

## DISTRIBUTION DES COMPOSÉS POLYPHÉNOLIQUES CHEZ LES LYCOPODINÉES\*

BERNARD VOIRIN

Département de Biologie végétale, Service de Phytochimie et de Phytophysologie,  
Université Claude Bernard, 69 Lyon, France

(Reçu le 6 mai 1971)

**Résumé**—L'analyse du contenu polyphénolique des Lycopodiées a été conduite à des fins chimiotaxinomiques. Des résultats concernant la distribution des leucoanthocyanes, flavonols, flavones et biflavones de 24 espèces sont présentés. Les problèmes relatifs à l'entité et à l'agencement interne de cette Classe sont discutés.

**Abstract**—The polyphenols of Lycopodiaceae have been surveyed from a chemotaxonomic point of view. Results on the distribution of leucoanthocyanins, flavonols, flavones and biflavones are presented and discussed.

### INTRODUCTION

Les Lycopodiées actuelles, plantes herbacées ou subligneuses, homosporées ou hétérosporées, présentent un corps végétatif composé d'axes aériens, de feuilles toujours petites, ligulées ou non et 'd'organes, qui jouent le rôle de racines sans en posséder la structure anatomique classique'.<sup>1</sup> Sous cette définition générale se trouvent réunis les genres *Lycopodium*, *Selaginella*, *Isoetes*, *Stylites* et *Phylloglossum*; elle est loin toutefois d'être admise par l'ensemble des Ptéridologues. Par ailleurs, l'agencement interne de cette Classe est sujet à de nombreuses controverses.

Dans un tel contexte, aborder la Systématique des Lycopodiées à l'aide de la Biochimie ne pouvait donc que faire progresser la connaissance de ce groupe. Notre propos est donc de présenter les résultats biochimiques relatifs à l'analyse de 24 espèces de Lycopodiées puis de discuter, à la lumière de ces données et de celles de la littérature (voir <sup>2-4</sup>), les problèmes taxinomiques concernant ce groupe: entité et agencement interne.

### RÉSULTATS

Le Tableau 1 résume l'ensemble de nos résultats.

Les données bibliographiques concernant les flavonoïdes des Lycopodiées apparaissent très fragmentaires: d'une part, Bate-Smith et Lerner<sup>2</sup> ont constaté l'absence de leucoanthocyanes chez trois Sélaginelles, *Selaginella apus*, *S. caulescens*, *S. kraussiana* et chez *Lycopodium selago*, et n'ont pu préciser l'absence ou la présence de ces composés chez *Isoetes lacustris*; d'autre part Harada et Saiki<sup>3</sup> mentionnent la présence de flavones

\* Parte XXV, *Recherches chimiotaxinomiques sur les plantes vasculaires*, Parte XXIV J. F. GONNET et PH. LEBRETON, *Plant Méd Phytot* (sous presse)

<sup>1</sup> L. EMBERGER, *Traité de Botanique Systématique*, II *Les Végétaux vasculaires*, fasc. I, Cryptogames vasculaires, p. 140 Masson, Paris (1960)

<sup>2</sup> E. C. BATE-SMITH et N. H. LERNER, *Biochem J* **58**, 126 (1954)

<sup>3</sup> T. HARADA et Y. SAIKI, *Pharm Bull (Tokyo)* **3**, 469 (1955)

TABLEAU 1. DISTRIBUTION DES FLAVONOÏDES CHEZ LES LYCOPODINÉES

	Lieu de récolte	LA	Foïdes tot	Flavone	Biflavone	Autres composés
<b>O. des Isoétales</b>						
<i>Isoetes delilei</i> Rothm						
( <i>I. setacea</i> Bosc ex Delile, non Lam)	S	—	+++ (4,7)	Api Lut	—	—
<i>I. durieu</i> Bory	S	—	+++ (2,1)	Api Lut	—	V <sub>1</sub>
<b>O des Lycopodiales</b>						
<i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh ex Schrank et Mart	A	—	+(0,2)	—	—	V <sub>2</sub>
<i>Lepidotis cernua</i> (L.) Beauv.	G	—	+(0,2)	Api Lut	—	—
<i>L. inundata</i> (L.) C. Borner	A	—	++ (0,6)	—	—	V <sub>2</sub> Violet 0,46
<i>Lycopodium annotinum</i> L	A	—	+(0,2)	—	—	V <sub>2</sub>
<i>L. clavatum</i> L	A	—	+(0,2)	—	—	V <sub>2</sub> ?
<i>Diphasium alpinum</i> (L.) Rothm	A	—	+(0,3)	—	—	V <sub>2</sub> Jaunes 0,32? 0,46?
<b>O des Sélaginellales</b>						
<i>Selaginella bellula</i> Cesati	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. canaliculata</i> (L.) Spring	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. cuspidata</i> (Link) Link	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. delicatula</i> (Desv.) Alston	L	—	tr	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. denticulata</i> (L.) Spring	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. erythropus</i> (Mart.) Spring	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. galeottii</i> Spring	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. gracillima</i> (Kunze) Spring ex Salom	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. helvetica</i> (L. Spring)	A	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub> Jaune 0,42
<i>S. kraussiana</i> (Kunze) A. Br	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. martensii</i> Spring	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. mutabilis</i> Hort. ex A. Br	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. spinulosa</i> A. Br	A	—	+++ (2)	—	Am	V <sub>3</sub> Jaune 0,46
<i>S. uncinata</i> (Desv.) Spring	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. usta</i> Vieill. ex Baker	L	—	+(0,1)	—	Am	V <sub>3</sub>
<i>S. watsoniana</i> Hort., Sander ex Gard	L	—	+(0,2)	—	Am	V <sub>3</sub>

Lieux de récolte: échantillons prélevés *in natura*: A—Alpes française, G—Guyane, échantillons prélevés en jardin. L—Jardin Botanique de la Ville de Lyon.

Polyphénols. LA—leucoanthocyane, Foïdes tot —teneurs absolues en flavonoïdes (voir partie expérimentale), Api —apigénine, Lut —lutéoline, Am —amentoflavone, V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> V<sub>3</sub>—flavonoïdes inconnus (voir partie expérimentale)

chez quatre Lycopodes, *Lycopodium serratum*, *L. phlegmaria*, *L. clavatum*, *L. cernum* et chez deux Sélaginelles, *Selaginella tamariscina* et *S. pachystachys*, l'existence de flavonoïdes inconnus chez *Lycopodium sieboldii*, *L. nikoense* et l'absence de tout composé flavonique chez *Lycopodium fordii*.

Signalons, enfin, que la présence de biflavones aurait été mise en évidence chez deux Sélaginelles, *Selaginella tamariscina* et *S. involvens*.<sup>4</sup>

## DISCUSSION TAXINOMIQUE DES RÉSULTATS

### La Classe des Lycopodiées

La composition biochimique des Lycopodiées, sans être identique chez les diverses espèces analysées, présentent néanmoins une 'homogénéité négative' extrêmement nette, traduite par l'absence de leucoanthocyanes et de flavonols simples dans tous les genres étudiés.

L'absence de flavones et la présence de flavonols simples chez les Filicinées eusporangées<sup>5</sup> d'une part, l'existence de biflavones chez les Cycadales<sup>4</sup> d'autre part, permettent d'écarter les hypothèses respectives de Campbell<sup>6</sup> et de Greguss<sup>7</sup> tendant à inclure le genre *Isoetes*, soit dans les Filicinées, soit dans les *Pteropsida*.

Par ailleurs, la composition pigmentaire des deux espèces d'*Isoetes* étudiées présente une telle similitude avec celle de *Lepidotis cernua* que nous ne pouvons soutenir la proposition des auteurs comme Rothmaler,<sup>8</sup> Reed<sup>9</sup> et Boivin<sup>10</sup> selon laquelle le genre *Isoetes* doit être rangé dans la Classe autonome (ou la division) des *Isoetopsida*.

Devant cette similitude de résultats, nous ne pouvons donc souscrire aux diverses hypothèses selon lesquelles le genre *Isoetes* doit être exclu des Lycopodiées, les données biochimiques ne faisant que confirmer la définition classique de ce taxon. L'absence des mêmes composés (leucoanthocyanes, flavonols simples) et la présence de flavones justifient le maintien de ces deux Ordres dans la même Classe et militent en faveur d'un rapprochement entre Lycopodiales et Isoétales.

### Les Ordres des Lycopodiées

L'Ordre des Isoétales se caractérise par sa richesse en flavones: apigénine et lutéoline; on note de plus chez une espèce, *I. durieui*, la présence d'un composé flavonique particulier. V<sub>1</sub>.

Chez les Lycopodiales, seuls les flavonoïdes de *Lepidotis cernua* ont pu être identifiés; il se pourrait néanmoins que la tache violette de R<sub>f</sub> 0,46 dans l'acide acétique 60 % mise en évidence chez *L. inundata* soit également de la lutéoline, la très faible quantité de matériel végétal dont nous disposions ne nous ayant pas permis de déterminer la nature exacte de ce composé.

Toutes les espèces étudiées, à l'exception de *L. cernua*, possèdent le composé V<sub>2</sub>, montrant ainsi la grande homogénéité de l'Ordre.

Les Sélaginellales présentent elles aussi un contenu chimique homogène, le représentant majeur étant l'amentoflavone (biflavone); un composé V<sub>3</sub> (autre biflavone ?) se trouve constamment à l'état de traces. Il conviendrait toutefois de vérifier la présence éventuelle de composés jaunes (flavonols, R<sub>f</sub> 0,32 et 0,46 acide acétique 60 %) rencontrés respectivement chez *S. helvetica* et *S. spinulosa*, et d'en préciser la nature.

<sup>4</sup> T. KARIYONE, *J. Pharmacogn. Soc. Jap.* 16, 1 (1962)

<sup>5</sup> B. VOIRIN, *Thèse Doct. Lyon* (1970)

<sup>6</sup> D. H. CAMPBELL, *The Evolution of the Land Plants* Stanford University Press (1940)

<sup>7</sup> P. GREGUSS, *Ber. der Deutsch bot. Gesellsch.* 81, 5, 187 (1968)

<sup>8</sup> W. ROTHMALER, *Fedde's Repertorium*, 54, 256 (1951)

<sup>9</sup> C. F. REED, *Mem. Soc. Broteriana, Coimbra*, 27, 5 (1953).

<sup>10</sup> B. BOIVIN, *Bull. Soc. Fr.* 103, 490 (1956)

Le contenu chimique respectif de chacun des trois Ordres apparaît donc à la fois homogène et pourtant différencié, on peut le résumer ainsi:

	Leucoanthocyanes	Flavonoïds	Flavones <i>s. l.</i>		Autres composés flavoniques <i>s. s.</i>
			Monomères	Dimères	
Isoétales	—	—	+	—	V <sub>1</sub>
Lycopodiales	—	—	+	—	V <sub>2</sub>
Selaginellales	—	—	—	+	V <sub>3</sub>

La biochimie des Isoétales (Lycopodiniées ligulées), proches de celle des Lycopodiales (Lycopodiniées aligulées), mais nettement différente de celle des Sélaginellales (Lycopodiniées ligulées), ne nous autorise donc pas à suivre la classification proposée par Emberger<sup>1</sup> pour qui les particularités morphologiques—et tout spécialement la présence ou l'absence de ligule—permettent de répartir les Lycopodiniées en deux lignées: Lycopodiniées aligulées (O des Lycopodiales) et Lycopodiniées ligulées (O des Lépidospermales, F. des Sélaginellacées, O. des Isoétales, F. des Isoétiniées).

Par contre, la répartition des Lycopsida en trois ordres indépendants (*Lycopodiales*, *Selaginellales* et *Isoetales*) telle que Reimers<sup>11</sup> (et Pichi-Sermolli<sup>12</sup>) l'envisage, se voit confirmée par les données chimiques.

Notre conclusion sera plus nuancée, néanmoins, à l'égard de la classification de Pichi-Sermolli.<sup>12</sup> Nos résultats partiels ne nous permettent pas d'élever au rang de Sous-classes (*Lycopodiaceae*, *Selaginellaceae*, *Lepidodendraceae*) les Ordres correspondants comme cet auteur le propose.

### Les Taxons Inférieurs

*des Lycopodiales.* La Systématique des Lycopodiales a été peu à peu précisée. Rothmaler,<sup>13</sup> le dernier auteur à s'être intéressé à la taxinomie de ce groupe, subdivise les Lycopodiales en deux familles, *Urostachyaceae* (g. *Huperzia*) et *Lycopodiaceae* (g. *Lycopodium*, g. *Lepidotis*, g. *Diphasium*, g. *Phylloglossum*).

Les données anatomiques (structure de l'appareil vasculaire), morphologiques (organisation de la sporophylle) du sporophyte et physiologiques du gamétophyte (comportement du prothalle) militent en faveur d'une telle subdivision.

Cependant, d'après les études de Knox,<sup>14</sup> conduites sur la morphologie des spores, seule la distinction du genre *Huperzia* des autres genres reconnus par Rothmaler semble fondée.

Les études caryologiques de Manton<sup>15</sup> et de Ninan<sup>16</sup> confirment par contre la taxinomie préconisée par Rothmaler: *Huperzia* se caractérise en effet par une haute polyploïdie ( $2n = 260 ?$ ,  $405 ?$ ) tandis que  $n$  apparaît respectivement égal à 78, 34 et 24–25 chez *Lepidotis cernua*, *Lycopodium clavatum*, *L. annotinum* et *Diphasium alpinum*.

<sup>11</sup> H. REIMERS, in *Engler's Syllabus Pflanzenfamilien* (edited by H. MELCHIOR et E. WERDERMANN), Band I, p. 269 (1954)

<sup>12</sup> R. PICHİ-SERMOLLI, *Uppsala Univ. Årsskrift* 6, 70 (1958)

<sup>13</sup> W. ROTHMALER, *Fedde's Report. Sp. Nov.* 54, 55 (1944)

<sup>14</sup> E. KNOX, *Trans. Bot. Soc. Edin.* 35, 209 (1950)

<sup>15</sup> I. MANTON, *Problems of Cytology and Evolution in Pteridophytes*, p. 252 Cambridge University Press (1950)

<sup>16</sup> C. A. NINAN, *Proc. Nat. Inst. Sci. Indian* 24, 54 (1958)

Du point de vue biochimique, les Lycopodiales se révèlent assez homogènes; nous ne disposons pas d'éléments décisifs en faveur de l'originalité d'une famille des *Urostachyaceae*; par contre, si l'existence de composés jaunes ( $R_f$  0,32 et 0,46) chez *Diphasium alpinum* et la présence de lutéoline (composé violet  $R_f$  0,46) chez *Lepidotis inundata* se voyaient confirmées, la diversité des diagnoses chimiques viendrait à l'appui de la subdivision des Lycopodiales effectuée par Rothmaler. Il faut noter toutefois que cette répartition trouve un fondement chimique: parmi les Lycopodiales en effet, les espèces du genre *Huperzia* sont les seules à ne pas accumuler d'aluminium.<sup>17</sup>

*des Selaginellales.* D'après les caractères des appareils végétatifs et reproducteurs, Hieronymus<sup>18</sup> divise le genre *Selaginella* en deux sections et quatre sous-sections; Rothmaler<sup>13</sup> propose par contre une subdivision de *Selaginella s.l.* en trois genres, *Selaginella*, *Lycopodioides* et *Didichlis*.

Les études cytologiques restreintes, mais conduites sur des espèces appartenant aux divers taxons des auteurs précédents, montrent une très grande homogénéité du genre ( $n = 9$ , Manton<sup>15</sup>). De ce point de vue, il semble donc que le genre *Selaginella* constitue une unité taxinomique bien définie qui, en dépit du nombre élevé d'espèces qu'il englobe, doit être considéré comme un genre naturel.

Du point de vue chimique, la présence d'un flavonoïde jaune ( $R_f$  0,46 acide acétique 60%) chez *S. spinulosa*, seule Sélaginelle de la section *Homophyllum* que nous avons étudiée, aurait pu constituer un élément en faveur de la théorie de Hieronymus, mais comme nous avons pu mettre en évidence un composé de même nature ( $R_f$  0,42) chez *S. helvetica* (section *Heterophyllum*), la présence éventuelle de composé particulier ne paraît pas l'apanage d'une seule section.

*des isoétales.* Les deux espèces étudiées montrent une très grande homogénéité biochimique: absence de leucoanthocyanes et de biflavones, présence de flavones, confirmant ainsi les vues des auteurs tels que Grenda<sup>19</sup> et Reed<sup>91</sup> qui, sur des bases morphologiques reconnaissent l'unité du genre *Isoetes*.

## CONCLUSION

Les Lycopodiniées nous apparaissent chimiquement comme un taxon nettement défini. Ainsi, le point de vue des auteurs selon lequel les Isoétales doivent être séparées des Lycopodiales et des Sélaginellales et rangées dans une Classe autonome, ne nous paraît pas soutenable, les Isoétales se définissent par le même type de flavonoïdes que les autres Lycopodiales et, de ce fait, doivent être incluses dans la même Classe que ces dernières.

Par contre, la proposition de Reimers tendant à répartir les Lycopodiniées en trois Ordres trouve un fondement biochimique; chacun d'eux s'individualise en effet par la présence ou l'absence de composés particuliers.

## EXPERIMENTALE

*Matériel végétal.* Les analyses portent sur des frondes, la détermination de chaque espèce a été soigneusement contrôlée par Monsieur Berthet. La nomenclature des Lycopodiales et des Isoétales est extraite de *Flora Europaea*<sup>20</sup>, celle des Sélaginellales de l'*Index Selaginellarum*<sup>21</sup>

<sup>17</sup> G. E. HUTCHINSON et A. WOLLACK, *Trans. Connecticut Acad. Arts Sci.* **35**, 73 (1943)

<sup>18</sup> G. HIERONYMUS, in *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (édité par A. ENGLER et K. PRANTL), Teil I, p. 621 Engelmann, Leipzig (1902)

<sup>19</sup> A. GREND, *Bot. Archiv. Koenigsberg* **16**, 268 (1926)

<sup>20</sup> T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS, D. A. WEBB, *Flora Europaea*, Vol. I, p. 3 Cambridge University Press (1964)

<sup>21</sup> F. C. REED, *Index Selaginellarum*, Mem. Soc. Broteriana, Coimbra **28**, 1 (1955-1956)

*Processus analytique général* Les techniques de dosage et d'analyse ont été publiées en détails par ailleurs <sup>22</sup>

*Processus analytique particulier* Composé  $V_1$  Ce flavonoïde de fluorescence violette rencontré chez *I. durieu* ( $R_f$  0,30 ac acétique 60%) présente les propriétés spectrales suivantes EtOH (257?), 281, 349 nm, NaOEt (280), 396 nm stable,  $AlCl_3$  275, 382 nm;  $H_3BO_3$  (260), 372 nm, NaOAc 275,360 nm. De par l'interprétation de la position du maximum d'absorption, de la bande I en milieu éthanolique, des déplacements spectraux en présence des divers réactifs, <sup>23</sup> de la valeur de  $R_f$  on peut attribuer à  $V_1$  une structure dérivée de la lutéoline. Parmi les hypothèses structurales les plus simples pouvant être retenues,  $V_1$  pourrait être homologué à l'hydroxy-6 méthyl-7 lutéoline, le flavonoïde parental, l'hydroxy-6 lutéoline présente en effet deux maximums d'absorption situés respectivement à 285 et 349 nm <sup>24</sup> Faute de posséder substance témoin et quantité suffisante de produit naturel, il ne nous a pas été possible d'effectuer une comparaison directe entre ces deux composés

Composé  $V_2$ . Obtenu après hydrolyse, chromatographie et élution éthanolique d'une bande de  $R_f$  0,58 (ac acétique 60%) de *L. annotinum*,  $V_2$  présente les propriétés spectrales ci-dessous EtOH 270, 346 nm,  $AlCl_3$  288, (306), 349, 386 nm, NaOAc 271, 346 nm,  $H_3BO_3$  271, 346 nm, EtONa 265, 415 nm stable Par rechromatographie sur couche mince de gel de silice H Merck dans deux solvants (solvant 1 benzène-dioxanne-acide acétique 90 25 4, solvant 2 benzène-pyridine-ammoniaque 80 20 1 goutte), on obtient les résultats suivants

	Solvant 1	Solvant 2
$V_2$	0,45	0,35
Vitexine	0-0,01	0-0,01
Amentoflavone	0-0,01	0,1
Méthyl-3 kaempférol	0,55	0,5
Genkwanine	0,55	0,6
Acacétine	0,65	0,45
Apigénine	0,35	0,45

Les valeurs de  $R_f$  enregistrées dans ces deux systèmes montrent *a priori* que  $V_2$  ne peut être homologué à aucune des substances témoins utilisées, on peut cependant préciser qu'il s'agit vraisemblablement d'un aglycone 'simple', avec trois —OH libres, puisque son comportement chromatographique est nettement différent de celui d'un C-glycoside et de celui d'une biflavone Toutefois, devant l'abondance de composés surnuméraires présents chez toutes les Lycopodiées étudiées, nous avons rencontré des difficultés particulièrement aigües pour isoler, purifier ce produit, et par suite, pour définir ses constantes spectrales et chromatographiques, aussi, à la limite, peut-on se demander si  $V_2$  n'est pas simplement de l'apigénine dont les diverses constantes sont faussées par la présence d'une impureté Mais il est à noter que, chaque fois que nous avons rencontré et caractérisé l'apigénine, nous avons utilisé les mêmes méthodes de purification et d'identification, le flavonoïde ainsi isolé a toujours fourni des valeurs spectrales et chromatographiques identiques à celles d'un échantillon de référence

Composé  $V_3$  Pour ce pigment de fluorescence violette, présentant un comportement chromatographique de biflavone, une hypothèse structurale peut être avancée car  $V_3$  possède les mêmes valeurs de  $R_f$ , dans les systèmes chromatographiques précédemment cités que la méthyl-7 amentoflavone (=sotetsuflavone)

*Remerciements*—Nous devons nombre de nos échantillons végétaux à Monsieur le Professeur Berthet, Directeur du Jardin botanique de la ville de Lyon et les biflavones de référence à Monsieur le Docteur Kawano, Pharmaceutical Faculty, University of Nagasaki, Japan

<sup>22</sup> Ph LEBRETON, M JAY et B VOIRIN, *Chim Anal Fr* **49**, 375 (1967)

<sup>23</sup> L JURD, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (edited by T A. GEISSMAN), p 107, Pergamon Press, Oxford (1962)

<sup>24</sup> J B HARBORNE, *Comparative Biochemistry of Flavonoids*, p 140, Academic Press, London and New York (1967)

*Key Word Index*—Lycopods, lycopsida, flavonoids, chemotaxonomy, amentoflavone, apigénin; luteolin