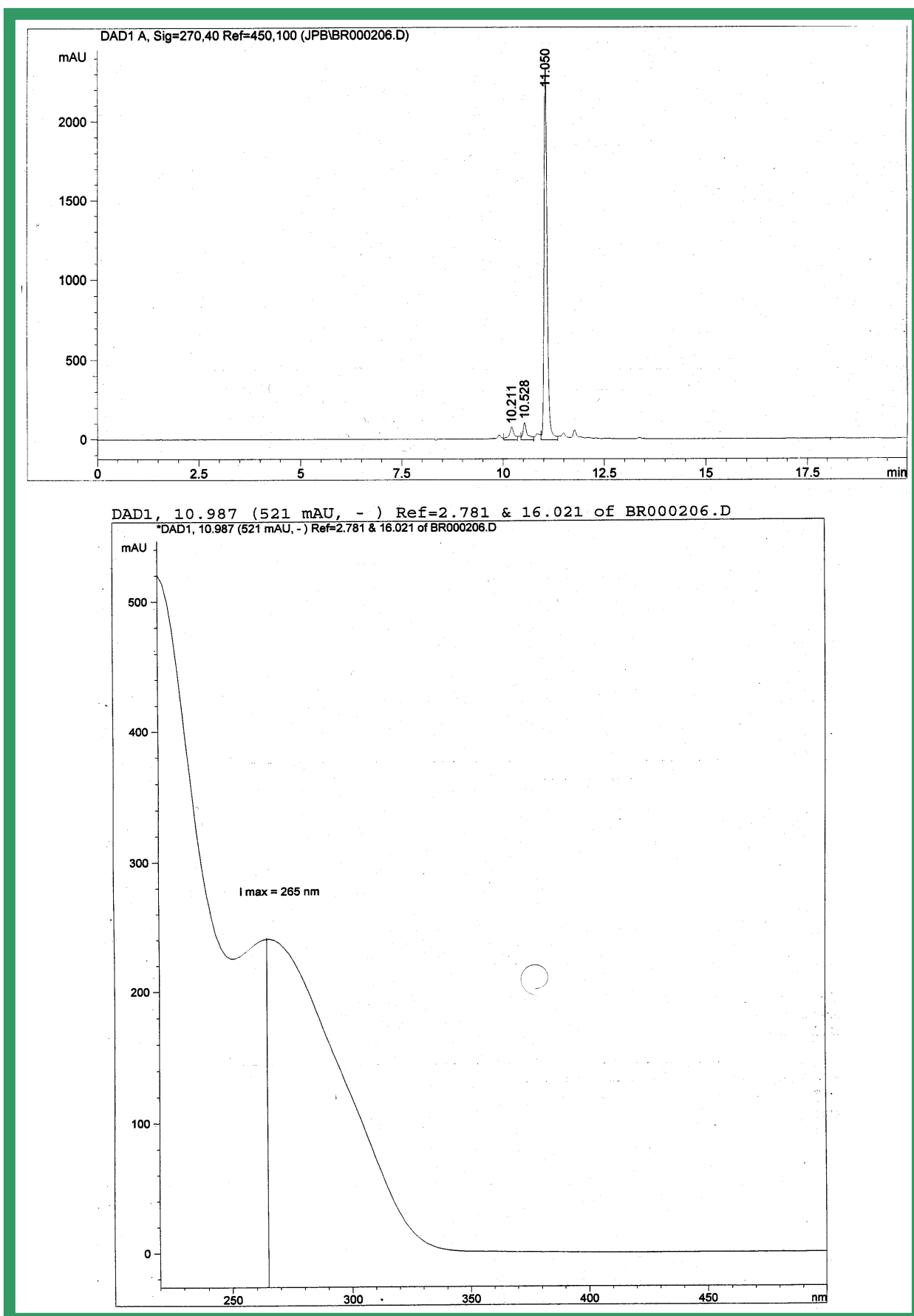
Milieu Malt :

Extrait de Malt	10 g
Glucose	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1 litre
pH	6

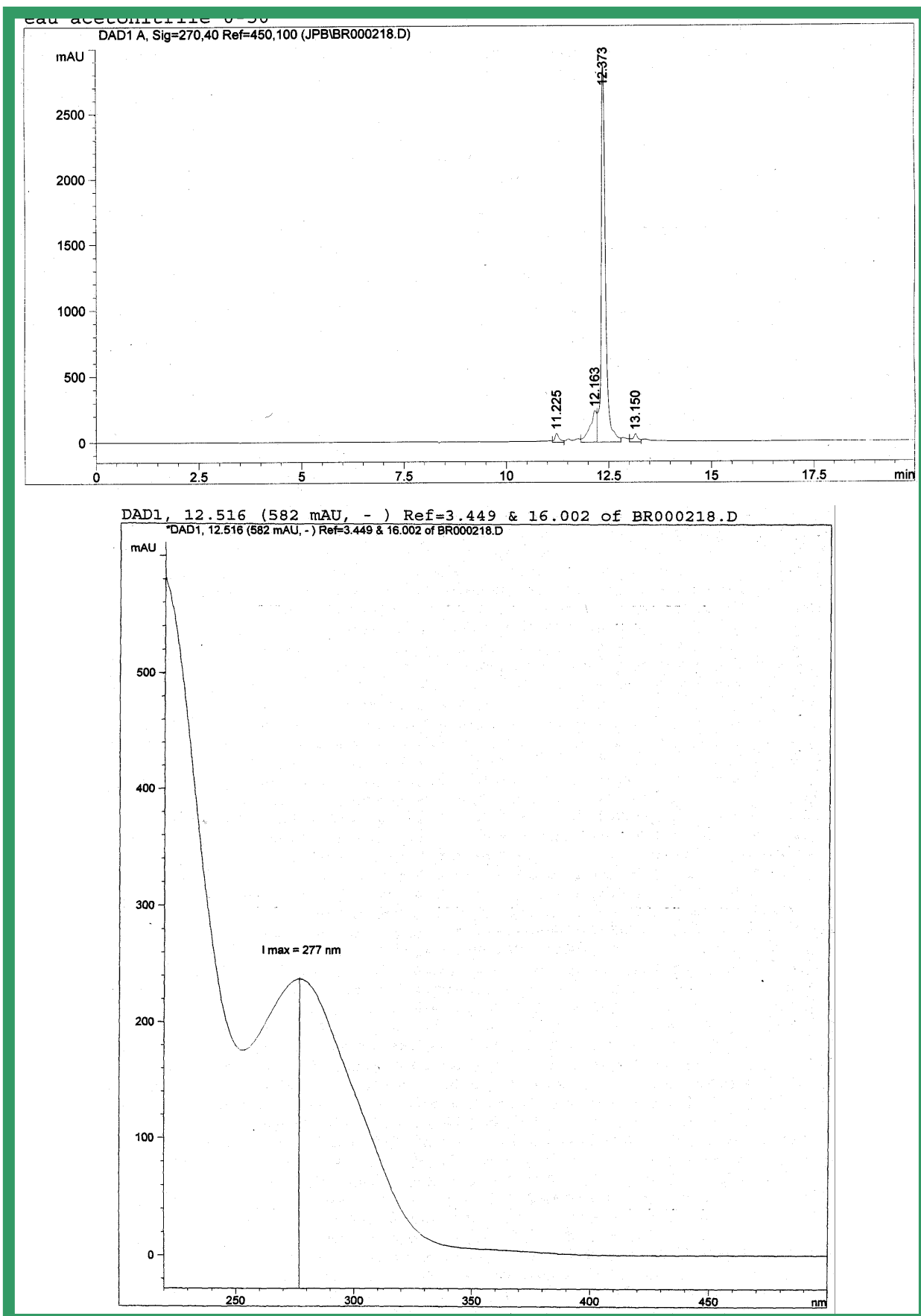
ANNEXE IV : PROFILS D'ELUTIONS ET SPECTRES ULTRAVIOLETS DES MOLECULES PURIFIEES



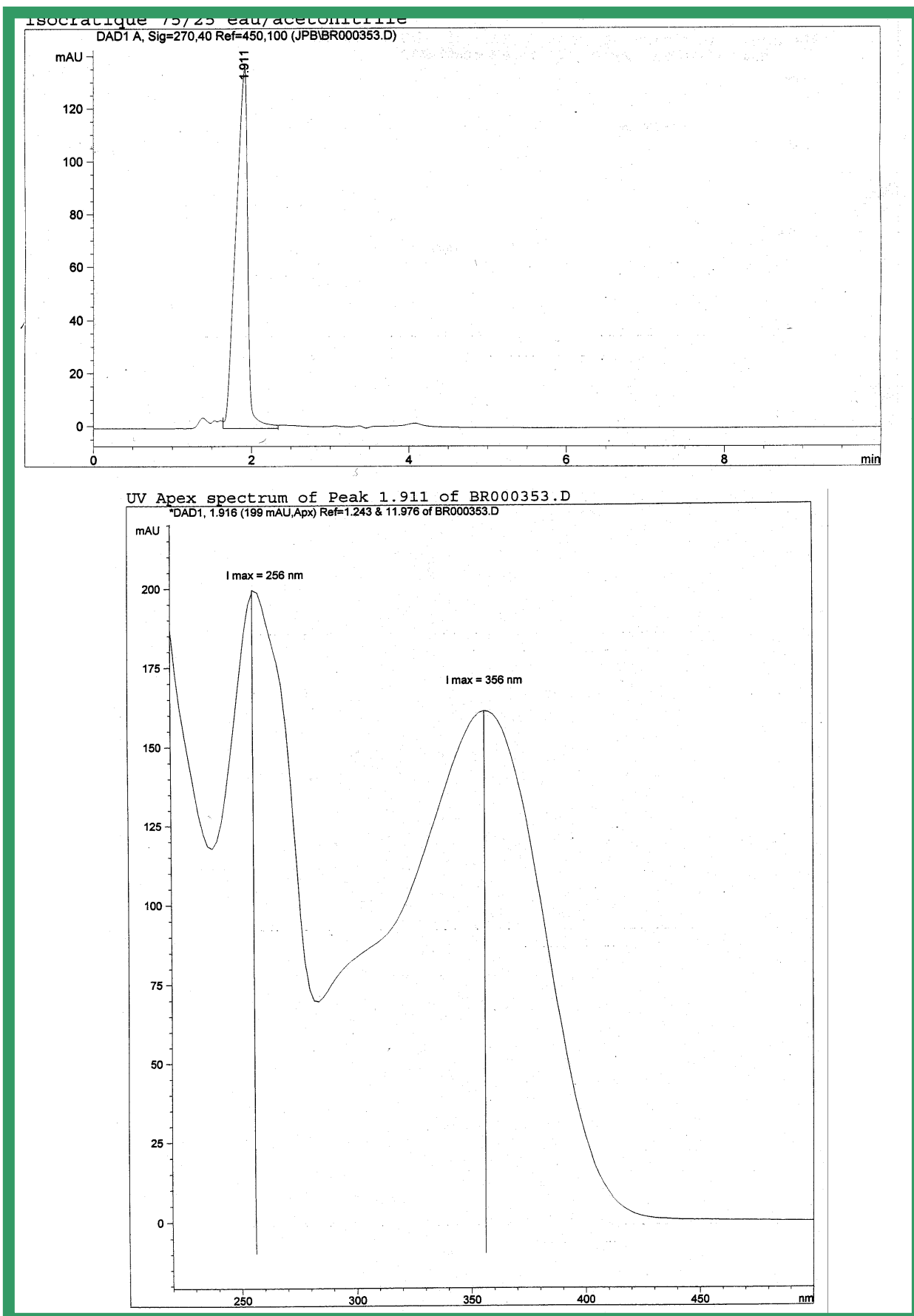
Annexe IV- 1: Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM17, obtenus par analyse HPLC.



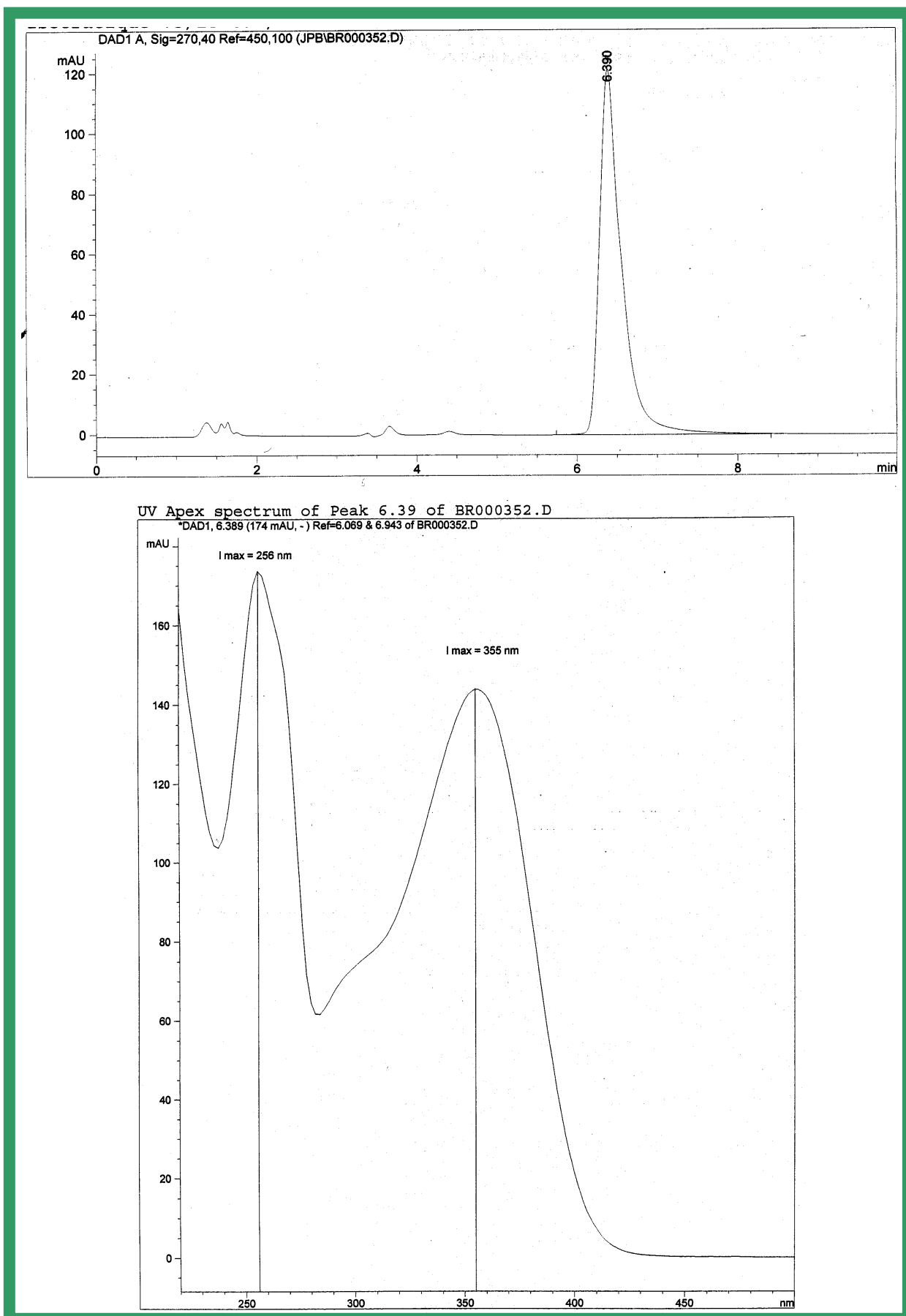
Annexe IV- 2: Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM 18, obtenus par analyse HPLC.



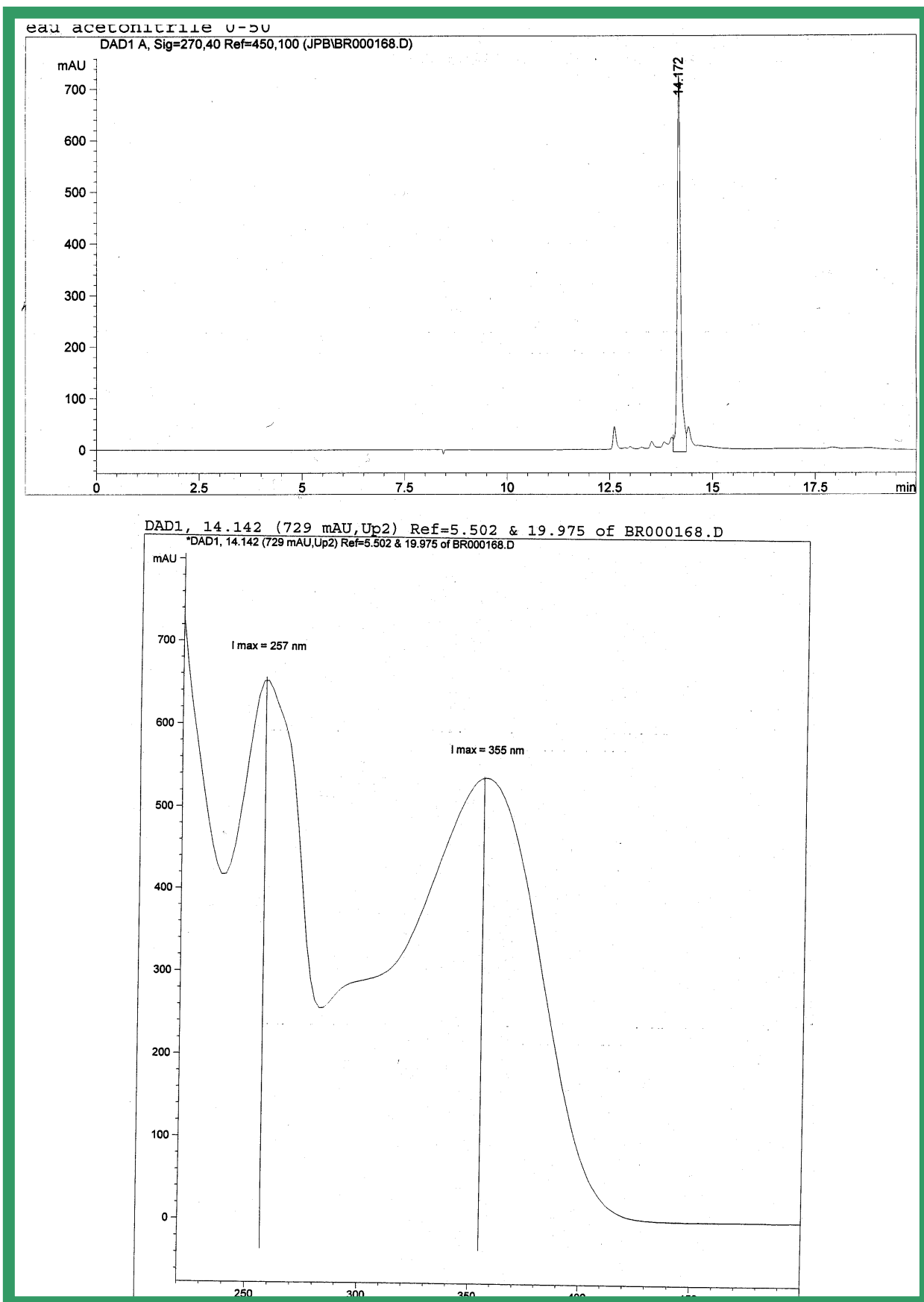
Annexe IV- 3 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM24, obtenus par analyse HPLC.



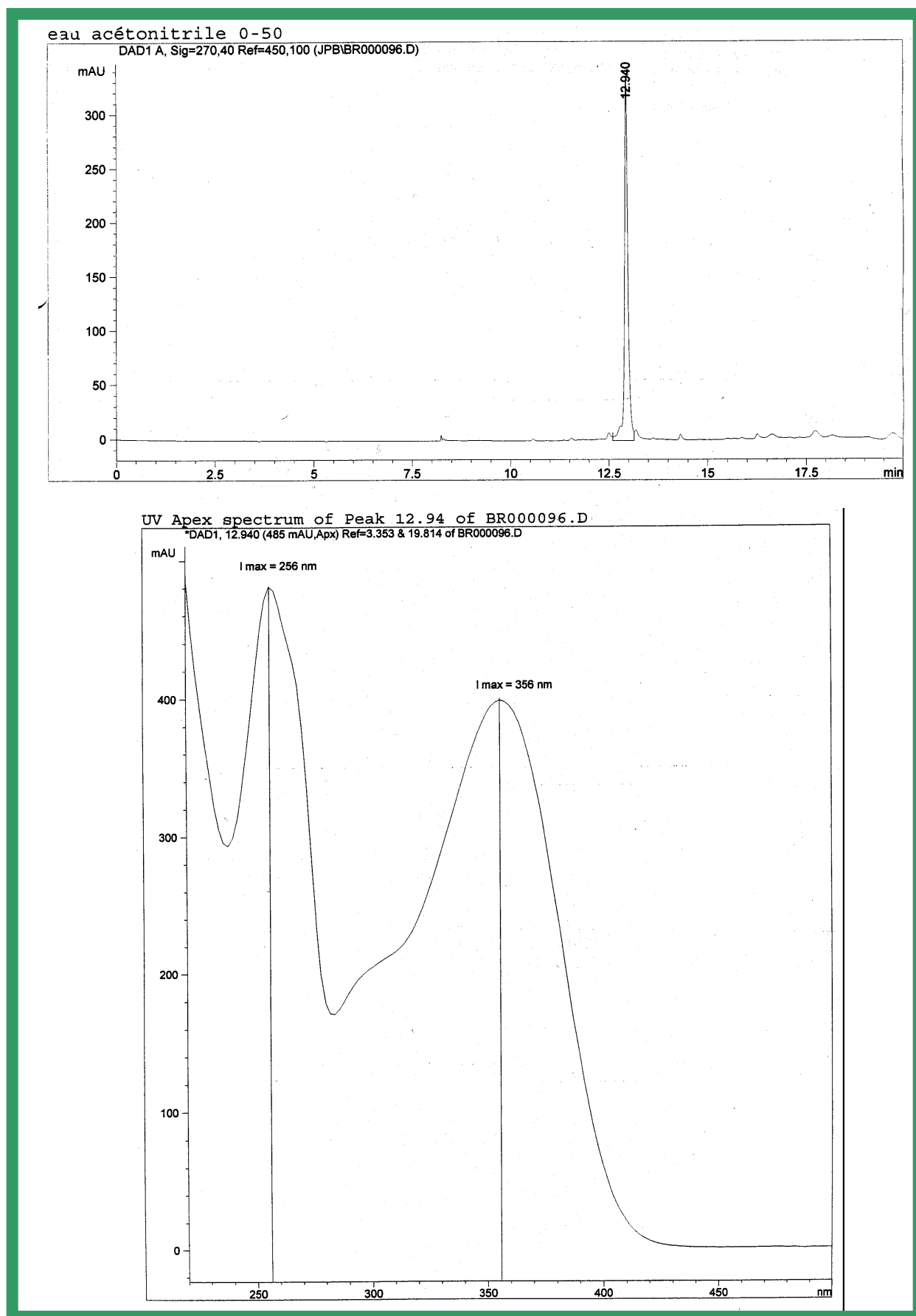
Annexe IV- 4 : Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM4, obtenus par analyse HPLC.



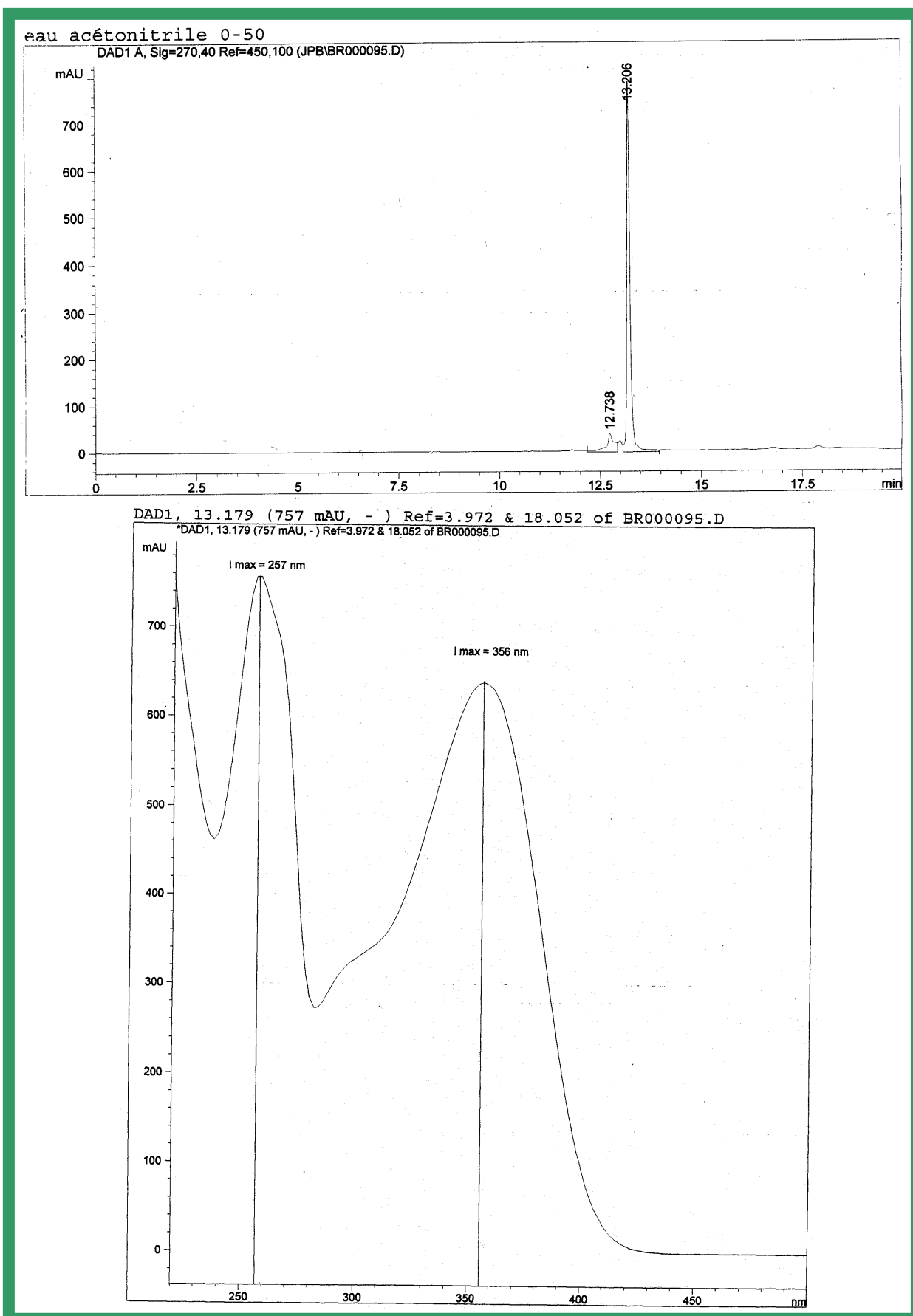
Annexe IV- 5 : Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM5, obtenus par analyse HPLC.



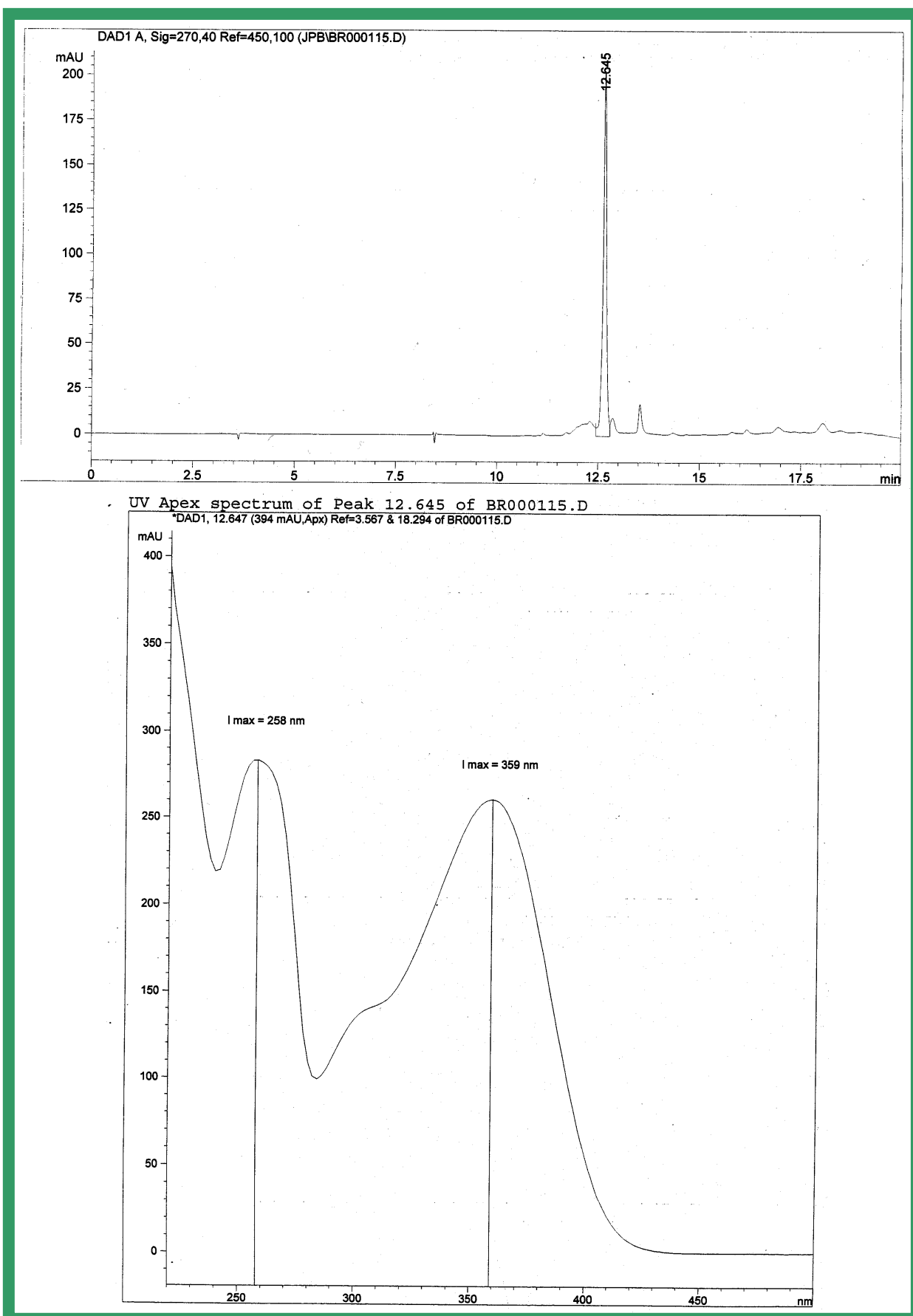
Annexe IV- 6 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM6, obtenus par analyse HPLC.



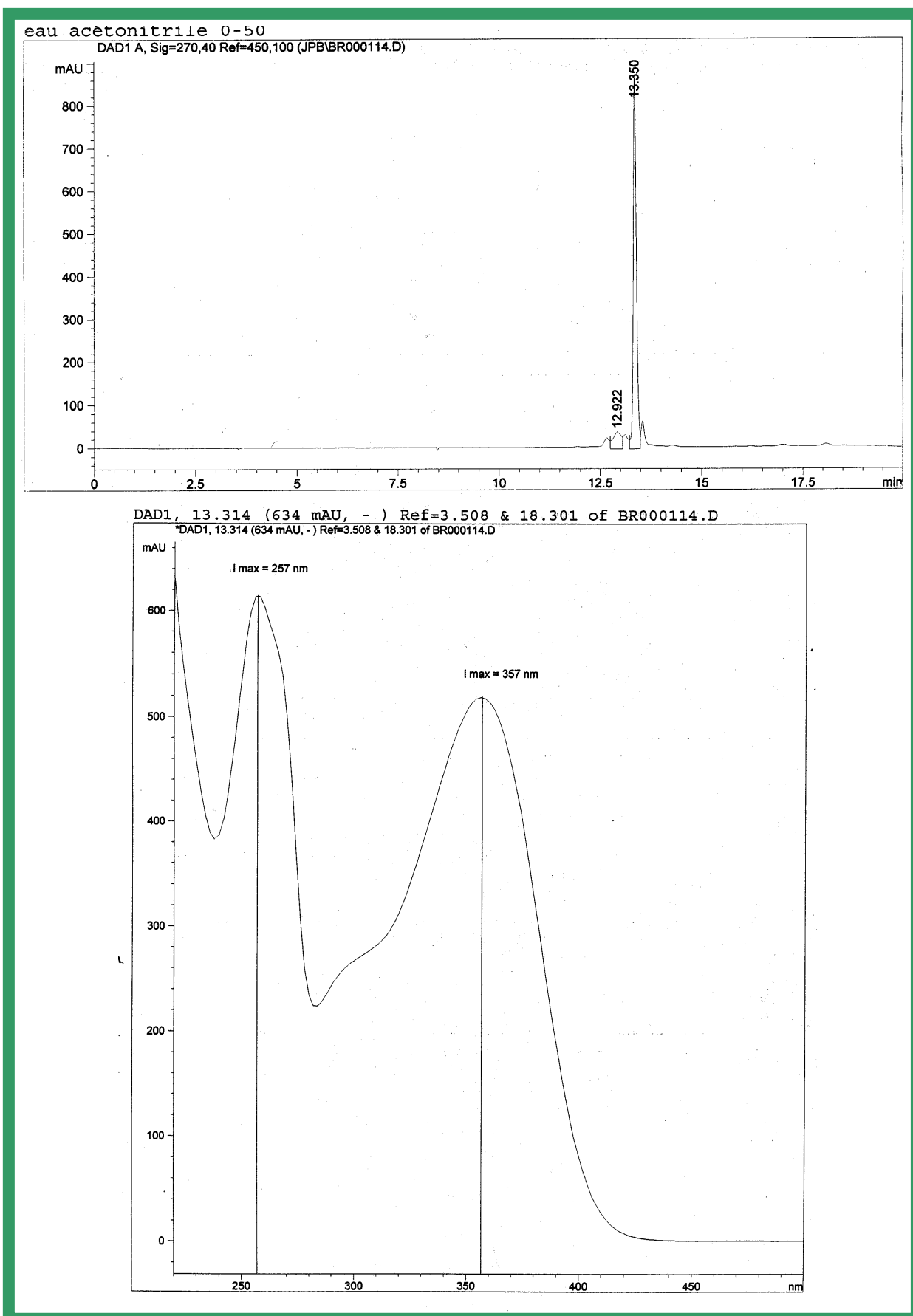
Annexe IV- 7 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM8, obtenus par analyse HPLC.



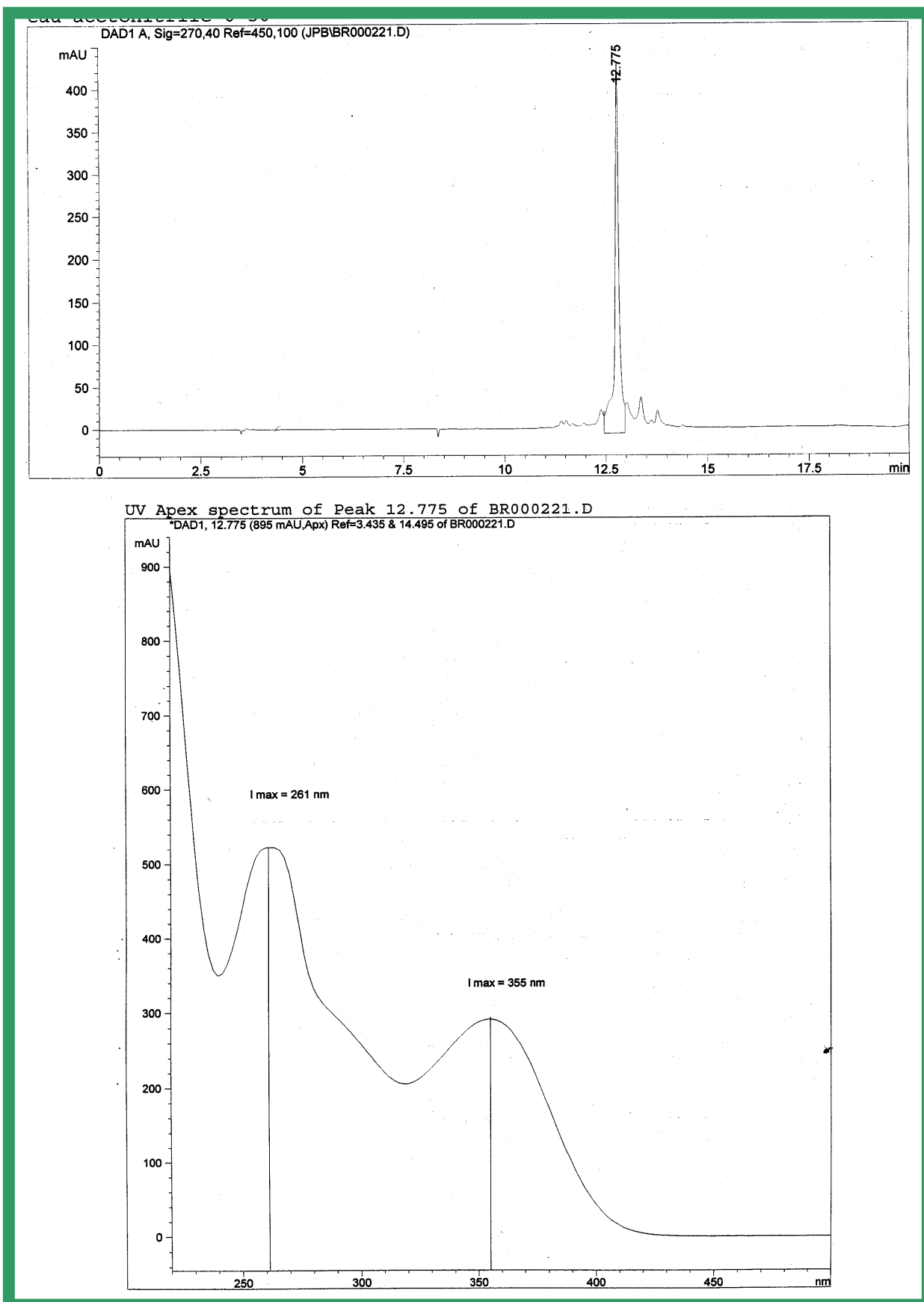
Annexe IV- 8 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM9, obtenus par analyse HPLC.



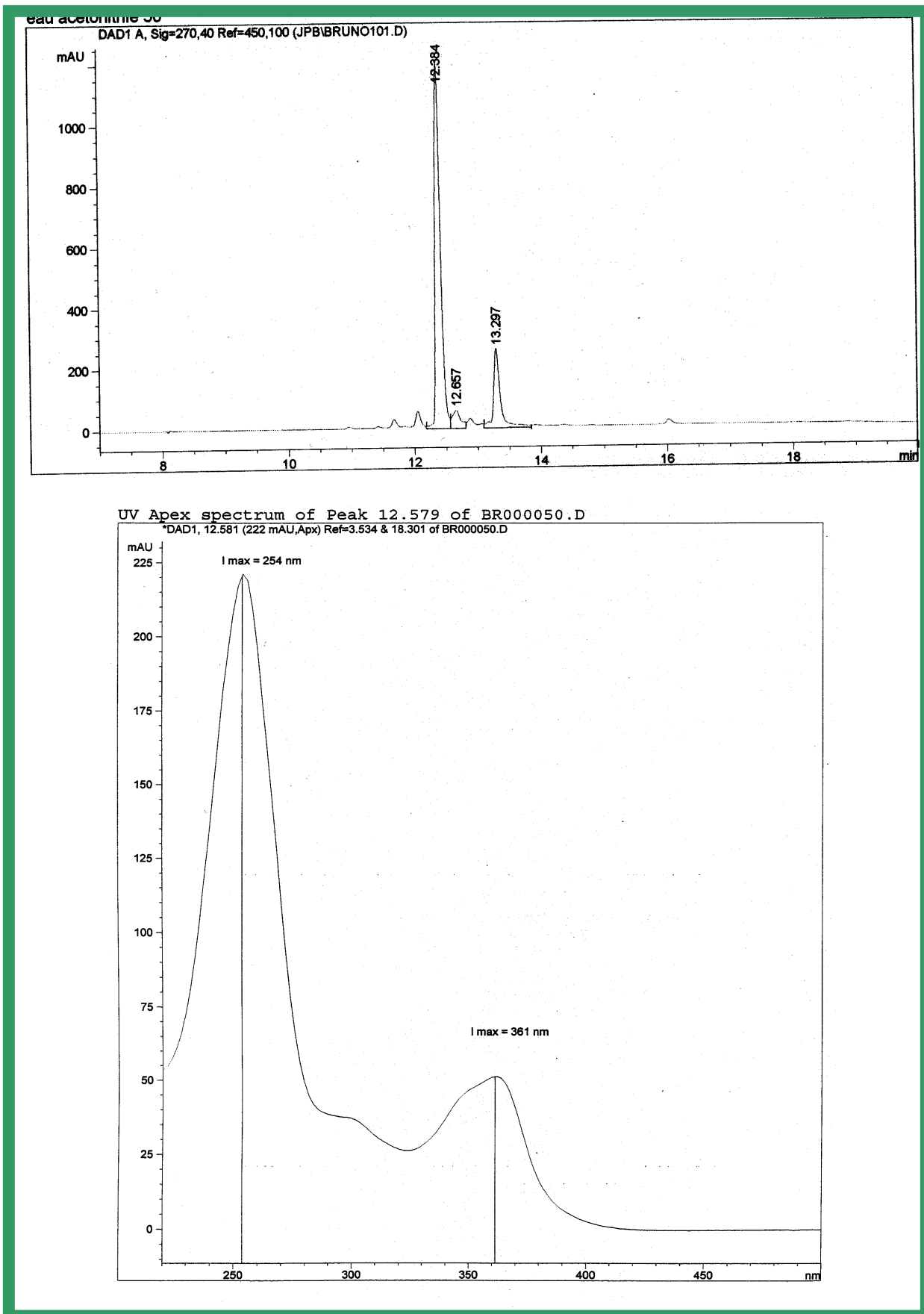
Annexe IV- 9 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM10, obtenus par analyse HPLC.



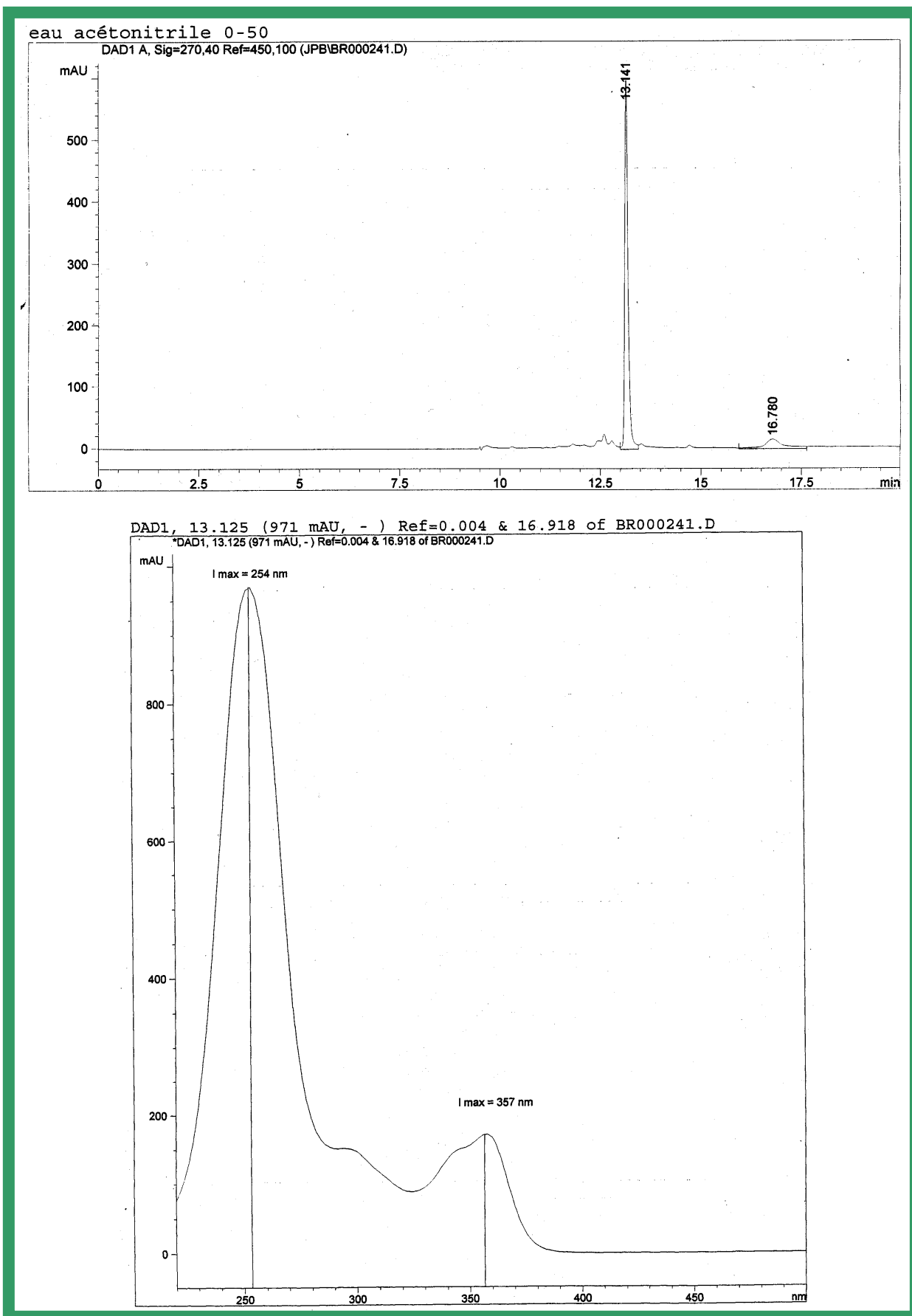
Annexe IV- 10 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM12, obtenus par analyse HPLC.



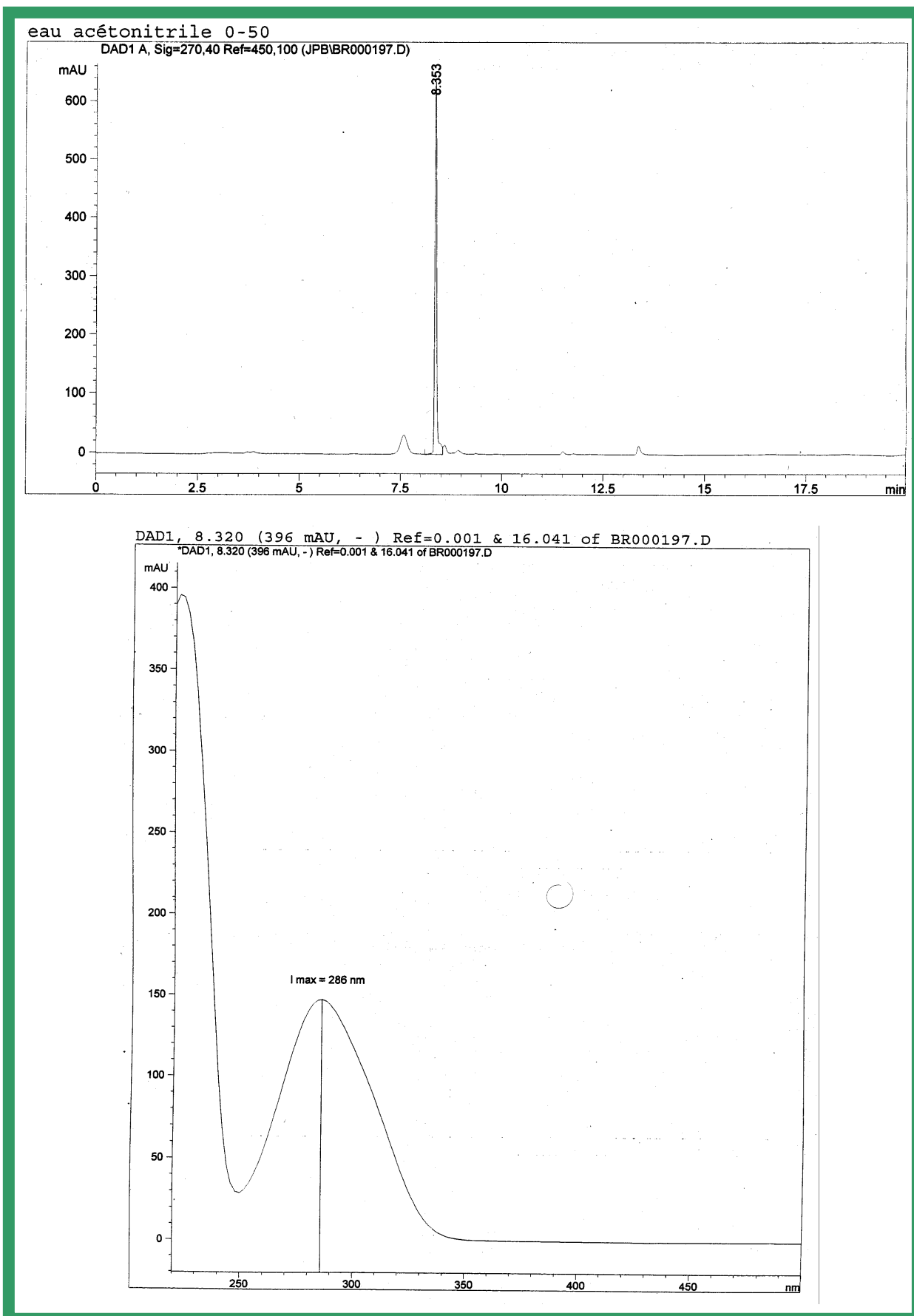
Annexe IV- 11 : Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM25, obtenus par analyse HPLC.



Annexe IV- 12 : Profil d'élution et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM3, obtenus par analyse HPLC.



Annexe IV- 13 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM16, obtenus par analyse HPLC.



Annexe IV- 14 : Profil d'éluion et spectre ultraviolet (220-500nm) de la molécule purifiée CM20, obtenus par analyse HPLC.

Résumé :

Cinquante espèces de la famille des Cunoniaceae, appartenant aux six genres répertoriés en Nouvelle-Calédonie, ainsi qu'une espèce de Polynésie Française, ont été collectées, herborisées, décrites et identifiées. Une d'entre-elles localisée à Port boisé est une espèce nouvelle du genre *Codia*. La répartition globale de chacune permet de confirmer qu'elles sont localisées essentiellement sur maquis miniers de basses, moyennes ou hautes altitudes, mais également en forêt humide ou en zone marécageuse.

Les différentes parties de plantes récoltées ont été séchées, broyées puis extraites au méthanol ou à l'acétate d'éthyle fournissant ainsi 204 extraits bruts. Chacun d'entre eux a fait l'objet de tests chimiques préliminaires afin de déterminer la présence ou l'absence de grands groupes de métabolites secondaires. Un criblage biologique sur diverses cibles a permis de sélectionner dix-sept espèces susceptibles d'être étudiées pour leurs potentialités bioactives. De nombreuses activités antibiotiques, antifongiques, inhibitrices de la xanthine oxydase ou de l'élastase, toxiques ou cytotoxiques ainsi que la présence de piègeurs de radicaux libres ont pu être détectées chez de nombreuses espèces. Deux d'entre-elles ont été retenues pour une étude chimique approfondie visant à purifier les molécules responsables des activités biologiques observées. Ainsi, la purification et la caractérisation structurale de douze molécules ont pu être réalisées à partir d'un extrait méthanolique de feuilles de *Cunonia macrophylla* reconnu pour ses potentialités antibiotiques et antifongiques. Sept sont des tanins hydrolysables tous bioactifs dont six de type ellagitannins, les cinq autres étant des hétérosides flavonoïdiques dérivés de la quercétine, elle-même détectée. De nouvelles activités biologiques sont attribuées à certaines de ces molécules dont la découverte est récente. Un travail similaire sur l'extrait acétate d'éthyle d'écorce de *Weinmannia dichotoma* a conduit à l'isolement du catéchol inhibiteur de la xanthine oxydase.

La recherche des voies et moyens pour pérenniser les espèces *Cunonia macrophylla* et *Geissois pruinosa*, d'intérêt pharmaceutique, cosmétique ou horticole a conduit à mieux appréhender certains aspects de leur germination et de leur multiplication conforme. L'impact de différents facteurs abiotiques sur la capacité germinative de leurs semences a permis de déterminer les conditions optimales à leur germination. Divers prétraitements leurs ont été appliqués : exposition à l'eau froide ou chaude, à l'acide sulfurique, essais de prégermination dans le polyéthylène glycol et scarification mécanique. Cette dernière est apparue comme la plus efficace. L'influence de certains éléments caractéristiques du syndrome serpentinique, nickel, magnésium ou calcium révèle une stratégie d'adaptation différente de ces deux espèces. Le suivi de leur croissance sur différents types de sols du maquis minier et l'effet d'un apport croissant de nickel confirme ce comportement différentiel.

Des essais de macrobouturage ont montré que la présence du bourgeon apical était favorable à un bon développement du système racinaire, ce qui laisse entrevoir la possibilité de culture hydroponique rentable pour une production de masse. De la même manière, les protocoles mis au point en culture *in vitro*, en particulier pour *Geissois pruinosa* ont permis de régénérer une plante entière. Dans l'optique d'une exploitation des molécules bioactives, nous avons pu prouver que les cals obtenus à partir de feuilles de *Cunonia macrophylla*, cultivés en milieu liquide, révélaient une activité similaire à celle de l'individu adulte.

Enfin, la description des différents stades morphologiques intermédiaires entre la semence et l'état adulte de ces deux espèces apporte des renseignements d'une grande importance pour leur taxonomie et laisse présager de la complexité de l'expression des gènes au cours de leur développement.

Abstract:

Fifty Cunoniaceae species, from the six genera known in New Caledonia, and one from French Polynesia were collected and vouchered in the herbarium, described and identified. One collected species of *Codia* genus appears to be new. The collection locations confirmed that species of this family are commonly found on ultramafic substrate, in maquis, forests, or swampy and riparian habitats, at low, middle or high altitude.

Different plant parts collected were dried, powdered and extracted with methanol or ethyl acetate giving 204 crude extracts. All were subjected to preliminary chemical tests to determine the presence of particular secondary metabolite. A biological screening on varied targets led to the selection of seventeen species for their bioactive potentialities. Numerous activities, such as antibiotic or fungicide effects, xanthine oxidase or elastase inhibitions, toxicity or cytotoxicity and occurrence of free radical scavengers were detected in several species. Two of them were chosen for an extensive chemical study in order to purify molecules responsible of activities. Purification and structural characterisation of twelve molecules were realised from a methanol extract of *Cunonia macrophylla* leaves known for antibiotic and fungicide effects. Seven are hydrolysable tanins, six of which type ellagitannins, and the other five are all derived from quercetine. New biological activities are attributed to some of these molecules recently discovered. A similar study on ethyl acetate extract of *Weinmannia dichotoma* bark gives catechol, a xanthine oxidase inhibitor.

We studied propagation techniques for *Cunonia macrophylla* and *Geissois pruinosa*, which are of pharmaceutical, cosmetic and horticultural interest, using cuttings and seeds. The effect of different abiotic factors on the germination capacity of seeds and the optimal germination conditions, were defined. Several pretreatment were tried : cold or hot water and sulphuric acid exposure, osmoconditioning and mechanical scarification. The last in particular appears to be the most efficiency and profitable. Influence of some characteristic elements of the serpentine syndrome, nickel, magnesium or calcium revealed different adaptation ways used by this two species. Studies on their development on different mining soils and effects of increasing nickel supply confirm this differential behaviour.

Propagation by cuttings in assays shown the importance of the apical bud to obtain a well-rooted plant, and the possibility of profitable hydroponics culture for significant plant production. In same way, *in vitro* culture methods we defined, in particular for *Geissois pruinosa*, permitted to obtain a large plant. If the goal is simply to get bioactive molecules, the callus obtained from *Cunonia macrophylla* leaves is sufficient to produce them.

Finally, observations in the greenhouse on the growth of the two species from seedlings to adult plants revealed phylogenetically and morphologically intriguing patterns that suggest a complex expression of their genes during their development.

Mots Clés : Cunoniaceae, Nouvelle-Calédonie, Substances naturelles, Activités biologiques, Antibiotiques, Inhibiteurs, Xanthine oxydase, Elastase, Cytotoxique, Tanins, Flavonoïdes, Germination, Semences, Optimisation, Scarification, Prégermination, Bouturage, Culture *in vitro*, Croissance, Syndrome serpentinique, Maquis minier, Nickel, Morphologie.