



HAL
open science

Détermination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la maturation artificielle de leurs homologues actuels : implications paléobotaniques et paléoenvironnementales

Yueming Lu

► To cite this version:

Yueming Lu. Détermination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la maturation artificielle de leurs homologues actuels : implications paléobotaniques et paléoenvironnementales. Paléontologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0353 . tel-01751660

HAL Id: tel-01751660

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751660v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine en Géosciences

par
Yueming LU

Détermination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la maturation artificielle de leurs homologues actuels :

Implications paléobotaniques et paléoenvironnementales

Soutenance publique le 24 Juin 2014

Membres du jury :

Rapporteurs	Philippe Schaeffer	Directeur de recherches CNRS, Université de Strasbourg
	Monika J Fabiańska	Assistant professeur, Université de Silésie, Pologne
Examineurs	Bernard Lathuilière	Professeur, Université de Lorraine
	Bernard Gomez	Maître de conférences, Université de Lyon 1
Directeur de thèse	Raymond Michels	Chargé de recherches CNRS, Université de Lorraine
Co-directeur de thèse	Yann Hautevelle	Maître de conférences, Université de Lorraine

AVANT-PROPOS

L'ensemble de ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire de géochimie organique de l'unité mixte UMR CNRS 7359 GeoRessources. Je remercie les directeurs successifs du laboratoire Michel Cathelineau (du G2R, Pré-GeoRessources) puis Jacques Pironon de m'avoir accueillie au sein de l'unité pour réaliser cette thèse.

Je remercie vivement mes deux directeurs de thèse Raymond Michels et Yann Hautevelles, qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse. Les chinoises apprennent de leur enfance que '*One who be your teacher one day, is the father for whole lifetime*', je tiens à exprimer ma sincère gratitude pour leur confiance, leur soutien, leur patience et leur désintéressement pour la transmission de connaissance en sciences durant les quatre années.

Je remercie également tous les membres du jury qui ont accepté de donner leur expertise pour évaluer ce travail. Merci à Philippe Schaeffer et Monika J Fabiańska, mes rapporteurs ainsi qu'à Bernard Lathuilière et Bernard Gomez qui ont accepté d'examiner ce travail. Une autre petite pensée va à Monika J Fabiańska qui a passé au total plus de 20 heures de car pour faire le trajet A/R entre le Pologne et la France.

Je remercie aussi tous les collègues du GeoRessources et des autres laboratoires de l'Université de Lorraine que j'ai pu rencontrer et avec qui j'ai pu échanger durant cette recherche, en particulier :

Alain Izart pour son expertise en matière organique fossile (macroscopique et moléculaire) ;

Vincent Huault pour les éclaircissements sur la terminologie paléontologique ;

François Dupire du SRSMC UMR 7565 pour l'analyse au GC-MS/MS.

Un grand merci aussi à Christine, Marie-Odile et Laurence pour tous les services administratifs. Patrick pour son aide à l'impression, les reliures, les astuces d'utilisation de logiciels bureautiques ainsi que pour sa bonne humeur.

Je vais remercier tous les membres d'AROME (ou Club du 'TLMVPSP'), j'ai appris tous les jours avec vous que ce soit en culture, vocabulaire, humour, et tout et tout : à Pierre qui est toujours de

bonne humeur et a toujours des blagues à partager au moment du déjeuner et de la pause-café ; à Catherine pour ses connaissances diversifiées en chimie analytique et qui possède une personnalité très attachante, ainsi que pour son encouragement et soutien pour aller faire du sport entre midi et deux ; à Aurélien qui répond à tous types de demandes en aide que ce soit en muscle ou en minutie ; à Gilles pour tous les petits bricolages ; à Delphine pour son attitude toujours très rassurante. Il n'y a aucune raison de ne pas évoquer notre grande équipe de doctorants : Coralie, Thierry, Pascale, Olivia, Phuc, Fatima, Ogier et Claire. Bien qu'on ai le même âge j'ai toujours considérée Coralie comme une grande sœur. Le côté rebelle et la sincérité de Thierry m'ont beaucoup touché. Les connaissances en histoire et en mythologie de Pascale m'impressionnent toujours. Olivia, son inépuisable énergie, ses petites intentions très touchantes et sa générosité resteront dans mes souvenirs. Fatima est une fille remplie d'amour et de générosité, j'ai appris beaucoup beaucoup avec toi. Phuc, mon compatriote asiatique au labo, est toujours de bonne humeur et reste toujours positif quelques soit la situation. Cela a vraiment touché les gens qui t'entourent. Pareillement pour Ogier, ta bonne humeur a influencé plein de monde. Claire, est une fille très chaleureuse que je n'oublierai jamais. Il y a également Aymeric, même si nous n'avons travaillé que pendant une très courte durée, je n'oublierai jamais ta gentillesse. Une pensée aussi à Seyed et ses gâteaux d'Iran.

Je remercie également les autres thésards de GeoRessources, en particulier Emmanuel, Anthony, Lucile et Thomas pour notre partage de moments de joies et de soutiens lors des moments de stress et de dépression.

Une pensée particulière à Apolline et Suel, j'ai eu vraiment de la chance de vous avoir comme collègues de bureau. On a pu échanger des idées très diversifiées sur des sujets en dehors du travail. Vos attitudes et expériences de la vie m'ont impressionnées.

Pour finir, en tant qu'enfant unique je dois m'excuser auprès de mes parents pour toutes ses années d'absence. C'est grâce à leur générosité, soutien financier et moral que j'ai pu finir mes études en France. Je remercie mon mari Paul-Arthur, qui est toujours là pour me soutenir et supporter (ou plutôt 'subir' selon lui) mes mauvaises humeurs (bien sur de temps en temps ^^). Aussi à mes chers amis Gaëlle, Sarah-Jane, Agathe, etc. ...

*"Ce n'est pas un malheur d'être méconnu des hommes,
mais c'est un malheur de les méconnaître."*

--- Confucius

Résumé

De nombreuses biomolécules qui constituent les plantes vasculaires ne sont synthétisées que par certains taxons de plantes et ont donc une spécificité chimiotaxonomique. Certaines de ces biomolécules, tels que les bioterpénoïdes, sont particulièrement résistantes et sont préservées dans les sédiments où elles se transforment en géoterpénoïdes au cours de la diagenèse. Ces géoterpénoïdes conservent, partiellement ou totalement, leur spécificité initiale (spécificité paléochimiotaxonomique). Cependant, nos connaissances actuelles en paléochimiotaxonomie botanique, qui permettent d'associer ces biomarqueurs moléculaires à des taxons végétaux, restent encore lacunaires.

L'objectif de cette étude est de déterminer la signature moléculaire des familles de conifères fossiles. 68 représentants appartenant aux 7 familles actuelles de conifères ont été artificiellement maturés par pyrolyse en milieu confiné. Cette technique permet de reproduire en laboratoire la transformation des bioterpénoïdes en géopterpénoïdes.

Les résultats montrent que les Pinaceae, les Araucariaceae, les Cupressaceae, les Sciadopityaceae, les Podocarpaceae, les Taxodiaceae et les Taxaceae "fossilisés" peuvent se distinguer par la nature et la proportion relative de ces terpénoïdes. Ces composés sont principalement des cédranes, des cuparanes, des abiétanes, des totaranes, des diterpénoïdes tétracycliques, des hydrocarbures isohexylalkylaromatiques, des rimuanes et des cembranes. La comparaison des signatures moléculaires ont permis de réaliser des regroupements intergénériques pour chaque famille. Ces regroupements sont comparables avec ceux de la classification phylogénétique.

A terme, ces résultats pourront être utilisés dans le cadre d'études paléobotaniques, paléoenvironnementales, environnementales et archéologiques.

Mots clés :

Paléochimiotaxonomie botanique, chimiotaxonomie botanique, paléobotanique, plante vasculaire, conifère, maturation artificielle, biomarqueur moléculaire, terpénoïde.

Abstract

Many biomolecules that constitute terrestrial vascular plants are only synthesized by a restricted number of plant taxa and have thus a chemotaxonomic specificity. Some of these biomolecules, like the terpenoids, are particularly resistant and can be preserved within sediments where they are transformed into geomolecules during diagenesis. Geoterpenoids keep, partially or totally, their initial specificity (palaeochemotaxonomic specificity). However, our current knowledge in botanical palaeochemotaxonomy, allowing to link these plant biomarkers to plant taxa, remains incomplete.

The aim of this study is to determine the molecular signature of fossil conifers. In this objective, 68 species belonging to the 7 extant conifer families were subjected to artificial maturation by confined pyrolysis. This process converts the bioterpenoids included within the plant material into geoterpenoids.

The results show that the "fossilized" Pinaceae, Araucariaceae, Cupressaceae, Sciadopityaceae, Podocarpaceae, Taxodiaceae and Taxaceae can be distinguished from each other by the nature and the relative proportion of these geoterpenoids. They are mainly represented by cedranes, cuparanes, abietanes, totaranes, tetracyclic diterpenoids, desisohexylalkylaromatic hydrocarbons, rimuanes and cembranes. The comparison of these molecular signatures allows to achieve intergeneric groups for each family. These groups are comparable to those of the phylogenetic classification.

In the future, these results could be used for palaeobotanical, palaeoenvironmental, environmental and archaeological assessments.

Key words:

Botanical palaeochemotaxonomy, botanical chemotaxonomy, palaeobotany, vascular plants, conifers, artificial maturation, molecular biomarker, terpenoids.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I. : Plantes vasculaires : description, évolution, taxonomie & chimiotaxonomie botanique	19
1. APPARITION, EVOLUTION ET CLASSIFICATION DES PLANTES TERRESTRES.....	19
1.1. Apparition et évolution des plantes vasculaires au Paléozoïque.....	19
1.2. Evolution des plantes vasculaires au Méso-Cénozoïque.....	21
2. APPARITION, EVOLUTION ET CLASSIFICATION DES CONIFERALES	23
2.1. Apparition et développement des Voltziales	24
2.2. Apparition et développement des conifères modernes.....	24
3. CHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE : relations entre la classification taxonomique et la composition moléculaire des plantes.....	27
3.1. La composition moléculaire des plantes.....	27
3.2. Les biomolécules spécifiques des plantes vasculaires et la chimiotaxonomie botanique.....	28
3.3. Chimiotaxonomie des conifères.....	33
Chapitre II. : Généralités sur la matière organique sédimentaire et introduction à la paléochimiotaxonomie botanique.....	37
1. LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE : ORIGINE, COMPOSITION ET EVOLUTION	37
1.1. Origine et composition de la matière organique sédimentaire.....	37
1.2. Evolution de la matière organique sédimentaire.....	40
2. LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE : DEFINITION ET DOMAINES D'APPLICATION	43
2.1. Définition de la paléochimiotaxonomie botanique	43
2.2. Les terpénoïdes en paléochimiotaxonomie botanique	44
2.2.1. Des bioterpénoïdes aux géoterpénoïdes	44
2.2.2. Les monoterpénoïdes.....	45
2.2.3. Les sesquiterpénoïdes	46
2.2.4. Les diterpénoïdes	48
2.2.5. Les triterpénoïdes	49
2.2.6. Les polyterpénoïdes	51
2.2.7. Biomarqueurs botaniques non terpéniques.....	52

Table des matières

Chapitre III. : Echantillons, protocoles et méthodes analytiques.....	57
1. ECHANTILLONS DES PLANTES DE CONIFERES.....	57
1.1. Plantes pour la détermination de la signature moléculaire fossile	57
1.2. Préparation des échantillons de plante et protocole expérimental.....	60
1.2.1. Préparation des échantillons de plantes	60
1.2.2. Préparation des capsules en or pour la pyrolyse en milieu confiné.....	60
1.2.3. Protocole de pyrolyse	62
2. EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE SOLUBLE DANS LES SOLVANTS ORGANIQUES.....	64
2.1. Principe de l'extraction au solvant par extracteur automatique "Accelerated Solvent Extraction - 350"	64
2.2. Protocole d'extraction	64
3. FRACTIONNEMENT DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR PHASE SOLIDE	65
3.1. Principe de la chromatographie liquide sur phase solide.....	66
3.2. Protocole de fractionnement	67
4. ANALYSE MOLECULAIRE DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS)	69
4.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	69
4.2. Appareillage	70
4.3. Protocole analytique	72
Chapitre IV. : Determination de la signature moleculaire des coniferes fossiles par la paleochimiotaxonomie experimentale – partie 1 : Araucariaceae	75
1. INTRODUCTION	75
2. SOME GENERALITIES CONCERNING THE ARAUCARIACEAE FAMILY	76
2.1. Taxonomy, geographical distribution and living environments.....	76
2.1.2. Fossil Araucariaceae.....	77
2.1.3. Usefulness of Araucariaceae from the past to present days	78
3. SAMPLES AND EXPERIMENTAL PROCEDURES	79
3.1. Samples	79
3.2. Experimental and analytical procedures	79
3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and identification of compounds..	79
4. RESULTS AND DISCUSSION	79
4.1. Molecular characteristics of artificially diagenetic <i>Araucaria</i> genus	79
4.1.1. Sesquiterpenoids.....	79
4.1.2. Diterpenoids	84
4.2. Molecular characteristics of artificially diagenetic of <i>Agathis</i> genus	89
4.2.1. Sesquiterpenoids.....	89
4.2.2. Diterpenoids	90

Table des matières

4.3.	Molecular characteristics of artificially diagenetic of <i>Wollemia</i> genus.....	91
5.	Conclusion	92
Chapitre V. : Determination de la signature moleculaire des coniferes fossiles par la paleochimiotaxonomie experimentale – partie 2: Pinaceae.....		
1.	SOME GENERALITIES ABOUT THE PINACEAE FAMILY	97
1.1.	Taxonomy, geographical distribution and living environment	98
1.2.	Evolution of Pinaceae through geological times	100
1.3.	Chemotaxonomy	103
2.	SAMPLES.....	104
3.	RESULTS.....	106
3.1.	Sesquiterpenoid composition of artificially matured Pinaceae	106
3.2.	Diterpenoid composition of artificially matured Pinaceae	108
3.3.	Triterpenoid composition of artificially matured Pinaceae.....	113
4.	DISCUSSION.....	118
4.1.	Shared molecular features of fossil Pinaceae	118
4.2.	Intergeneric variability in the molecular signature of matured Pinaceae ..	119
Chapitre VI. : Determination de la signature moleculaire des coniferes fossiles par la paleochimiotaxonomie experimentale – partie 3: Cupressaceae et Taxodiaceae		
1.	SOME GENERALITIES ABOUT THE CUPRESSACEAE AND TAXODIACEAE	125
1.1.	Taxonomy, geographical distribution and living environment	126
1.2.	Evolution of Cupressaceae and Taxodiaceae through geological times	128
1.3.	Chemotaxonomy	130
2.	SAMPLES.....	132
3.	RESULTS.....	135
3.1.	Sesquiterpenoid composition of artificially matured Cupressaceae	135
3.1.1.	Acyclic and monocyclic sesquiterpenoids.....	135
3.1.2.	Bicyclic sesquiterpenoids	136
3.1.3.	Tricyclic and other sesquiterpenoids.....	137
3.2.	Diterpenoid composition of artificially matured Cupressaceae.....	140
3.2.1.	Bicyclic diterpenoids	140
3.2.2.	Tricyclic diterpenoids	140
3.2.3.	Tetracyclic diterpenoids.....	148
3.2.4.	Other diterpenoids.....	148
3.3.	Sesquiterpenoid composition of artificially matured Taxodiaceae	150
3.4.	Diterpenoid composition of artificially matured Taxodiaceae.....	150
4.	DISCUSSION.....	156
4.1.	Shared molecular signatures of matured Cupressaceae and Taxodiaceae	156
4.2.	Distinctive molecular features of matured Cupressaceae and Taxodiaceae	157

Table des matières

4.3. Intergeneric variability in the molecular signature of matured Cupressaceae and Taxodiaceae.....	158
Chapitre VII.: Determination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paléochimiotaxonomie expérimentale – partie 4: Taxaceae, Sciadopityaceae et Podocarpaceae	167
1. SOME GENERALITIES ABOUT PODOCARPACEAE, TAXACEAE AND SCIADOPITYACEAE FAMILIES.....	167
1.1. Taxonomy, geographical distribution and living environment	167
1.2. Evolution of the Podocarpaceae, Taxodiaceae and Sciadopityaceae through geological times	170
1.3. Chemotaxonomy	172
1.3.1. Podocarpaceae.....	172
1.3.2. Taxaceae.....	173
1.3.3. Sciadopityaceae	173
2. SAMPLES.....	174
3. RESULTS.....	175
3.1. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Podocarpaceae	175
3.1.1. Sesquiterpenoids.....	175
3.1.2. Diterpenoids	176
3.2. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Taxaceae	180
3.2.1. Sesquiterpenoids.....	180
3.2.2. Diterpenoids.....	181
3.3. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Sciadopityaceae.....	185
4. DISCUSSION.....	186
4.1. An insight into the molecular features of matured Podocarpaceae	188
4.2. Molecular features of matured Taxaceae	188
4.3. Molecular features of matured Sciadopityaceae.....	189
Conclusion générale.....	193
Références bibliographiques	205
Annexe	235

Liste des illustrations

Introduction :

Fig. Int.1 : Transformation des biomolécules des plantes en géomolécules au cours de la fossilisation des plantes terrestres. 3

Chapitre I. : Plantes vasculaires : description, évolution, taxonomie & chimiotaxonomie botanique

Fig.I.1 : Origine et évolution des plantes vasculaires (gymnospermes et angiospermes). Modifié d'après [Stewart et Rothwell \(1993\)](#). 23

Fig. I.2 : Phylogénèse des conifères d'après le séquençage de l'ARNr 28S ([Stefanovic et al., 1998](#)). 27

Fig. I.3 : Les principales familles des composés spécifiques des plantes vasculaires. 32

Chapitre II. : Matière organique sédimentaire & paléochimiotaxonomie botanique

Fig. II.1 : Diagramme de van Krevelen H/C_{atomique} versus O/C_{atomique} avec la position des trois types de kérogène. Type I : lacustre ; Type II : marin ; Type III : terrestre. Modifié d'après [Vandenbroucke et Largeau \(2007\)](#). 39

Fig. II.2 : Evolution chimique et nature de la transformation de la matière organique au cours des trois stades de transformation. Schéma adapté d'après [Tissot et Welte \(1984\)](#). 42

Fig. II.3 : Principes de la chimiotaxonomie botanique et de la paléochimiotaxonomie botanique. 44

Liste des illustrations

Fig. II.4 : Transformation des bioterpénoïdes spécifiques de plantes en géoterpénoïdes au cours de la diagenèse.	45
Fig. II.5 : Exemples des biomolécules de type monoterpénoïdes.	46
Fig. II.6 : Exemples de principales classes de biomarqueurs des plantes vasculaires de la famille des sesquiterpénoïdes (Biomolécules → Biomarqueurs).	48
Fig. II.7 : Exemples de principale classes des biomarqueurs des plantes vasculaires de la famille des diterpénoïdes (Biomolécules → Biomarqueurs).	50
Fig. II.8 : Exemples des structures carbonées de certains triterpénoïdes (Biomolécules → Biomarqueurs).	51
Fig. II.9 : Structures de type polycadinène (à gauche) et de l'acide polycommuniqué (polylabdanoïde ; à droite).	52

Chapitre III. : Echantillons, protocoles et méthodes analytiques

Fig. III.1: Production de H ₂ au cours de la décomposition thermique de LiAlH ₄ (adapté d' Ares et al. (2008)).	61
Fig. III.2 : Dispositif de soudure des capsules d'or.	62
Fig. III.3 : Coupe d'un autoclave préparé avec des capsules en or.	63
Fig. III.4 : Dispositif et principe de la pyrolyse en milieu confiné.	63
Fig. III.5 : Principe et schéma simplifiés de la chromatographie liquide sur phase solide (alumine et silice).	68
Fig. III.6 : Appareillage et principe de fonctionnement d'un couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Schéma modifié d'après Peters et al. (2005)	71
Tab. III.1 : Liste des espèces et provenance des échantillons étudiés dans ce travail. Nancy : Jardin botanique du Montet ; Lyon : Jardin botanique de la Tête d'Or.	59

Chapitre IV. : Détermination de la signature moléculaire des conifères fossile par la paléochimiotaxonomie expérimentale – Partie 1 : Araucariaceae

- Fig. IV.1: Phylogenetic classification of conifers. 76
- Fig. IV.2: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 4a and 4b are given in Fig. 4. x: absence of compound; tr: at trace level; *: cadalane-type compounds. 82
- Fig. IV.3: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 4d, 4e and 4f are given in Fig. 4. tr: at trace level. 83
- Fig. IV.4: Mass spectra of some identified Araucariaceae sesquiterpenoids. a): saturated cadalane-type compounds; b): 4 α (H)-eudesmane (identified using Wiley275 database); c): 4 β (H)-eudesmane (identified from spectrum in [Alexander et al., \(1983\)](#)); d): norcadalene (identified from spectrum in [Singh et al. \(1994\)](#)); e): chamazulene (identified using Wiley275 database); f): pentamethyl-2,3-dihydroindene (identified using Wiley275 database). 84
- Fig. IV.5: Mass spectra of identified isohexyl alkylaromatic hydrocarbons in Araucariaceae species and mass spectral cleavage patterns (identified after [Ellis et al., \(1996\)](#)). a): 1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene; b): 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene; c): 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalenemethylretene. Mass spectra of some unidentified Araucariaceae diterpenoids, but similar to some of the identified isohexyl alkylaromatic hydrocarbons: d) to b) and e) to c). 85
- Fig. IV.6: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 8d and 8e are given in Fig. 8. The mass spectrum of 9a is given in Fig. 9. ★: labdanes; x: absence of compound. 86
- Fig. IV.7: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 5b, 5c, 5d and 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8a and 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b, 9c, 9d, 9e, 9f and 9g are given in Fig. 9. tr: in trace; x: absence of compound. 87
- Fig. IV.8: Mass spectra of some tentatively identified Araucariaceae diterpenoids and suggested mass spectral cleavage patterns for a, b, d and e. a: monoaromatic labdane; b:

Liste des illustrations

clerodane; c: methylretene (tentatively identified according to Alexander et al. (1995); d: 17-norphyllocladane (identified according to Noble et al. (1986); e: 16(H)-homo-phyllocladane. 88

Fig. IV.9: Mass spectra of some unidentified, but recurrent Araucariaceae diterpenoids. a) (only for *A. nemorosa* and *A. cunninghamii* in Fig. 6), i–j) (only for *Agathis*, in Fig. 11): in the aliphatic fraction; (b–g) in the aromatic fraction (Figs. 6 and 11).89

Fig. IV.10: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time windows) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of pyrolysates of *Agathis* species. The mass spectra of 4a, 4b, 4e, 4f and 4f are given in Fig. 4. x: absence of compound ; *: cadalane-type compounds.90

Fig. IV.11: Partial chromatograms (diterpenoids retention time windows) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of pyrolysates of *Agathis* species. The mass spectra of 5b to 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8a and 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b to 9j are given in Fig. 9. x: absence of compound.....91

Fig. IV.12: Partial chromatograms [sesquiterpenoids (a, b) and diterpenoids (c, d) retention time windows] of aliphatic (a, c) and aromatic (b, d) fractions of pyrolysates of *Wollemia nobilis*. The mass spectra of 4a, 4b, 4c, 4d and 4f are given in Fig. 4. The mass spectra of 5b to 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b to 9f are given in Fig. 9. *: cadalane-type compounds. 92

Tab. IV.1: Phylogentic relationships, geographical range and provenance of Araucariaceae species selected for this study..... 77

Tab. IV.2: Relative abundances (% GC-MS peak integration normalized to the highest peak) of saturated sesquiterpenoids and diterpenoids in Araucariaceae species obtained from the pyrolysis with LiAlH₄.80

Tab. IV.3: Relative abundances (% GC-MS peak integration normalized to the highest peak) of saturated sesquiterpenoids and diterpenoids in Araucariaceae species obtained from the pyrolysis without LiAlH₄.81

Tab. IV.4: Major sesquiterpenoids and diterpenoids classes detected in Araucariaceae species after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH₄ as reducing agent..... 85

Chapitre V. : Détermination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paléochimiotaxonomie expérimentale – Partie 2 : Pinaceae

Fig. V.1: Phylogenetic relationship of Pinaceae with other extant conifer families based on 28S rRNA gene sequences (Stefanović et al., 1998). 97

Fig. V.2: Phylogenetic relationships of extant Pinaceae genera according to Wang et al. (2000). Δ : Pinoideae; o: Laricoideae; *: Abietoideae. 98

Fig. V.3: Emergence of extant Pinaceae genera. Compilation of data based on a.): Delevoryas and Hope (1973); b.): Alvin (1960); c.): Klymiuk and Stockey (2012); d.): Liu and Basinger (2000); e.): Hermann (1985); f.): Schorn (1994); g.): Xiang et al. (2006); h.): Blokhina et al. (2006); i.): LePage (2003c); j.): LePage and Basinger (1995); k.): Miller Jr, (1977; 1988); l.): Wang et al., (2000); *.): Zachos et al. (2001). 101

Fig. V.4: Palaeogeographic reconstruction with the major land bridges of the Northern Hemisphere in polar projection during the Early Cretaceous (left) and the Palaeocene (right) modified according to LePage (2003a). The major land bridges: S.: Spitsbergen Corridor; PB.: Protoberingia; B.: Beringian Corridor; G.: DeGeer Route; T.: Thulian Route. TU.: Turgai Strait; A.: Africa; FENN.: Fennoscandia; EU.: Europe. 102

Fig. V.5: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH₄. X: absence of compound; tr.: at trace level; *: cadalane- type compounds. 109

Fig. V.6: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH₄. The mass spectra of 7a, 7b, 7c and 7d, are given in Fig. 7. X: absence of compound; tr.: at trace level. . 110

Fig. V.7: Mass spectra of some Pinaceae sesquiterpenoids. a.: 1-isopropyl-4-methylnaphthalene (norcadalene) (identified from mass spectrum in Singh et al., (1994); b.: tentatively identified norcadalene (identified from mass spectrum in Singh et al., (1994); c.: chamazulene (identified according to Wiley275 database); d.: unidentified sesquiterpenoid, C₁₄H₁₆. 111

Liste des illustrations

Fig. V.8: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH_4 . N.: Norpimaranes; P.: Isopimaranes; A.: Abietanes; F.: Norabietanes; n.: n-alkanes; C.: cembranes; X: absence of compound; tr.: at trace level. The mass spectra of 11a, 11b and 11c are given in Fig. 11..... 114

Fig. V.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level. A.: 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene; B.: 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene. 115

Fig. V.10: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Pinus sylvestris* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 116

Fig. V.11: Mass spectra of some Pinaceae diterpenoids. a.: isocopalane (identified from spectrum in Philp (1985); b.: cembrane (identified using Wiley275 database); c.: unidentified saturated tricyclic diterpenoid, $\text{C}_{20}\text{H}_{36}$ 116

Fig. V.12: Phylogenetic relationship of Pinaceae obtained from gene sequences (left) according to Wang et al. (2000), and established taxonomic relationship (right) according to terpenoid composition (this study). ■: higher proportion; ■: significant proportion ■: low proportion; □: absence.....121

Tab. V.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of selected Pinaceae species.105

Tab. V.2: Major detected sesqui- and di- terpenoids types detected in Pinaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH_4 as reducing agent. 117

Chapitre VI. : Détermination de la signature moléculaire des conifères fossile par la paléochimiotaxonomie expérimentale – Partie 3 : Cupressaceae & Taxodiaceae

Fig. VI.1: Phylogenetic relationship of Cupressaceae and Taxodiaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequences according to [Stefanović et al. \(1998\)](#). 125

Fig. VI.2: Phylogenetic relationships of the extant Cupressaceae and Taxodiaceae families based on the morphological and cpDNA evidences (modified from [Gadek et al. \(2000\)](#). Cun.: Cunninghamioideae; Tai.: Taiwanoioideae; Ath.: Athrotaxoideae; Seq.: Sequoioioideae; Tax.: Taxodioideae. 126

Fig. VI.3: Emergence and evolution of the Cupressaceae and Taxodiaceae families. Compilation of data based on a.): [Bosma et al. \(2012\)](#); b.): [Rothwell et al. \(2011\)](#); c.): [Escapa et al. \(2008\)](#); d.): [Endo \(1951\)](#); e.): [Heusser \(1990\)](#); f.): [Li and Yang \(2002\)](#). 130

Fig. VI.4: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH₄. The mass spectra of 6a, 6b, 6c are given in Fig. VI. 6. X: absence of compound; tr: at trace level; *: cadalane- type compounds. 138

Fig. VI.5: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fractions of pyrolysis products of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH₄. X: absence of compound; tr.: at trace level; S.: selinenes. 139

Fig. VI.6: Mass spectra of some identified Cupressaceae sesquiterpenoids. a.: tentatively identified drimane (identified from spectrum in [Alexander et al. \(1983\)](#); b.: δ -cuparenol; c.: cedrane; d.: α -cedrene (identified from spectra in [Grantham and Douglas \(1980\)](#)). 140

Fig. VI.7: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH₄. The mass spectra of compounds 12b, 12c, 12d, 12e and 12f are given in the Fig. VI.12. N.: Norpimaranes; P.: Pimaranes; A.: Abietanes; B: *ent*-beyerane; F.: Norabietanes; Ph: Phyllocladane; n.: n-alkanes; X: absence of compound; tr: at trace level. 143

Liste des illustrations

Fig. VI.8: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH₄. X: absence of compound; tr: at trace level.....144

Fig. VI.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Chamaecyparis nookatensis* and *Juniperus phoenicea* obtained from the pyrolysis without LiAlH₄. Mass spectra of 10a ~ 10e are given in the Fig. VI.10.....145

Fig. VI.10: Mass spectra of abietic and callitrisic acids. a.: dehydrocallitrisic acid (identified as methyl-ester-dehydrocallitrisic acid); b.: dehydroabietic acid (identified as methyl-ester-dehydroabietic acid); c.: 16,17-bisnor-dehydrocallitrisic acid (identified as methyl-ester-16,17-bisnordehydrocallitrisate); d.: 16,17-bisnor-dehydroabietic acid (identified as methyl ester 16,17-bisnordehydroabietate); e.: dehydrocallitrisal; f.: dehydroabietal..... 146

Fig. VI.11: Postulated diagenetic pathway of rimuanes and isopimaranes modified from [Tuo and Philp \(2005\)](#).....147

Fig. VI.12: Mass spectra of some Cupressaceae diterpenoids detected in the aliphatic fraction from pyrolysis with LiAlH₄. a.: tentatively identified as rimuane (according to [Philp \(1985\)](#); [Noble et al., \(1986\)](#)); b., c., d., e., f. : unidentified and recurrent saturated diterpenoids. 149

Fig. VI.13: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxodiaceae representatives obtained from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH₄. The mass spectra of 6b and 6c are given in Fig. VI.6. X: absence of compound; tr.: at trace level; *: cadalane-type compounds. 152

Fig. VI.14: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxodiaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH₄. The mass spectrum of 12b is given in Fig. VI.12. X: absence of compound; tr.: at trace level..... 153

Fig. VI.15: Phylogenetic relationship of Cupressaceae and Taxodiaceae obtained from DNA ([Gadek et al., 2000](#)) and palaeochemotaxonomic classifications proposed in this study. *IAH: Isohexyl Alkylaromatic Hydrocarbons. ■: higher proportion; ■: significant high proportion; ■: significant proportion; ■: low proportion; □: absence.163

Liste des illustrations

Tab. VI.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Taxodiaceae species in this study.	133
Tab. VI.2: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Cupressaceae in this study.	134
Tab. VI.3: Major sesqui- and diterpenoid derivatives detected in matured Cupressaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH_4 as reducing agent. Ph.: phenolic abietane; Ab.: abietanoic acids; C. : callitrisic abietane.....	154
Tab. VI.4: Major detected sesqui- and diterpenoid derivatives detected in matured Taxodiaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without LiAlH_4 (aromatic compounds) as reducing agent.	155

Chapitre VII. : Détermination de la signature moléculaire des conifères fossile par la paléochimiotaxonomie expérimentale – Partie 4 : Taxaceae, Sciadopityaceae et Podocarpaceae

Fig. VII.1: a.) Phylogenetic relationship of Podocarpaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequencing (Stefanoviac et al., 1998). b.) Phylogenetic relationships of extant Podocarpaceae genera according to Kelch (1998) and Conran et al. (2000).	168
Fig. VII.2: a.) Phylogenetic relationship of Taxaceae and Sciadopityaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequencing (Stefanoviac et al., 1998); b.) Phylogenetic relationships of extant Taxaceae and Sciadopityaceae genera according to Hao et al. (2008).	170
Fig. VII.3: Emergence and evolution of the Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae families. Compilation of data based on a.) Townrow (1967, 1969), b.) Bock (1969) and c.) Won and Renner (2006). Geologic time scale from the International Commission on Stratigraphy (ICS, version 2013/01).	171

Liste des illustrations

Fig. VII.4: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Podocarpaceae representatives obtained from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level.176

Fig. VII.5: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Podocarpaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . Mass spectra of 7a, 7b, 7c and 7d are given in the Fig. VII.7. X: absence of compound; tr.: at trace level.....179

Fig. VII.6: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Podocarpus totara* and *Prumnopitys andina* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . Dehydroabiatic acid identified as methyl-ester-dehydroabiatic acid; 7-oxo-dehydroabiatic acid identified as methyl-ester-7-oxo-dehydroabiatic acid); dehydroisopimaric acid identified as methyl-ester-dehydroisopimaric acid. 180

Fig. VII.7: Mass spectra of some Podocarpaceae diterpenoids. a.: unidentified tricyclic compound $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$; b., c. and d.: unidentified $\text{C}_{20}\text{H}_{34}$ tricyclic compounds..... 181

Fig. VII.8: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level.183

Fig. VII.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) aromatic (right) fractions of Taxaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . P.: pimaranes; A.: Abietanes; n.: n-alkanes; X: absence of compound; tr.: at trace level..... 184

Fig. VII.10: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Cephalotaxus fortunei* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4185

Fig. VII.11: Partial chromatograms (sesquiterpenoid (a, c) and diterpenoid (b, d) retention time windows) of aliphatic (a, b) and aromatic (c, d) fractions of *Sciadopitys verticillata* obtained from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH_4 . P.: pimaranes..... 186

Liste des illustrations

Tab. VII.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Podocarpaceae, Sciadopityaceae and Taxaceae species.174

Tab. VII.2: Major sesquiterpenoid and diterpenoid types detected in Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without LiAlH₄ (aromatic compounds) as reducing agent.187

Conclusion :

Fig. C.1 : Comparaison entre la classification phylogénétique (Stefanoviac et al., 1998) et la classification paléochimiotaxonomique (basée sur la composition des terpénoïdes obtenue par maturation artificielle) des différentes familles de conifère. *: IHAH: hydrocarbures isoheptyl-alkylaromatiques. 199

Tab. C.1 : Composition et distribution des sesquiterpénoïdes dans les différentes familles de conifères. l : composés majeurs ; o : composés mineurs ; l : proportions variables ; tr. : à l'état de trace ; / : absence. 196

Tab. C.2 : Composition et distribution des diterpénoïdes dans les différentes familles de conifères. l : composés majeurs ; O : composés mineurs ; l : proportions variables ; tr. : à l'état de trace ; / : absence.197

Tab. C.3: Terpénoïdes discriminants des conifères qui permettent de faire les distinctions interfamiliales et intergénériques. * : famille monotypique (une seule espèce), ** : échantillonnage peu représentatif ; ¹ : IHAH : hydrocarbures isoheptyl-alkylaromatiques.198

INTRODUCTION

Introduction générale

De la chimiotaxonomie à la paléochimiotaxonomie

A partir des années 70, de nombreuses techniques analytiques ont été mises au point ou perfectionnées. Parmi celles-ci, les procédés chromatographiques, spectrométriques et spectroscopiques ont permis de séparer et d'identifier les différents composés moléculaires qui constituent les êtres vivants. Ces innovations technologiques, et les découvertes qui en ont résulté, ont engendré un essor considérable dans le domaine de la **biochimie**. En effet, les nombreux travaux d'analyse et d'investigation du contenu moléculaire des êtres vivants qui ont été menés au fil des années ont permis d'acquérir une meilleure compréhension de la composition chimique des organismes vivants. Peu à peu, ces travaux ont abouti à un inventaire relativement précis des différentes familles de composés moléculaires (glucides, lipides, protéines, etc.) et des biomolécules (glucose, cholestérol, hémoglobine, etc.) qui les constituent.

De fil en aiguille, ces travaux ont souligné la particularité qu'avaient certains composés à n'être uniquement synthétisés que par les représentants de certains groupes d'êtres vivants (taxons). A titre d'exemples, les chlorophylles ne sont synthétisées que par les végétaux alors que les hémoglobines ne le sont que par les animaux. Les hopanoïdes et les stéroïdes sont tous deux des rigidifiants des parois cellulaires mais les premiers ne sont produits que par des procaryotes alors que les seconds ne le sont que par les eucaryotes. La mise en évidence des relations entre la composition moléculaire des êtres vivants et leur classification taxonomique est à l'origine de la **chimiotaxonomie** (ou **chimiosystématique**).

La chimiotaxonomie se définit donc comme la branche de la biochimie qui s'intéresse aux relations entre la composition chimique des organismes vivants et leur classification taxonomique. Elle a pour objectifs :

2. | Introduction

- d'identifier les biomolécules qui ont une **spécificité chimiotaxonomique**, c'est-à-dire caractéristiques d'un seul ou de quelques taxons ;

- d'établir une nomenclature qui permettrait d'identifier les êtres vivants sur la base de leur analyse moléculaire et plus particulièrement à partir de ces marqueurs moléculaires spécifiques.

De nombreuses études sur la composition moléculaire des plantes vasculaires terrestres ont pointé l'intérêt chimiotaxonomique de certaines protéines, de certains acides gras, de quelques flavonoïdes et surtout de lipides comme les terpénoïdes (e.g. Aplin et al., 1963; Thomas, 1969; Gornall et Bohm, 1978; Schirone et al., 1991; Castro et al., 1996; Wolff et al., 1997a; Iwashina, 2000; Otto et Wilde, 2001). Par exemple, les flavonoïdes sont principalement synthétisés par des angiospermes (Iwashina, 2000). Certains acides gras, tels que les acides cis- Δ^5 -oléfiniques ainsi que la plupart des diterpénoïdes sont plutôt spécifiques des conifères (Wolff et al., 1996, 1997a ; Otto et Wilde, 2001). Certains composés peuvent même n'être synthétisés que par un nombre très limité d'espèces, voire même par une seule, et sont par conséquent très spécifiques. C'est par exemple le cas de l'acide ricinoléique, le composé principal de l'huile de ricin, qui n'est synthétisé en quantité que par cette plante (Binder et al., 1962).

L'importance des **terpénoïdes** en chimiotaxonomie botanique a été soulignée par de nombreux travaux (Otto et Wilde, 2001). Ces composés sont des métabolites secondaires qui sont les constituants majeurs des huiles essentielles ainsi que des résines végétales et ils sont plus particulièrement synthétisés par les conifères. Leur intérêt chimiotaxonomique est notamment dû à leur grande diversité car ils sont représentés par plusieurs milliers de composés répartis sur plusieurs dizaines de classes structurales différentes. Cette importante diversité implique que de nombreux composés ne sont de fait synthétisés que par certains taxons de plantes. Ainsi, il est en théorie possible d'identifier un conifère à partir de l'analyse des composés terpéniques qui le constituent. Malheureusement, nos connaissances en chimiotaxonomie botanique restent aujourd'hui très lacunaires puisque les nombreux travaux n'ont pas permis d'établir un inventaire précis et exhaustif de l'ensemble des composés terpéniques synthétisés par chaque espèce de conifère.

Les débris végétaux (ou phytoclastes) qui contiennent les terpénoïdes peuvent ensuite être exportés jusque dans les bassins sédimentaires où ils sédimentent. Ces phytoclastes peuvent être sous forme de fines particules organiques ou sous forme de macro-restes fossiles. Après le dépôt, le sédiment, et notamment sa composante organique, subit diverses transformations diagénétiques (**Fig. Int.1**).

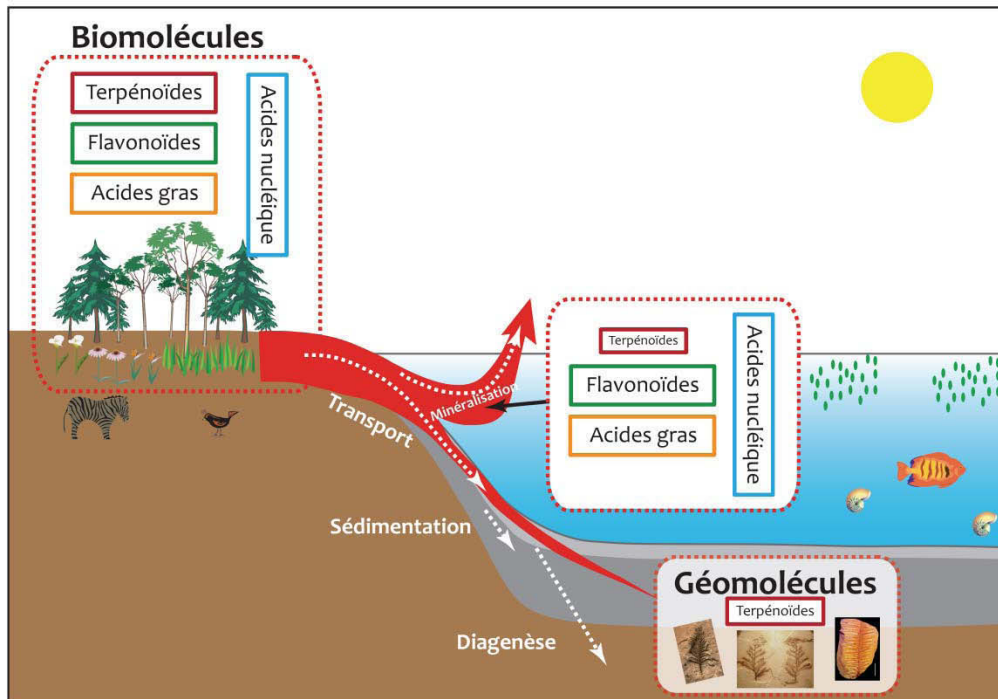


Fig. Int.1 : Transformation des biomolécules des plantes en géomolécules au cours de la fossilisation des plantes terrestres.

Outre leur spécificité taxonomique, les terpénoïdes ont également pour intérêt d'être des composés de bas poids moléculaire constitués d'un squelette carboné particulièrement résistant. Ces **bioterpénoïdes**, lorsqu'ils ne sont pas minéralisés, ne sont que peu dégradés au cours du transport, de la sédimentation et de la diagenèse. Ces dégradations chimiques n'affectent en général pas, ou peu, le squelette carboné des bioterpénoïdes et se limitent essentiellement à des réactions de défonctionnalisation (perte des fonctions oxygénées), de déméthylation, de perte des doubles liaisons C=C, de saturation ou d'aromatization des cycles. Ces transformations aboutissent à la formation de **géoterpénoïdes** à partir des bioterpénoïdes initiaux (**Fig. Int.1**).

4. | Introduction

La structure moléculaire de ces géoterpénoïdes préservés dans les dépôts sédimentaires reste proche de celle des bioterpénoïdes dont ils sont issus. Par conséquent, de par leur structure moléculaire, ces géoterpénoïdes ne peuvent avoir qu'une origine biologique. Ce sont par conséquent de véritables **biomarqueurs moléculaires** tels que la notion est définie en géochimie organique. Ces géoterpénoïdes sont particulièrement intéressants puisqu'ils peuvent conserver une partie ou la totalité de la spécificité taxonomique des bioterpénoïdes dont ils sont issus.

Ainsi, il existe des relations entre ces biomarqueurs moléculaires et la classification taxonomique des plantes fossiles. Ce sont ces relations qui sont étudiées par la **paléochimiotaxonomie botanique** (ou **paléochimiosystématique botanique**). La paléochimiotaxonomie botanique se définit donc comme la branche commune de la géochimie organique et de la paléobotanique qui s'intéresse aux relations entre la composition chimique des plantes fossiles et leur classification taxonomique.

Intérêts et domaines d'application de la paléochimiotaxonomie botanique

Applications en paléobotanique

Du fait des relations qui existent entre les biomarqueurs de plantes vasculaires et la taxonomie des plantes fossiles, les géoterpénoïdes préservés dans les plantes fossiles constituent d'excellents traceurs permettant d'apporter des informations sur la nature des fragments végétaux préservés dans les dépôts sédimentaires.

La paléochimiotaxonomie botanique est donc un outil complémentaire à la paléobotanique traditionnelle, à la paléoxylogie¹ et à la palynologie².

¹ Paléoxylogie : la science qui étudie la structure et les propriétés physiques, mécaniques et chimiques du bois fossile.

La paléochimiotaxonomie botanique est notamment susceptible d'apporter des informations pertinentes pour :

1) identifier des plantes fossiles difficilement identifiables par les méthodes traditionnelles. En effet, il est fréquent que des plantes fossiles soient difficilement associables à un genre et/ou une espèce précise, parfois même à une famille. Ce problème d'identification est essentiellement dû :

- à la mauvaise préservation des végétaux fossiles. La classification des plantes fossiles est basée sur des critères morphologiques susceptibles d'être mal, voire pas du tout, préservés lors de la fossilisation ;

- à la fragmentation des végétaux fossiles. La classification des plantes fossiles est basée sur un ensemble de critères morphologiques relatifs à différentes parties anatomiques (disposition des nervures et forme des feuilles ; disposition des feuilles et des fruits sur la tige; morphologie des fruits ; structure du xylème, etc.). Les plantes vasculaires fossiles ne sont que très rarement préservées entièrement (c'est-à-dire avec le tronc, les branches, les feuilles, les fruits et les racines en connexion) et il est par conséquent très rare de disposer de tous les critères morphologiques permettant de faire une identification qui soit fiable et précise.

Le problème des bois fossiles illustre très bien cette difficulté d'identification. Ils sont souvent retrouvés déconnectés des autres parties anatomiques et le seul critère pertinent qui permette de les associer à un taxon botanique reste la microstructure du xylème qui n'est pas toujours bien préservé. De plus, il n'est pas évident d'associer directement cette microstructure à des taxons botaniques. C'est pour cette raison qu'une nomenclature spécifique aux bois fossiles a été mise en place sur la base de leur microstructure. Cette classification paléoxylologique est basée sur des morphogènes (*Agathoxylon*, *Taxoxylon*, *Ginkgoxylon*, etc.) dont les correspondances avec la classification couramment utilisée en paléobotanique restent encore très floues. Par exemple, il n'est pas évident que les bois appartenant au morphogène *Agathoxylon* aient systématiquement pour origine des conifères du genre *Agathis* ou même de la famille des Araucariaceae. Ainsi, l'analyse moléculaire des géoterpénoïdes contenus dans les bois fossiles pourraient permettre de préciser leur origine botanique indépendamment de leur nomenclature paléoxylologique. ;

² Palynologie : la science qui étudie la morphologie des pollens et des spores fossiles et/ou actuelles.

6. | Introduction

2) réaliser des corrélations entre différents fragments ou produits végétaux (bois, feuilles, résine, etc.) fossiles. En effet, puisque les végétaux fossiles sont souvent retrouvés sous forme fragmentée dans les dépôts sédimentaires, il est difficile de déterminer si des fragments de natures différentes (bois, feuilles, fruits, spores, etc.) appartiennent à une même espèce où s'ils ont pour origine des taxons différents. Un exemple bien connu en paléobotanique est celui de la fougère paléozoïque *Lyginopteris oldhamia* qui est généralement retrouvée sous forme très fragmentée dans les dépôts sédimentaires. *Lyginopteris oldhamia* fait référence aux fragments de tige. Ses organes reproducteurs mâle et femelle étaient respectivement identifiés comme *Crossotheca* sp. et *Lagenostoma lomaxi* alors que son feuillage l'était comme *Sphenopteris hoeninghausi* avant que les paléobotanistes ne s'aperçoivent qu'il s'agissait là d'une seule et même plante (Lemoigne, 1988).

Le problème des ambres (résines fossiles) illustre également très bien ce problème de corrélation. Il est difficile de déterminer les plantes sources des ambres, y compris lorsque les ambres sont retrouvés dans des dépôts riches en végétaux fossiles bien identifiés, ou même en connexion avec ces végétaux, car rien n'indique que ce soient ces plantes qui aient réellement secrétées la résine. En revanche, l'analyse moléculaire des terpénoïdes de l'ambre peut bel et bien permettre de déterminer leur origine botanique, a fortiori si l'analyse est couplée à celle des phytoclastes présents dans le dépôt sédimentaire encaissant ;

3) établir des filiations phylogénétiques entre taxons fossiles. En effet, les études chimiotaxonomiques montrent que la composition moléculaire des plantes reflète la classification botanique et les affinités phylogénétiques entre différents taxons (Otto et Wilde, 2001). Typiquement, des taxons qui sont phylogénétiquement proches sont souvent caractérisés par des compositions moléculaires assez similaires. À l'inverse, des taxons qui sont phylogénétiquement éloignés sont généralement caractérisés par des compositions moléculaires différentes. Par exemple, les Cupressaceae et les Taxodiaceae sont deux familles de conifères phylogénétiquement très proches et sont toutes deux caractérisées par la présence de cuparanes qui ne sont pas synthétisés par les autres conifères (Otto et Wilde, 2001).

Ainsi, la paléochimiotaxonomie botanique est un outil pouvant permettre d'établir des relations phylogénétiques entre des taxons de plantes qui peuplaient les paléoflores. Cela peut s'avérer particulièrement utile pour les taxons aujourd'hui éteints pour lesquels les relations phylogénétiques ne peuvent pas être établies par les techniques de biologie moléculaire actuelles (séquençage d'ADN par exemple).

Applications pour les reconstitutions paléoenvironnementales, paléofloristiques et paléoclimatiques

Les bassins sédimentaires sont les réceptacles de l'ensemble des terpénoïdes issus des paléoflores terrestres (**Fig. Int.1**). Ainsi, les biomarqueurs de plantes préservés dans un dépôt sédimentaire sont le reflet des essences végétales qui constituaient la(les) flore(s) installée(s) sur les terres émergées proches à l'époque où le dépôt s'est mis en place.

L'analyse et l'étude détaillées des biomarqueurs de plantes détectés dans un dépôt sédimentaire permettent donc de préciser quelles plantes constituaient la(les) paléoflore(s) contemporaine(s) du dépôt. Par ailleurs, il existe des relations étroites entre la composition des flores et les paramètres climatiques. Chaque flore, de par les essences qui la constituent, reflète des conditions climatiques bien précises (température, humidité, saisonnalité, etc.). Par conséquent, il est également possible d'acquérir des informations paléoclimatiques via l'étude détaillée des biomarqueurs de plantes présents dans un dépôt sédimentaire. Couplée à une approche stratigraphique, la paléochimiotaxonomie botanique peut ainsi permettre de reconstituer l'évolution des paléoflores et des paléoclimats au cours des temps géologiques.

La paléochimiotaxonomie botanique est donc un outil complémentaire à la paléobotanique et la palynologie pour acquérir des informations paléofloristiques et paléoclimatiques. En ce sens, l'approche moléculaire est particulièrement pertinente car les biomarqueurs sont plus fréquents dans les archives sédimentaires que les macro-fossiles de plantes bien identifiés et ils peuvent être associés à des taxons contrairement aux spores et pollens préservés dans des dépôts mis en place il y a plusieurs dizaines de millions d'années.

8. | Introduction

Par exemple, [Hautevelle et al. \(2006a\)](#) ont mis en évidence un changement important de la nature des biomarqueurs de plantes préservés dans les dépôts sédimentaires d'âge Callovo-Oxfordien à l'Oxfordien inférieur. Ce changement était matérialisé par une augmentation de la proportion des abiétanes, notamment des acides abiétanoïques ainsi que par l'absence de diterpanes tétracycliques et d'abiétanes (cétono-)phénoliques. Sur la base de données paléochimiotaxonomiques disponibles dans la littérature, les auteurs ont pu montrer que ce changement dans la distribution des géoterpénoïdes était imputable à une augmentation de la proportion de Pinaceae (une famille de conifères) au sein des flores de l'époque. De plus, compte-tenu de certaines particularités morphologiques des Pinaceae par rapports aux autres plantes qui peuplaient les aires continentales au Jurassique supérieur, les auteurs avaient associé ce changement paléofloristique à une augmentation concomitante de l'aridité. Ce changement climatique était par ailleurs documenté par d'autres études paléoclimatiques. Cet exemple illustre très bien les applications que peut avoir la paléochimiotaxonomie botanique dans le domaine des reconstitutions paléoenvironnementales.

Applications en archéologie

En sus de ces applications dans les domaines de la paléobotanique et des reconstitutions paléoenvironnementales, la paléochimiotaxonomie botanique est également susceptible d'être une approche efficace et pertinente dans d'autres domaines comme l'archéologie et l'environnement par exemple ([Beck, 1974](#) ; [Simoneit, 2005](#)).

L'utilisation et la transformation de produits d'origine végétale sont les points communs à toutes les civilisations, y compris les plus anciennes. Parmi les produits les plus utilisés figurent plus particulièrement ceux issus de résines et d'huiles végétales qui sont particulièrement riches en terpénoïdes. Ces résines et huiles essentielles étaient notamment utilisées sous forme brute ou transformée pour la confection de peintures, de revêtements étanches ainsi que de produits de beauté, alimentaires et rituels. Les modifications qui affectent les terpénoïdes lors de la transformation du matériel végétal et de leur évolution au cours des siècles s'apparentent à celles qui se produisent au cours de la diagenèse

(défonctionnalisation, aromatisation, etc.). La paléochimiotaxonomie botanique peut donc permettre de préciser l'origine botanique de matériaux/substances associés à des objets archéologiques (Connan et Nissenbaum, 2003; Colombini et al., 2005; Hjulström et al., 2006).

Charrié-Duhaut et al. (2007) ont par exemple identifié deux types de signature moléculaire de la matière organique provenant d'une collection de poteries égyptiennes. Le premier type de signatures moléculaires est caractérisé par la présence des produits de la dégradation d'acides gras et de sesquiterpénoïdes (longibornéol à partir des données paléochimiotaxonomiques disponibles dans la littérature les auteurs ont pu montrer que cette signature est typique d'un mélange de matières d'origines animale (acides gras) et végétale (sesquiterpénoïdes). Le second type de signature moléculaire est caractérisé par la présence de triterpénoïdes (de types ursanes, oléananes et lupanes). Il est typique de la résine végétale des angiospermes. Les connaissances sur l'utilité de certains produits végétaux (huiles essentielles et résines) pour les peuples antiques couplées aux données moléculaires ont permis de mettre en évidence les modes d'utilisation de certaines poteries égyptiennes. Les auteurs en ont alors conclut que ces poteries ont d'abord été utilisées pour le stockage de produits utilisés pour certains rites (mélange de matières animales et végétales) avant d'être utilisées comme jarres canopiques (d'où la présence de résine d'angiospermes) par les égyptiens.

Ainsi, l'analyse moléculaire de matériaux archéologiques d'origine végétale peut permettre de reconstituer les coutumes des anciennes civilisations ainsi que de préciser les modes de vie et de culte de peuples aujourd'hui disparus.

Applications en environnement

Malgré l'utilisation de plus en plus intensive de matériaux synthétiques dans les civilisations actuelles, des matériaux d'origine végétale sont encore couramment utilisés comme matière première dans divers domaines de l'industrie. Ces matériaux constituent donc de fait une source de pollutions qu'il est nécessaire de savoir tracer dans

l'environnement. Au cours des processus industriels et suite à leur rejet dans l'environnement, les bioterpénoïdes issus des produits végétaux se dégradent et sont susceptibles de se transformer en composés assez similaires aux géoterpénoïdes formés lors de la diagenèse. La paléochimiotaxonomie botanique peut donc permettre de déterminer quels sont des composés susceptibles d'être générés dans l'environnement suite à des rejets de déchets d'origine végétale.

Par exemple, de nombreuses études ont porté sur les rejets en aval des usines à papier qui utilisent essentiellement des pins pour la fabrication de la pâte à papier (Leppänen et Oikari, 1999, Leppänen et al., 2000). Les pollutions issues de ces rejets peuvent être tracées grâce à des marqueurs moléculaires spécifiques aux pins comme les acides abiétanoïques. Cependant, ces traceurs moléculaires ont leurs limites puisque ces composés sont instables et se dégradent rapidement avant et après leur rejet dans les environnements naturels. En revanche, les produits issus de la dégradation des acides abiétanoïques sont nettement plus stables et sont similaires à ceux produits par la diagenèse de l'acide abiétique (abiétanes aromatiques). Par conséquent, ces composés sont également de bons traceurs moléculaires pour étudier les pollutions provoquées par les usines à papier.

PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE

Actuellement, les données paléochimiotaxonomiques disponibles ont été acquises via deux approches différentes et complémentaires.

La première approche consiste à prédire les transformations diagénétiques qui devraient théoriquement affecter les biomolécules ayant un intérêt chimiotaxonomique. Ces transformations sont supposées être limitées à la perte des fonctions oxygénées ainsi qu'à la saturation ou à l'aromatization des cycles sans affecter significativement le squelette carboné. Cette extrapolation des données chimiotaxonomiques publiées en données paléochimiotaxonomiques via la prédiction des transformations diagénétiques est aujourd'hui la principale source d'informations en paléochimiotaxonomie.

Cependant plusieurs difficultés découlent de ce mode d'acquisition des données paléochimiotaxonomiques. Premièrement, comme indiqué auparavant, les données chimiotaxonomiques sont de fait elles-mêmes très lacunaires et il n'est donc pas possible d'obtenir des données paléochimiotaxonomiques qui soient exhaustives. De plus, cette extrapolation n'est pas rigoureuse car il est difficile de prédire de manière certaine les transformations diagénétiques. Par ailleurs, du point de vue analytique, il n'est pas évident de savoir identifier les composés déduits de cette extrapolation s'ils n'ont jamais été décrits dans la littérature auparavant.

La seconde approche consiste à analyser des plantes fossiles bien identifiées afin de déterminer la signature moléculaire du taxon correspondant. Cependant, ces analyses n'apportent que des informations limitées puisque les fossiles de végétaux bien identifiés et portant des biomarqueurs moléculaires sont rares. De plus, l'analyse moléculaire d'un nombre de plantes fossiles qui soit significatif et représentatif de l'ensemble des végétaux ayant vécu relèverait d'un travail d'analyse et de catalogage considérable. Il n'est donc pas non plus possible d'acquérir par ce biais des informations paléochimiotaxonomiques qui soient exhaustives.

Ainsi, les modalités d'acquisition des données paléochimiotaxonomiques induisent inévitablement des lacunes et des incertitudes qui permettent difficilement d'associer chaque taxon de plante fossile à une signature moléculaire bien précise et définie.

Ce travail de thèse propose une approche alternative pour acquérir des données paléochimiotaxonomiques. Cette troisième approche, la **paléochimiotaxonomie expérimentale**, consiste à réaliser des maturations artificielles par pyrolyse en milieu confiné de plantes actuelles. Ces maturations permettent de reproduire en laboratoire et sur une durée raisonnable l'évolution diagénétique de fragments végétaux (typiquement des rameaux et des feuilles) prélevés sur un individu d'une espèce donnée. L'analyse de ces fragments après maturation artificielle permet d'obtenir la signature moléculaire de l'équivalent fossile de la plante fraîche maturée. Cette procédure de maturation artificielle par pyrolyse en milieu confiné a été initialement développée dans les années 80 pour des applications pétrolières, notamment pour étudier la maturation thermique des kérogènes

ainsi que la genèse d'huile et de gaz (Monthieux et al., 1985 ; Landais et al., 1989). Dans les années 2000, la pyrolyse en milieu confiné a été utilisée pour réaliser des maturations artificielles de tissus animaux et végétaux afin de préciser leur évolution chimique lors de leur fossilisation (Stankiewicz et al., 2000 ; Gupta et al., 2006, 2007). Plus récemment, cette procédure a été adaptée pour acquérir des informations paléochimiotaxonomiques (Hautevelle et al., 2006b).

Cette approche tout à fait novatrice permet de pallier aux différentes lacunes et incertitudes inhérentes aux deux approches traditionnelles sus-citées. En effet, elle permet de s'affranchir d'une part des lacunes et des extrapolations "hasardeuses" des données issues de la chimiotaxonomie et, d'autre part, de la disponibilité du matériel paléobotanique de qualité.

Cependant, si la paléochimiotaxonomie expérimentale permet de contourner certaines difficultés inhérentes aux approches plus classiques, l'utilisation de plantes actuelles pour acquérir des données sur la composition chimique des plantes fossiles induit également quelques inconvénients. En effet, la flore actuelle est le fruit de l'évolution des végétaux terrestres depuis de Dévonien et elle n'est pas représentative des flores passées, a fortiori des flores paléozoïques. Ainsi, certains taxons anciens n'ont plus de représentants actuels alors que certains taxons actuels n'étaient pas représentés par le passé. Cela limite et contraint fortement la détermination de la signature moléculaire par le biais de la paléochimiotaxonomie expérimentale.

L'objectif principal de ce travail de thèse est de compléter nos connaissances en paléochimiotaxonomie des conifères en réalisant des maturations artificielles sur un nombre représentatif de leurs représentants actuels. Ce travail s'intéresse plus particulièrement aux conifères car ils constituent une composante essentielle des flores méso-cénozoïques et ils sont réputés synthétiser de grandes quantités de terpénoïdes ayant une spécificité chimiotaxonomique.

Il s'agit plus précisément :

- 1) de réaliser des maturations artificielles sur un échantillonnage jugé représentatif de conifères actuels (68 espèces) ;
- 2) de déterminer la signature moléculaire de l'équivalent fossile de chacune des 68 espèces de conifères ;
- 3) de mettre en évidence des caractéristiques moléculaires communes aux représentants de chaque famille et de chaque genre de conifères afin de souligner celles qui peuvent être utilisées en paléochimiotaxonomie botanique ;
- 4) de comparer les données acquises par voie expérimentale avec les données paléochimiotaxonomiques déjà publiées afin de confirmer, infirmer, compléter, modérer les informations paléochimiotaxonomiques aujourd'hui disponibles dans la littérature.

PLAN ADOPTÉ

Chapitre I : Plantes vasculaires : description, évolution, taxonomie & chimiotaxonomie botanique

Ce chapitre s'articule en deux parties. La première partie présente les généralités sur les plantes vasculaires, et plus particulièrement sur les gymnospermes et les conifères. Leur apparition et leur évolution au cours des temps géologique sont décrites. Les relations entre l'évolution des plantes et les changements paléoenvironnementaux sont également exposées. La seconde partie traite plus spécifiquement de chimiotaxonomie. Elle présente une synthèse des connaissances actuelles en chimiotaxonomie et permet d'introduire ultérieurement les notions de paléochimiotaxonomie.

Chapitre II : Matière organique sédimentaire et paléochimiotaxonomie botanique

Ce chapitre s'articule également autour de 2 parties. La première partie décrit la nature, l'origine et l'évolution de la matière organique sédimentaire. La seconde traite plus particulièrement de paléochimiotaxonomie.

Chapitre III: Echantillons, protocoles & méthodes analytiques

Ce chapitre présente tout d'abord les échantillons de conifères ayant fait l'objet de maturations artificielles dans ce travail. Les protocoles expérimentaux (pyrolyse en milieu confiné) et analytiques (extraction et fractionnement de la matière organique soluble, analyse moléculaire par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse) sont également décrits.

Chapitre IV à VII: Détermination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paléochimiotaxonomie expérimentale

Ces 4 chapitres présentent les résultats sur la caractérisation de la composition des terpénoïdes des 7 familles de conifères actuels soumises à la maturation artificielle.

Le **chapitre IV** traite des **Araucariaceae**. Ce chapitre est présentée sous la forme d'un article publié à Biogeosciences ([Lu et al., 2013](#)).

Le **chapitre V** s'intéresse aux **Pinaceae**.

Le **chapitre VI** présent les travaux sur les **Cupressaceae et les Taxodiaceae**.

Finalement, le **chapitre VII** traite des **Podocarpaceae, Sciadopityaceae et Taxaceae**.

Les chapitres V à VII sont également rédigés en anglais dans le but de valoriser les résultats acquis dans de futures publications.

Chapitre I

**PLANTES VASCULAIRES : DESCRIPTION,
EVOLUTION, TAXONOMIE
&
CHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE**

Chapitre I. : Plantes vasculaires : description, évolution, taxonomie & chimiotaxonomie botanique

1. APPARITION, EVOLUTION ET CLASSIFICATION DES PLANTES TERRESTRES

1.1. Apparition et évolution des plantes vasculaires au Paléozoïque

Les plantes terrestres (ou embryophytes) regroupent les bryophytes et les tracheophytes³. Elles ont probablement évolué à partir d'algues vertes (Chlorophyta) et plus particulièrement celles de la famille des Charophyceae comme l'attestent les données biochimiques (ADN, *rbcL* ; Kranz et al., 1995 ; Lewis et McCourt, 2004 ; McCourt et al., 2004 ; Turmel et al., 2007). Des spores préservées dans des dépôts sédimentaires de l'**Ordovicien** moyen (475 Ma) sont les témoins des plus anciennes plantes terrestres (Wellman et Gray, 2000). Les premiers macrofossiles de plantes vasculaires (*Cooksonia*, appartenant aux Rhynopsida⁴) sont datés du Silurien moyen (Edwards et Feehan, 1980). La période **siluro-dévonienne** est marquée par une radiation intensive des plantes terrestres primitives (Bateman et al., 1998). Les terres émergées étaient alors peuplées par des bryophytes comme les hépatiques et les anthocérotes (Edwards et Fanning, 1985 ; Kenrick et Crane, 1997 ; Bateman et al., 1998). Les plantes terrestres se diversifient vers le **Dévonien** inférieur

³ : Trachéophytes = plantes vasculaires incluant les ptéridophytes (fougères) et les spermatophytes (plante à graines). Ces derniers comprennent les gymnospermes (graine nue) et les angiospermes (graine enveloppée par le 'fruit')

⁴ : Rhynopsida est la division la plus primitive des Trachéophytes.

après avoir développé des adaptations morphologiques plus appropriées à la vie terrestre, telles que :

- des vaisseaux qui permettent le transport de l'eau et des nutriments vers chaque partie de la plante,
- des tiges comme organes de support,
- un nouveau mode de reproduction s'affranchissant du milieu strictement aquatique,
- la capacité à synthétiser de la cutine et de la sporopollénine qui assurent une protection contre la sécheresse (Erdwards et Selden, 1992 ; Kenrick et Crane, 1997 ; Willis et McElwain, 2002).

Du **Dévonien** au **Carbonifère** supérieur, des communautés de plantes terrestres se forment et se diversifient tout en colonisant les surfaces continentales en fonction de zones climatiques. Six aires biotiques ont ainsi été identifiées (Willis et McElwain, 2002). À cette époque, la morphologie des plantes évolue :

- leur taille s'accroît (épaississement du tronc),
- leur système vasculaire se perfectionne et se complexifie (apparition des stèles),
- leur système reproductif se diversifie (apparition de deux variétés de spores et d'un système de réception des pollens). Par ailleurs, l'apparition de deux tailles de spores, méga- et microspores, marque une étape importante dans l'évolution des spermaphytes (plantes à graines ; Chaloner, 1967).

Vers la transition **Dévonien / Carbonifère**, les gymnospermes primitives apparaissent (**Fig. I.1**). Les Ptéridospermes, ou Pteridospermatophytes, apparaissent au **Dévonien** supérieur (Beck, 1976) et jouent un rôle important dans la composition des flores paléozoïques. Les Cordaïtales apparaissent au **Mississippien** et peuplent les forêts tropicales du Permo-Carbonifère (Falcon-Lang, 2003, 2005 ; Taylor et al., 2009). Les gymnospermes primitives se diversifient au cours du Carbonifère. Au **Pennsylvanien**, les premières gymnospermes modernes, comme les Cycadales (Pant, 2002) et les Coniférales primitives (Voltziales : descendant de certains Cordaïtales), apparaissent (Scott, 1974 ; Scott et Chaloner, 1983).

Au **Permien** inférieur, une diversification rapide des plantes vasculaires, comme les Cordaïtales, les Ptéridospermes, les Cycadales, les Coniférales primitives, se produit au sein

des paléoflores paléozoïques (Cleal et Thomas, 2009). C'est également à cette époque qu'apparaissent de nouveaux ordres de plantes vasculaires comme les Ginkgoales et Gnétales (Zhou, 1991 ; Taylor et al., 2009 ; Fig. I.1). Jusqu'au milieu du Permien, sept aires biotiques ont été distinguées en fonction des zones climatiques (Rees et al., 1999a). Cette diversification permienne est considérée comme l'apogée du premier grand développement de la végétation terrestre (e.g. Willis et McElwain, 2002 ; Cleal et Thomas, 2009).

1.2. Evolution des plantes vasculaires au Méso-Cénozoïque

A la limite **Permien-Trias** survient l'une des plus grandes crises biologiques de l'histoire de la planète. Cet événement est responsable de la disparition de 93 - 95 % des organismes marins (essentiellement des organismes littoraux ; Raup, 1979) et de 70 % des organismes terrestres (en particulier les animaux, y compris les insectes ; King, 1991 ; Maxwell, 1992). Concernant les plantes terrestres, une baisse de 50% de la diversité est observée sur une durée de 25 Ma. Ceci se traduit par une réduction progressive des communautés de flores paléozoïques (avec notamment la disparition des Cordaïtales) puis l'apparition de nouvelles associations floristiques, intégrant de nouveaux ordres tels que les Bennettiales (Trias inférieur ; Pott et al., 2007), les Cycadales, les Ginkgoales et les Coniférales. Ces derniers se diversifient au cours du **Trias** (Knoll, 1984), les Coniférales modernes apparaissent donc vers la **fin du Trias** (e.g. Taylor et al., 2009). Les paléoflores terrestres sont donc profondément renouvelées à la transition Paléozoïque-Mésozoïque.

A la limite **Trias-Jurassique**, plus de 95% de la paléoflore est renouvelée (Willis et McElwain, 2002). Ce renouvellement se matérialise par le remplacement des plantes à 'grandes feuilles' par des plantes à feuilles plus 'petites' ou 'disséquées'. Cette évolution morphologique reflèterait une adaptation à un climat plus chaud et plus aride (McElwain et al., 1999). A partir du **Pliensbachien**, cinq aires biotiques s'individualisent en fonction du climat (Rees et al., 1999a). La diversification et l'expansion géographique des gymnospermes atteignent leur maximum au Jurassique supérieur (Rees et al., 1999b).

Durant le début du **Crétacé**, les gymnospermes continuent de se diversifier et prennent une position dominante parmi les plantes terrestres (Willis et McElwain, 2002). Cette

situation perdue jusqu'à la fin du Crétacé inférieur. La fin du Crétacé inférieur est marquée par l'apparition des angiospermes (plantes à fleurs : un autre grand embranchement de plantes vasculaires ; [Brenner, 1996](#)). Les angiospermes semblent être apparues à partir de l'évolution des Bennettiales ([Crane et al., 1995](#)) ou des Gnétales ([Doyle, 1998](#) ; [Fig. 1.2](#)). Après leur apparition, les angiospermes se diversifient rapidement jusqu'au milieu du Crétacé supérieur ([Friis et al., 2000](#) ; [Coiffard et al., 2012](#)) et deviennent progressivement majoritaires sur les gymnospermes dans les régions situées en basse latitude et caractérisées par un climat tropical humide ([Crane, 1987](#)). L'importance des gymnospermes au sein des flores terrestres continue de décroître jusqu'à la limite Crétacé-Paléogène (K/Pg ; [Cleal et Thomas, 2009](#)).

La limite **Crétacé/Paléogène** (K/Pg ; 65 Ma) est caractérisée par une nouvelle crise biologique majeure qui se traduit par l'une des plus grandes extinctions de masse de l'histoire de la Terre. Elle se matérialise, dans le monde végétal, par un renouvellement et une réorganisation des paléoflores ([Spicer et Shackleton, 1989](#) ; [Truswell, 1990](#)), en particulier en Amérique du nord ([Upchurch et Wolfe, 1987](#)). Plus précisément, cette crise biologique aboutit à l'extinction des Bennettiales et à la réduction considérable en abondance et en diversité des Cycadales, Ginkgoales et Gnétales. Par ailleurs, chez les gymnospermes, seules les Coniférales ont gardé une importante diversité. Quant aux angiospermes, environ 5 à 10 % des espèces sont affectées par l'extinction de masse ([Halstead, 1990](#)). Certains taxons, tels que les Poaceae, apparaissent au Paléocène et commencent immédiatement à conquérir le globe ([Jacobs et al., 1999](#)).

Du **Paléocène** supérieur jusqu'au début de l'**Eocène** (65 - 45 Ma), les végétaux étaient adaptés du point de vue de leur morphologie à un climat chaud et humide ([Willis et McElwain, 2002](#)). Le nombre des aires biotiques des plantes terrestres varie de cinq à l'**Eocène** inférieur jusqu'à dix à la fin du **Miocène** ([Willis et McElwain, 2002](#)). Dans ce contexte, les gymnospermes s'installent préférentiellement dans des zones tempérées froides à subtropicales alors que les angiospermes présentent une distribution plus vaste et ont colonisé toutes les aires biotiques avec des formes très variées ([Wolfe, 1985](#) ; [Willis et McElwain, 2002](#)). Les 10 aires biotiques mises en place au **Miocène** sont, dans les grandes lignes, toujours reconnaissables aujourd'hui.

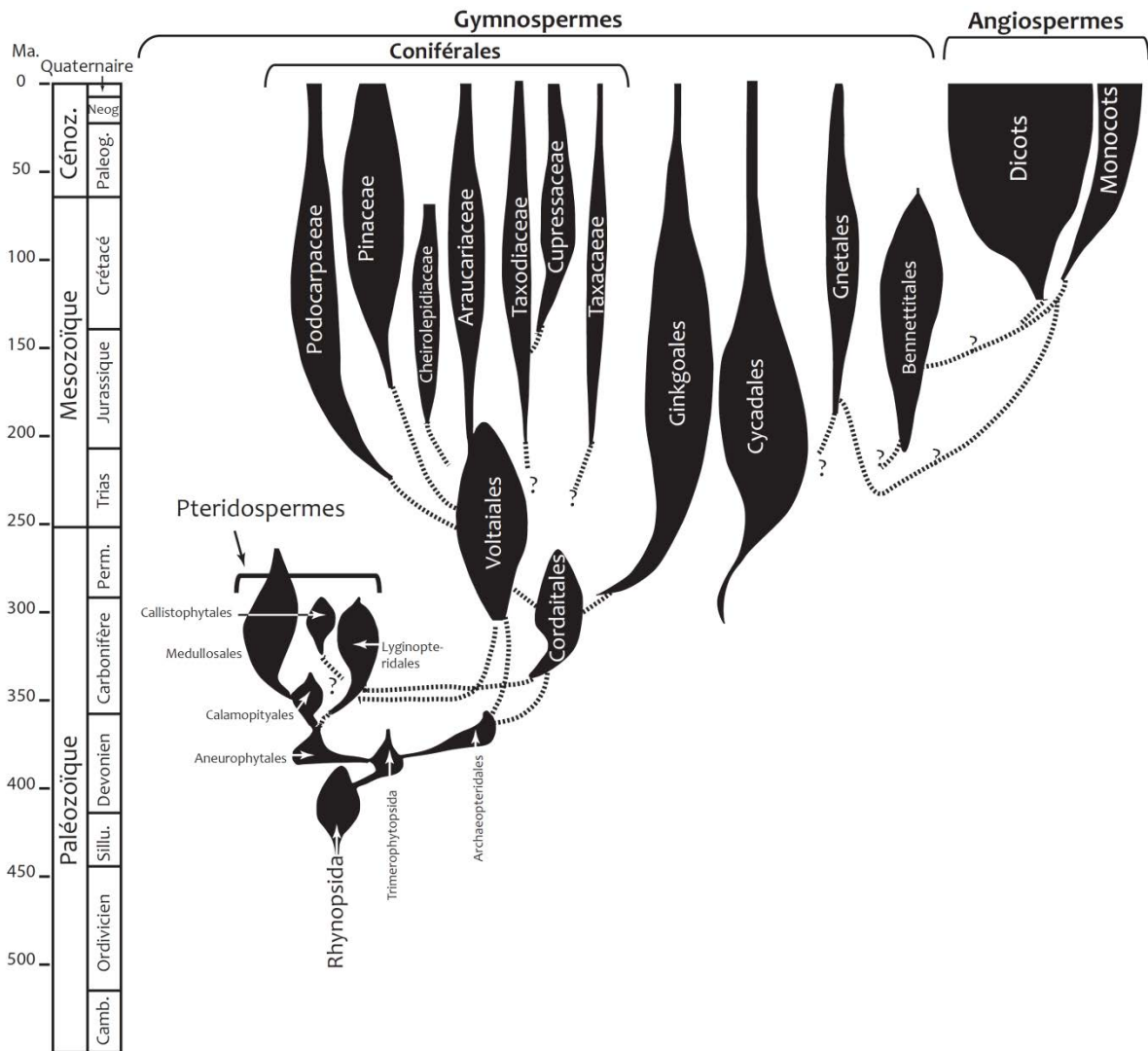


Fig.1.1 : Origine et évolution des plantes vasculaires (gymnospermes et angiospermes). Modifié d'après Stewart et Rothwell (1993).

2. APPARITION, EVOLUTION ET CLASSIFICATION DES CONIFERALES

Les conifères constituent un sous-embanchement des gymnospermes (plantes à graines). Les conifères diffèrent des autres gymnospermes (Ginkgoales, Gnétales et Cycadales) par la présence de cônes qui portent les graines. Ils sont aussi caractérisés par la présence des vaisseaux résineux et de feuilles parfois réduites à des aiguilles. Les conifères

constituent une composante essentielle des flores actuelles. Plus de 600 espèces ont été décrites et sont réparties dans environ 70 genres inclus dans 7 familles bien distinctes (Farjon et al., 1993). C'est l'ordre le plus diversifié parmi les gymnospermes.

Les conifères sont probablement apparus au **Pennsylvanien** (Carbonifère supérieur ; Scott et Chaloner, 1983 ; Fig. I.1). L'évolution des conifères se subdivise en 2 étapes : l'apparition et la diversification des premiers conifères (l'ordre des Voltziales) et la diversification des conifères modernes (l'ordre des Coniférales).

2.1. Apparition et développement des Voltziales

Les Voltziales ont probablement émergé à partir des Cordaitales (Hilton et Bateman, 2006 ; Gomankov, 2009) et sont apparues au **Pennsylvanien** inférieur dans les régions équatoriales (Scott, 1974 ; Scott et Chaloner, 1983 ; Looy, 2007). Puis, elles se sont propagées sous des altitudes et des latitudes plus élevées (Hermsen et al., 2007). Les Voltziales ont colonisé toutes les régions de la planète pendant le **Trias** avant de disparaître lors de crise Trias-Jurassique (Cleal et Thomas, 2009).

2.2. Apparition et développement des conifères modernes

Les conifères modernes (appelés les **conifères**) comprennent 8 grandes familles suivantes : Araucariaceae, Cheirolepidiaceae, Cupressaceae, Podocarpaceae, Pinaceae, Sciadopityaceae, Taxodiaceae et Taxaceae (Fig. I.1). Ils ont probablement émergé à partir des Utrechtiaceae (une famille de Voltziales ; Florin, 1951) et remplacent progressivement les Voltziales sur les terres émergées. Ces familles ont toujours des représentants actuels à l'exception des Cheirolepidiaceae.

Les Podocarpaceae et les Araucariaceae sont apparues au **Trias inférieur** dans l'hémisphère sud (Townrow, 1967, 1969 ; Stockey, 1982). Ils sont suivis par l'apparition des autres familles de conifères, telles que les Cheirolepidiaceae, les Cupressaceae, les Sciadopityaceae, les Pinaceae, les Taxaceae et les Taxodiaceae à l'hémisphère nord au cours du **Trias supérieur** (Miller Jr, 1977 ; Bock, 1969 ; Delevoryas et Hope, 1973 ; Axsmith et al., 2004 ; Won et Renner, 2006 ; Bosma et al., 2012 ; Fig. VII.2).

Au cours du **Mésozoïque**, les conifères se diversifient et peuplent toutes les terres émergées. Plus précisément, les Podocarpaceae colonisent progressivement l'hémisphère nord (eg. Gomolitzky, 1962 ; Gnaedinger, 2007), tout comme les Araucariaceae (Kershaw et Wagstaff, 2001). L'évolution des Pinaceae est mal connue avant la transition Jurassique supérieur/Crétacé inférieur, du fait d'une faible préservation des fossiles (macrorestes et pollens ; Rothwell et al., 2012). A partir du Crétacé inférieur, les Pinaceae peuplent très rapidement les aires terrestres qui se situent entre les moyennes et hautes latitudes de l'hémisphère nord (Liu et Basinger, 2000). Au cours du Jurassique, deux sous-familles de Cupressaceae s'individualisent, les Cupressoideae et les Callitroideae. Leur apparition est synchronique de la partition définitive de la Pangée en Laurasie et Gondwana. Cela se traduit par une distribution géographique distincte de ces deux sous-familles avec les Cupressoideae en Laurasie (la partie nord de la Pangée) et les Callitroideae sur le Gondwana (la partie sud de la Pangée, Mao et al., 2012). Les Taxodiaceae peuplent les terres émergées de l'hémisphère nord, plus particulièrement l'Asie. Les Sciadopityaceae se diversifient dans hémisphère nord, notamment dans les régions où le climat est tempéré (Eurasie et Amérique du Nord ; Stockey et al., 2005 ; Jiang et al., 2012). Les Taxaceae sont représentés par un faible nombre de taxons dans l'hémisphère nord (Europe, Asie et Amérique du Nord ; Miller Jr, 1977 ; Hao et al., 2008). Quant aux Cheirolepidiaceae, ils ont une morphologie adaptée au climat tempéré chaud et humide à tropical sec et se diversifient dans les régions à basse latitude (Watson, 1988 ; Axsmith et Jacobs, 2005 ; Taylor et al., 2009). A partir du Crétacé supérieur, les Cheirolepidiaceae ont commencé à périr à cause de la compétition avec les angiospermes. A la fin du Crétacé, un refroidissement climatique au Maastrichtien semble avoir accéléré leur disparition (Gerstel et al., 1986 ; van der Ham et al., 2010). Cette famille disparaît lors de la crise du Crétacé/Paléogène (K/Pg).

A l'exception des Cheirolepidiaceae, les autres familles des conifères ont résisté à l'extinction de masse du **Crétacé/Paléogène**. Cependant, du fait de l'adaptation rapide des angiospermes à presque toutes les zones climatiques après la crise biologique, la diversification et la colonisation des aires biotiques par les conifères sont freinées par celles des angiospermes au cours du Cénozoïque. Les Coniférales prédominent toujours dans les zones tempérées froides et sont de moins en moins fréquentes dans les zones tropicales humides (Wolfe, 1985 ; Willis et McElwain, 2002). De plus, du fait de deux refroidissements

successifs à l'**Oligo-Miocène** et au **Plio-Pléistocène**, la diversité, l'abondance et la distribution géographique des différentes familles de conifères ont été beaucoup réduites ou modifiées. Les Podocarpaceae se retirent de l'hémisphère nord et leur distribution est réduite à l'hémisphère sud et Asie du Sud-Est (Jordan, 1995 ; Wagstaff, 2004 ; Jin et al., 2010). L'abondance et la diversité des Sciadopityaceae sont considérablement réduites pour aboutir à une espèce vivante actuellement et restreinte aux forêts humides du Japon. La population des Taxaceae est également réduite et certaines espèces sont devenues endémiques à certaines localités de l'hémisphère nord. Concernant les Pinaceae, ces refroidissements ne semblent que réduire leur population alors que leur diversité phylogénétique n'est que peu affectée. Quant aux Taxodiaceae, leur distribution est restreinte à certaines localités de l'Asie, de l'Amérique du Nord et de l'Australie. Malgré la résistance au froid de certains Cupressaceae, leur abondance est significativement réduite et la distribution géographique de certaines espèces est limitée à certaines localités de l'hémisphère sud.

Les relations phylogénétiques des sept familles actuelles de conifères ont été beaucoup étudiées depuis la fin du XVIII siècle sur la base de comparaisons morphologiques des feuillages, des organes reproducteurs et aussi du mode de pollinisation (i.e. Saxton, 1913 ; Florin, 1951 ; Hart, 1987 ; Page, 1990 ; Miller Jr, 1999). Cette classification a été, par la suite, confirmée par Stefanoviac et al. (1998) via l'analyse des séquences d'ARNr 28S. Les conifères forment un groupe de plantes monophylétique (i.e. les conifères ont un même ancêtre commun), y compris les Taxaceae qui sont souvent considérées comme un ordre différent des conifères (ordre des Taxales). Les Pinaceae sont été considérées comme les plantes sœurs des autres conifères (Fig. I.3). Les Cupressaceae et les Taxodiaceae sont parfois regroupées sous une même famille (Cupressaceae au sens large). Elles ont des relations phylogénétiques étroites avec les Taxaceae et les Sciadopityaceae. Quant aux Cheirolepidiaceae, elles se distinguent des autres conifères par leur pollen de type *Classopolis* et leurs cônes bien caractéristiques. Des études comparatives, basées sur l'étude des feuillages, ont permis de mettre en évidence des affinités entre les Araucariaceae, les Taxodiaceae et les Cupressaceae (van der Ham et al., 2003 ; Taylor et al., 2009).

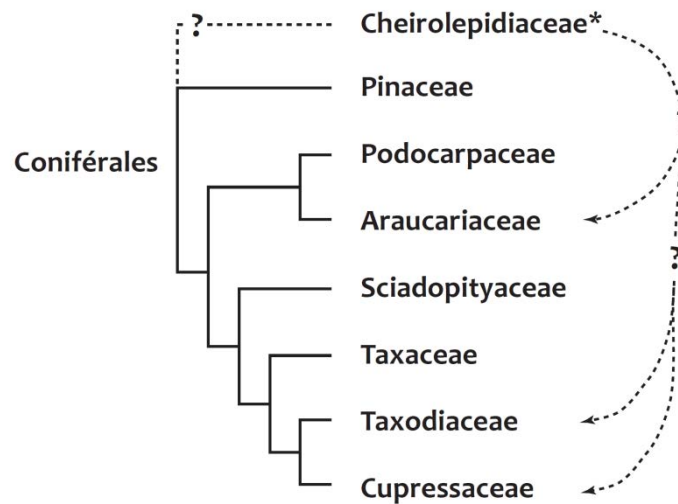


Fig. 1.2 : Phylogénèse des conifères d'après le séquençage de l'ARNr 28S (Stefanoviac et al., 1998).

3. CHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE : relations entre la classification taxonomique et la composition moléculaire des plantes

3.1. La composition moléculaire des plantes

Les plantes terrestres synthétisent un très grand nombre de molécules qui, pour la plupart, appartiennent à un nombre limité de familles moléculaires, telles que les glucides, les protéines, les lipides et les lignines. Ce sont souvent des **biopolymères** formés par la polymérisation de plusieurs unités moléculaires de même type appelés **monomères**.

Les **glucides** sont des molécules constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène avec pour formule brute $C_n(H_2O)_n$. Ils sont formés par la condensation (ou polymérisation) de monosaccharides, qui comportent des groupements cétone ou aldéhyde. Chez les plantes, les glucides sont essentiellement représentés par les celluloses et hémicelluloses qui sont formées par la condensation des plusieurs monosaccharides d'un même type (comme D-glucose) et de types différents respectivement. Ils servent essentiellement à rigidifier les membranes cellulaires (rôle de soutien) et sont les constituants majeurs du bois.

Les **lignines** sont formées par la condensation des unités p-hydroxyphényles, vanillyles et syringyles. Les lignines représentent entre 12 et 25 % de la biomasse végétale (de Leeuw et Largeau, 1993). Toujours en association avec les hémicelluloses, ils sont des constituants majeurs des tissus ligneux (bois) qui servent au soutien des plantes. La lignine contribue également à la protection naturelle des végétaux contre certaines attaques parasitaires.

Les **protéines** sont formées par la polymérisation d'acides aminés. Elles constituent la plus grande réserve d'azote dans les organismes vivants. Il existe une très grande diversité de protéines et elles peuvent jouer des rôles physiologiques très variés chez les organismes vivants.

Les **lipides** sont des composés très diversifiés. Ils forment un ensemble de molécules qui ont des structures et des fonctions extrêmement variées. Ils regroupent par exemple les acides gras, les phospholipides, les cires et les terpénoïdes. Ils assurent diverses fonctions comme le stockage de l'énergie, le soutien et la protection des plantes.

3.2. Les biomolécules spécifiques des plantes vasculaires et la chimiotaxonomie botanique

Les plantes vasculaires synthétisent certains composés qui leur sont propres, c'est-à-dire qui ne sont pas synthétisés par d'autres organismes vivants. Ces biomolécules spécifiques de plantes vasculaires sont essentiellement des métabolites secondaires et sont donc uniquement synthétisées dans certains compartiments physiologiques ou à des étapes précises de la vie des plantes. Elles jouent des rôles très variés comme par exemple la répulsion des prédateurs ou, au contraire, l'attraction des organismes pollinisateurs (Croteau et al., 2000).

Ces composés spécifiques des plantes vasculaires sont très diversifiés et se répartissent en plusieurs familles de composés comme les lignines, les flavonoïdes, les stilbènes, les alcaloïdes et les terpénoïdes.

- Les lignines

Les **lignines** représentent entre 12 et 25 % de la biomasse végétale (de Leeuw et Largeau, 1993). Ces composés organiques peuvent être synthétisés par toutes les trachéophytes. Cependant, celles qui sont synthétisées par les gymnospermes sont essentiellement constituées d'unités **vanillyles** alors que celles des angiospermes sont composées d'unités vanillyles et **syringyles**. Des unités **p-hydroxyphényles** sont synthétisées communément en faible proportion par les gymnospermes et les angiospermes (de Leeuw et Largeau, 1993).

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de type phénol. Le terme de 'flavonoïdes' regroupe l'ensemble des composés qui comportent une fonction phényle-benzopyranique reliée à un cycle benzénique par trois atomes de carbone (**Fig. 1.3**). La grande majorité des flavonoïdes est classée en trois familles structurales selon la position du cycle benzénique : les flavonoïdes au sens strict (e.g. 2-phényle-benzopyrane), les isoflavonoïdes (e.g. 3-phényle-benzopyrane) et les néoflavonoïdes (e.g. 4-phényle-benzopyrane ; **Fig. 1.3**). Les autres, comme les chalcones et les aurones ne représentent qu'une minorité de flavonoïdes naturels (Marais et al., 2006). Ces composés peuvent être à l'origine de la couleur, des arômes et des parfums de certaines plantes. Ils jouent un rôle d'attraction des pollinisateurs et de protection contre les rayons UV (Croteau et al., 2000).

Les flavonoïdes sont généralement plus communs chez les Trachéophytes que chez les Bryophytes. La quasi-totalité des flavonoïdes est synthétisée par les angiospermes (Gornall et Bohm, 1978). La présence et/ou la distribution de certains flavonoïdes peuvent être spécifiques de certaines familles d'angiospermes. Par exemple, les rosinidines et les aurantinidines ne sont respectivement synthétisés que par les Primulaceae et les

Balsaminaceae (Iwashina, 2000). Les flavonoïdes sont peu fréquents chez les gymnospermes et sont essentiellement des biflavonoïdes, des isoflavonoïdes et des dihydrochalcones. De manière beaucoup plus anecdotique, certains coraux marins et certains champignons synthétisent aussi des flavonoïdes (e.g. Bird et Marshall, 1969 ; Sanduja et al., 1984 ; Stafford, 1991).

- Les stilbéoïdes

Les stilbéoïdes, comme les flavonoïdes, sont aussi des métabolites secondaires de type phénol. Ce sont des polyphénols naturels qui comportent deux cycles benzéniques reliés par deux carbones (Fig. I.3). Les stilbéoïdes sont divisés en trois classes structurales en fonction de la nature du pont carboné qui relie les noyaux aromatiques : les benzyles (-C-C-), les stilbènes (-C=C-) et les phénanthrènes (cyclique ; Fig. I.3). Ils jouent des rôles similaires aux flavonoïdes pour les plantes.

Les stilbéoïdes constituent un petit groupe de composés synthétisés par les bryophytes, ptéridophytes et par de nombreuses familles d'angiospermes (e.g. Erdtman, 1963 ; Likhitwitayawuid et Sritularak, 2001 ; Shen et al., 2009). Chez les gymnospermes, en revanche, ils n'ont été détectés que dans quelques espèces de *Picea* et *Pinus* (Pinaceae ; Robinson, 1955 ; Gehlert et al., 1990 ; Slimestad, 1998).

- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires hétérocycliques azotés (Fig. I.3). Ils font partie des composés protéiniques basiques et ont des propriétés thérapeutiques ou toxiques. Ces composés organiques sont principalement synthétisés par les plantes vasculaires (Croteau et al., 2000). Ils sont répandus chez les angiospermes (e.g. Salatino et Gottlieb, 1981 ; Trigo et al., 2003). La présence et/ou la distribution de certains alcaloïdes pyrrolizidiniques, pyridiniques et quinolizidiniques peuvent être spécifiques à des familles d'angiospermes comme les Asteraceae, les Fabaceae et les Rutaceae (e.g. Waterman, 1975 ;

van Wyk et Verdoorn, 1990 ; Trigo et al., 2003). Chez les gymnospermes, l'occurrence des alcaloïdes est très limitée. Ils ne sont détectés, sous forme de taxol, que dans quelques espèces de Taxaceae (Otto et Wilde, 2001).

- Les terpénoïdes

Les **terpénoïdes** sont des métabolites secondaires lipidiques. Ces biomolécules interviennent notamment dans la défense des plantes contre les herbivores et les agents pathogènes et l'attraction des pollinisateurs (Langenheim, 1994). Les terpénoïdes sont des biopolymères issus de la condensation de plusieurs monomères de type C₅-isoprène ("**règle de l'isoprène**" ; Fig. 1.3). Les terpénoïdes présentent une très grande diversité structurale. Ils peuvent être sous la forme de **mono-, sesqui-, di- ou triterpénoïdes** en fonction du nombre d'unités isoprène qui sont condensées (respectivement deux, trois, quatre et six unités isoprènes; Fig. 1.3). La plupart sont cycliques et fonctionnalisés avec des groupements acides, alcools et cétones. Les terpénoïdes sont synthétisés essentiellement par les gymnospermes, notamment par les conifères, et par certaines angiospermes (Otto et Wilde, 2001). Ce sont des constituants majeurs des résines végétales et des huiles essentielles.

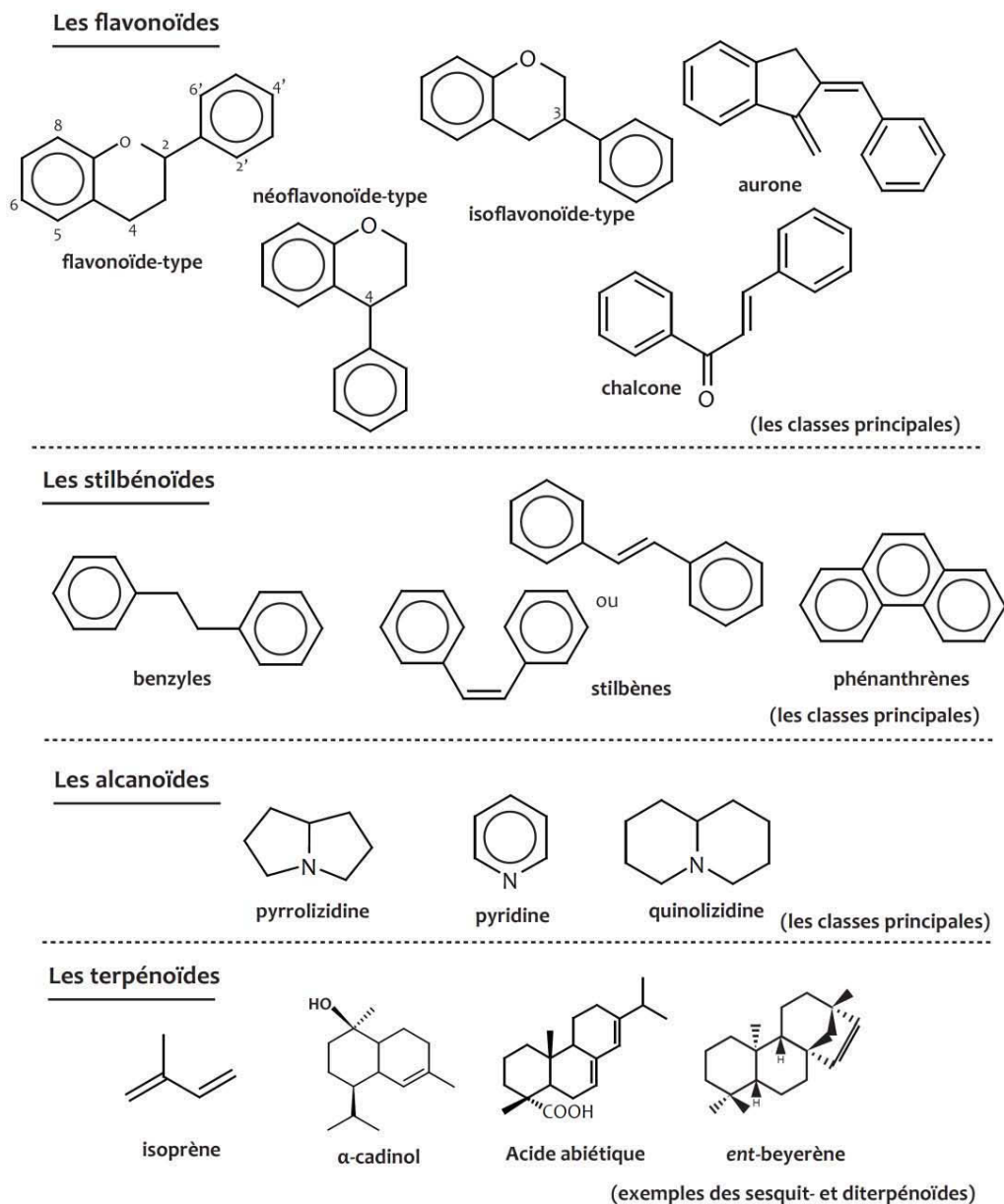


Fig. 1.3 : Les principales familles des composés spécifiques des plantes vasculaires.

Certains terpénoïdes ne sont synthétisés que par certains taxons de plantes vasculaires, à l'image du rosinidine et de l'aurantinidine qui sont spécifiques aux Primulaceae et Balsaminaceae ainsi que du taxol qui est spécifique aux Taxaceae. Ces composés spécifiques peuvent donc être utilisés comme des marqueurs caractéristiques de certaines familles / genres / espèces de plantes vasculaires. Ces exemples soulignent qu'il existe bien des relations entre la composition moléculaire des plantes d'une part et leur taxonomie d'autre part.

La **chimiotaxonomie botanique** est la discipline qui s'intéresse aux relations entre la composition chimique (et plus particulièrement moléculaire) des plantes et leur classification taxonomique.

3.3. Chimiotaxonomie des conifères

Les nombreuses études qui ont portées sur la composition moléculaire des conifères ont démontré l'importance qu'avaient les terpénoïdes en chimiotaxonomie. En effet, ces composés sont bien souvent synthétisés en abondance par les conifères, puisqu'ils sont les composants majeurs des résines végétales et des huiles essentielles, et un grand nombre d'entre-eux ne sont synthétisés que par certains(aines) familles / genres / espèces de conifères. Les valeurs chimiotaxonomiques des sesqui-, di- et de certains triterpénoïdes chez les conifères sont décrites par la synthèse bibliographique d'[Otto et Wilde \(2001\)](#). Ce travail a synthétisé de nombreuses études en phytochimie réalisées dans les années 60 à 90. Il a ainsi permis de préciser la/les source(s) botanique(s) de la plupart des bioterpénoïdes et de mettre en évidence les relations entre la composition moléculaire des conifères et leur classification taxonomique.

Généralement, les sesquiterpénoïdes synthétisés par les conifères sont des composés acycliques, monocycliques et bicycliques et la plupart d'entre-eux sont répartis dans cinq grandes classes structurales : farnesanes, bisabolanes, cadalanes, himachalanes et germacrane. Les diterpénoïdes sont présentés par des composés bicycliques, tricycliques, tétracycliques et macrocycliques et sont répartis dans une dizaine de classes structurales comme les labdanes, les pimaranes, les abietanes, les kauranes, les béyeranes, les cembranes et les verticillanes. Chaque classe structurale est caractérisée par un squelette carboné qui lui est propre et regroupe aussi bien des hydrocarbures ainsi que des composés hétéroatomiques (acides, alcools, cétones ; [Otto et Wilde, 2001](#)).

Les Pinaceae synthétisent des sesquiterpénoïdes (les longicyclanes et les sativanes) qui leur sont propres. Cette famille se distingue des autres familles de conifères par l'absence

d'abiétanes phénoliques et de diterpénoïdes tétracycliques. Les Pinaceae synthétisent aussi des composés communs aux Cupressaceae (guaianes, ylanganes, himachalanes) mais aussi aux Cupressaceae et Podocarpaceae (longifolanes, longibornanes et longipinanes). Les Cupressaceae synthétisent de nombreux terpénoïdes et la plupart d'entre-eux, en particulier les diterpénoïdes, sont communs aux autres conifères. Ils synthétisent également des sesquiterpénoïdes qui leur sont spécifiques, tels que les chamigranes, les cuparanes, les widdranes, les acoranes et les tropolones. Ils synthétisent aussi de nombreux composés qui sont communs avec les Taxodiaceae (tels que les cédranes), les Sciadopidiaceae et les Podocarpaceae (tels que les abiétanes phénoliques et totaranes). Les composés tels que les podocarpanes et les rosanes semblent caractéristiques des Podocarpaceae. Les Araucariaceae sont caractérisés par la prédominance des diterpénoïdes tétracycliques. Ils synthétisent aussi parfois des composés qui leur sont propres comme les clérodanes, les atisanes et les trachylobanes. Les Taxaceae sont bien distincts des autres conifères, car ils ne synthétisent que peu de composés terpéniques. Cependant, certains alcaloïdes de type terpénique comme le taxol sont spécifiques des Taxaceae (Otto et Wilde, 2001).

Chapitre II

**GENERALITES SUR LA MATIERE
ORGANIQUE SEDIMENTAIRE
ET INTRODUCTION A LA
PALEOCHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE**

Chapitre II. : Généralités sur la matière organique sédimentaire et introduction à la paléochimiotaxonomie botanique

1. LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE : ORIGINE, COMPOSITION ET EVOLUTION

La matière organique sédimentaire est un constituant habituel des sédiments et des roches sédimentaires. A l'inverse de la phase minérale, elle ne représente qu'une très faible proportion du contenu des roches sédimentaires (Tissot et Welte, 1984). L'étude de la nature de la matière organique, et plus particulièrement de sa composition chimique, est susceptible d'apporter des informations pertinentes sur son origine, l'environnement dans lequel elle s'est déposée ainsi que son évolution diagénétique.

1.1. Origine et composition de la matière organique sédimentaire

La matière organique sédimentaire a pour origine quasi exclusive les organismes vivants. Ce sont principalement les organismes autotrophes (organismes qui sont capables d'assimiler la matière inorganique comme CO_2 et NO_2 pour synthétiser de la matière organique), comme les plantes terrestres, les algues et certaines bactéries, qui contribuent à la formation de la matière organique sédimentaire.

La matière organique sédimentaire sur le plan de sa composition chimique est constituée de deux fractions distinctes.

Le **kérogène** représente la fraction majoritaire de la matière organique sédimentaire. Il est issu de la condensation de composés organiques au cours de la diagenèse. Il correspond à la fraction de la matière organique sédimentaire non-soluble dans les solvants organiques usuels (chloroforme, dichlorométhane, etc. ; Forsman et Hunt, 1958 ; Durand, 1980). Trois types de kérogène peuvent être différenciés selon leur composition élémentaire et plus particulièrement leurs concentrations relatives en carbone, hydrogène et oxygène. Ces trois types de kérogène sont associés à des origines biologiques différentes de la matière organique et correspondent à trois types d'environnement de dépôt différents (lacustre, marin et terrestre). Les différents types de kérogène sont traditionnellement représentés dans le diagramme de [van Krevelen \(1993\)](#) qui représente le rapport atomique hydrogène/carbone (H/C) en fonction du rapport oxygène /carbone (O/C) (**Fig.II. 1** ; [van Krevelen, 1993](#)) :

- le kérogène de **type I** est caractérisé par un rapport atomique H/C relativement élevé et un rapport O/C faible. La matière organique qui contribue à la formation de kérogène de type I provient essentiellement d'algues lacustres ou de milieux marins protégés ;

- le kérogène de **type II** est caractérisé par un rapport atomique H/C intermédiaire et un rapport O/C plus élevé que celui du type I. Il provient essentiellement de micro-organismes marins (zooplanctons, phytoplanctons et microflores bactériennes) ;

- le kérogène de **type III** est caractérisé par un rapport atomique H/C relativement faible et un rapport O/C élevé. Il provient essentiellement de végétaux terrestres.

Par ailleurs, outre leur composition élémentaire, les trois types de kérogène peuvent aussi être distingués par la nature des composés organiques qui les composent. Globalement, le kérogène de type I contient essentiellement des composés aliphatiques. Le kérogène de type II est riche en composés cycliques naphthéniques et peut aussi présenter une teneur importante en soufre. Quant au kérogène de type III, il est composé essentiellement de composés polyaromatiques et de composés ayant des fonctions oxygénées.

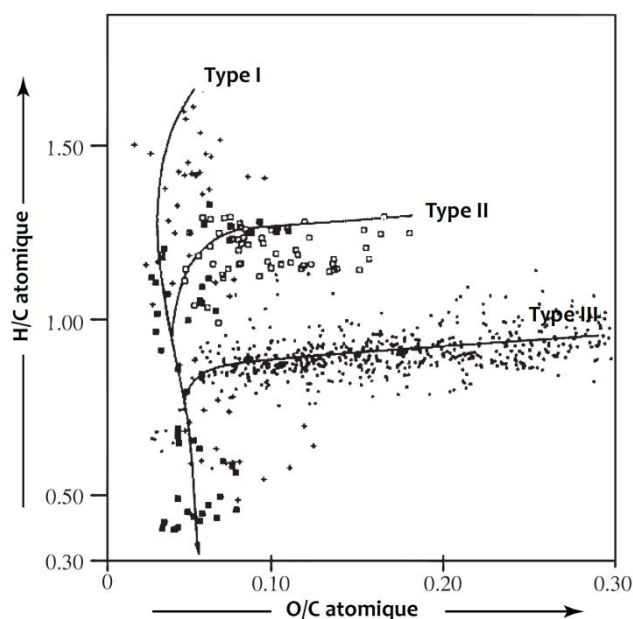


Fig. II.1 : Diagramme de van Krevelen H/C_{atomique} versus O/C_{atomique} avec la position des trois types de kérogène. Type I : lacustre; Type II: marin; Type III: terrestre. Modifié d'après [Vandenbroucke et Largeau \(2007\)](#).

Outre le kérogène, la matière organique sédimentaire est aussi constituée d'une grande diversité de composés de faibles poids moléculaires et qui restent à l'état libre (non condensés) dans les dépôts sédimentaires ([Tissot et Welte, 1984](#)). Ces **composés libres** ne représentent généralement qu'une faible proportion de la matière organique sédimentaire. Ils correspondent à la fraction des composés solubles dans les solvants organiques usuels (composés lipidiques). Les composés libres peuvent être des hydrocarbures (constitué uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène) et des composés fonctionnalisés (contenant des hétéroatomes comme N, S, O). Ils proviennent principalement des lipides synthétisés par les êtres-vivants et peuvent aussi avoir pour origine le craquage thermique du kérogène. Par ailleurs, c'est aussi dans cette fraction de la matière organique que sont présents les biomarqueurs moléculaires. Les **biomarqueurs moléculaires**, de manière générale, sont des composés organiques qui ne peuvent avoir qu'une origine biologique. Ce sont des composés lipidiques libres dont les structures carbonées peuvent être directement associées à des familles de biomolécules. L'étude de la nature des biomarqueurs moléculaires apporte non seulement des informations pertinentes sur l'origine biologique de la matière organique mais elle aide aussi à comprendre son histoire sédimentaire (environnement de

dépôt, paléobiodiversité et paléoclimat, etc.) et diagénétique (pH et E_h du milieu sédimentaire interstitiel, thermicité) (Killops et Killops, 2005 ; Peters et al., 2005). Les biomarqueurs moléculaires peuvent donc être considérés comme de véritables fossiles moléculaires.

1.2. Evolution de la matière organique sédimentaire

Après la mort des organismes (plantes terrestres, algues et bactéries), une partie des débris organiques sont exportés vers les bassins sédimentaires où ils sont incorporés aux sédiments. Au cours du transport, une grande partie de la matière organique est minéralisée par les processus de biodégradation via les chaînes trophiques. Seule une faible proportion de la matière organique échappe à la **minéralisation**. Cette partie non minéralisée de la matière organique est altérée par les processus de dégradations physiques (altération mécanique au cours du transport), biologique (biodégradation bactérienne) et abiotique (e.g. oxydation) tout le long du transport jusque dans les bassins sédimentaires et où elle est incorporée dans les sédiments.

La matière organique subit ensuite diverses transformations successives après le dépôt. Trois stades de transformations successives sont distingués selon le degré de l'activité microbienne, de stress thermique et la profondeur d'enfouissement : la **diagenèse**, la **catagenèse** et la **métagenèse** (Fig. II.2).

- **Diagenèse** :

La diagenèse correspond au stade au cours duquel la matière organique incorporée dans le sédiment est dégradée sans intervention significative de la température et de la pression. En effet, la transformation de la matière organique est contrôlée tout d'abord par l'activité bactérienne. La plupart des **biopolymères** hydrolysables, comme les polysaccharides

et les protéines se dégradent par l'activité bactérienne en **biomonomères**. Rapidement, ces derniers se condensent de façon aléatoire et aboutissent à la formation d'une part de **géopolymères** et d'autre part de gaz (CO_2 , NH_3 , H_2S , etc.) et d'eau. Avec la progression de la diagenèse et le changement des propriétés physico-chimiques du milieu interstitiel, ces géopolymères perdent progressivement leurs groupements fonctionnels (alcool, acide, cétone, etc.) et aboutissent à la formation du **kérogène** (Tissot et Welte, 1984). Ce processus de formation du kérogène est appelé dégradation-recondensation (ou néogenèse).

Par ailleurs, certaines **biomacromolécules** hautement aliphatiques (tels que les algaénanes, les sporopollénines, les cutines, etc.) sont réputées résistantes vis-à-vis des altérations bactériennes et chimiques au cours de la diagenèse (Tegelaar et al., 1989). Ces biomacromolécules sont préférentiellement préservées et leur accumulation dans les dépôts sédimentaires participent également à la formation du **kérogène** hautement aliphatique (e.g. de Leeuw et al., 1991 ; Derenne et al., 1991). Ce processus de formation du kérogène est appelé préservation sélective.

Les composés **lipidiques** de faibles poids moléculaires ne se condensent pas ou très peu dans des structures macromoléculaires. Ils restent à l'état libre et forment la fraction de **composés libres**. Ces composés ont pour particularité d'être constitués d'un squelette carboné particulièrement résistant. Les transformations diagénétiques ne conduisent essentiellement qu'à la perte des groupements fonctionnels (alcool, acide, cétone, etc.), des doubles liaisons (saturation) et de certains groupements méthyles (déméthylation), ainsi qu'à l'aromatisation des cycles à six atomes de carbone (Fig. II.2).

- Catagenèse :

La catagenèse correspond au stade au cours duquel la matière organique sédimentaire est dégradée sous les effets combinés de la température et de la pression.

Du fait de l'augmentation de la température, certaines liaisons carbone-carbone du kérogène et aussi des composés libres se rompent progressivement au cours de la catagenèse. Sous cet effet, le kérogène et les composés libres libèrent une grande quantité de composés libres (essentiellement des hydrocarbures) de bas et moyen poids moléculaires (**géomonères** ; Fig. II.2). Le kérogène résiduel s'enrichit de plus en plus en carbone.

La catagenèse est donc caractérisée par une production maximale des huiles (fenêtre à huile) essentiellement issues du craquage thermique du kérogène (Fig. II.2). La fin de ce stade marque le début de la genèse de gaz hydrocarbonés (gaz humides).

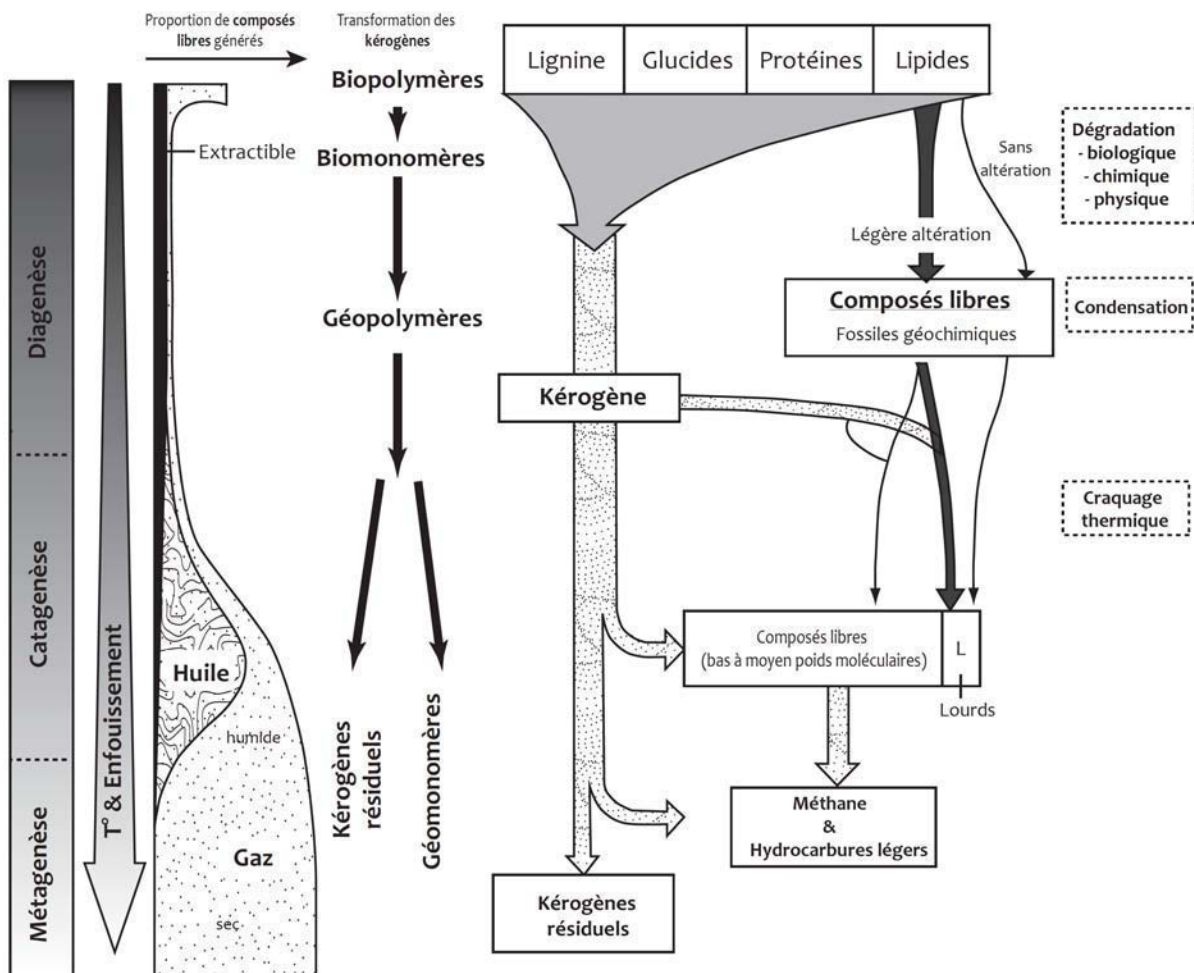


Fig. II.2 : Evolution chimique et nature de la transformation de la matière organique au cours des trois stades de transformation. Schéma adapté d'après Tissot et Welte (1984).

- **Métagenèse :**

La métagenèse correspond au stade au cours duquel la matière organique sédimentaire est fortement dégradée sous les effets combinés de hautes températures et de hautes pressions. Au cours de ce stade, le craquage thermique des composés organiques formés au cours de la catagenèse (kérogènes résiduels, huile, gaz humide) se poursuit et aboutit à la formation de gaz secs (notamment le méthane ; **Fig. II.2**). Le kérogène résiduel continue de s'appauvrir en hydrogène et sa structure se rapproche progressivement de celle du graphite.

2. LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE BOTANIQUE : DEFINITION ET DOMAINES D'APPLICATION

2.1. Définition de la paléochimiotaxonomie botanique

La matière organique sédimentaire est notamment constituée de biomarqueurs moléculaires qui proviennent en partie des plantes vasculaires terrestres. Ces biomarqueurs sont essentiellement les produits diagénétiques de composés terpéniques susceptibles de posséder une spécificité chimiotaxonomique. Ils peuvent avoir conservé une partie de la spécificité initiale au cours de la diagenèse. Ainsi ces biomarqueurs de plantes ont également une spécificité paléochimiotaxonomique. La **paléochimiotaxonomie botanique** est, par analogie avec la chimiotaxonomie botanique, la discipline qui associe la composition chimique (biomarqueurs moléculaires) des plantes fossiles à leur classification botanique (**Fig. II.3**).

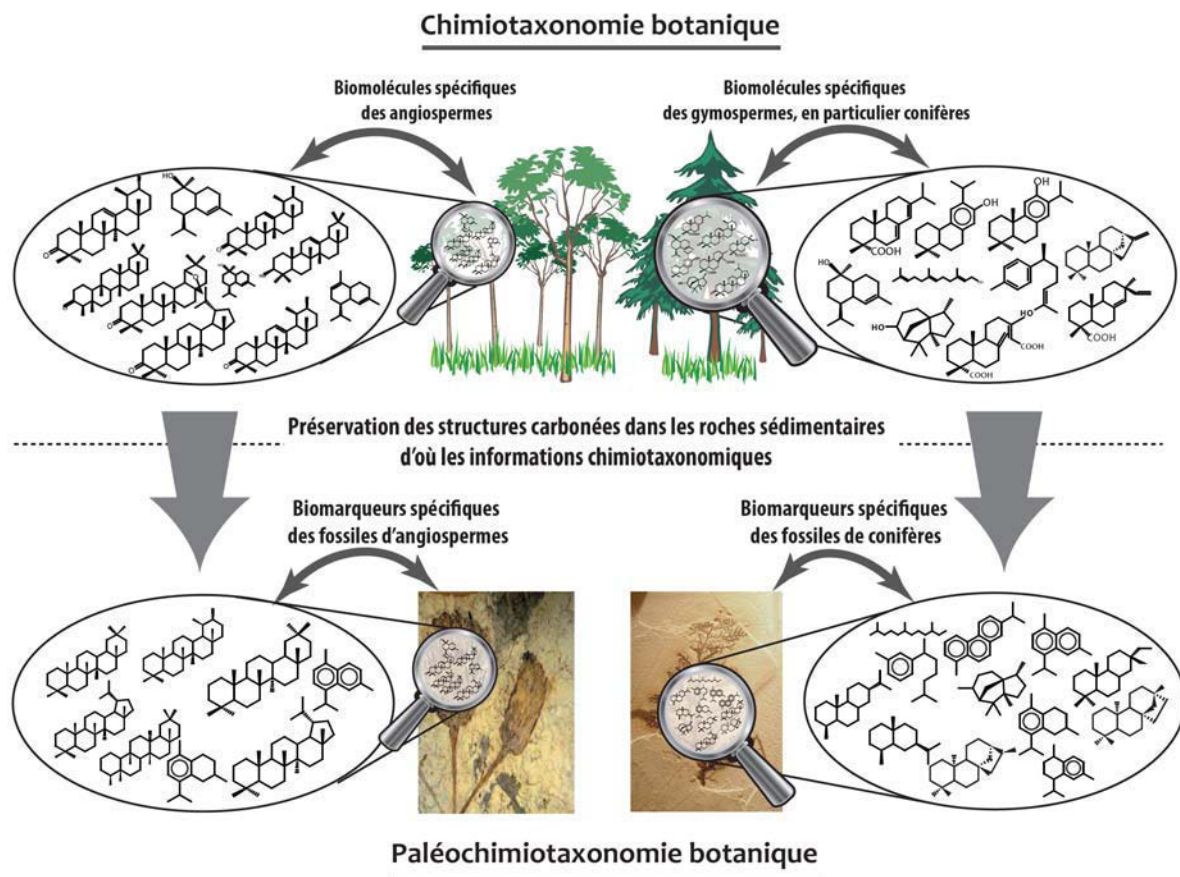


Fig. II.3 : Principes de la chimiotaxonomie botanique et de la paléochimiotaxonomie botanique.

2.2. Les terpénoïdes en paléochimiotaxonomie botanique

2.2.1. Des bioterpénoïdes aux géoterpénoïdes

Les plantes vasculaires représentent la principale source de la matière organique sédimentaire d'origine terrestre (Tissot et Welte, 1984). Elles synthétisent une grande diversité de composés organiques (celluloses, lignines, lipides, tannins, etc.). Les bioterpénoïdes sont les constituants majeurs des résines végétales et des huiles essentielles et ils peuvent donc être synthétisés en quantités par certains végétaux, plus particulièrement les conifères (Otto et Wilde, 2001). Ces composés sont intéressants d'une part parce qu'ils peuvent avoir une valeur chimiotaxonomique et d'autre part parce que leur structure carbonée leur confère une grande résistance vis-à-vis des transformations diagénétiques.

Ces bioterpénoïdes sont ensuite exportés jusque dans les bassins sédimentaires où ils sont incorporés dans les sédiments. Au cours de la diagenèse, diverses modifications chimiques (défonctionnalisation, saturation, aromatisation, etc.) peuvent affecter ces composés organiques qui se transforment alors en géoterpénoïdes (**Fig. II.4**). La spécificité chimiotaxonomique initiale portée par les bioterpénoïdes peut être partiellement ou totalement préservée par les géoterpénoïdes qui en sont issus. Ces géoterpénoïdes constituent donc d'excellents biomarqueurs moléculaires qui sont susceptibles d'apporter des informations pertinentes sur la nature des plantes ayant contribué à la matière organique sédimentaire. En d'autres termes, les géoterpénoïdes constituent une source d'information paléochimiotaxonomique.

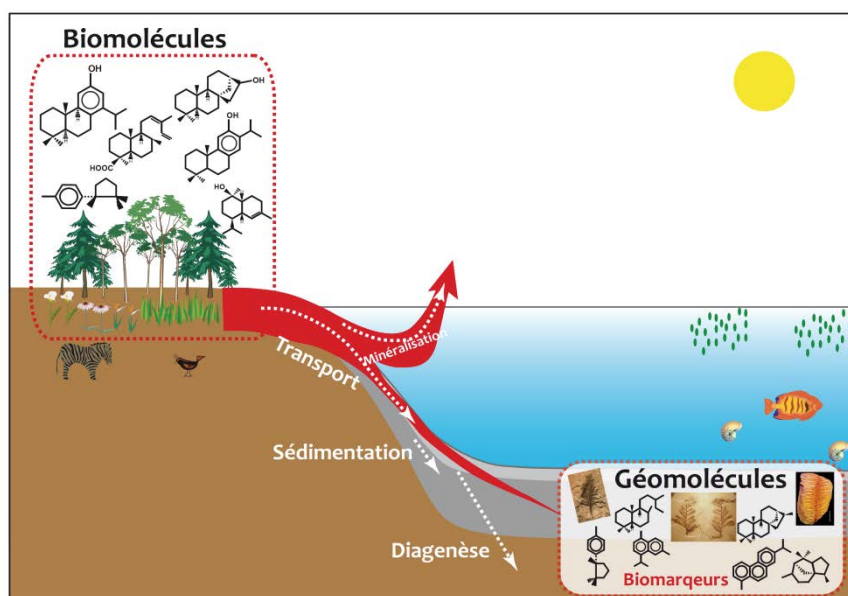


Fig. II.4 : Transformation des bioterpénoïdes spécifiques de plantes en géoterpénoïdes au cours de la diagenèse.

2.2.2. Les monoterpénoïdes

Les monoterpénoïdes (C_{10}) sont des composés formés par la condensation de deux unités isoprènes (C_5) et arrangés de façon cyclique et parfois acyclique (**Fig. II.5**). Du fait de leur faible poids moléculaire, les monoterpénoïdes sont des composés volatiles et sont

souvent utilisés en tant qu'odorants et phéromones. Ils sont également des constituants majeurs des huiles essentielles de plantes.

Les monoterpénoïdes sont principalement synthétisés par les plantes vasculaires mais ils peuvent être également présents chez certaines algues. Du fait de leur forte volatilité, les monoterpénoïdes sont difficilement préservés dans les sédiments et peu abondants dans les roches sédimentaires. Leurs spécificités paléochimiotaxonomiques sont très limitées.

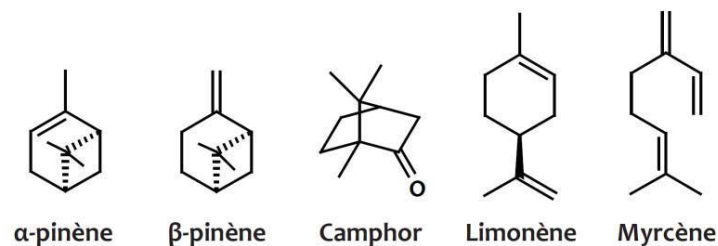


Fig. II.5 : Exemples des biomolécules de type monoterpénoïdes.

2.2.3. Les sesquiterpénoïdes

Les sesquiterpénoïdes (C_{15}) sont des composés formés par la condensation de trois unités isoprènes. Leur structure est soit cyclique (mono-, bi- et même tricyclique) ou acyclique. C'est l'une des classes de terpénoïdes les plus diversifiées car elle comprend plus de 30 classes structurales assez répandues dans le règne végétal et plus de 70 autres qui sont moins communes (Devon et Scott, 1972).

Les sesquiterpénoïdes les plus couramment détectés dans les roches sédimentaires sont par exemple les drimanes, les eudesmanes, les bisabolanes et surtout les cadalanes.

Les composés de type **drimane** (Fig. II.6) proviennent de la transformation diagénétique de composés bicycliques comme le driménol et les drimènes. Ces derniers peuvent avoir pour origine des plantes vasculaires mais aussi des Bryophytes, des bactéries et/ou des organismes marins (e.g. Asakawa et al., 2012). Alexander et al. (1983) ont également montré que dans les pétroles, le drimane peut aussi être formé issu du craquage thermique de terpénoïdes de plus haut poids moléculaire, tels que les hopanes.

Les **bisabolanes** (Fig. II.6) ont aussi été largement observés dans les huiles essentielles de plantes vasculaires, notamment chez de nombreuses gymnospermes et angiospermes (Phillips et Croteau, 1999 ; Sacchetti et al., 2005). Dans les plantes, les bisabolanes sont souvent présents sous forme insaturée ou d'alcools comme l'*ar-curcumène* ou le bisabobol. Cependant, dans les roches sédimentaires, seuls le dihydro-*ar-curcumène* et l'isodihydro-*ar-curcumène* sont fréquents (e.g. Ellis et al., 1995 ; Bastow et al., 1997). Les **eudesmanes** (Fig. II.6) sont aussi des composés répandus chez les plantes vasculaires (Otto et Wilde, 2001). Leur biomolécules, comme les eudesmols, sont synthétisées par quelques angiospermes, notamment par des espèces de la famille des Asteraceae (Wei et al., 1997 ; Wu et al., 2006) et quelques gymnospermes (Otto et Wilde, 2001). Ils sont représentés par des eudesmanes dans les archives sédimentaires (Alexander et al., 1983 ; Dzou et al., 1995). Par ailleurs, certains eudesmanes sont aussi synthétisés par quelques organismes marins (Dembitsky et Tolstikov, 2004).

Les **cadalanes** (Fig. II.6) sont plus spécifiques aux plantes vasculaires. Ils représentent les sesquiterpénoïdes les plus répandus dans la biosphère. Dans les roches sédimentaires, ils sont détectés sous forme saturée et plus généralement aromatique comme le *calamène*, le *calamenène* et/ou le *cadalène* (e.g. Alexander et al., 1984 ; Otto et Simoneit, 2002 ; Grice et al., 2005). Néanmoins, certaines algues et bryophytes synthétisent aussi des cadalanes (Bordoloi et al., 1989 ; Elias et al., 1997).

En plus de ces quatre classes structurales couramment observées dans les roches sédimentaires, deux autres classes moins répandues ont une grande spécificité taxonomique. Ce sont les **cédranes** et les **cuparanes** (Fig. II.6) qui sont les biomarqueurs spécifiques des Cupressaceae. De plus, les cédranes ont également été détectés chez certaines espèces de Taxodiaceae (Grantham et Douglas, 1980 ; Otto et Simoneit, 2001 ; Otto et Wilde, 2001 ; Bechtel et al., 2002).

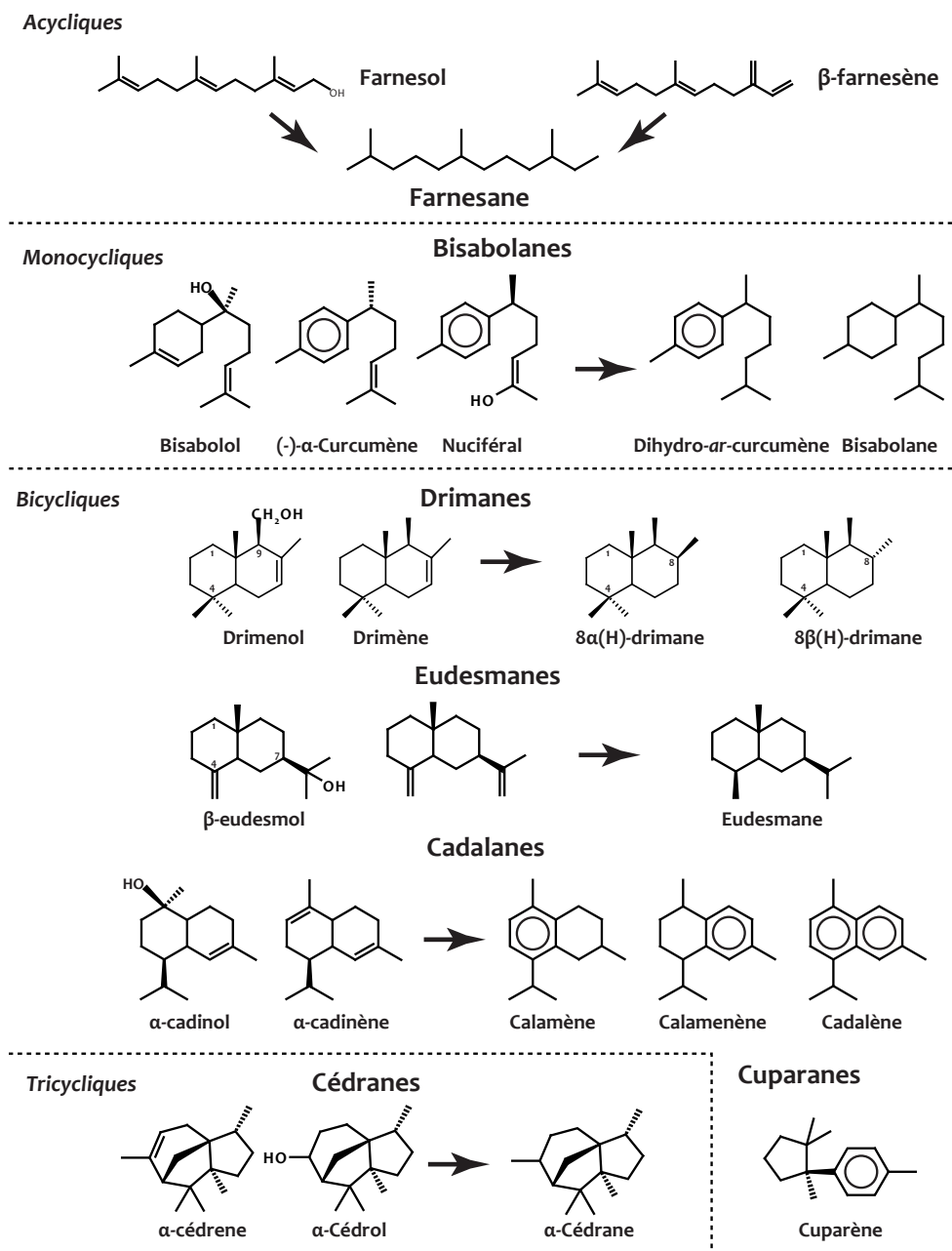


Fig. II.6 : Exemples de principales classes de biomarqueurs des plantes vasculaires de la famille des sesquiterpénoïdes (Biomolécules \rightarrow Biomarqueurs).

2.2.4. Les diterpénoïdes

Les diterpénoïdes (C_{20}) sont formés par la condensation de quatre unités isoprènes. Les diterpénoïdes ont été principalement regroupés dans 20 classes structurales chez les êtres vivants (Devon et Scott, 1972). Ils sont essentiellement présents sous forme cyclique et le

nombre de cycles varie de deux à quatre. Parmi eux, les composés bi- et tricycliques sont les plus répandus dans les dépôts sédimentaires. Ils sont principalement synthétisés par les plantes vasculaires, et plus particulièrement les conifères, mais aussi par certains organismes marins (e.g. Schmitz et al., 1982 ; Briand et al., 1997 ; Otto et Wilde, 2001 ; Han et al., 2004). Chez les conifères, ils se présentent sous forme d'acides, d'alcools, d'hydrocarbures et de phénols dans les résines et les huiles essentielles (Aplin et al., 1963 ; Thomas, 1970).

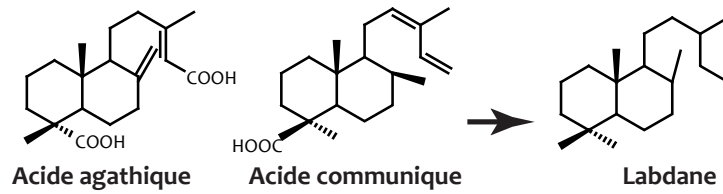
Les classes structurales les plus abondantes sont les **labdanes**, **abiétanes**, **pimaranes**, **béyeranes**, **kauranes** et **phyllocladanes**. D'autres classes sont moins répandues comme les **totaranes**, les **semperviranes**, les **cassanes** et les **gibberrelanes** (Fig. II.6).

2.2.5. Les triterpénoïdes

Les triterpénoïdes (C₃₀) sont formés par la condensation de six unités isoprènes et plus de 30 classes structurales ont été décrites chez les êtres vivants (Devon et Scott, 1972). Les triterpénoïdes originaires des plantes vasculaires les plus courantes dans les archives sédimentaires sont les **arboranes**, les **amyrines**, les **allobetulanoïdes**, les **fernanes** et les **friédélanoïdes** (Fig. II.8 ; Ohmoto et al., 1970 ; Vliex et al., 1994 ; Paull et al., 1998 ; Otto et al., 2005 ; Auras et al., 2006 ; Xu et al., 2008). Ce sont des composés qui sont essentiellement synthétisés par les angiospermes (e.g. Jacob et al., 2005 ; Lavrieux et al., 2011). Chez les gymnospermes, les triterpénoïdes tels que les lanostanes, les fernanes et les gammacéranes sont également présents mais toujours en faible abondance et chez un nombre réduit d'espèces (Otto et Wilde, 2001). Par ailleurs, les triterpénoïdes comme les arboranes et les fernanes semblent pouvoir aussi être synthétisés par certaines bactéries dans les milieux lacustres (Jaffé et Hausmann, 1995).

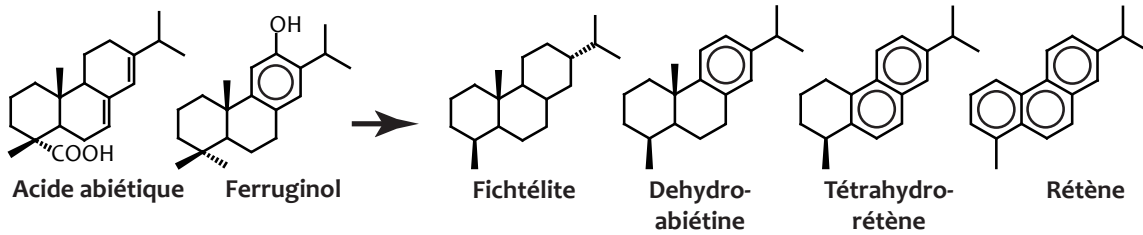
Bicycliques

Labdanes

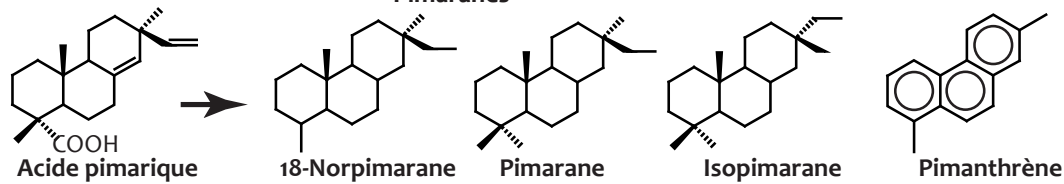


Tricycliques

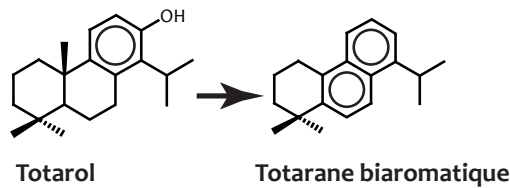
Abiétanes



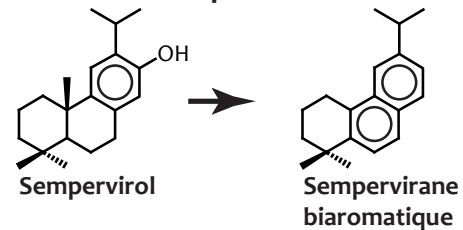
Pimaranes



Totaranes

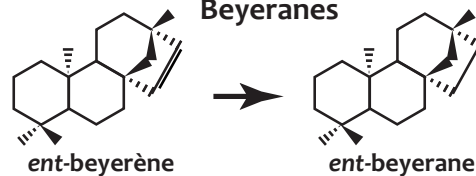


Semperviranes

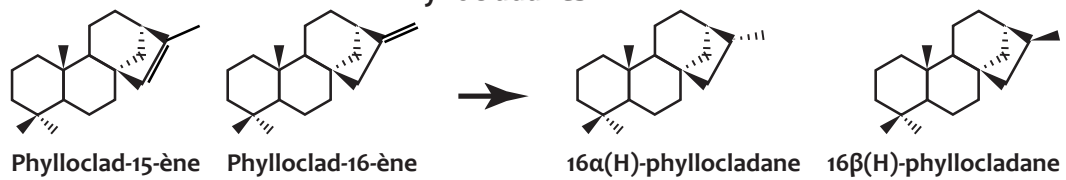


Tétracycliques

Beyeranes



Phyllocladanes



Kauranes

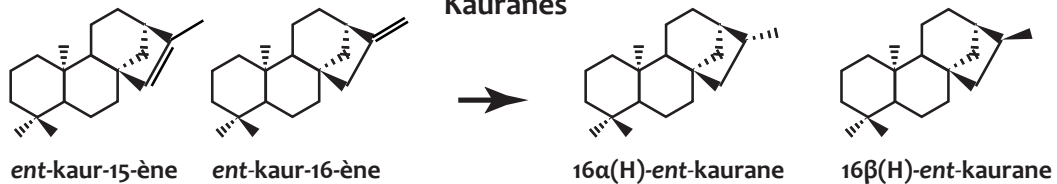


Fig. II.7 : Exemples de principale classes des biomarqueurs des plantes vasculaires de la famille des diterpénoïdes (Biomolécules → Biomarqueurs).

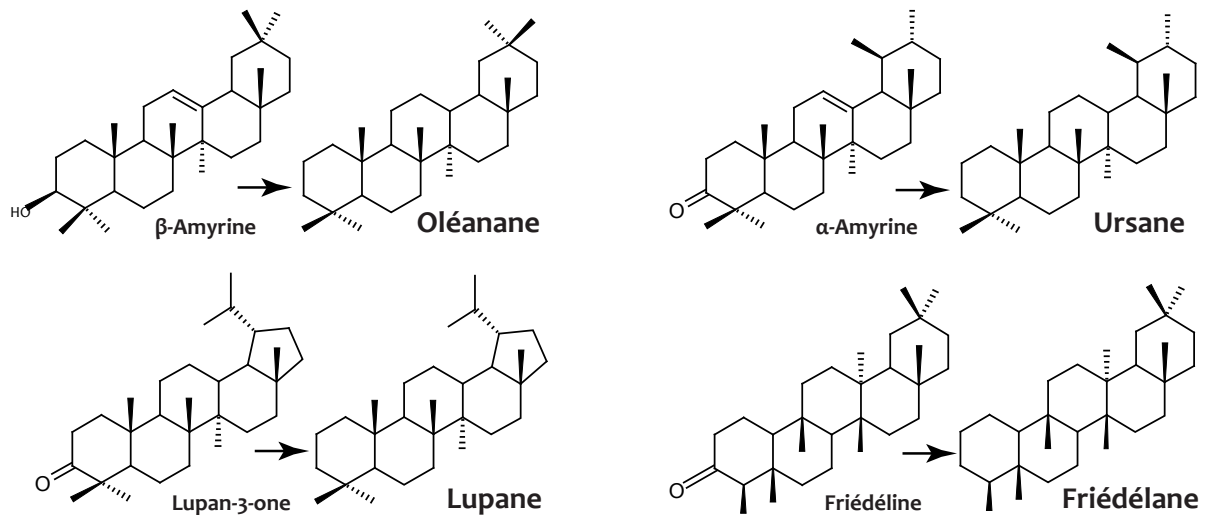


Fig. II.8 : Exemples des structures carbonées de certains triterpénoïdes (Biomolécules → Biomarqueurs).

2.2.6. Les polyterpénoïdes

Les polyterpénoïdes ($C > 30$) sont des polymères formés par la condensation de plus de six unités isoprènes. Les polyterpénoïdes sont notamment fréquents dans les résines fossiles telles que les ambres (Langenheim, 1969). Les polyterpénoïdes les plus fréquents sont les **polycadinènes** et les **polylabdanoïdes** qui sont formés respectivement par la condensation de cadinanes et de labdanes, comme l'acide communiqué, le communol, le biformène (Anderson et al., 1992 ; Fig. II.9). Les polylabdanoïdes sont essentiellement issus de la fossilisation de résines de gymnospermes et de Fabaceae (une famille d'angiospermes ; Cunningham et al., 1983 ; Anderson et al., 1992 ; Pereira et al., 2011b). Les polycadinènes sont quant à eux principalement issus de la fossilisation de résines de Dipterocarpaceae (une famille d'angiospermes ; van Aarssen et al., 1990, 1992 ; Anderson et al., 1992).

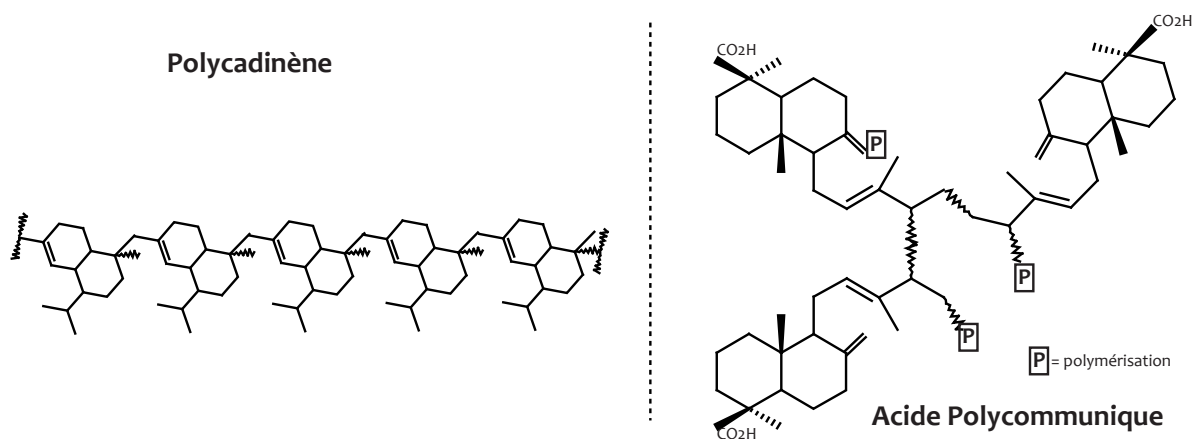


Fig. II.9 : Structures de type polycadinène (à gauche) et de l'acide polycommuniqué (polylabdanoïde ; à droite).

2.2.7. Biomarqueurs botaniques non terpéniques

En sus des terpénoïdes, il existe aussi d'autres types de composés lipidiques classiquement utilisés en géochimie organique pour tracer l'occurrence des plantes vasculaires dans les dépôts sédimentaires, comme les *n*-alcane, les dérivés de la chlorophylle et de la lignine.

Les ***n*-alcane** (C_nH_{2n+2}) sont constitués d'une chaîne carbonée linéaire sans aucune ramification. Ce ne sont pas réellement des biomarqueurs car ils peuvent également être synthétisés de manière abiotique, par le procédé Fischer-Tropsch⁵ par exemple. Cependant, l'essentiel des *n*-alcane de la géosphère sont biogéniques. Leurs précurseurs, les acides *n*-alcanoïques, peuvent être synthétisés par la plupart des organismes vivants, dont les plantes vasculaires. Les *n*-alcane qui proviennent essentiellement des cires cuticulaires de plantes vasculaires et possèdent entre 20 et 34 atomes de carbone et sont caractérisés par la prédominance des *n*-alcane possédant un nombre impair d'atomes de carbone. Cette imparité est quantifiée par l'indice CPI⁶. Ce rapport a été beaucoup décrit dans la littérature et largement utilisé dans diverses études de géochimie organique (Tissot et Welte, 1984 ; Killips et Killips, 2005 ; Peters et al., 2005).

⁵ : (2n+1)H₂ + nCO → C_nH_{2n+2} + nH₂O.

⁶ : Carbon Preference Index = 0,5 ((Σn-C_{2i+1}/Σn-C_{2i}) + (Σn-C_{2i+1}/Σn-C_{2i+2})), avec i = 12 à 16

Les **lignines** sont spécifiques aux plantes vasculaires et sont particulièrement résistantes vis-à-vis des transformations diagénétiques. Selon leurs origines biologiques (gymnospermes et/ou angiospermes), les monomères de la lignine (vanillyles syringyles et *p*-hydroxyphényles) sont différents. L'étude de la nature des monomères qui constituent les lignines préservées dans les archives sédimentaires est donc susceptible d'apporter des informations paléochimiotaxonomiques pertinentes (e.g. [Hedges et Mann, 1979](#) ; [Hedges et al., 1988](#)).

L'utilisation de ces composés moléculaires en paléochimiotaxonomie botanique est moins pertinente que celle des terpénoïdes et ne permet pas de discriminer la taxonomie botanique à l'échelle des ordres familles / genres / espèces. Les informations portées par ces "biomarqueurs" sont par conséquent très limitées.

Chapitre III

ECHANTILLONS, PROTOCOLES

ET

METHODES ANALYTIQUES

Chapitre III. : Echantillons, protocoles et méthodes analytiques

1. ECHANTILLONS DES PLANTES DE CONIFERES

1.1. Plantes pour la détermination de la signature moléculaire fossile

Dans ce travail, 68 espèces de conifères ont été étudiées. Ces 68 espèces appartiennent aux 7 familles qui constituent actuellement les conifères.

La famille des Araucariaceae est représentée par 12 espèces appartenant à 3 genres : 3 *Agathis*, 8 *Araucaria* et la seule espèce actuellement vivante de *Wollemia*.

La famille des Cupressaceae est représentée par 18 espèces appartenant à 9 genres (parmi les 15 genres existants) : 1 *Calocedrus*, 4 *Chamaecyparis*, 1 *Cupressoparis*, 2 *Cupressus*, 5 *Juniperus*, 1 *Microbiota*, 2 *Thuja*, 1 *Thujopsis* et 1 *Platyclusus*.

La famille des Pinaceae est représentée par 22 espèces appartenant à 7 genres (parmi les 11 genres existants) : 4 *Abies*, 3 *Cedrus*, 4 *Larix*, 5 *Picea*, 4 *Pinus*, 1 *Pseudotsuga* et 1 *Tsuga*.

La famille des Taxaceae est représentée par 5 espèces appartenant à 3 genres (parmi les 6 genres existants) : 2 *Cephalotaxus*, 2 *Taxus* et 1 *Torreya*.

La famille des Taxodiaceae est représentée par 8 espèces appartenant à 5 genres (parmi les 9 genres existants) : 1 *Cryptomeria*, 2 *Cunninghamia*, 1 *Metasequoia*, 1 *Sequoia* et 2 *Taxodium*.

La famille des Podocarpaceae est représentée par 2 espèces de *Podocarpus* et 1 *Prumnopitys*.

La famille des Sciadopityaceae est représentée par la seule espèce actuellement vivante de *Sciadopitys*.

La table III.1 présente la liste des conifères étudiés et la provenance des échantillons.

Famille	Genre	Espèce	Provenance des échantillons
Araucariaceae	<i>Agathis</i> Salisbury, 1807	<i>australis</i> (D. Don) Loudon 1829	Musée nationale d'histoire naturelle Paris
		<i>moorei</i> (Lindl.) Mast. 1892	Nancy
		<i>robusta</i> (C. Moore ex F. Muell.) Bailey 1883	Lyon
	<i>Araucaria</i> Jussieu, 1789	<i>angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze 1898	Nancy
		<i>araucana</i> (Molina) K. Koch 1873	
		<i>bidwillii</i> Hooker 1843	Antibes
		<i>berneri</i> Buchholz 1949	Lyon
		<i>cunninghamii</i> Aiton ex Lambert 1837	Nancy
		<i>heterophylla</i> (Salisb.) Franco 1952	dans le commerce
		<i>laubenfelsii</i> Corbasson 1968	Lyon
	<i>nemorosa</i> de Laubenfels 1969		
	<i>Wollemia</i> Jones, Hill et Allen, 1995	<i>nobilis</i> Johns, Hill & Allen 1994	Wollemia Pine France
	<i>Abies</i> (Plin. ex Tourn.) Miller, 1754	<i>firma</i> Siebold et Zuccarini, 1842	
<i>pinsapo</i> Boissier, 1838		Nancy	
<i>spectabilis</i> (D. Don) Spach, 1841			
<i>veitchii</i> Lindley, 1861		Lyon	
<i>Cedrus</i> Trew, 1755	<i>atlantica</i> (Endlicher) Manetti	Nancy	
	<i>decussata</i> (D. Don.) G. Don.		
	<i>libani</i> A. Rich	Lyon	
<i>Larix</i> Miller, 1754	<i>gmelinii</i> (Ruprecht) Kuzeneva 1920		
	<i>kaempferi</i> (Lambert et al.) Carrière 1856	Nancy	
	<i>laricina</i> (DuRoi) K. Koch 1873	Lyon	
	<i>sibirica</i> Ledebour 1833		
Pinaceae	<i>Picea</i> A. Dietrich 1824	<i>abies</i> (Linnaeus) Karsten 1881	Nancy
		<i>abies nidiformis</i> (subsp. <i>abies</i>)	
		<i>mariana</i> (Miller) Britton Sterns, et Poggenburg 1888	Lyon
		<i>orientalis</i> (Linnaeus) Link	Nancy
	<i>Pinus</i> Linnaeus, 1753	<i>pungens</i> Engelmann 1879	
		<i>sylvestris</i> Linnaeus, 1753	
		<i>nigra</i> J.F. Arnold 1785	Nancy
		<i>koraiensis</i> Siebold et Zuccarini 1842	
		<i>wallichiana</i> A.B. Jackson 1938	
		<i>Pseudotsuga</i> Carrière, 1867	<i>menziesii</i> (Mirbel) Franco 1950
<i>Tsuga</i> (Endlicher) Carrière, 1855	<i>canadensis</i> (Linnaeus) Carrière 1855	Nancy	

(... page suivante)

Famille	Genre	Espèce	Provenance des échantillons
Cupressaceae	<i>Calocedrus</i> Kurz, 1873	<i>decurrens</i> (Torrey) Florin, 1956	Nancy
		<i>lawsoniana</i> (A. Murray) Parlatore, 1864	Nancy
	<i>Chamaecyparis</i> Spach, 1841	<i>nootkatensis</i> David Don, 1824	Nancy
		<i>obtusa</i> (Siebold et Zuccarini) Endlicher, 1847	Lyon
		<i>pisifera</i> (Siebold et Zuccarini) Endlicher	Nancy
	<i>Cupressus</i> Linnaeus, 1753	<i>arizonica</i> Greene, 1882	Nancy
		<i>sempervirens</i> Linnaeus, 1753	Nancy
	<i>Cupressoparis</i> (A.B.Jacks. et Dallim.) Farjon, 2002	<i>leylandii</i> (A.B.Jacks. et Dallim.) Farjon, 2002	Nancy
		<i>chinensis</i> Linnaeus, 1767	Nancy
	<i>Juniperus</i> Linnaeus, 1753	<i>communis</i> Linnaeus, 1753	Nancy
		<i>oxycedrus</i> Linnaeus, 1753	Nancy
		<i>phoenicea</i> Linnaeus, 1753	Lyon
		<i>virginiana</i> Linnaeus, 1753	Nancy
		<i>decussata</i> Komarov, 1923	Nancy
	<i>Microbiota</i> Komarov, 1923	<i>orientalis</i> (Linnaeus) Franco, 1949	Nancy
<i>Platyclusus</i> (Linnaeus) Franco, 1949		Nancy	
<i>Thuja</i> Linnaeus, 1753	<i>dolabrata</i> Siebold et Zuccarini, 1844	Nancy	
	<i>occidentalis</i> Linnaeus, 1753	Lyon	
	<i>plicata</i> D. Don in Lambert, 1824	Nancy	
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i> D. Don, 1839	<i>japonica</i> D. Don, 1839	Nancy
		<i>konishii</i> Hayata, 1908	Nancy
	<i>Cunninghamia</i> (Lambert et al.) Hooker, 1827	<i>lanceolata</i> (Lambert et al.) Hooker, 1827	Nancy
		<i>glyptostroboïdes</i> Hu et Cheng, 1948	Nancy
	<i>Metasequoia</i> Hu et Cheng, 1948	<i>sempervirens</i> (D. Don) Endlicher, 1847	Nancy
<i>Sequoia</i> (D. Don) Endlicher, 1847	<i>distichum</i> (L.) Richard, 1810	Nancy	
	<i>taxodium</i> Richard, 1810	<i>mucronatum</i> Tenore, 1853	Lyon
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i> L'Heritier ex Persoon, 1807	<i>alpinus</i> R. Br. ex Hook. f. 1845	Nancy
		<i>totara</i> G. Benn. ex D. Don in Lambert, 1828	Nancy
Sciadopityaceae	<i>Prumnopitys</i> Philippi, 1860	<i>andina</i> de Laubenfels, 1978	Nancy
		<i>verticillata</i> Siebold et Zuccarini, 1842	Nancy
Taxaceae	<i>Sciadopitys</i> Siebold et Zuccarini, 1842	<i>fortunei</i> Hooker, 1850	Nancy
		<i>harringtonia</i> K. Koch 1873	Lyon
	<i>Cephalotaxus</i> Siebold et Zuccarini ex Endlicher, 1842	<i>baccata</i> Linnaeus, 1753	Nancy
		<i>brevifolia</i> Nuttall 1849	Nancy
<i>Taxus</i> Linnaeus, 1753	<i>nucifera</i> Siebold et Zuccarini, 1846	Nancy	
	<i>Torreya</i> Arnott, 1838	Nancy	

Tab. III.1 : Liste des espèces et provenance des échantillons étudiés dans ce travail. Nancy : Jardin botanique du Montet ; Lyon : Jardin botanique de la Tête d'Or.

1.2. Préparation des échantillons de plante et protocole expérimental

Le protocole utilisé dans ce travail est celui décrit par [Hautevelle et al. \(2006b\)](#).

1.2.1. Préparation des échantillons de plantes

Les feuilles des conifères ont tout d'abord été nettoyées à l'eau déminéralisée afin d'éliminer d'éventuelles particules présentes à la surface des plantes. Puis, elles ont été finement coupées et déshydratées dans un dessiccateur à 45°C pendant 24h sous vide. Les plantes ont ensuite été gelées à l'azote liquide (-196°C) pour être plus facilement réduites en poudre dans un mortier en acier.

1.2.2. Préparation des capsules en or pour la pyrolyse en milieu confiné

- Préparation des capsules en or

Les capsules sont obtenues en découpant des tubes en or (50 cm de longueur, 5 mm de diamètre et 0,5 mm d'épaisseur) en plus petits tubes de 40 mm de long. Afin d'améliorer leur malléabilité, les petits tubes sont chauffés à 700°C pendant 30 min et sont soudés à l'une des extrémités (soudure à l'arc) avant d'y introduire les échantillons.

- Préparation des réactifs

Deux capsules sont préparées pour chaque plante. La première capsule est remplie avec environ 2 mg de plante réduite en poudre, la seconde l'est avec un mélange en quantité égale de plante en poudre et d'hydrure d'aluminium et de lithium (LiAlH_4 , *Fluka*, No 62420, pureté $\geq 97\%$). [Hautevelle et al. \(2006b\)](#) ont montré que la pyrolyse des plantes seules permet de générer au cours de la maturation des composés aromatiques et fonctionnalisés qui sont précisément ceux détectés dans les sédiments et les roches sédimentaires. Cependant, la pyrolyse des plantes actuelles ne permet pas de générer des biomarqueurs aliphatiques, qui

sont généralement formés dans des conditions réductrices et qui peuvent aussi être détectés dans les archives sédimentaires. Ces composés aliphatiques peuvent être obtenus en pyrolysant la plante dans les mêmes conditions en présence de LiAlH_4 (Hautevelle et al., 2006b). LiAlH_4 est un agent réducteur qui libère une quantité importante d'hydrogène lors de sa décomposition thermique (Sakintuna et al., 2007 ; Ares et al., 2008 ; Equ. 1, Equ. 2 dans la Figure III.1) et favorise donc la saturation au détriment de l'aromatisation des cycles des composés organiques.

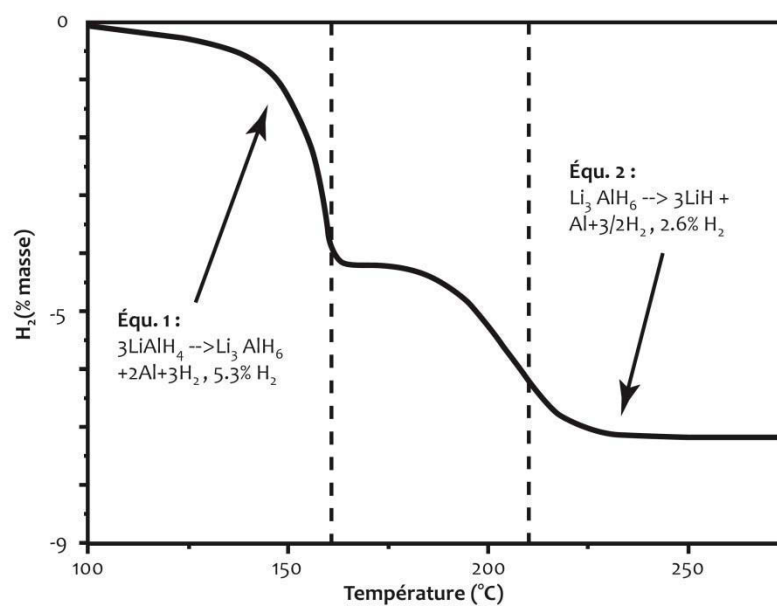


Fig. III.1 : Production de H_2 au cours de la décomposition thermique de LiAlH_4 (adapté d'Ares et al., 2008).

- Fermeture des capsules en or

Afin d'éviter d'éventuelles réactions avec l'oxygène de l'air au cours de la pyrolyse, les capsules sont fermées sous atmosphère d'argon dans une boîte à gants.

La seconde extrémité des capsules est ensuite soudée tout en refroidissant la partie de la capsule en contact avec la plante. En effet, pour souder l'or, la température doit atteindre plus de 1000°C et donc sans un système de refroidissement pendant la soudure, les échantillons introduits dans les capsules pourraient être instantanément brûlés. Pour cela, la

partie de la capsule contenant la plante est refroidie par un flux d'azote, lui-même refroidi par de l'azote liquide à -196°C (**Fig. III.2**).

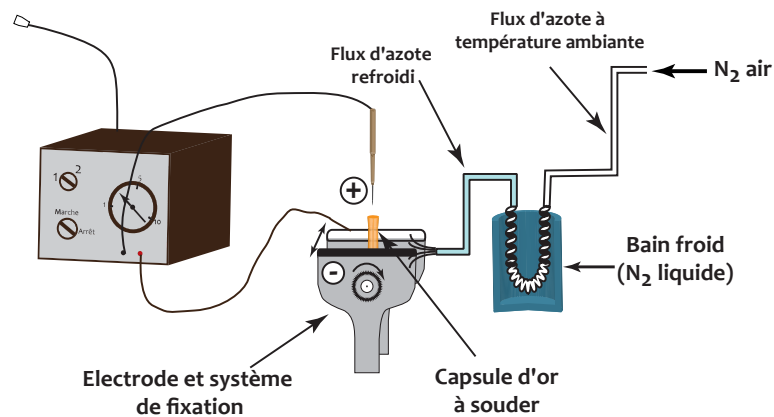


Fig. III.2 : Dispositif de soudure des capsules d'or.

1.2.3. Protocole de pyrolyse

Les capsules sont ensuite placées dans un autoclave. L'autoclave contenant les capsules en or est assemblé comme indiqué sur la Fig. III.4. Cet autoclave est conçu pour supporter des pressions et des températures pouvant atteindre 1,5 kbar et 650°C . L'étanchéité de ce montage est assurée par un système de fermeture composé de joints, écrous et contre-écrous à différents niveaux (**Fig. III.3**). L'autoclave est ensuite introduit dans un four préchauffé à 280°C puis est connecté à la ligne de pression.

Les pyrolyses en milieu confiné sont réalisées à 280°C sous 700 bars de pression pendant 24 h ([Hautevelle et al., 2006b](#)). Au cours de la pyrolyse, le contrôle de la température est assuré par 2 thermocouples (**Fig. III.3**). Un thermocouple interne, situé dans l'enceinte de l'autoclave, permet de suivre la variation de température des capsules. Un thermocouple externe, au niveau du four, permet de contrôler la température imposée dans l'ensemble du système. Ces différentes températures sont enregistrées par une station de contrôle et d'acquisition (**Fig. III.4**). La pression imposée pour la pyrolyse est générée par une pompe hydraulique et est transmise à l'intérieur de l'autoclave par un mélange d'eau et d'huile.

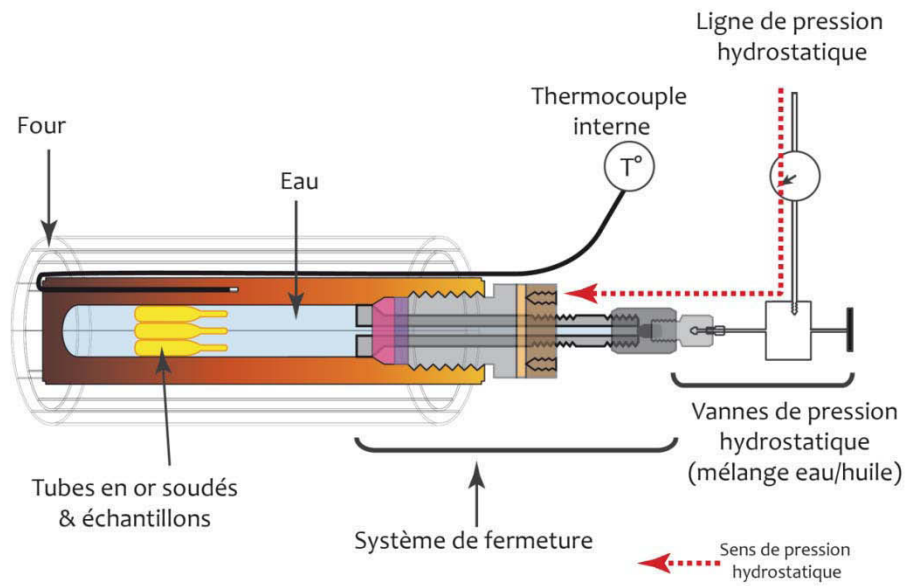


Fig. III.3 : Coupe d'un autoclave préparé avec des capsules en or.

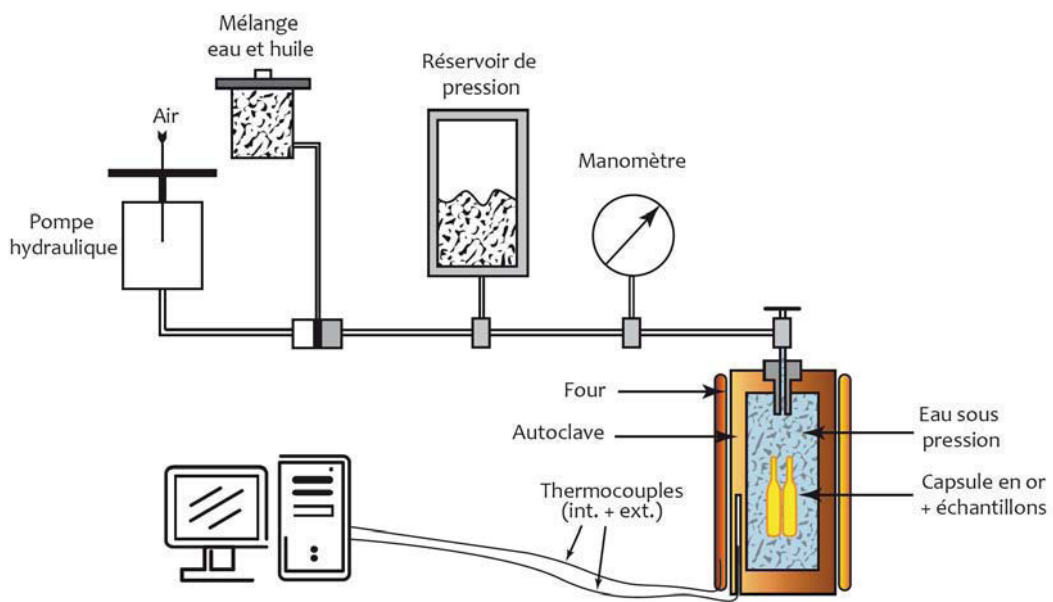


Fig. III.4 : Dispositif et principe de la pyrolyse en milieu confiné.

A la fin de la pyrolyse, les capsules sont retirées de l'autoclave. La masse de chaque capsule est ensuite contrôlée pour vérifier leur étanchéité. Les capsules en bon état sont ensuite lavées au dichlorométhane.

L'ouverture des capsules est réalisée à l'aide de pinces coupantes. Les capsules préparées avec LiAlH_4 sont en surpression à cause de l'accumulation d'hydrogène et pour faire baisser la pression, les capsules sont trempées dans un bain d'azote liquide juste avant leur ouverture. Les pyrolysats sont ensuite récupérés dans des flacons en verre et conservés au froid.

2. EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE SOLUBLE DANS LES SOLVANTS ORGANIQUES

La matière organique soluble (ou extractible) a été extraite des plantes fraîches et des plantes pyrolysées (avec et sans LiAlH_4) en la solubilisant dans du dichlorométhane. L'extraction est réalisée de manière automatique à l'aide d'un extracteur "ASE-350" (Accelerated Solvent Extraction, Dionex).

2.1. Principe de l'extraction au solvant par extracteur automatique " Accelerated Solvent Extraction - 350"

L'extracteur automatique "ASE-350" (Accelerated Solvent Extraction, Dionex) permet d'extraire de la matière organique à chaud (80°C) et sous pression. Par rapport aux méthodes d'extraction plus traditionnelles (extraction Soxhlet par exemple), elle améliore l'efficacité de l'extraction en maintenant le solvant chaud à l'état liquide au contact de l'échantillon à extraire. L'extraction automatique permet de minimiser la durée de l'extraction et la quantité de solvant utilisé.

2.2. Protocole d'extraction

L'extraction de la matière organique est réalisée à l'aide de la cellule d'extraction en acier. Un filtre de verre est introduit à la base de la cellule afin de séparer des extraits liquides des résidus solides à la fin de chaque extraction. Pour éliminer toute trace de matière organique éventuellement présente sur le matériel d'extraction, les cellules font l'objet d'une

extraction à vide à l'ASE 350 à 130°C pendant 1 minute avec un mélange de solvant dichlorométhane / méthanol (v : v ; 1 :1). Le matériel à extraire (pyrolysats dans les capsules d'or et les plantes fraîches) est ensuite introduit dans les cellules en acier qui sont finalement fermées. La matière organique est extraite à 80°C pendant 10 min.

Après extraction, la matière organique est récupérée sous forme dissoute dans un grand volume de dichlorométhane. Ceci nécessite une étape d'évaporation du solvant et de concentration les extraits organiques.

1) La majeure partie du dichlorométhane est d'abord évaporée dans un évaporateur automatique 'TurboVap' (Zymark). Dans le TurboVap, les flacons contenant le dichlorométhane et les extraits organiques sont plongés dans un bain-marie à 35°C (proche de la température d'ébullition du dichlorométhane qui est de 40°C) et sont soumis à un flux d'azote.

2) L'évaporation est poursuivie sous un faible débit d'azote une fois les extraits transvasés dans des flacons de 7 ml (Supelco) préalablement pesés. L'évaporation sous flux d'azote est arrêtée lorsqu'il reste environ une centaine de microlitres de solvant dans le flacon.

3) Afin d'éviter la perte des hydrocarbures légers (< C₂₁n-alcanes), le flacon est ensuite recouvert par du papier aluminium troué et les évaporations sont achevées sous hotte.

Une fois que tout le solvant est évaporé, le flacon est à nouveau pesé avec la matière organique extraite. Cela permet de calculer la quantité de la matière organique extraite.

3. FRACTIONNEMENT DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR PHASE SOLIDE

La matière organique extractible est constituée d'une grande variété de composés moléculaires. Pour faciliter l'exploitation des données, la matière organique extractible est fractionnée en 3 parties caractérisées par des polarités différentes par chromatographie liquide sur phase solide. Les trois fractions sont :

- la fraction aliphatique. Elle est constituée par des hydrocarbures sans noyau aromatique. Ces composés sont peu polaires.

- la fraction aromatique. Elle est constituée par des hydrocarbures avec un ou plusieurs noyau(x) aromatique(s) et de quelques composés soufrés (notamment les benzothiophènes et les dibenzothiophènes) et/ou oxygénés (notamment les benzofuranes et les dibenzofuranes). Ces composés aromatiques ont des polarités modérées.

- la fraction polaire. Elle est constituée par des composés possédant des groupements fonctionnalisés (acide, alcool, etc.). Ces composés ont une polarité plus importante que ceux des fractions aliphatiques et aromatiques.

3.1. Principe de la chromatographie liquide sur phase solide

La chromatographie d'adsorption, appelée aussi la chromatographie liquide sur phase solide, est une technique de séparation des composés moléculaires. Elle est basée sur le principe d'adsorption-désorption d'un mélange de molécules de différentes polarités sur une phase stationnaire.

L'extrait organique brut contenant des composés de différentes polarités (**soluté**) est dissout dans un solvant de faible polarité (**phase mobile**). Cette solution est injectée dans une colonne chromatographique remplie d'une fine poudre (**phase stationnaire**). La colonne chromatographique est posée verticalement, l'élution des 3 fractions est réalisée sous l'effet de la gravité. Selon l'affinité des composés organiques avec les sites actifs de la phase stationnaire, les composés organiques sont plus ou moins fortement adsorbés sur les sites actifs (**solutés adsorbés**). Les forces d'adsorption entre une molécule organique et la phase stationnaire sont d'autant plus fortes que la polarité de la molécule est grande. La **phase mobile libre** migre donc vers la sortie et entraîne avec elle les composés organiques qui y sont dissouts. Les **solutés adsorbés** sur la phase stationnaire sont ensuite récupérés par élution avec un solvant plus polaire.

Pour résumer, le principe de la chromatographie liquide sur phase solide est basé sur l'affinité des composés organiques d'une part avec la phase mobile libre et d'autre part avec

la phase stationnaire. Plus une molécule est polaire et plus la phase mobile doit avoir une forte polarité pour la désorber et l'entraîner avec elle vers la sortie de la colonne. Ainsi, des éluions successives par des solvants de polarité croissante permettent de récupérer autant de fractions contenant des composés de polarité également croissante.

3.2. Protocole de fractionnement

Le fractionnement est réalisé selon 2 étapes successives sur 2 phases stationnaires : alumine et silice. La colonne chromatographique est constituée d'une pipette pasteur de 6 mm de diamètre intérieur. Avant remplissage par la phase stationnaire, elle est bouchée avec du coton rincé au dichlorométhane. La colonne est ensuite remplie avec environ 5 cm de hauteur d'alumine ou de silice. L'alumine et la silice sont lavées par l'éluion successive de cyclohexane, de dichlorométhane et de méthanol puis activées à 125°C pendant 3h avant utilisation.

L'extrait total est d'abord dilué dans 300 µl de dichlorométhane, puis est déposé en tête de la **colonne d'alumine**. Ensuite, 1000 µl puis 6 fois 500 µl de dichlorométhane sont injectés successivement dans la colonne. Pendant cette éluion, les composés ayant une forte polarité (la fraction polaire) sont adsorbés par l'alumine et les composés ayant une plus faible polarité (les fractions aliphatique, aromatique et quelques composés polaires) sont récupérés à la sortie de colonne après éluion au dichlorométhane (*solution A – Sol. A*). Puis, un mélange de méthanol/dichlorométhane (v : v ; 1 : 1) est injecté dans la colonne jusqu'à ce que les composés les plus polaires soient élués (*solution B – Sol. B ; Fig. III.6*). Les deux solutions (*Sol. A* et *Sol. B*) sont ensuite séchées, soit par flux d'azote modéré soit par évaporation à l'air libre.

La *solution A* (*Fig. III.6*) est ensuite diluée dans 300 µl de *n*-pentane puis est injectée en tête de la **colonne de silice**. 1000 µl puis 5 fois 500 µl de *n*-pentane sont injectés successivement. Au cours de cette éluion, les composés ayant une forte polarité sont adsorbés par la silice et les composés les moins polaires sont récupérés à la sortie de la

colonne de silice. Les composés les moins polaires constituent la fraction aliphatique. 5 fois 500 μl de mélange *n*-pentane/dichlorométhane ($v : v ; 65 : 35$) sont, par la suite, successivement injectés dans la colonne. L'élution de mélange *n*-pentane/dichlorométhane permet de désorber les composés ayant une polarité intermédiaire et les composés polaires restent adsorbés sur la silice. Les composés à polarité intermédiaire sont récupérés à la sortie de colonne et constituent la fraction aromatique. Pour récupérer les composés polaires adsorbés sur la silice, le mélange de méthanol/dichlorométhane ($v : v ; 1 : 1$) est à nouveau injecté jusqu'à élution complète de la fraction polaire.

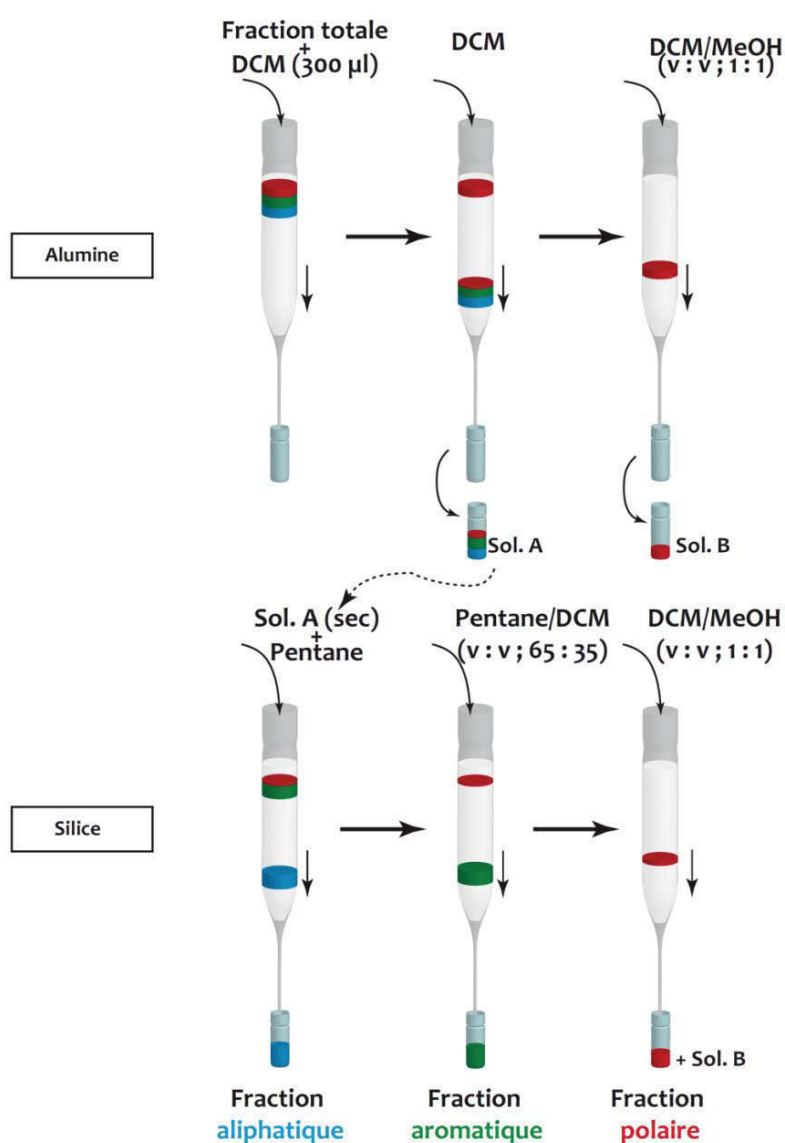


Fig. III.5 : Principe et schéma simplifiés de la chromatographie liquide sur phase solide (alumine et silice).

Les trois fractions sont ensuite de nouveau évaporées à sec de la même manière. La différence de masse entre les piluliers vides et les piluliers pleins permet d'obtenir la masse de chaque fraction.

4. ANALYSE MOLECULAIRE DE LA MATIERE ORGANIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS)

Les trois fractions obtenues précédemment ont ensuite été analysées en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette analyse permet d'obtenir la composition moléculaire de chacune des trois fractions.

4.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Le chromatographe en phase gazeuse permet de séparer les différents composés contenus dans la fraction à analyser. Les composés organiques dissous dans du solvant sont tout d'abord vaporisés sous effet de la température dans l'injecteur. Les composés organiques vaporisés (**soluté**) sont entraînés dans une colonne chromatographique par un gaz vecteur, de l'hélium (**phase mobile**).

Ces composés sont plus ou moins adsorbés par la **phase stationnaire** qui est greffée sur la paroi intérieure de la colonne chromatographique. Ils sont ensuite élués sous contrôle de l'augmentation de la température du four du chromatographe. Les composés sont séparés en fonction de :

- leurs **poids moléculaires**. Le temps de rétention est d'autant plus long que leur poids moléculaire est élevé ;
- leur **polarité**. Le temps de rétention est autant plus long que le nombre de fonctions organiques est grand ;
- leur **configuration moléculaire**. Il est courant que les composés ayant une même formule brute aient des temps de rétention significativement différents. Cela est dû au fait que leurs structures moléculaires sont différentes. Par exemple, les hydrocarbures ayant une structure ramifiée ont un temps de rétention plus court que leurs homologues non-ramifiés.

Le spectromètre de masse permet d'identifier les molécules. A la sortie de la colonne chromatographique, les composés séparés entrent successivement dans un spectromètre de masse chauffé. Le gaz vecteur est éliminé par pompage. Les composés arrivent successivement dans la chambre d'ionisation et sont bombardés par un faisceau d'électrons dont l'énergie est de 70 eV produit par l'excitation de l'un des filaments de rhénium (Re). Sous effet de bombardement par le faisceau d'électrons, les composés organiques sont fragmentés et chargés positivement. Les fragments moléculaires sont repoussés par le *repeller* chargé aussi positivement vers l'analyseur. En fonction du rapport masse/charge (m/z), les ions sont accélérés par un champ électromagnétique dans l'analyseur de type quadrupôle. Les ions sont ensuite comptés par un détecteur. Les signaux sont détectés et multipliés par le détecteur et l'amplificateur. Ils sont ensuite traités par le système informatique d'acquisition.

4.2. Appareillage

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Hewlett-Packard HP GPG 6890N avec un injecteur split-splitless. Il est composé :

- d'un **injecteur** qui permet d'introduire les fractions dissoutes à l'aide d'une seringue (0-5 μ l) et de les vaporiser à 300 °C ;
- d'une **colonne** capillaire chromatographique d'une longueur de 60 m, d'un diamètre interne de 0.25 mm et d'une épaisseur de film (phase stationnaire) de 0.10 μ m. Une colonne

capillaire DB-5MS J&W Scientific et greffée avec un film de phase stationnaire composée de 5% de diphényle et de 95% de diméthylsiloxane sur la paroi intérieure a été utilisée ;

- un **four** qui permet de chauffer la colonne chromatographique selon un programme de températures défini par l'utilisateur (**Fig. III.6**).

Le spectromètre de masse utilisé est un Hewlett-Packard HP 5973N MSD. Il est chauffé à 220 °C et est relié avec le chromatographe en phase gazeuse via une ligne de transfert chauffée à 320 °C. Ce spectromètre est composé :

- d'une **source d'ionisation électronique (EI)**. Elle contient 2 **filaments** en rhénium et un **repeller** (appelé aussi *repousseur* qui sont chargé positivement), ce qui permet respectivement de générer le faisceau d'électrons et de repousser les ions positifs générés jusqu'à l'analyseur ;

- d'un **analyseur de type quadripôle** formé de quatre barreaux sous tension, ce qui crée un champ électromagnétique ;

- d'un **détecteur de type multiplicateur d'électrons** qui détecte les signaux reçus et les amplifie pour que les informations puissent être traitées informatiquement par la suite ;

- d'une **pompe turbo** qui produit le vide poussé requis par le spectromètre de masse. Le gaz vecteur est également éliminé par cette pompe (**Fig. III.6**).

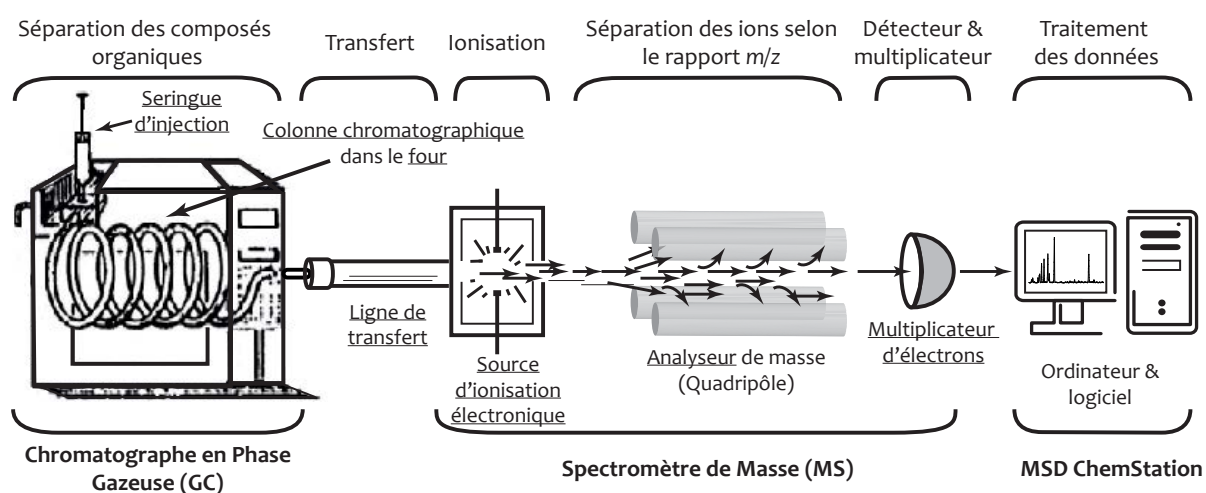


Fig. III.6 : Appareillage et principe de fonctionnement d'un couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Schéma modifié d'après Peters et al. (2005).

4.3. Protocole analytique

Pour chaque espèce de plante utilisée pour la paléochimiotaxonomie expérimentale, des extraits organiques ont été obtenus à partir 1) de la plante fraîche, 2) des produits de pyrolyse avec LiAlH_4 et 3) des produits de pyrolyse sans LiAlH_4 . Les fractions aliphatique, aromatique et polaire de la plante fraîche, la fraction aliphatique issue de la pyrolyse avec LiAlH_4 et les fractions aromatique et polaire issues de la pyrolyse sans LiAlH_4 sont analysées en GC-MS. En effet, la pyrolyse de conifères (à 280°C pendant 24h) en présence de LiAlH_4 permet de générer les composés aliphatiques semblables à ceux détectés dans les dépôts sédimentaires. La pyrolyse de plantes sans LiAlH_4 permet de générer quant à elle les biomarqueurs aromatiques et polaires semblables à ceux détectés dans les sédiments et les roches sédimentaires (Hautevelle et al., 2006b).

Les six fractions associées à un seul et même taxon sont ensuite analysées séparément. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1.4 ml/min. La température du four du chromatographe augmente de façon progressive :

- de 70 °C à 130 °C à 15 °C/min ;
- de 130 °C à 315 °C à 3 °C/min ;
- un palier à 315 °C pendant 15 min.

Chapitre IV

**DETERMINATION DE LA SIGNATURE
MOLECULAIRE DES CONIFERES FOSSILES
PAR LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE
EXPERIMENTALE – PARTIE 1 :
ARAUCARIACEAE**

Biogeosciences, 10, 1943–1962, 2013
 www.biogeosciences.net/10/1943/2013/
 doi:10.5194/bg-10-1943-2013
 © Author(s) 2013. CC Attribution 3.0 License.

Biogeosciences 



Determination of the molecular signature of fossil conifers by experimental palaeochemotaxonomy – Part 1: The Araucariaceae family

Y. Lu, Y. Hautevelle, and R. Michels

UMR 7359 CNRS Georesources, University of Lorraine, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

Correspondence to: Y. Hautevelle (yann.hautevelle@univ-lorraine.fr)

Received: 11 July 2012 – Published in Biogeosciences Discuss.: 8 August 2012

Revised: 7 January 2013 – Accepted: 17 February 2013 – Published: 20 March 2013

Abstract. Twelve species of the conifer family Araucariaceae, including *Araucaria* (6 species), *Agathis* (3 species) and *Wollemia* (1 species) genera, were submitted to artificial maturation by confined pyrolysis. The aim of these experiments is to transform the biomolecules synthesized by these species into their homologous geomolecules in laboratory conditions. Determination of the diagenetic molecular signatures of Araucariaceae through experimentation on extant representatives allows us to complete our knowledge in botanical palaeochemotaxonomy. Such knowledge is relevant to palaeoenvironmental, environmental and archaeology purposes. All artificially diagenetic species of Araucariaceae are firstly characterized by a predominance of saturated tetracyclic diterpenoids including *ent*-beyerane, phyllocladanes and *ent*-kauranes. Moreover, *Araucaria* genus shows a high relative abundance of bicyclic sesquiterpenoids, particularly the cadalane-type compounds accompanied by those of eudesmane and bisabolane types as well as chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes. Diterpenoids are of labdane, isopimarane and abietane types (essentially derived from abietanoic acids) as well as isohexyl alkylaromatic hydrocarbons. Compared to the tetracyclic diterpenoids, these compounds show a relatively lower abundance, reaching trace levels in the case of saturated abietanes. Distributions of sesquiterpenoids and diterpenoids of *Agathis* show some similarities to that of *Araucaria*, with the exception of one species, in which the tetracyclic compounds are absent and the abietane type (essentially derived from abietanoic acids) predominant. High similarities between the *Wollemia* and *Araucaria* genera are observed. Both are characterized by some high relative abundance of tetracyclic compounds with no predominance of other specific diterpenoids.

1 Introduction

Numerous studies of the molecular composition of extant terrestrial plants have pointed out the chemotaxonomic values of many biological compounds, bioterpenoids in particular (e.g. Aplin et al., 1963; Smith, 1976; Castro et al., 1996; Mongrand et al., 2001). This means that these biomolecules are synthesized by a restricted number of plant taxa and can be used as specific markers. While most bioterpenoids are degraded and their atomic constituents recycled in the surface processes of Earth, a minor part is incorporated into sediments, thus joining the geological cycle. During this process, the bioterpenoids are transformed by diagenesis, leading to the formation of reaction products called geoterpenoids. Their initial chemotaxonomic value can be partially or totally retained (e.g. Simoneit, 1986; Otto and Simoneit, 2001). Geoterpenoids of ancient sediments may thus provide palaeochemotaxonomic information inherited from their biological precursors.

Botanical palaeochemotaxonomy has some specific attributes compared to palaeobotany and palynology in the reconstruction of palaeofloral and palaeoclimatic evolutions through geological times (e.g. Vliex et al., 1994; van Aarssen et al., 2000; Hautevelle et al., 2006a). Indeed, (1) plant biomarkers are more widespread in the stratigraphic record than well-preserved plant macrofossils; (2) on the contrary to Palaeozoic and Mesozoic palynomorphs, they can be directly linked to specific taxa of plants, and (3) biomarkers could be readily analysed by usual organic geochemistry procedures on total rock samples.

In addition to being useful to palaeofloristic and palaeoclimatic studies, botanical palaeochemotaxonomy has also been recently applied in other instances. In environmental science,

it proved to be helpful in the appreciation of past land use and recent anthropogenic impacts to soil (e.g. Farella et al., 2001; Heim et al., 2010; Huang et al., 2011; Lavrieux et al., 2011) as well as in tracing river pollution caused by paper mills (e.g. Leeming and Nichols, 1998; Wang et al., 2007). In archaeology, palaeochemotaxonomy is used to trace dietary habits and to understand the use of natural products in craft and funeral rites (e.g. Colombini et al., 2005; Romanus et al., 2008).

Most of palaeochemotaxonomic investigations are derived from published chemotaxonomic data (Otto and Wilde, 2001) and to some parts from the studies of fossil plants found in sedimentary rocks (Otto and Simoneit, 2001; Otto et al., 2005; Dutta et al., 2011). Unfortunately, our knowledge on botanical palaeochemotaxonomy is still very scarce. As pointed out by Hautevelle et al. (2006b), difficulties are related to the following: (1) available chemotaxonomic data (generally focused on specific biomolecules or on particular substances, like resins or essential oils); (2) degradation and diagenetic reactions, which may significantly modify the initial molecular fingerprint, making it difficult to perform a direct chemotaxonomic relationship between an extant plant and its fossil counterpart; (3) the scarcity of reference collections of well-preserved and identifiable fossil plants containing organic molecules.

In order to fill these gaps, within the 7 extant conifer families (Fig. 1), we investigated the palaeochemotaxonomy of several extant species of the Araucariaceae (Table 1) using an experimental method based on artificial maturation by confined pyrolysis (Hautevelle et al., 2006b). This procedure allows simulation of the conversion of biomolecules into their corresponding diagenetic geomolecules (Stankiewicz et al., 2000; Gupta et al., 2006, 2007). Aims of this study are (1) to determine the common palaeochemotaxonomic (diagenetic) signatures of all extant Araucariaceae species, (2) to evaluate the inter- and intra-generic differences within the family, (3) to highlight the molecular characteristics which should allow their distinction from other conifer families in ancient sediment samples. This contribution should serve as a database for future palaeoenviroennemental, archaeological and environmental research.

2 Some generalities concerning the Araucariaceae family

Araucariaceae is considered as a Southern Hemisphere conifer family and was among the first conifer families to be individualized from their “Voltziales” ancestors during the Triassic (Stockey, 1994). Diversity and abundance of Araucariaceae are well preserved up to present despite some reduction of geographic distribution and extinction of several species during evolution (Axsmith et al., 2004; Kunzmann, 2007a).

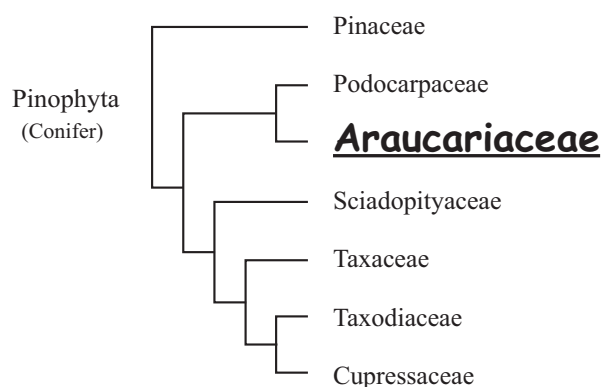


Fig. 1. Phylogenetic classification of conifers.

2.1 Taxonomy, geographical distribution and living environments

2.1.1 Extant Araucariaceae

Today, Araucariaceae species represent a dominant component of Southern Hemisphere forests. The major native Araucariaceae species are restricted to the South American, South-West Asian and the Western Pacific regions and cover a large rainfall region extending from subtropics to tropics (Enright and Hill, 1995). Nowadays, more than 40 species are described and consist of three well-defined genera, which are (1) *Agathis* (Salisbury, 1807), represented by 21 species, (2) *Araucaria* (Jussieu, 1978) represented by 19 species and (3) *Wollemia* (Jones et al., 1995) represented by the single species *Wollemia nobilis*. The latter, previously thought to be extinct, was rediscovered in 1994 in Australia, cloistered deep in the New South Wales (Jones et al., 1995).

These phylogenetic relationships of Araucariaceae species were also confirmed by Setoguchi et al. (1998) based on *rbcl* gene sequences:

- the three genera are all monophyletic (i.e. all species descend from a unique ancestor);
- *Araucaria* could be intra-generically classified into four sections: *Araucaria*, *Bunya*, *Eutacta*, and *Intermedia*. This sub-classification is in agreement with their morphological characteristics (Stockey, 1982);
- phylogenetic relationships within *Agathis* remain somewhat unclear;
- *Wollemia* is the most basal extant taxon in the family, sharing morphologies with *Araucaria* and *Agathis*.

Geographic distribution of major Araucariaceae species is given in Table 1. Extant *Araucaria* species develop in the subtropical regions and extend into the marginal tropical regions where there is a lower climatic variability, while

Table 1. Phylogentic relationships, geographical range and provenance of Araucariaceae species selected for this study.

Genera	Section	Species	Geographical range	Sample's provenance
<i>Agathis</i>		<i>australis</i> (D. Don) Loudon (1829) Syn. : <i>Dammara australis</i> , <i>Podocarpus zamiiifolius</i> Com. : kauri, New Zealand kauri	New Zealand (Northland & Coromandel peninsulas)	Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France)
		<i>moorei</i> (Lindl.) Mast (1892) Syn. : <i>Dammara moorei</i> , <i>Dammara lanceolata</i> Com. : Moore kauri	New Caledonia	Botanical Garden of Lyon (France)
		<i>robusta</i> (C. Moore ex F. Muell.) Bailey (1883) Com. : Queensland kauri, smooth-bark kauri, kauri pine	Australia (Queensland)	Botanical Garden of Lyon (France)
<i>Araucaria</i>		<i>angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze 1898 Syn. : <i>A. braziliana</i> , <i>Columbea angustifolia</i> Com. : Parana pine, candelabra tree	South America (Brazil, North Argentina & Paraguay)	Botanical Garden of Lyon (France)
		<i>araucana</i> (Molina) K. Koch (1873) Syn. : <i>A. imbricata</i> Com. : monkey puzzle tree	South America (S. Chile & SW. Argentina)	Botanical Garden of Montet (Nancy, France)
<i>Araucaria</i>	<i>Bunya</i>	<i>bidwillii</i> Hooker (1843) Com. : bunya, bunya pine	Australia (Queensland)	Botanical Garden of the Villa Thuret (France)
		<i>bernieri</i> Buchholz 1949 Com. : Bernier's araucaria	New Caledonia	Botanical Garden of Lyon (France)
		<i>cunninghamii</i> Aiton ex Lambert (1837) Com. : Hoop pine, Moreton Bay pine	Australia (Queensland & North of New South Wales)	Botanical Garden of Montet (Nancy, France)
<i>Eutecta</i>		<i>heterophylla</i> (Salisb.) Franco (1952) Syn. : <i>A. excelsa</i> , <i>Dombeya excelsa</i> , <i>Eutassa heterophylla</i> Com. : Norfolk Island pine	Norfolk Island	Found in the trade
		<i>laubenfelsii</i> Corbasson (1968) Com. : De Laubenfels araucaria	South of New Caledonia	Botanical Garden of Lyon (France)
		<i>nemorosa</i> de Laubenfels (1969) Com. : Boise araucaria	South of New Caledonia	Botanical Garden of Lyon (France)
<i>Intermedia</i>	/	New Guinea		
<i>Wollemia</i>		<i>nobilis</i> Johns, Hill and Allen (1994) Com. : Wollemi pine	Australia (Wollemi National Park)	Wollemi Pine France

most *Agathis* species occupy the tropical islands (Dettmann and Clifford, 2005). These two genera, extending within the equatorial region of New Guinea and Southeast Asia at lower latitude grow under a mesothermal climate, limited to the lower montane zone (Kershaw and Wagstaff, 2001). The monotypic genus *Wollemia* is by far the most endemic genus and its few wild species (about 40 adult plants) live deep in a wilderness rainforest of the Wollemi National Park in New South Wales (Australia).

2.1.2 Fossil Araucariaceae

Appearance and evolution of Araucariaceae are recorded by both macrofossils and pollen in sedimentary series all around the world. The first pollen record is from the early Triassic of Australia (as ancestor) just after the Permo-Triassic extinction, and the unequivocal Araucariaceae representatives were found in the Middle Jurassic of North Yorkshire (Stockey, 1982; Kershaw and Wagstaff, 2001; Kunzmann, 2007b). The maximum worldwide distribution was achieved in both hemispheres during the Cretaceous (Krassilov, 1978; Kunz-

mann, 2007b). Their distribution was then reduced during the Middle Palaeocene to the Southern Hemisphere, with an extension to the Northern Hemisphere (restricted to South-East Asia).

During the Jurassic, *Araucaria* (especially the *Eutecta* and the *Bunya* sections) was the first genus to appear and diversify. Its macrofossils and pollens broadened a wide range of habitats in the two hemispheres (Gondwana and Laurasia), where Jurassic climate condition was subtropical to warm-temperate (Kershaw and Wagstaff, 2001). During the Cretaceous, the first effective *Agathis* and *Wollemia* fossils appeared, but remained restricted to Australia and New Zealand (Hill and Bigwood, 1987; Stockey, 1994). This palaeogeographic limitation could have been due to the break-up of palaeofloristic exchanges between Gondwana and Laurasia. Moreover, appearance of angiosperms during the Cretaceous also forced *Agathis* to be more competitive (Kershaw and Wagstaff, 2001), *Wollemia* probably evolved under similar circumstances. At the end of the Cretaceous, *Araucaria* genus began to leave the Northern Hemisphere. As pointed

out by Kunzmann (2007b), their retreat from Northern Hemisphere coincides with two major events in Earth history: (1) major changes in forest composition in Europe and North America, and (2) rapid environmental changes across the K-Pg boundary.

Later, during the Cenozoic, *Wollemia* and especially *Agathis* became more prominent from the early Eocene to the early Oligocene. This development was synchronous with the diversification of angiosperms. Owing to their adaptation ability to many unfavourable conditions, such as the ultramafic soils on peridotites and the unstable climate in islands, *Agathis* species began to colonize and diversify in New Caledonia and other Asia-Pacific islands (Jaffré, 1995). In parallel there was a reduction of *Agathis* from south-eastern Australia due to the cooler conditions at high latitudes. Regarding *Araucaria* species, they regenerated from early Miocene under subtropical to warm-temperate conditions (Kershaw and Wagstaff, 2001).

2.1.3 Usefulness of Araucariaceae from the past to present days

The worldwide patchy and sparse distribution of Araucariaceae in sedimentary deposits, as inferred by palaeobotanic and palynological data, can thus provide valuable palaeoclimatic information. Indeed, they preferentially grow under warm and wet conditions, mainly in equatorial, tropical or subtropical rainforests as well as peat swamps (Kershaw and Wagstaff, 2001).

Furthermore, many Araucariaceae produce resins having archaeological and economical values. *Agathis* is highly considered as a source of attractive, straight-grained, easily worked timber. The wood of *Agathis australis* has been intensively used in the past for the construction of canoes, houses and cult objects by native Maori people of New Zealand. Some of these objects were well preserved and are of archaeological interest nowadays. The resin of *Agathis* (kauri copal, kauri gum or kauri resin) was also widely used for the manufacture of paints, varnishes and linoleum during the XIX and XX centuries. Other *Agathis* living in Indonesia and Philippines, as *Agathis dammara*, produce resin having an important economic value (Manilla resin or Manilla copal). Copal has also been used for a long time in jewellery and related arts. Furthermore, *Araucaria* may not have an equivalent economical value as *Agathis*, but provided wood for ship building during several centuries.

2.2 Chemotaxonomy

Available data on the composition of monoterpenoids (C_{10}), sesquiterpenoids (C_{15}) and diterpenoids (C_{20}) of many Araucariaceae representatives are here summarized.

Monoterpenoids (C_{10}) are abundantly synthesized by Araucariaceae. Compounds, like pinene, thujene and limonene are widespread in most Araucariaceae species

(Brophy et al., 2000). They represent the major components of araucarian essential oils (Brophy et al., 2000; Staniek et al., 2010). Furthermore, owing to their lower molecular weight, these chemicals are generally highly volatile and not readily preserved in sediments.

Sesquiterpenoids are composed by monocyclic (e.g. elemene, germacrane and humulane types), bicyclic (e.g. cadinane, copaane, muurolane and caryophyllane types) and tricyclic (e.g. aromadendrane, cubebane and gurjunane types) compounds. These chemicals are mainly represented by unsaturated hydrocarbons, alcohols and acids, constituents of essential oil and resins (e.g. Pietsch and König, 2000; Brophy et al., 2000). However, they are common in conifers as well as in other plants like angiosperms and bryophytes (Otto and Wilde, 2001).

Regarding diterpenoids, they are represented by bicyclic, tricyclic and tetracyclic compounds. Bicyclic diterpenoids mainly composed by labdane-type compounds are common in all conifers. They are synthesized as unsaturated hydrocarbons (like sclarenes and biformenes), and alcohols (like sclareols) as well as acids (like agathic and communic acids) and isomers may occur (Caputo and Mangoni, 1974; Caputo et al., 1974a, b, 1976; Thomas, 1969; Pietsch and König, 2000; Otto and Wilde, 2001). Other bicyclic compounds belonging to the clerodane type, like clerodadienic acids, seem to be restricted to two *Araucaria* species: *A. bidwillii* (Caputo and Mangoni, 1974) and *A. hunsteinii* (Otto and Wilde, 2001).

Tricyclic diterpenoids reported in Araucariaceae are composed essentially of the abietane and pimarane types. Tetracyclic diterpenoids belong to the beyerane, kaurane, phyllocladane, trachylobane and atisane types (Brophy et al., 2000; Otto and Wilde, 2001). According to Thomas (1969), Brophy et al. (2000) and Pietsch and König (2000), both tri- and tetracyclic diterpenoids are synthesized as unsaturated hydrocarbons (like pimaradienes, abietadienes, kaurenes, etc.), acids (like abietic and isopimaric acids) and more rarely as alcohols (like phyllocladanol and phenolic abietanes, which are only reported in few *Agathis* species) in Araucariaceae species.

Distribution of bioterpenoids varies from one species to another in fresh plants (Thomas, 1969; Brophy et al., 2000). For instance, each species seems to be dominated by one or possibly two compounds. Their molecular composition could thus be theoretically specific to each araucarian species and/or genus. These data originate from a compilation of several studies, and some inconsistencies may occur. For instance, Thomas (1969) insists on the presence of compounds like agathic, communic, isopimaric and abietic acids in *Agathis* species, while these compounds are not reported by Brophy et al. (2000). Such kinds of contradictions are certainly due to the fact that the former studied the resins while the last studied essential oil. Nevertheless, chemotaxonomic data provide valuable knowledge to palaeochemotaxonomy.

3 Samples and experimental procedures

3.1 Samples

Leaves and twigs of about 12 Araucariaceae species were selected for this study, including 3 *Agathis*, 8 *Araucaria* and 1 *Wollemia*. Choice of leaves and twigs as plant material in this study is done based on the following reasons. (1) Most of sedimentary organic matter originating from conifers comes from leaves and twigs. (2) Plant biomarkers investigated in this paper derive from terpenoids that are of the major components of essential oils and resins. The terpenoids are transported with resins through vessels to all part of a plant, including leaves and twigs. (3) Analysis of the molecular composition of leaves and twigs provided currently available relevant chemotaxonomic and even some palaeochemotaxonomic data. More details of representatives, their phylogenetic relationships, native geographic distributions as well as their provenances are given in the Table 1. This sampling is believed to be well representative of the intrinsic variability of the Araucariaceae family.

3.2 Experimental and analytical procedures

This study focuses on the diagenetic molecular signature of Araucariaceae. Transformation of fresh material to its diagenetic counterpart was carried out by experimental artificial maturation by confined pyrolysis, developed by Hautevelle et al. (2006b). Twigs and leaves of the selected plants were finely cut and dried under vacuum for 24 h in a desiccator at 45 °C before being crushed. The plants to be pyrolysed were introduced into gold tubes with and without LiAlH₄ (Fluka No. 62420, purity 97 %, powder form). The use of LiAlH₄ favours the generation of saturated over aromatic terpanes during pyrolysis. The filled gold tubes were then sealed under an argon atmosphere and introduced into autoclaves and heated at 280 °C and 700 bars during 24 h. These parameters of pyrolysis were determined to obtain the broadest distribution of biomarkers (aliphatic, aromatic and polar). Biomolecules of the starting fresh plant samples of each representative were also studied.

The soluble organic compounds of fresh plants and their pyrolysates were extracted under 80 °C and 100 bars using CH₂Cl₂ with an accelerated solvent extractor (ASE 350, Dionex). The total extract was then fractionated into aliphatic, aromatic and polar fractions using liquid chromatography on alumina (separation of hydrocarbon and polar fraction) and silica (separation of aliphatic and aromatic fractions from the hydrocarbon fraction) columns. The fractions were successively eluted with CH₂Cl₂ and CH₃OH/CH₂Cl₂ (50/50 v/v) on the alumina column, then with pentane, followed by pentane/CH₂Cl₂ (65/35 v/v) and CH₃OH/CH₂Cl₂ (50/50 v/v) on the silica column. The obtained fractions were diluted in hexane (4 mg mL⁻¹ for aliphatic fraction and 8 mg mL⁻¹ for the others) before analysis by GC-MS.

3.3 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and identification of compounds

Aliphatic and aromatic fractions were analysed using an HP 5890 Series II gas chromatograph coupled with an HP 5971 mass spectrometer (GC-MS). Polar fractions were silylated using N, O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) at 60 °C for 15 min before analysis. The capillary column was a DB-5 J&W (60 m × 0.25 mm i.d., with 0.1 μm film thickness). The temperature programme was 70–315 °C at 15 °C min⁻¹ to 130 °C, and then 3 °C min⁻¹ followed by an isothermal stage at 315 °C for 15 min. Helium was the carrier gas (1 mL min⁻¹ flow rate). The MS operated in the electron impact mode (EI) at 70 eV ionization energy, and mass spectra were scanned from 50 to 500 Da using a quadrupole detector. Data were acquired and processed using the Agilent ChemStation software. Compounds were identified by comparison of mass spectra with the literature and library database (Wiley275) or by interpretation of mass spectrometric fragmentation patterns. Relative abundance of compounds was measured by integration of peak area.

4 Results and discussion

Aliphatic, aromatic and polar fractions were studied for each Araucariaceae representative, including the extracts of fresh plants and of their pyrolysates. Since our study mainly focuses on palaeochemotaxonomy, the extracts of pyrolyzed plants were preferentially studied.

4.1 Molecular characteristics of artificially diagenetic *Araucaria* genus

4.1.1 Sesquiterpenoids

Distribution of aliphatic and aromatic sesquiterpenoids of *Araucaria* is respectively shown in Figs. 2 and 3. The proportion of detected sesquiterpenoids in each representative is given in Tables 2 and 3, which respectively correspond to compositions of saturated and aromatic compounds obtained from pyrolysis with and without LiAlH₄. Di- and trimethylnaphthalenes are ubiquitous in each representative. *Araucaria* species are also commonly characterized by the following:

- farnesane (C₁₅H₃₂) and bisabolane-type compounds. Acyclic farnesane, probably derived from isomers of farnesol (*trans*- and *cis*-) detected in the fresh plants, is identified in all *Araucaria* species. Bisabolane-type compounds, like isomers of saturated bisabolane (C₁₅H₃₀), *ar*-curcumene (C₁₅H₂₂) and dihydro-*ar*-curcumene (C₁₅H₂₄), are observed in the aliphatic and the aromatic fraction respectively. *Ar*-curcumene is often found in trace amounts for all species. Bisabolane-type compounds are generally derived from

Table 2. Relative abundances (%), GC-MS peak integration normalized to the highest peak) of saturated sesquiterpenoids and diterpenoids in Araucariaceae species obtained from the pyrolysis with LiAlH₄.

Compounds	MW	Araucaria (%)										Agathis (%)			Wollomia(%)
		<i>Angustifolia</i>	<i>Araucana</i>	<i>bernieri</i>	<i>bidwillii</i>	<i>cunninghamii</i>	<i>heterophylla</i>	<i>laubenfelsii</i>	<i>nemorosa</i>	<i>australis</i>	<i>moorei</i>	<i>robusta</i>	<i>nobilis</i>		
Sesquiterpanes															
Farnesane	212	3.5	6.8	-	-	1.0	8.1	0.6	0.2	1.9	10.1	3.3	0.7		
Eudesmane	208	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0		
4 β (H)-eudesmane	208	2.0	1.0	1.2	0.6	-	0.6	0.1	0.2	4.0	1.8	-	1.8		
Bisabolane	210	3.8	6.6	-	-	2.0	3.0	0.4	0.2	1.1	-	-	1.0		
bisabolane N° 1	210	1.3	3.6	-	-	-	0.8	0.3	0.1	1.1	-	-	0.6		
bisabolane N° 2	210	1.3	3.6	-	-	-	0.8	0.3	0.1	1.1	-	-	0.6		
Cadlanaes															
109(208)N° 1	208	1.3	4.0	0.1	-	-	0.9	-	-	1.6	-	4.0	0.9		
109(208)N° 2	208	1.8	0.8	0.2	-	-	-	0.1	-	3.5	39.7	16.2	1.3		
109(208)N° 3	208	2.8	-	0.9	1.5	-	1.1	0.2	0.1	2.4	100	5.8	1.9		
109(208)N° 4	208	4.8	1.4	0.4	0.3	6.0	0.9	0.2	0.3	6.5	-	15.8	3.1		
109(208)N° 5	208	3.2	-	0.5	0.5	2.0	1.4	0.1	-	10.1	-	-	2.7		
109(208)N° 6	208	3.0	-	0.2	0.9	-	1.4	0.7	-	-	-	-	1.9		
Diterpanes															
Clerodane (Fig. 8b)	278	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Labdane type															
Labdane 1	278	4.6	4.8	7.3	9.6	86.4	7.5	0.0	14.6	6.8	7.7	66.6	-		
Labdane 2	278	4.8	8.6	5.0	11.5	51.7	9.4	0.0	11.2	5.8	5.3	47.6	-		
Labdane 3	278	3.8	-	4.1	-	45.7	-	0.4	2.5	-	-	-	2.5		
Labdane 4	278	-	-	8.1	-	-	-	0.3	2.2	-	-	-	2.5		
C19H36 (Fig. 9f)	264	-	-	-	-	-	-	-	-	41.8	53.3	-	-		
Abietane type															
Fichtelite	262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-		
Abietane	276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32.2	-		
Related abietane-type															
C20H36 (Fig. 9a)	276	-	-	-	-	50.0	-	-	100	-	-	-	-		
C20H34 (Fig. 9f)	274	-	-	-	-	-	-	-	-	10.8	6.0	-	-		
Pinarane type															
Isopimarane	276	-	-	6.0	-	-	2.2	8.1	0.8	13.0	-	28.1	-		
<i>Ent</i> -beyerane	274	-	100	2.6	100	100	-	8.1	-	54.9	-	-	8.8		
16 β (H)-phylocladanes	274	17.6	-	22.9	1.5	59.0	19.2	39.6	-	57.4	13.5	-	32.2		
16 α (H)-	274	100	4.5	41.0	2.4	18.0	100	100	-	100	49.2	-	100		
17-norphylocladane (Fig. 8d)	260	1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16(H)-homophyllocladane (Fig. 6e)	288	2.6	-	1.9	-	-	-	1.2	-	-	-	-	1.4		
<i>Ent</i> -16 β (H)-kauranes	274	-	1.7	100	-	-	40.7	23.7	-	12.1	5.4	-	1.6		
<i>Ent</i> -16 α (H)	274	-	5.6	8.9	-	56.0	8.2	19.2	2.3	-	-	-	0.6		

Table 3. Relative abundances (%), GC-MS peak integration normalized to the highest peak) of aromatic sesquiterpenoids and diterpenoids in Araucariaceae species obtained from the pyrolysis without LiAlH₄.

Compounds	MW	Araucaria (%)					Agathis (%)			Wollemia (%)		
		<i>Angustifolia</i>	<i>Araucana</i>	<i>berneri</i>	<i>bidwillii</i>	<i>cunninghamii</i>	<i>heterophylla</i>	<i>laubmoenlii</i>	<i>nemorosa</i>	<i>australis</i>	<i>moorei</i>	<i>robusta</i>
Sesquiterpenoids												
Ionene	156	7.8	13.3	4.7	—	—	43.5	9.3	—	4.1	—	2.7
<i>n</i> -methyl naphthalene	156	39.3	22.3	33.7	—	—	40.7	16.4	1.5	20.9	13.0	27.4
DMN	170	100	100	56.8	33.6	66.3	100	24.3	43.1	3.2	39.9	100
TMN	174	—	26.3	11.3	6.2	5.8	51.3	100	69.2	62.4	8.2	—
Tetramethyl-octahydro-naphthalene												
Bisabolane-type												
Dihydro- <i>ar</i> -curcumene	204	19.7	27.0	9.3	1.9	3.8	33.9	19.6	1.8	2.3	2.7	3.1
<i>ar</i> -curcumene	202	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Isobexyl alky aromatic hydrocarbons												
1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene, (Fig. 5a)	204	11.0	9.2	2.0	4.3	2.1	16.2	11.7	6.9	10.4	3.8	2.3
Cudane-type												
Calamene	202	17.0	8.3	9.0	5.7	4.1	13.9	15.3	4.4	2.2	15.3	4.0
Norcadalene	184	9.4	9.4	5.4	5.6	4.4	8.6	7.7	4.0	2.9	4.0	2.9
Calamene	202	9.3	4.4	13.7	5.1	1.3	6.2	8.2	5.0	27.1	16.5	3.3
Cadlone	198	51.4	14.1	100	21.9	12.1	26.8	17.8	34.8	5.7	100	20.8
Pentamethyl-dihydroindene 1	188	11.5	55.6	9.3	4.2	100	30.2	7.5	24.0	31.8	22.3	2.8
Pentamethyl-dihydroindene 2	188	24.2	15.7	5.4	48.1	10.0	25.9	18.2	14.6	100	8.3	12.9
Chamazulene	184	40.4	19.6	20.7	7.8	31.2	30.3	10.7	24.6	19.1	22.7	40.1
Diterpenoids												
Labdane-type												
Monoaromatic labdane (Fig. 8a)	244	39.9	28.0	—	6.6	8.6	51.7	—	33.8	39.2	13.1	—
Abietane-type												
Bis-simonellite	224	—	—	—	—	—	—	6.3	—	—	—	—
19-Norabietatriene	256	28.0	6.6	—	10.7	7.3	27.5	6.6	—	—	18.7	—
18-Norabietatriene	256	20.1	—	19.9	39.7	7.1	33.2	4.9	—	—	13.8	3.3
Dehydroabietane	270	17.9	—	20.3	18.2	11.9	26.0	41.4	82.5	46.2	—	—
1-methyl-10,18-bisnorabietatriene-8,11,13-triene	256	15.7	15.7	—	28.9	6.3	18.8	—	43.9	11.8	—	—
1,2,3,4-tetrahydroretene	238	23.1	4.7	10.7	49.1	11.6	31.7	13.5	29.6	—	25.4	15.3
Simonellite	252	—	—	14.3	9.1	—	—	4.3	83.8	15.9	—	—
Retene	234	8.3	—	22.3	100	19.8	38.0	10.2	18.4	4.2	31.9	43.2
9-methyl-retene	248	8.6	—	3.0	19.4	2.6	3.7	1.2	—	—	3.5	5.3
2-methyl-retene	248	3.5	—	1.7	4.3	2.2	—	—	6.0	—	1.8	4.1
Related abietane-type												
C18H26 (Philp., 1985, N° 94)	242	30.0	24.4	—	18.4	9.0	49.5	5.7	15.6	25.5	—	11.4
C19H28	256	—	—	—	—	—	—	34.7	100	36.4	—	—
C19H30 (Fig. 9b)	258	29.8	18.8	—	38.4	11.4	25.2	—	13.0	26.3	—	—
C19H26 (Fig. 9h)	254	—	—	18.7	48.3	5.7	—	—	—	—	12.8	—
C18H22 (Fig. 9c)	238	23.1	10.9	16.3	23.3	12.5	31.3	—	21.0	12.7	24.1	—
C18H22 (Fig. 9d)	238	49.0	—	8.4	37.3	9.5	13.9	6.4	—	15.8	12.8	9.7
C19H24 (Fig. 9e)	252	32.4	11.6	14.8	26.5	12.4	22.2	—	20.0	6.2	8.5	4.4
C19H24 (Fig. 9f)	252	20.1	—	9.0	11.5	11.9	12.0	—	12.1	6.2	7.4	—
C19H24 (Fig. 9g)	252	14.1	—	5.5	24.1	8.6	9.7	2.3	—	—	16.0	9.2
Pentamethyl plicanthrene (Fig. 8c)	248	8.1	—	2.3	7.3	8.8	9.6	5.4	—	—	6.3	17.2
Isobexyl alky aromatic hydrocarbons												
2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene (Fig. 5b)	240	57.3	38.3	16.7	21.9	15.8	66.6	—	50.2	43.8	25.5	3.2
6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene (Fig. 5c)	254	12.1	17.6	26.3	33.7	22.8	41.0	—	—	8.1	26.9	5.0
C18H22 (Fig. 5d)	238	47.9	28.4	24.2	46.8	22.3	65.9	—	43.6	41.5	19.2	5.5
C19H26 (Fig. 5e)	254	2.3	5.5	11.3	18.5	10.8	12.1	—	12.5	7.4	—	2.5

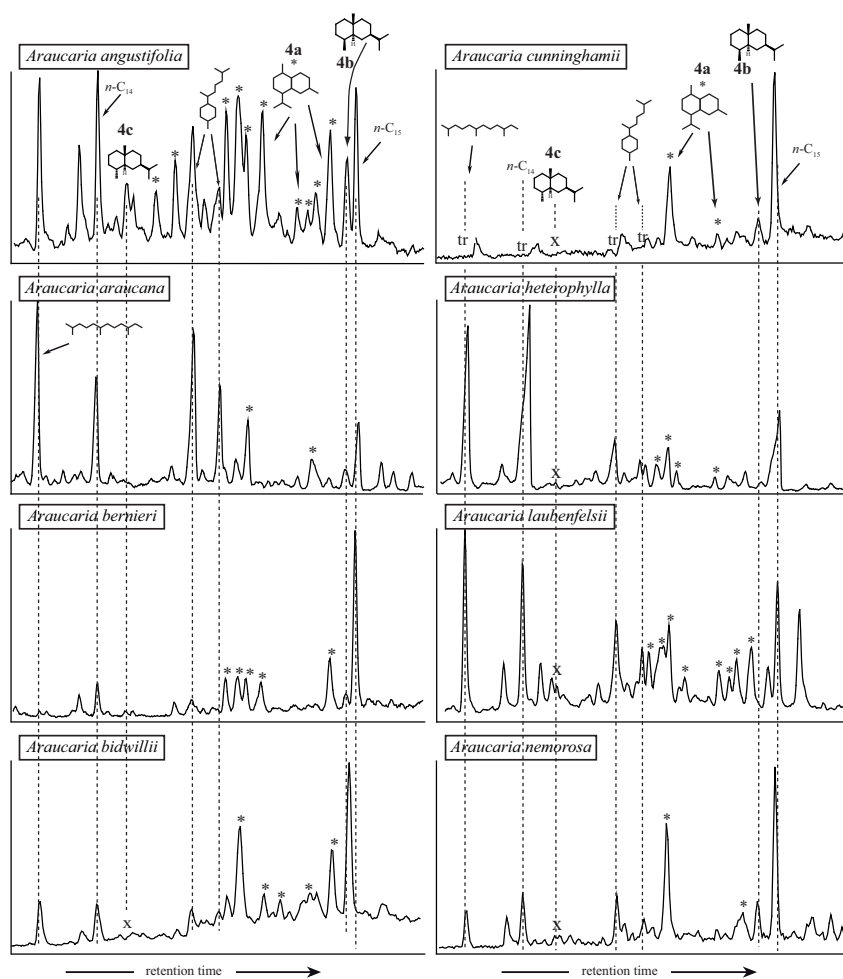


Fig. 2. Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 4a, 4b, and 4c are given in Fig. 4. x: absence of compound; tr: at trace level; *: cadalane-type compounds.

bisabolenes found in the fresh plants. They represent one of the major class of *Araucaria* sesquiterpenoids (especially in the aliphatic fractions), except for *A. bernieri* and *A. bidwillii*;

- cadalane-type compounds. They are mainly derived from cadinol and cadinenes, which are ubiquitous in vascular plants. In the aliphatic fractions, a variety of saturated cadalane-type compounds ($C_{15}H_{28}$) are identified like cadinanes, muurolanes and amorphanes. Their spectra are commonly characterized by a molecular ion at m/z 208, a low abundance (even absent) of the M^+-15 ion at m/z 193, a relatively high abundance of ion at m/z 165 (corresponding to the loss of a isopropyl unit, M^+-43) and a base peak at m/z 109 (corresponding to a fragmentation of A/B-ring moiety after the loss of precedent units) (Fig. 4a). In the aromatic fractions, the cadalane-type compounds are repre-

sented by calamenene and calamene ($C_{15}H_{22}$, both partially aromatized), cadalene ($C_{15}H_{18}$, completely aromatized). One norcadalene (probably the 1-isopropyl-7-methylnaphthalene according to the spectrum from Singh et al., 1994) is detected in all species (Fig. 4d). Its formation is the result of the demethylation of cadalane-type compounds, and no more precision to its structure was proposed. In addition, cadalane-type compounds show a high abundance in most species' samples and represent also one of the major *Araucaria* sesquiterpenoids, except for *A. araucana* and *A. cunninghamii*;

- eudesmane-type compounds. $4\alpha(H)$ -eudesmane and $4\beta(H)$ -eudesmane are identified according to Wiley275 database and the spectrum published by Alexander et al. (1983) (Fig. 4b and 4c). The relative abundances of these two compounds vary from one species to another. It is higher in *A. bernieri* and at trace level in *A. het-*

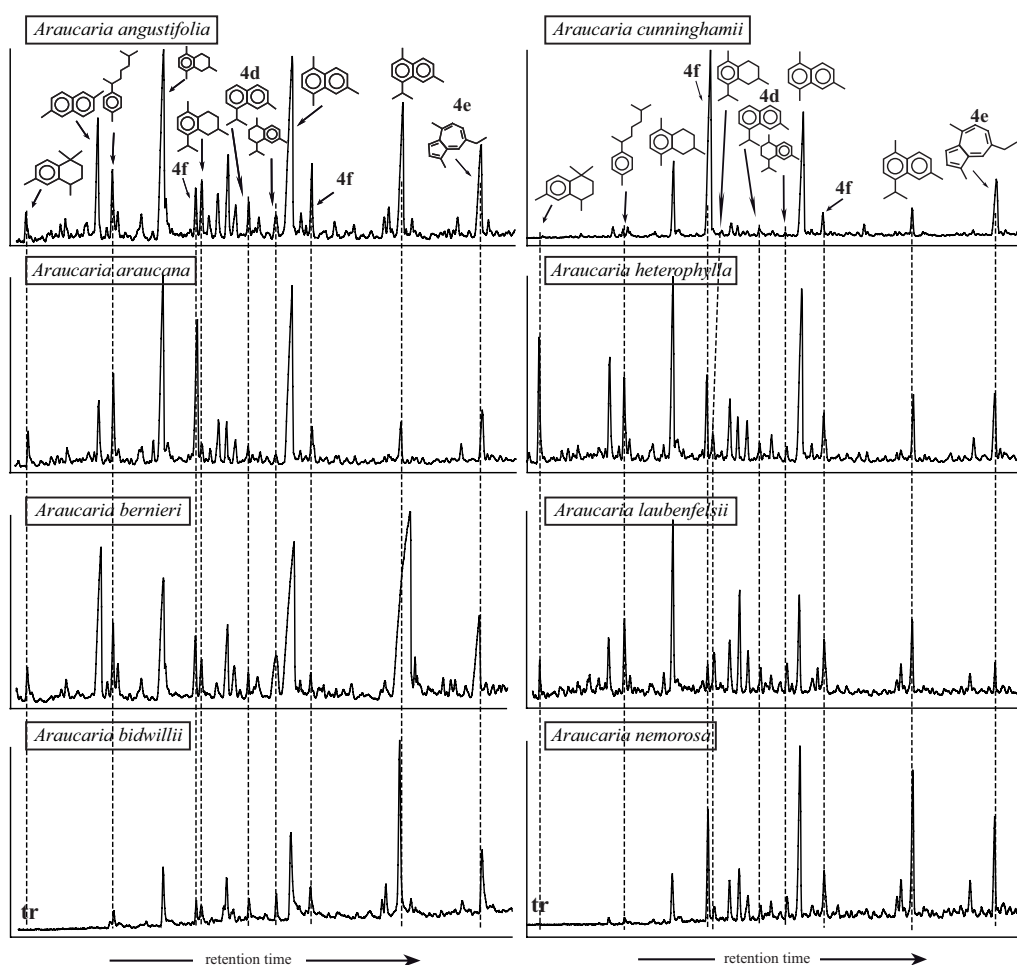


Fig. 3. Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 4d, 4e and 4f are given in Fig. 4. tr: at trace level.

- erophylla* as well as in *A. cunninghamii*. Moreover, eudesmanes-type compounds are widely distributed in fossil vascular plants (Alexander et al., 1983). However, they were not reported in the previous studies of Brophy et al. (2000) and Otto and Wilde (2001), which focus on fresh material;
- ionene ($C_{13}H_{18}$), with a molecular ion at m/z 174 and a base peak at m/z 159 according to Achari et al. (1973). It was detected for most of *Araucaria* species. It could be derived from β -carotene (like in sporopollenin (which derives from some pollen exines) (Achari et al., 1973; Simoneit, 1986). In our case, the ionene is probably directly derived from ionone that is abundant in fresh plants;
 - chamazulene ($C_{14}H_{16}$) and other compounds identified as pentamethyl-2,3-dihydroindenes according to their spectra are also remarkable in the aromatic fraction. Chamazulene elutes after cadalene and its spectrum, according to the Wiley275 database, is quite similar to that of norcadalene, but with a molecular ion (m/z 184) more intense than its base peak at m/z 169 (Fig. 4e). Due to its carbon skeleton composed of a ring composed of seven carbon atoms and a pentenic ring, it is probably derived from precursor of similar carbon skeleton, like aromadendrenes, alloaromadendrene and spathulenol, which are widespread in the fresh species (Brophy et al., 2000; Olawore, 2005). Pentamethyl-2,3-dihydroindene, identified according to Wiley275 database, is characterized by a spectrum with a molecular ion at m/z 188 ($C_{14}H_{20}$) and a base peak at m/z 173 ($M^+ - 15$) (Fig. 4f). Pentamethyl-2,3-dihydroindene and chamazulene show a higher abundance than other

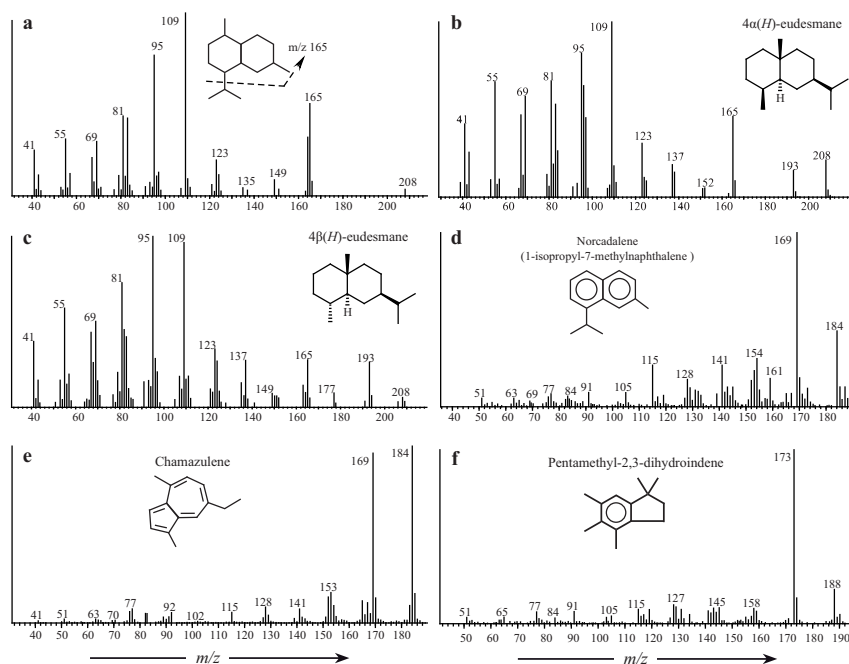


Fig. 4. Mass spectra of some identified Araucariaceae sesquiterpenoids. (a): saturated cadalane-type compounds; (b): $4\alpha(H)$ -eudesmane (identified using Wiley275 database); (c): $4\beta(H)$ -eudesmane (identified from spectrum in Alexander et al., 1983); (d): norcadalene (identified from spectrum in Singh et al., 1994); (e): chamazulene (identified using Wiley275 database); (f): pentamethyl-2,3-dihydroindene (identified using Wiley275 database).

aromatic bicyclic sesquiterpenoids with the exception of cadalene;

- furthermore, 1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene ($C_{15}H_{24}$) with a molecular ion at m/z 204 and a base peak at m/z 133 was detected in all *Araucaria* species, but with a low abundance. According to Ellis et al. (1996), it belongs to the family of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons with an opened A-ring (Fig. 5a). Its occurrence could be due to the alteration of some bicyclic compounds (like drimane) during the pyrolysis.

In addition, the general trend of *Araucaria* sesquiterpenoids, represented by the relative abundance of major class of sesquiterpenoids in each representative, is given in Table 4.

4.1.2 Diterpenoids

Diterpenoids in the extracts of pyrolysates of *Araucaria* species are characterized by a diversity of bicyclic, tricyclic and tetracyclic compounds. Distributions of saturated and aromatic diterpenoids are respectively shown in Figs. 6 and 7; the relative proportion of each diterpenoid is given in Tables 2 and 3.

Bicyclic diterpenoids

Bicyclic diterpenoids are essentially composed by labdane-type compounds ($C_{20}H_{38}$). Several isomers of labdane are identified in *Araucaria* species, although they do not show a high abundance in each representative. As shown in the literature, they are generally derived from labdadiene, phenolic labdanes and communic acids present in the fresh *Araucaria* (Caputo and Mangoni, 1974; Caputo et al., 1974a, b, 1976; Otto and Wilde, 2001). Moreover, according to de Paiva Campello and Fonseca, (1975), agathic acid could also be the origin of labdanes in the case of *A. angustifolia*.

A peak having a molecular ion at m/z 244 ($C_{18}H_{28}$) is detected in the aromatic fraction in all *Araucaria* species. It shows significant abundance in most species, but in traces for *A. bidwillii*, *A. laubenfelsii* and *A. nemorosa*. According to its mass spectrum, its base peak at m/z 159 matches very well to fragments composed of two rings (including an aromatic ring) and two methylene units. This fragment is probably formed via the loss of a branched chain with 6 carbon atoms (Fig. 8a). This kind of fragmentation seems to be consistent with a monoaromatic labdane. No aromatic labdane has been described in the literature until now.

Another peak having a molecular ion at m/z 278 ($C_{20}H_{38}$) and a base peak at m/z 109 is detected with a low abundance in the aliphatic fraction of *A. bidwillii*. Its mass spectrum

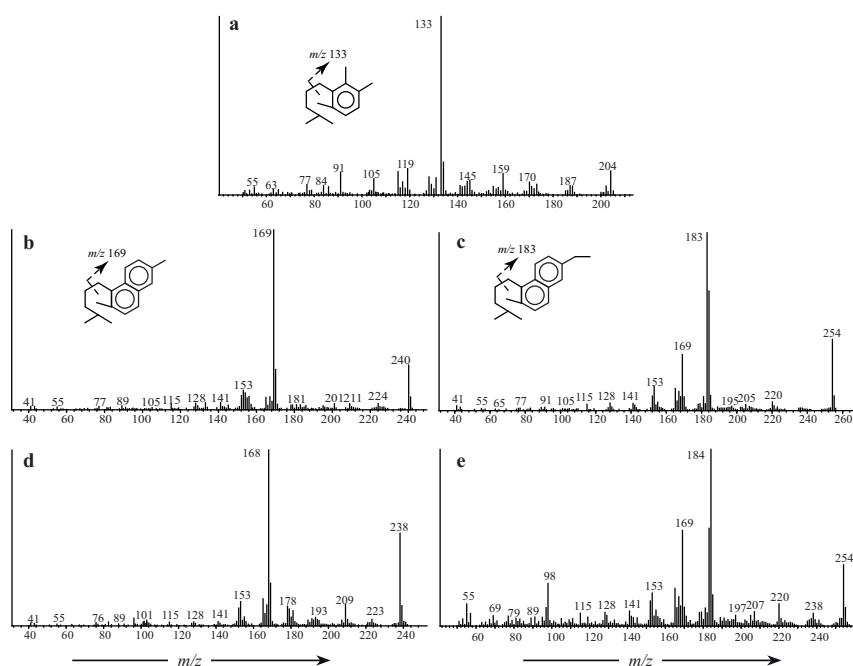


Fig. 5. Mass spectra of identified isohexyl alkylaromatic hydrocarbons in Araucariaceae species and mass spectral cleavage patterns (identified after Ellis et al., 1996). **(a):** 1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene; **(b):** 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene; **(c):** 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalenemethylretene. Mass spectra of some unidentified Araucariaceae diterpenoids, but similar to some of the identified isohexyl alkylaromatic hydrocarbons: **(d)** to **(b)** and **(e)** to **(c)**.

Table 4. Major sesquiterpenoids and diterpenoids classes detected in Araucariaceae species after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH_4 as reducing agent.

Class of structure	Agathis			Araucaria							Wollemia	
	australis	moorei	robusta	angustifolia	araucana	bidwillii	bernieri	cunninghamia	heterophylla	launbenfelsii	nemorosa	nobilis
Sesquiterpenoids												
Farnesane	+++	++	+	+++	+++	+	++	+	+++	+++	++	++
Bisabolane	+	tr	tr	+++	++++	+	+	tr	++	++	+	+
Eudesmane	+++	tr	tr	++	++	++	+	tr	tr	+	+	++
Cadalane	++++	+++	++	++++	++	++++	++++	++	+++	+++	+++	++++
Ionene	+	tr	tr	+	+	tr	+	tr	++	tr	tr	tr
Chamazulene	++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+++	/
Pentamethyl-dihydroindene	+	+	+	++	+	+	+	tr	++	++	++	+
Diterpenoids												
Labdane	+	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+
Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons	+++	+++	+	++++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++
Abietane												
normal abietane (dehydroabietic acid)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
phenolic abietane (ferruginol, sugiol and hinokiol)	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
diagenetic abietanes	++	+++	+++	+++	tr	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++++
Pimarane	+	/	/	/	/	/	+	/	+	++	+	/
Ent-beyerane	+++	/	/	/	+++	+++	+	++	/	/	/	+
Phyllocladane	+	+	/	++++	++	tr	++++	++++	+++	+++	/	/
Ent-kaurane	++++	+++	/	/	++	/	++++	++	++++	+++	+	++++

indicates that it could also be a bicyclic compound and has a similar carbon skeleton to labdane. Indeed, its fragment at m/z 193 matches to a configuration including two rings (A and B) and three methylene units, while its A/B-ring fragment (m/z 109) contains only two methylene units. The “third” methylene unit could thus only be bound at the carbon-9 position (Fig. 8b). This obtained configuration is consistent with a structure similar to that of clerodane. However, its report in extant conifers is limited to a few deriva-

tives of *ent*-clerodadienes (Otto and Wilde, 2001) and is restricted to two *Araucaria* species including *A. bidwillii* (Caputo and Mangoni, 1974; Cox et al., 2007).

2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene are abundant for most species and in traces in *A. launbenfelsii*. These two compounds are identified from spectra published by Ellis et al. (1996) and given in Fig. 5b and 5c. They belong to the family of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons

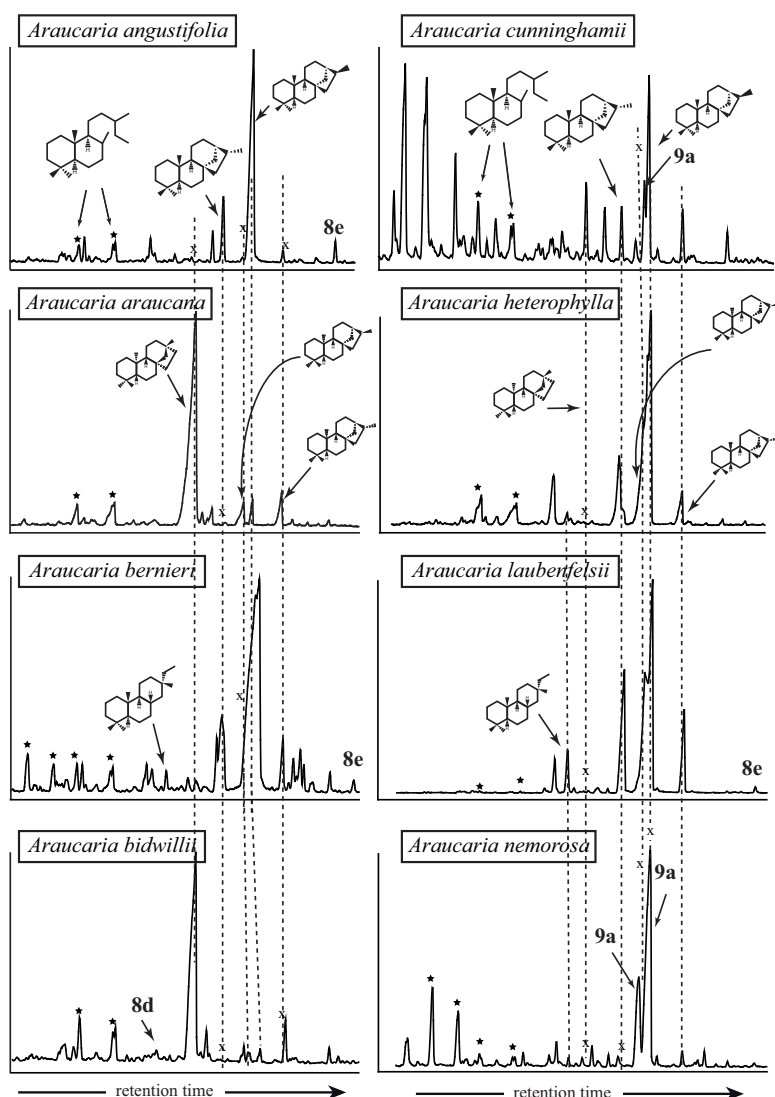


Fig. 6. Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fraction of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 8d and 8e are given in Fig. 8. The mass spectrum of 9a is given in Fig. 9. *: labdanes; x: absence of compound.

just like the 1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene previously described. Indeed, their specific carbon skeleton with an opened A-ring could be due to some specific chemical reactions, like aromatization, ring-opening processes and rearrangement during the maturation (Ellis et al., 1996). Furthermore, the co-occurrence of 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene suggests precursors like tricyclic diterpenoids (Ellis et al., 1996), for which the diagenetic products are structurally quite dissimilar to their precursors.

Tricyclic diterpenoid

Few aliphatic but a high diversity of aromatic tricyclic diterpenoids are observed. A pimarane-type compound, like isopimarane ($C_{20}H_{36}$), is detected in the aliphatic fraction with a significant abundance for numerous species, like *A. bernieri*, *A. heterophylla*, *A. laubenfelsii* and *A. nemorosa*. This kind of tricyclic aliphatic diterpenoids is probably derived from isopimara-7, 15-dienes, 13-isopimaradiene, isopimara-8(9),15-diene as well as 8β -hydroxyisopimarene, that are detected in some of the fresh *Araucaria* species.

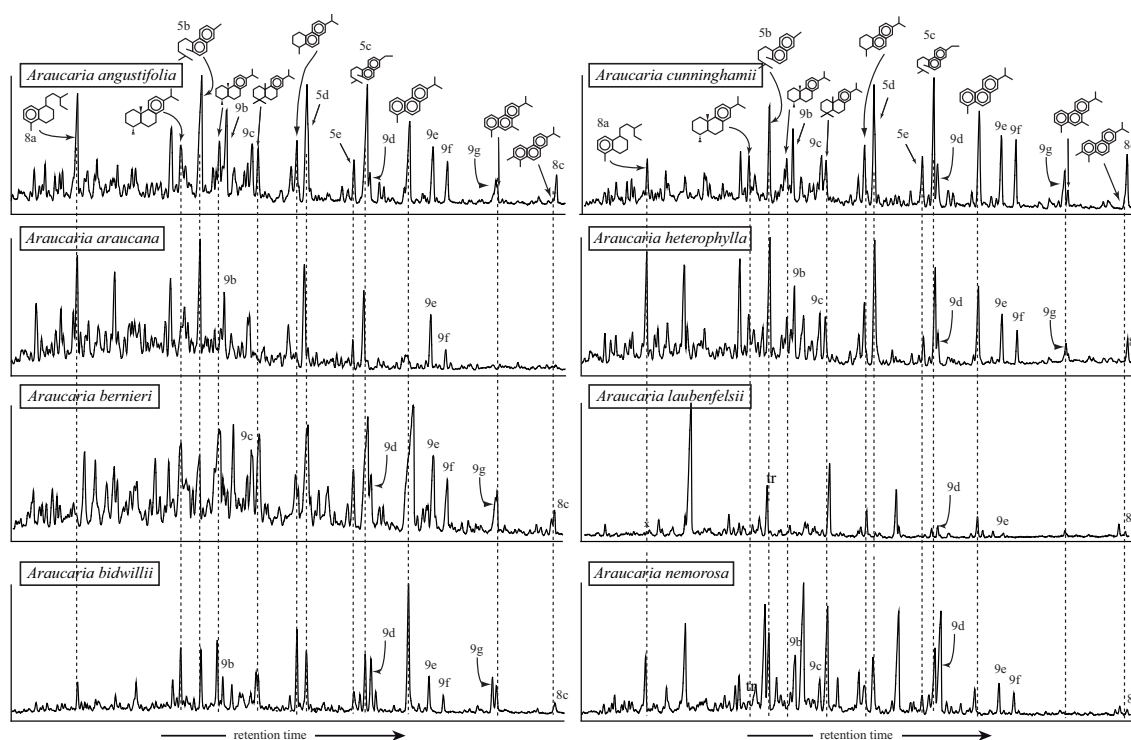


Fig. 7. Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of pyrolysates of *Araucaria* species. The mass spectra of 5b, 5c, 5d and 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8a and 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b, 9c, 9d, 9e, 9f and 9g are given in Fig. 9. tr: in trace; x: absence of compound.

Other tricyclic diterpenoids, like abietane-type compounds, show a higher diversity, especially in the aromatic fraction. Related aromatic compounds are retene, dehydroabietane, 18- and 19-norabietane-8, 11, 13-trienes, tetrahydrotene, simonellite, bisnor-simonellite, 2- and 9-methylretenes. While the saturated abietane-type compounds like abietanes and fichtelite/norabietanes are detected at trace level.

These abietane-type compounds are the major diterpenoids of *Araucaria*. They are mostly derived from dehydroabietic acid that is observed in the polar fraction of pyrolysates and more generally from abietanoic acids in the fresh plants. Regarding the phenolic abietanes including sugiol, hinokiol and ferruginol (Otto and Wilde, 2001; Otto and Simoneit, 2001), which are known as abietane-type compounds precursors for Araucariaceae as well, show a low relative abundance in the fresh plants and are mostly degraded during pyrolysis.

A peak having a similar spectrum to those of methylretenes is observed in the aromatic fractions of all *Araucaria* species (Fig. 8c). Compared to Alexander et al. (1995), the spectra of these compounds have the same molecular ion and mass fragments, but are different by the fragment intensities.

They may rather be consistent with a pentamethyl phenanthrene.

Tetracyclic diterpenoids

Tetracyclic diterpenoids, mainly *ent*-beyerane, 16 α (H)- and 16 β (H)-phyllocladanes and *ent*-16 α (H)- and *ent*-16 β (H)-kauranes, show relatively high abundance in each representative. They are identified according to the spectra published by Noble et al. (1985). Their spectra are all characterized by a molecular ion at m/z 274 and a base peak at m/z 123 (C₂₀H₃₄). Distribution and abundance of these compounds for each representative are given in Fig. 6 and Table 2. They are probably derived mainly from beyerene, *ent*-kaurane, isokaurane and phylloclade-16-ene, as well as kauran-16-ol, phyllocladanol and kaur-16-en-19-ol, detected in the fresh plants. Furthermore, beyerane-type compounds are detected in *A. araucana*, *A. bidwillii* and *A. cunninghamii* in both their fresh plant (beyerene) and the pyrolysates (*ent*-beyerane). Co-occurrence of phyllocladane-type and kaurane-type compounds is observed in most of *Araucaria* species, except of *A. angustifolia* and *A. nemorosa*. Only phyllocladane-type or kaurane-type compounds are observed in *A. angustifolia* and in *A. nemorosa* respectively.

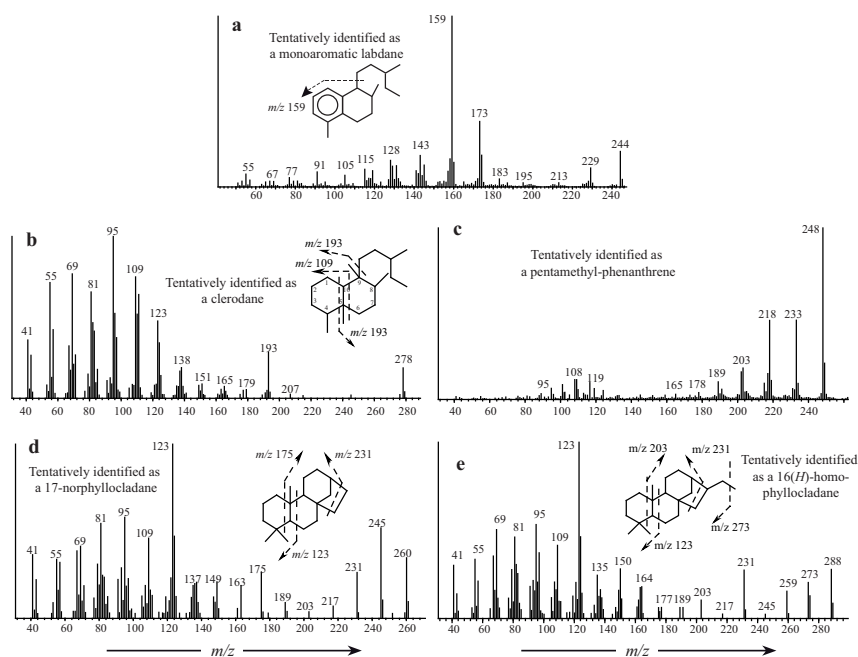


Fig. 8. Mass spectra of some tentatively identified Araucariaceae diterpenoids and suggested mass spectral cleavage patterns for (a), (b), (d) and (e). (a): monoaromatic labdane; (b): clerodane; (c): pentamethyl-phenanthrene; (d): 17-norphyllocladane (identified according to Noble et al., 1986); (e): 16(H)-homo-phylllocladane.

A peak with a spectrum characterized by a molecular ion at m/z 260 ($C_{19}H_{32}$) with a base peak at m/z 123 is detected in *A. angustifolia*. This spectrum matches very well to that of 17-nortetracyclic diterpane described by Noble et al. (1986) (Fig. 8d). Formation of this C-19 diterpane is likely due to the demethylation of a C-20 tetracyclic diterpane, while its precise molecular structure remains unclear. Furthermore, in the case of *A. angustifolia*, as only phyllocladanes are observed, the C-19 tetracyclic diterpane could rather be a 17-norphyllocladane.

Another peak, characterized by a molecular ion at m/z 288 ($C_{21}H_{32}$) and a base peak at m/z 123 is detected in *A. angustifolia*, *A. bernieri* and *A. laubenfelsii* (Fig. 8e). It is likely a methylated tetracyclic diterpane because the positive difference of molecular weight of 14 Da to the well-known tetracyclic diterpenoids corresponds to an additional CH_2 group. This configuration is in correspondence to a C-21 tetracyclic diterpane. Moreover, (1) according to the spectrum, the ion at m/z 231 is relatively more abundant than the ions at m/z 259; (2) *A. angustifolia*, *A. bernieri* and *A. laubenfelsii* all show the presence of phyllocladanes. This C-21 tetracyclic diterpane is probably a 16(H)-homo-phylllocladane.

It is also interesting to point out that, according to Otto and Wilde (2001), tetracyclic diterpenoids like trachylobane-type and atiserane-type compounds are those exclusive to the *Araucaria* genus among all conifers. Unfortunately, the diagenetic products of these two compounds are, to our

knowledge, still unknown. In our study, trachylobane and atiserane/isoatiserane are identified in the fresh *A. araucana* and *A. nemorosa*, yet no possible corresponding pyrolysates could be identified.

Unidentified compounds

Numerous compounds remain unidentified in the extract of *Araucaria* pyrolysates and some of them, their mass spectra are given in the Figs. 5d, 5e and 9a–h. Tentative identification as proposed in Fig. 9a suggests saturated tricyclic diterpenoid. They have, to our knowledge, never been reported in previous studies on vascular plant biomarkers. Nevertheless, many of them are quite abundant in several species. For instance, it was observed that two peaks having spectra with molecular ions at m/z 238 ($C_{18}H_{22}$; Fig. 5d) and 254 ($C_{19}H_{26}$; Fig. 5e), base peaks at m/z 168 and 184, respectively, co-appear with 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene. These two unidentified peaks show also respectively similar abundance to 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene. The relationship of the compounds is not clear; while their co-occurrence and similar fragmentation tend each couple to a similar structure. However, these unidentified compounds may have some relevant

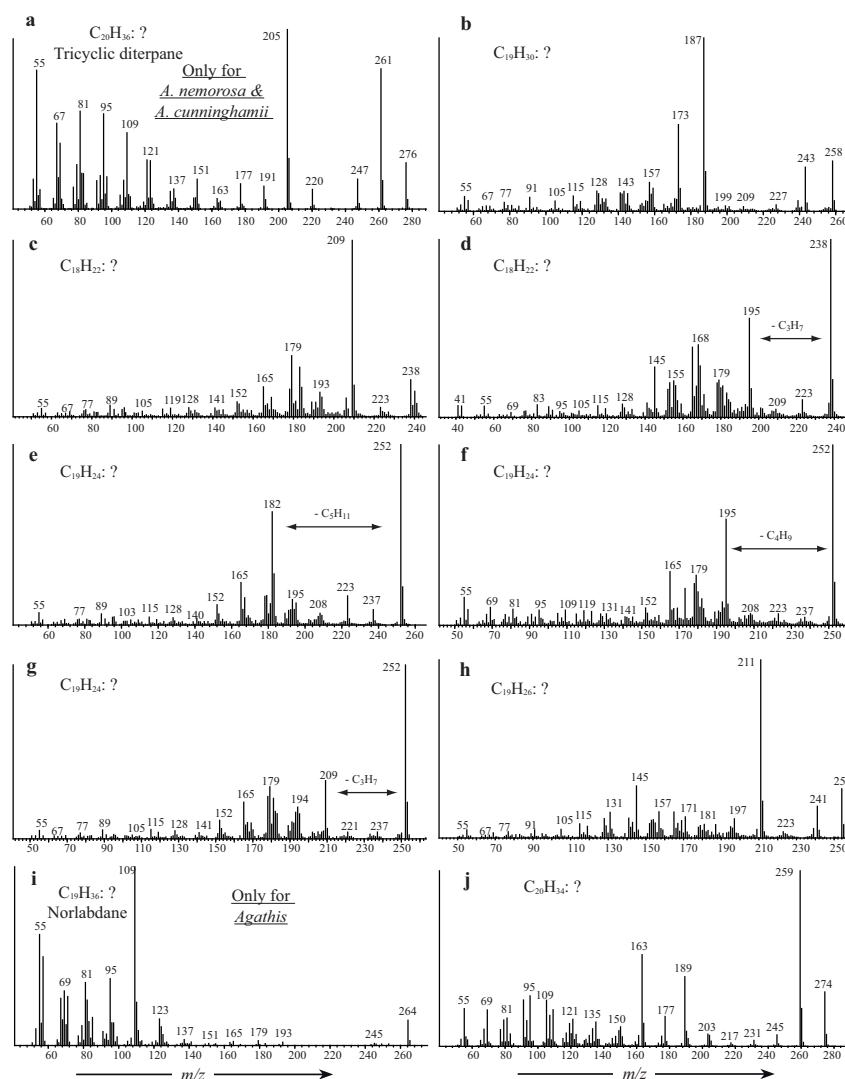


Fig. 9. Mass spectra of some unidentified, but recurrent Araucariaceae diterpenoids. (a) (only for *A. nemorosa* and *A. cunninghamii* in Fig. 6), (i–j) (only for *Agathis*, in Fig. 11): in the aliphatic fraction; (b–g) in the aromatic fraction (Figs. 6 and 11).

palaeochemotaxonomic values, and special attention should be paid to these biomarkers in future studies.

Relative abundance of major class of *Araucaria* diterpenoids (including saturated and aromatic compounds) in each representative is summarized in Table 4.

4.2 Molecular characteristics of artificially diagenetic *Agathis* genus

4.2.1 Sesquiterpenoids

The composition of sesquiterpenoids in *Agathis* (*Ag.*) species is shown in Figs. 10 (saturated) and 11 (aromatic). The proportion of each sesquiterpenoid is given in Table 2 (saturated) and Table 3 (aromatic). Some similari-

ties to the molecular composition of *Araucaria* species are observed. Farnesane, cadalane-type compounds (saturated cadalanes, calamene, calamenene, cadalene and norcadalene), pentamethyl-dihydroindenes and chamazulene show some high relative abundances in each *Agathis* representative. 1,3,4-trimethyl-2-(4-methylpentyl)benzene is detected as well, but at trace level.

Furthermore, bisabolane-type compounds (bisabolanes and dihydro-*ar*-curcumene), which are widespread in *Araucaria* genus, are observed only in *Ag. australis* and show a low abundance in the other *Agathis* species. Concerning the eudesmanes, they are detected only in *Ag. australis*.

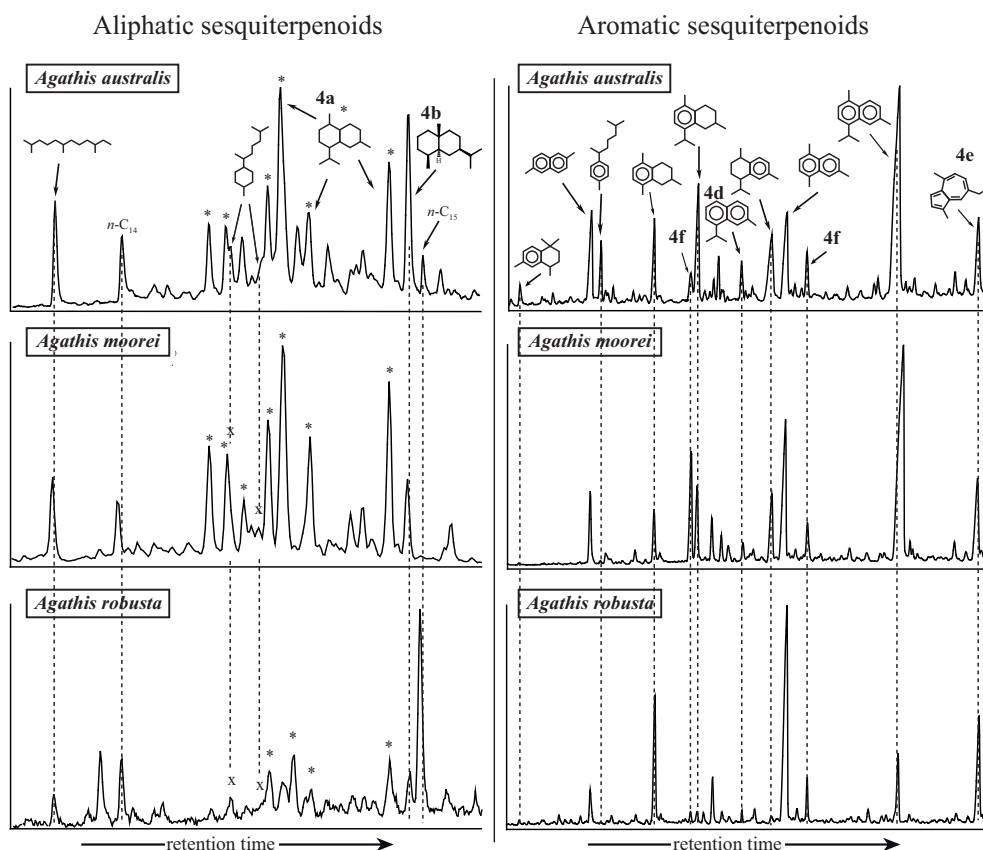


Fig. 10. Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time windows) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of pyrolysates of *Agathis* species. The mass spectra of 4a, 4b, 4c, 4d, 4e and 4f are given in Fig. 4. x: absence of compound ; *: cadalane-type compounds.

4.2.2 Diterpenoids

As sesquiterpenoids, compositions of diterpenoids of *Agathis* species (Fig. 11) show also several similarities to those of *Araucaria*. Distribution and abundance of major diterpenoids of the *Agathis* genus are given in Tables 2 and 3.

Bicyclic diterpenoids are characterized by the presence of labdanes in the aliphatic fraction and monoaromatic labdane in the aromatic fraction, which essentially originate from agathic acids (Thomas, 1969). The tricyclic diterpenoids like isopimarane is observed in *Ag. australis* and *Ag. robusta*. Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons (2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene) show high relative abundance in most *Agathis* species and are found as traces for *Ag. robusta* (Fig. 5b and c). Abietane-type compounds show a high abundance in all species. Aromatic abietanes, like retene, dehydroabietane, 18- and 19-norabietane-8,11,13-trienes, tetrahydroretene, 2- and 9-methylretenes, are much more abundant in *Ag. moorei* and *Ag. robusta* than in *Ag. australis*. Methylretenes and norabietane-8,11,13-trienes are detected only at trace level in *Ag. australis*. Saturated abietanes are gener-

ally in trace in *Ag. australis* and *Ag. moorei*, but in higher abundance in *Ag. robusta*. As for *Araucaria*, the detected abietane-type compounds are in majority derived from dehydroabietic acid (detected in the pyrolysates) as well as from other abietanoic acid precursors and (ceto)phenolic abietanes (detected in the fresh plants). Only dehydroabietic acid is observed in the pyrolysates. Tetracyclic diterpenoids, *ent*-beyerane is identified only in *Ag. australis*; 16α (H)-phyllocladane, *ent*- 16α (H)- and *ent*- 16β (H)- kauranes, are detected in high abundance except for *Ag. robusta*. Despite the presence and the absence, these tetracyclic compounds represent the major components within the *Agathis* species. The unidentified compounds, like those of Fig. 8a to 8e, are also detected with significant abundances in *Agathis* species.

Furthermore, some peaks show relatively high abundance and their spectra are respectively characterized by molecular ions at m/z 264 and 274. A base peaks at m/z 109 and 259 are observed in the aliphatic fraction of *Ag. australis* and *Ag. moorei*. Their chemical formulas are, respectively, $C_{20}H_{24}$ and $C_{20}H_{34}$, and their spectra are given in Fig. 9i and 9j. Since these spectra are neither referenced in the literature nor in our spectral database, their molecular structures

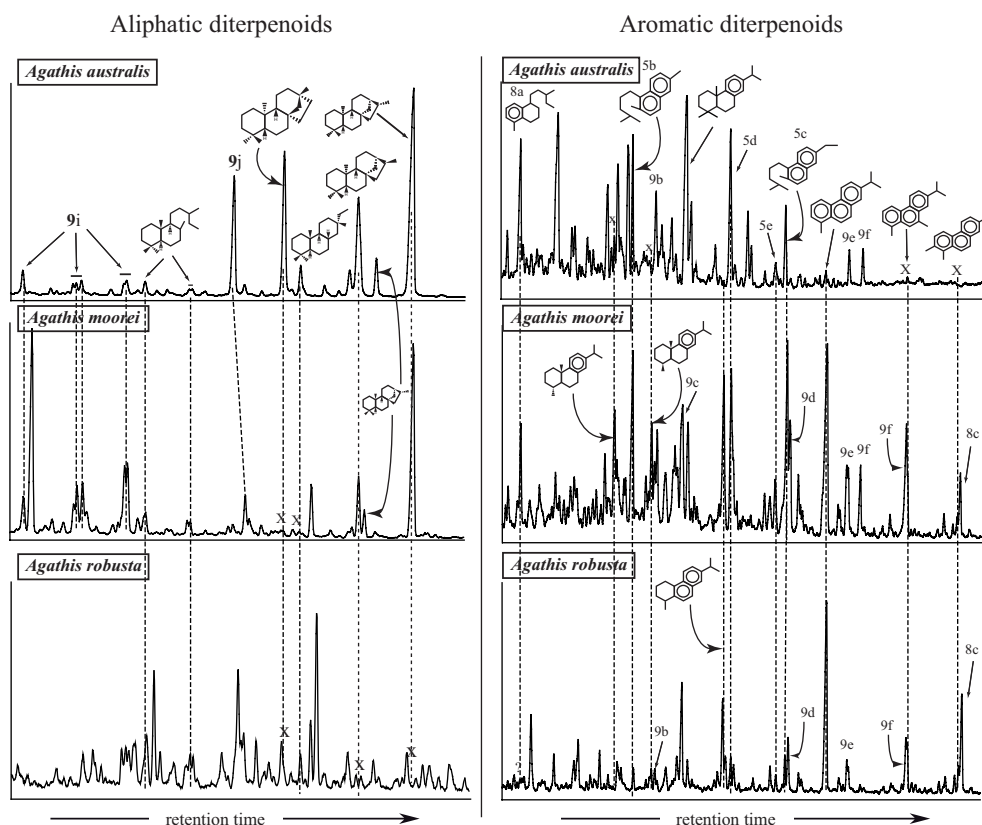


Fig. 11. Partial chromatograms (diterpenoids retention time windows) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of pyrolysates of *Agathis* species. The mass spectra of 5b to 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8a and 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b to 9j are given in Fig. 9. x: absence of compound.

are not yet clear. However their frequent, significant and also unique presence (Fig. 9i) and predominance (Fig. 9j) in *Agathis* species could be interesting for future biomarker research.

In addition, the relative abundance of major class of sesquiterpenoids and diterpenoids in each *Agathis* representative is summarized in Table 4.

4.3 Molecular characteristics of artificially diagenetic of *Wollemia nobilis*

W. nobilis shows several similarities to other Araucariaceae genera (Figs. 2 and 3, Figs. 6 and 7, as well as Figs. 10 and 11). Relative proportions of sesquiterpenoids and diterpenoids of this monotypic genus are given in Tables 2 and 3.

For the sesquiterpenoids, *W. nobilis* is characterized by the presence of eudesmane-type [4α (H)- and 4β (H)- eudesmanes], bisabolane-type (bisabolane, *ar*-curcumene and dihydro-*ar*-curcumene), cadalane-type (saturated cadalanes, norcadalene, calamene, calamenene and cadalene) compounds. Pentamethyl-dihydroindene in *W. nobilis* is not as abundant as those observed in *Araucaria* and *Agathis* species

among the sesquiterpenoids. Chamazulene, which presents a relatively high abundance in both *Araucaria* and *Agathis*, is here absent.

Furthermore, *W. nobilis* shows a wide diversity of diterpenoids. On one hand, as the other Araucariaceae species, it is characterized by the presence of labdane-type compounds (like labdanes), isohexyl alkylaromatic hydrocarbons (like 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene), abietane-type compounds (like retene, dehydroabietane, 18- and 19- norabieta-8,11,13-trienes, tetrahydroretene, 2- and 9- methylretenes as well as dehydroabietic acid), and tetracyclic diterpenoids (like *ent*-beyerane, *ent*- 16α (H)- and *ent*- 16β (H)- kauranes). Phyllocladane-type compounds, being largely widespread in most of Araucariaceae species, are neither detected in fresh nor in pyrolysates of *W. nobilis*. Moreover, due to the high abundance of tetracyclic diterpenoids, the saturated abietanes are present at trace level in the aliphatic fraction. The unidentified compounds like those cited in Sect. 4.1.2. (Fig. 9) show significant abundances. The diversity of diterpenoids of *W. nobilis* is, on the other hand, demonstrated by a great variety of other

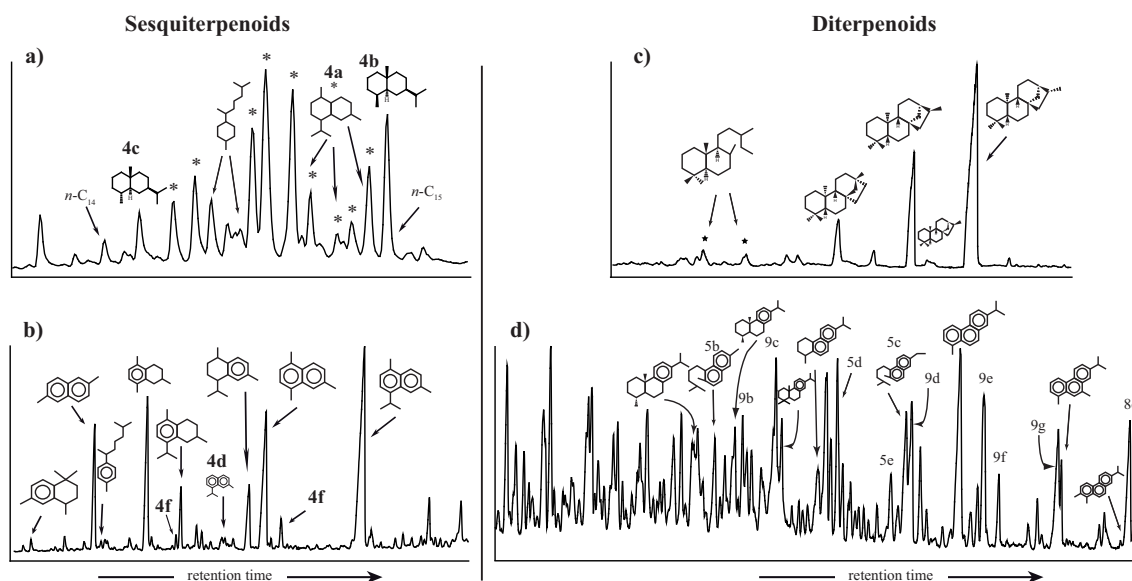


Fig. 12. Partial chromatograms (sesquiterpenoids (a, b) and diterpenoids (c, d) retention time windows) of aliphatic (a, c) and aromatic (b, d) fractions of pyrolysates of *Wollemia nobilis*. The mass spectra of 4a, 4b, 4c, 4d and 4f are given in Fig. 4. The mass spectra of 5b to 5e are given in Fig. 5. The mass spectra of 8c are given in Fig. 8. The mass spectra of 9b to 9f are given in Fig. 9. *: cadalane-type compounds.

unknown aromatic diterpenoids. The particularities of these compounds are that they are of similar abundance with no predominance of any specific compounds (Fig. 12).

Relative abundances of major classes of sesquiterpenoids and diterpenoids in *Wollemia nobilis* are summarized in Table 4.

5 Conclusion

Palaeochemotaxonomy of the Araucariaceae family is evaluated using artificial maturation by confined pyrolysis of extant species. The Araucariaceae family is characterized by the remarkable predominance of saturated tetracyclic diterpenoids, including beyerane, phyllocladanes as well as kauranes. This family is also characterized by a relatively high abundance of sesquiterpenoids (like cadalanes, bisabolane, eudesmane as well as chamazulene) and diterpenoids (like abietanes). The palaeochemotaxonomy of the Araucariaceae could be summarized as follows:

- the *Araucaria* genus is mainly characterized by the high abundance of sesquiterpenoids, like eudesmanes, bisabolanes, chamazulene, pentamethyl-dihydroindenes and more particularly by cadalane-type compounds. For the diterpenoids, saturated tetracyclic compounds are largely predominant. Compared to the tetracyclic diterpenoids, other diterpenoids, like labdane, isopimarane, abietanes as well as isohexyl alkylaromatic hydrocarbons, show a relatively lower abundance. Moreover,

isopimarane is only detected in the *Eutecta* section species.

- the *Agathis* genus is characterized by the high abundance of sesquiterpenoids, like cadalane-type compounds, chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes. Compared to the *Araucaria* genus, bisabolanes and eudesmanes are occasionally present in only some species. Concerning the diterpenoids, most species are highly similar to those of *Araucaria* species, which are characterized by a high abundance of tetracyclic diterpanes and isohexyl alkylaromatic hydrocarbons, but a low abundance of saturated abietanes. This is the case for *Ag. australis* and *Ag. moorei*, but not for *Ag. robusta*. The latter is characterized by the absence of tetracyclic diterpane and a relatively lower abundance of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons. The saturated abietanes represent thus a significant fraction of the aliphatics. Moreover, the aromatic abietanes show constantly a high relative abundance in all *Agathis* representatives.
- *Wollemia nobilis* presents high similarities to *Araucaria* genus. Presence of cadalane-types, bisabolanes, eudesmanes, pentamethyl-dihydroindenes and also the absence of chamazulene characterize the sesquiterpenoids signature of *Wollemia nobilis*. Tetracyclic compounds, like *ent*-beyerane and *ent*-kauranes, are predominant among the diterpenoids. Other recurrent diterpenoids in *Araucaria* and *Agathis* genera, like labdanes and isopimarane, are at trace amount or absent. The recurrent abietane-type compounds are identified. The aromatic

abietanes do not seem as abundant as those observed in the two other genera. In addition, *Wollemia nobilis* shows a great variety of unidentified aromatic diterpenoids and they are of the similar relative abundance as much of the other well-known biomarkers like the aromatic abietane-type compounds and the isohexyl alkylaromatic hydrocarbons.

Acknowledgements. We thank Alain Rouiller, Frédéric Lannuzel, Bastien Farre for technical assistance. We thank Frédéric Thévenard (UMR 5276 LGLTPE, University Claude Bernard, Lyon I), Anne Allaria (Botanical Garden of the Villa Thuret, INRA, Antibes), Denis Larpin (Museum Nationale d'Histoire Naturelle, Paris), Romaric Pierrel and Marc Rémy (Botanical Garden of Montet, Vandoeuvre-lès-Nancy) for their help for providing samples. We also thank the Wollemi Pine France (<http://france.wollemipine.com>) and the Kientzler society for providing branches of the Wollemi Pine in 2006 during the propagation programme of this species in several botanical gardens around the world. We also wish to thank the handling editor of Biogeoscience (X. Wang), Dr. Sawada and a second anonymous reviewer for their appreciation, as well as for their numerous helpful suggestions, which improved the quality of our manuscript. This research benefited from the support of the Ministry of Higher Education and Research of France (MESR) through a PhD grant to Yueming Lu.

Edited by: X. Wang



The publication of this article is financed by CNRS-INSU.

References

- Achari, R. G., Shaw, G., and Holleyhead, R.: Identification of ionene and other carotenoid degradation products from the pyrolysis of sporopollenins derived from some pollen exines, a spore coal and the Green River shale, *Chem. Geol.*, 12, 229–234, 1973.
- Alexander, R., Kagi, R., and Noble, R.: Identification of the bicyclic sesquiterpenes drimane and eudesmane in petroleum, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 5, 226–228, 1983.
- Alexander, R., Bastow, T. P., Fisher, S. J., and Kagi, R. I.: Geosynthesis of organic compounds: II. Methylation of phenanthrene and alkylphenanthrenes, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 59, 4259–4266, 1995.
- Aplin, T. T., Cambie, R. C., and Rutledge, P. S.: The taxonomic distribution of some diterpene hydrocarbons, *Phytochemistry* 2, 205–214, 1963.
- Axsmith, B. J., Krings, M., and Waselkov, K.: Conifer pollen cones from the Cretaceous of Arkansas: implications for diversity and reproduction in the Cheirolepidiaceae, *J. Paleontol.*, 78, 402–409, 2004.
- Brophy, J. J., Goldsack, R. J., Wu, M. Z., Fookes, C. J. R., and Forster, P. I.: The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*), *Biochem. Syst. Ecol.*, 28, 563–578, 2000.
- Caputo, R. and Mangoni, L.: Diterpenes from *Araucaria bidwilli*, *Phytochemistry*, 13, 467–470, 1974.
- Caputo, R., Dovinola, V., and Mangoni, L.: New diterpenes from *Araucaria cunninghami*, *Phytochemistry*, 13, 475–478, 1974a.
- Caputo, R., Dovinola, V., and Mangoni, L.: New labdane diterpenes from *Araucaria cooki*, *Phytochemistry* 13, 471–474, 1974b.
- Caputo, R., Mangoni, L., Monaco, P., Pelosi, L., and Previtiera, L.: Neutral diterpenes from *Araucaria bidwilli*, *Phytochemistry*, 15, 1401–1402, 1976.
- Castro, M. A., Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J. M., and Feliciano, A. S.: The distribution of lignanoids in the order coniferae, *Phytochemistry*, 41, 995–1011, 1996.
- Colombini, M. P., Giachi, G., Modugno, F., and Ribechini, E.: Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt), *Microchem. J.*, 79, 83–90, 2005.
- Cox, R. E., Yamamoto, S., Otto, A., and Simoneit, B. R. T.: Oxygenated di- and tricyclic diterpenoids of southern hemisphere conifers, *Biochem. Syst. Ecol.*, 35, 342–362, 2007.
- de Paiva Campello, J. and Fonseca, S. F.: Diterpenes from *Araucaria angustifolia*, *Phytochemistry*, 14, 2299–2300, 1975.
- Dettmann, M. E. and Clifford, H. T.: Biogeography of Araucariaceae, Australia and New Zealand Forest Histories: No. 2, in: *Araucarian Forests*, edited by: Dargavel, J., 2, 2005.
- Dutta, S., Mallick, M., Kumar, K., Mann, U., and Greenwood, P. F.: Terpenoid composition and botanical affinity of Cretaceous resins from India and Myanmar, *Int. J. Coal Geol.*, 85, 49–55, 2011.
- Ellis, L., Singh, R. K., Alexander, R., and Kagi, R. I.: Formation of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons from aromatization-rearrangement of terpenoids in the sedimentary environment: A new class of biomarker, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 60, 4747–4763, 1996.
- Enright, N. and Hill, R.: The southern conifers: an introduction, in: *Ecology of the Southern Conifers*, edited by: Enright, N. and Hill, R., Melbourne University Press, Melbourne, 1–9, 1995.
- Farella, N., Lucotte, M., Louchouart, P., and Roulet, M.: Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajos, Brazilian Amazon, *Org. Geochem.*, 32, 1443–1458, 2001.
- Gupta, N. S., Michels, R., Briggs, D. E. G., Evershed, R. P., and Pancost, R. D.: The organic preservation of fossil arthropods: an experimental study, *P. Roy. Soc. B Biol. Sci.*, 273, 2777–2783, 2006.
- Gupta, N. S., Michels, R., Briggs, D. E. G., Collinson, M. E., Evershed, R. P., and Pancost, R. D.: Experimental evidence for the formation of geomacromolecules from plant leaf lipids, *Org. Geochem.*, 38, 28–36, 2007.
- Hautevelle, Y., Michels, R., Malartre, F., and Trouiller, A.: Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France), *Org. Geochem.*, 37, 610–625, 2006a.
- Hautevelle, Y., Michels, R., Lannuzel, F., Malartre, F., and Trouiller, A.: Confined pyrolysis of extant land plants: A contribution to palaeochemotaxonomy, *Org. Geochem.*, 37, 1546–1561, 2006b.

- Heim, A., Hofmann, A., and Schmidt, M. W. I.: Forest-derived lignin biomarkers in an Australian oxisol decrease substantially after 90 years of pasture, *Org. Geochem.*, 41, 1219–1224, 2010.
- Hill, R. S. and Bigwood, A. J.: Tertiary gymnosperms from Tasmania: Araucariaceae, *Alcheringa* 11, 325–335, 1987.
- Huang, Z. Q., Davis, M. R., Condrón, L. M., and Clinton, P. W.: Soil carbon pools, plant biomarkers and mean carbon residence time after afforestation of grassland with three tree species, *Soil Biol. Biochem.*, 43, 1341–1349, 2011.
- Jaffré, T.: Distribution and ecology of the conifers of New Caledonia, in: *Ecology of the Southern Conifers*, edited by: Enright, N. J. and Hill, R. S., Cambridge University Press, Cambridge, 171–196, 1995.
- Jones, W. G., Hill, K. D., and Allen, J. M.: *Wollemia nobilis*, a new living Australian genus and species in the Araucariaceae, *Telopea*, 6, 173–176, 1995.
- Jussieu, A. L. D.: *Genera plantarum secundum ordines naturales disposita, iuxta methodum in Horto regio Parisiensi exarata anno 1774*, L'Herissant, Paris, 1778.
- Kershaw, P. and Wagstaff, B.: The southern conifer family Araucariaceae: History, status, and value for paleoenvironmental reconstruction, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32, 397–414, 2001.
- Krassilov, V. A.: Araucariaceae as indicators of climate and paleolatitudes, *Rev. Palaeobot. Palynolo.*, 26, 113–124, 1978.
- Kunzmann, L.: Neue Untersuchungen zu *Araucaria* Jussieu aus der europäischen Kreide, *Palaeontogr. Abt. B*, 276, 97–131, 2007a.
- Kunzmann, L.: Araucariaceae (Pinopsida): Aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic, *Zool. Anz.*, 246, 257–277, 2007b.
- Lavrieux, M., Jacob, J., LeMilbeau, C., Zocattelli, R., Masuda, K., Bréheret, J.-G., and Disnar, J.-R.: Occurrence of triterpenyl acetates in soil and their potential as chemotaxonomical markers of Asteraceae, *Org. Geochem.*, 42, 1315–1323, 2011.
- Leeming, R. and Nichols, P. D.: Determination of the sources and distribution of sewage and pulp-fibre-derived pollution in the Derwent Estuary, Tasmania, using sterol biomarkers, *Mar. Freshwater Res.*, 49, 7–17, 1998.
- Mongrand, S., Badoc, A., Patouille, B., Lacomblez, C., Chavent, M., Cassagne, C., and Bessoule, J.-J.: Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition, *Phytochemistry*, 58, 101–115, 2001.
- Noble, R. A., Alexander, R., Kagi, R. I., and Knox, J.: Tetracyclic diterpenoid hydrocarbons in some Australian coals, sediments and crude oils, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 49, 2141–2147, 1985.
- Noble, R. A., Alexander, R., Kagi, R. I., and Nox, J. K.: Identification of some diterpenoid hydrocarbons in petroleum, *Org. Geochem.*, 10, 825–829, 1986.
- Olawore, N. O.: Analysis of the leaf oil of *Araucaria cunninghamii* sweet, Grown in Nigeria, *The J. Essent. Oil Res.*, 17, 459–461, 2005.
- Otto, A. and Simoneit, B. R. T.: Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 65, 3505–3527, 2001.
- Otto, A. and Wilde, V.: Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers – A review, *Bot. Rev.*, 67, 141–238, 2001.
- Otto, A., Simoneit, B. R. T., and Rember, W. C.: Conifer and angiosperm biomarkers in clay sediments and fossil plants from the Miocene Clarkia Formation, Idaho, USA, *Org. Geochem.*, 36, 907–922, 2005.
- Pietsch, M. and König, W. A.: Enantiomers of sesquiterpene and diterpene hydrocarbons in *Araucaria* species, *Phytochem. Analysis*, 11, 99–105, 2000.
- Romanus, K., Van Neer, W., Marinova, E., Verbeke, K., Luypaerts, A., Accardo, S., Hermans, I., Jacobs, P., De Vos, D., and Waelkens, M.: Brassicaceae seed oil identified as illuminant in Nilotic shells from a first millennium AD Coptic church in Bawit, Egypt, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 783–793, 2008.
- Salisbury, R. A.: XIV. The Characters of several Genera in the Natural Order of Coniferae: with Remarks on their Stigmata, and Cotyledons, *Transactions of the Linnean Society of London*, 8, 308–317, 1807.
- Setoguchi, H., Asakawa Osawa, T., Pintaud, J.-C., Jaffre, T., and Veillon, J.-M.: Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences, *Am. J. Bot.*, 85, 1507–1516, 1998.
- Simoneit, B. R. T., Grimalt, J. O., Wang, T. G., Cox, R. E., Hatcher, P. G., and Nissenbaum, A.: Cyclic terpenoids of contemporary resinous plant detritus and of fossil woods, ambers and coals, *Org. Geochem.*, 10, 877–889, 1986.
- Singh, R. K., Alexander, R., and Kagi, R. I.: Identification and occurrence of norcadalenes and related compounds in crude oils and sediments, *Org. Geochem.*, 21, 249–256, 1994.
- Smith, P.: *The chemotaxonomy of plants*, Arnold, London, 1976.
- Staniek, A., Muntendam, R., Woerdenbag, H. J., and Kayser, O.: Essential oil constituents derived from different organs of a relictual conifer *Wollemia nobilis*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 38, 131–135, 2010.
- Stankiewicz, B. A., Briggs, D. E. G., Michels, R., Collinson, M. E., Flannery, M. B., and Evershed, R. P.: Alternative origin of aliphatic polymer in kerogen, *Geology*, 28, 559–562, doi:10.1130/0091-7613(2000)28<559:aoopi>2.0.co;2, 2000.
- Stockey, R. A.: The Araucariaceae: An evolutionary perspective, *Rev. Palaeobot. Palynolo.*, 37, 133–154, 1982.
- Stockey, R.: Mesozoic Araucariaceae: Morphology and systematic relationships, *J. Plant Res.*, 107, 493–502, doi:10.1007/bf02344070, 1994.
- Thomas, B. R.: Kauri resins-modern and fossil. In: Eglinton, G., Murphy, M.T.J. (Eds.), *Org. Geochem. – Methods and Results*, Springer, Berlin, 599–618, 1969.
- van Aarssen, B. G. K., Alexander, R., and Kagi, R. I.: Higher plant biomarkers reflect palaeovegetation changes during Jurassic times, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 64, 1417–1424, 2000.
- Vliex, M., Hagemann, H. W., and Püttmann, W.: Aromatized arborane/fernane hydrocarbons as molecular indicators of floral changes in Upper Carboniferous/Lower Permian strata of the Saar-Nahe Basin, southwestern Germany, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 58, 4689–4702, 1994.
- Wang, L., Lee, F. S. C., Wang, X. R., Yin, Y. F., and Li, J. R.: Chemical characteristics and source implications of petroleum hydrocarbon contaminants in the sediments near major drainage outfalls along the coastal of Laizhou Bay, Bohai Sea, China, *Environ. Monit. Assess.*, 125, 229–237, doi:10.1007/s10661-006-9514-0, 2007.

Chapitre V

**DETERMINATION DE LA SIGNATURE
MOLECULAIRE DES CONIFERES FOSSILES
PAR LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE
EXPERIMENTALE – PARTIE 2 : PINACEAE**

Chapitre V. : Determination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paleochimiotaxonomie expérimentale – partie 2 : Pinaceae

1. SOME GENERALITIES ABOUT THE PINACEAE FAMILY

The Pinaceae are resinous evergreen and deciduous needle-leave trees and shrubs. This family appeared during the Late Triassic and represents the second largest family of conifers after Cupressaceae in present days (Delevoryas and Hope, 1973). Presently, with 220-250 extant species, their habitat covers large geographical and ecological ranges in the Northern Hemisphere. Pinaceae are present from subarctic to tropical regions and show a maximum diversity in the mountainous and subalpine forests of North America, Europe and Southeast Asia. The extant Pinaceae species constitute a monophyletic family which is sister to the other conifer families according to rRNA gene sequences (Fig. V.1; Stefanoviac et al., 1998).

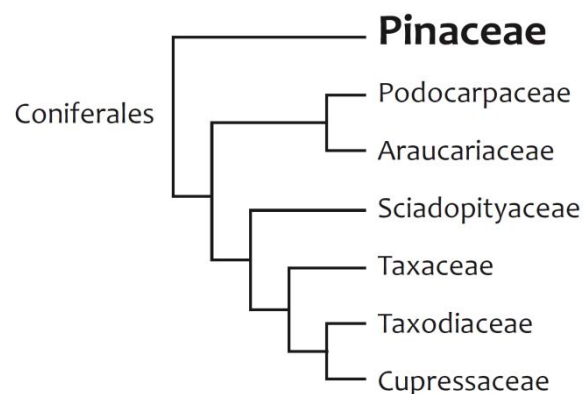


Fig. V.1: Phylogenetic relationship of Pinaceae with other extant conifer families based on 28S rRNA gene sequences (Stefanoviac et al., 1998).

1.1. Taxonomy, geographical distribution and living environment

The Pinaceae family is subdivided into 3 subfamilies comprising 11 genera based on the morphology of cones, seeds and leaves (Frankis, 1989; Farjon, 1990; Fig. V.2). The **Pinoideae** subfamily is represented by *Pinus* (or pines; about 115 species). The **Laricoideae** subfamily is represented by three genera: *Cedrus* (or cedars; 4 species), *Larix* (or larches, about 14 species) and *Pseudolarix* (1 species). The **Abietoideae** regroups the seven other genera: *Abies* (or firs; about 50 species), *Cathaya* (1 species), *Keteleeria* (3 species), *Nothotsuga* (1 species), *Picea* (or spruces, about 35 species), *Pseudotsuga* (or douglas-firs, 5 species) and *Tsuga* (or hemlocks; 9 species). However, phylogenetic relationship between the extant Pinaceae species are still in discussion (Saxton, 1913; Miller Jr, 1976a; Farjon, 1990; LePage, 2003c). The phylogenetic relationships established from genetic after Wang et al. (2000) are given in the Fig. V.2.

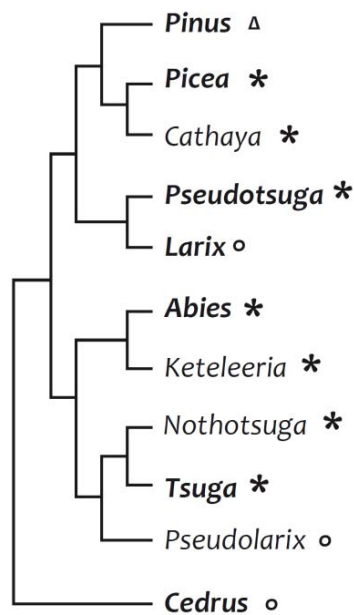


Fig. V.2: Phylogenetic relationships of extant Pinaceae genera according to Wang et al.(2000). Δ : Pinoideae; ○: Laricoideae; *: Abietoideae.

Pinus is the largest genus of the Pinaceae family with more than 120 well-defined species and is subdivided into 3 subgenera (*Pinus*, *Strobus*, *Ducampopinus*). These species are widely distributed from boreal to dry tropical regions in the Northern Hemisphere. *Picea* genus (spruces) is composed of about 35 evergreen species. Originating from North America,

they are abundantly found in the subtropical high altitude, temperate and boreal regions (Ran et al., 2006). Moreover, *Picea* displays a close phylogenetic relationship to *Pinus* (Farjon, 1990; Wang et al., 2000).

Pseudotsuga (douglas-firs) contains about of 6 evergreen species. Two of them live in western North America (*Pt. menziesii* and *Pt. macrocarpa*), one in Mexico (*Pt. lindleyana*), one in Japan (*Pt. japonica*) and the others in Asia.

Larix (larches) genus contains about 10-14 species. They are deciduous trees and are native to the cool-temperate regions in the Northern Hemisphere. They are present in the northern boreal forests in Russia and Canada as well as in moderate to high altitudes in northeastern USA, European Alps, Mongolia, northeastern China, northern Korea and central Japan.

Abies (fir) contains about 48-55 well-defined evergreen species. They could be morphologically distinguished from the other Pinaceae genera by their needle-like leaves. Most species are widely distributed in mountainous areas in the subtropical and temperate regions in the Northern Hemisphere (north America, central America, Europe, northern Africa, southern China; Xiang et al., 2006).

Cedrus (cedar) is a monophyletic genus. It is made up of 5 evergreen species in the world. They are native to the mountainous areas in the western Himalaya (at 1500-3200 m) and Southwestern Mediterranean regions (at 1000-2200 m; Ferguson, 1967).

Tsuga (hemlock) is represented by about 9 evergreen and endemic species. 4 live in North America and 5 in Eastern Asia. They are all native to relatively moist regions like oceanic and subcontinental areas and are cold-resistant (Sakai and Larcher, 1987; Farjon, 1990).

Keteleeria is a genus composed of 3 species. They are generally restricted to China, Taiwan, Laos and Vietnam (Ying et al., 1993). Other genera like ***Cathaya***, ***Nothotsuga*** and ***Pseudolarix*** are monotypic (respectively *Cathaya argyrophylla*, *Nothotsuga longibracteata*, *Pseudolarix amabilis*) and endemic to southern China (Ying et al., 1993).

1.2. Evolution of Pinaceae through geological times

The oldest Pinaceae fossil species was found in deposits dated from the Late Triassic and located in North Carolina (Delevoryas and Hope, 1973). Due to major gaps in the fossil records (pollen and macrofossil), the evolution of this family during the Late Jurassic and the Early Cretaceous is still unknown (Miller Jr, 1976a, 1977, 1988, 1999; Rothwell et al., 2012).

The earliest well-defined fossils of the *Pseudolarix*, *Pinus*, *Abies*, *Keteleeria* and probably *Cedrus* were successively identified in the sedimentary rocks of the Late Jurassic and the Early Cretaceous (e.g. Alvin, 1960; Ferguson, 1967; Miller Jr, 1977, 1988, 1999; LePage & Basinger, 1995; Keller & Hendrix, 1997; Blokhina et al., 2006; Fig. V.3). Due to the presence of "Spitsbergen Corridor" land bridge that connected North America and Asia, Pinaceae colonized these two continents during this period (e.g. Miller Jr, 1976b, 1977; LePage and Basinger, 1995; LePage, 2003a; Eckert and Hall, 2006; Fig. V.4), except *Cedrus* of which the occurrence was limited to Europe. The oldest *Cathaya* pollen were found in sedimentary rocks dated from Aptian in northwestern Canada (Brideaux and McIntyre, 1975). Their palaeogeographical distribution extended from middle to high latitudes in both North America and eastern Asia during Cretaceous (Liu and Basinger, 2000).

During the Late Mesozoic to the Early Cenozoic, palaeoflora exchanges intensified between Asia, North America and Europe across three land bridges (LePage, 2003a; Fig. V.4). *Cathaya* species finally reached Europe during the Paleocene. *Larix* and *Picea* appeared and extended towards high altitude and latitude regions in Northern Hemisphere (Schorn, 1994; LePage, 2001; Klymiuk and Stockey, 2012). These two genera as well as *Pseudolarix*, which are known as cool-resistant, were absent in polar region in Europe until Middle Cenozoic. *Pseudotsuga* appeared in North America during the Miocene between two Cenozoic cooling events (Eocene/Oligocene and Plio-Pleistocene; Hermann, 1985; Zachos et al., 2001; Falcon-Lang et al., 2004). *Tsuga* species appeared during this period in relatively lower latitudes of South Eurasia, where the climatic conditions matched better to their moisture requirement (LePage, 2003c; Fig. V.3). After the major global climatic cooling at the Eocene-Oligocene boundary, *Tsuga* began to adapt to cooler and drier climate and became more prevalent in

the mountainous regions in the Northern Hemisphere (LePage, 2003c). The palaeogeographic distribution of *Abies* extended towards the high altitudes in the Northern Hemisphere during middle of the Cretaceous and then towards the southern regions during Eocene/Oligocene cooling event (Xiang et al., 2006). *Keteleeria* species continued to be widely distributed in East Asia and North America during the middle of the Cenozoic across the Beringian land-bridge (Wang et al., 2006; Fig. V.4).

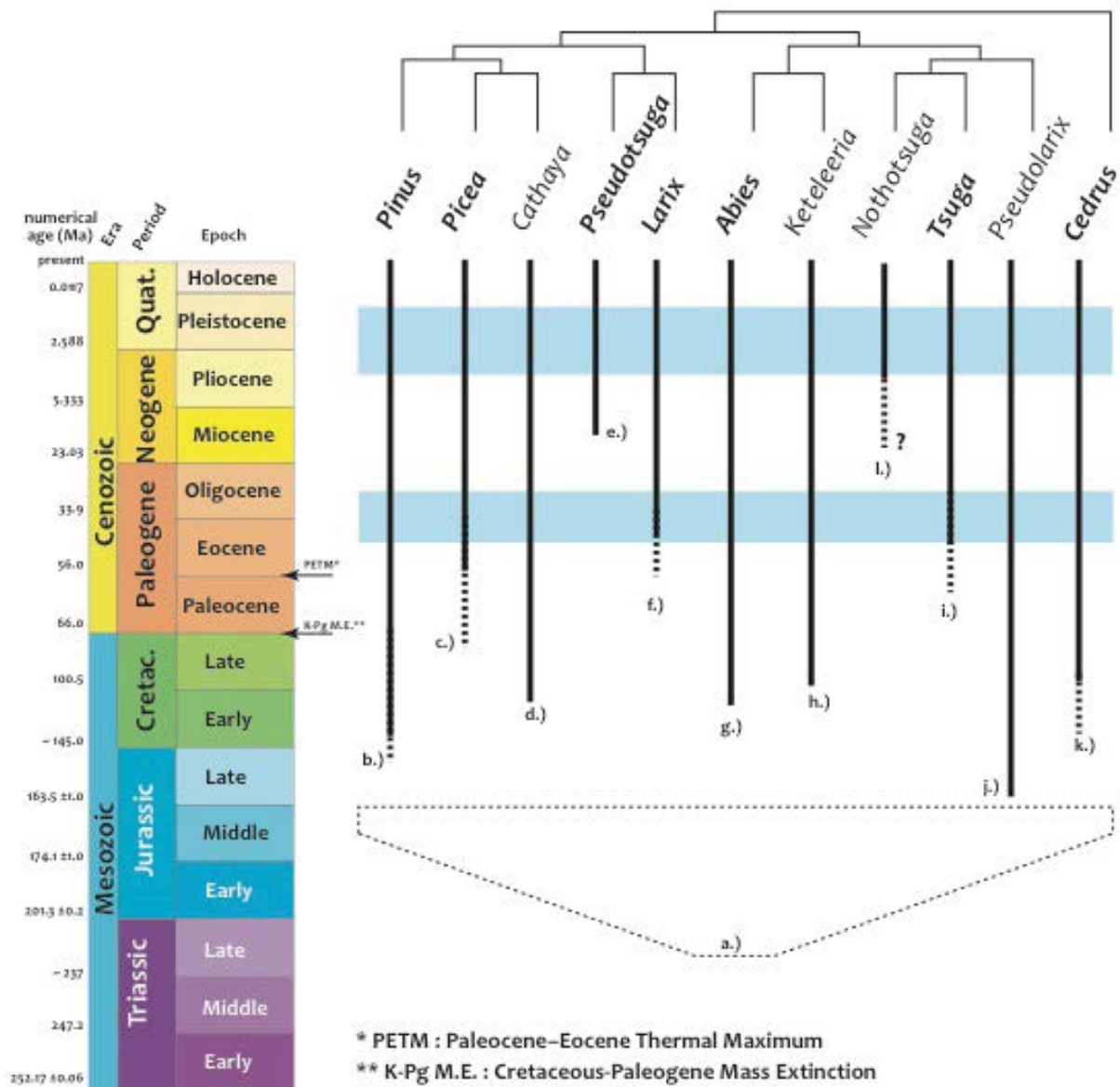


Fig. V.3: Emergence of extant Pinaceae genera. Compilation of data based on a.) : Delevoryas and Hope (1973); b.): Alvin (1960); c.): Klymiuk and Stockey (2012); d.): Liu and Basinger (2000); e.): Hermann (1985); f.): Schorn (1994); g.): Xiang et al. (2006); h.): Blokhina et al. (2006); i.): LePage (2003c); j.): LePage and Basinger (1995); k.): Miller Jr, (1977; 1988); l.): Wang et al., (2000); *.): Zachos et al. (2001).

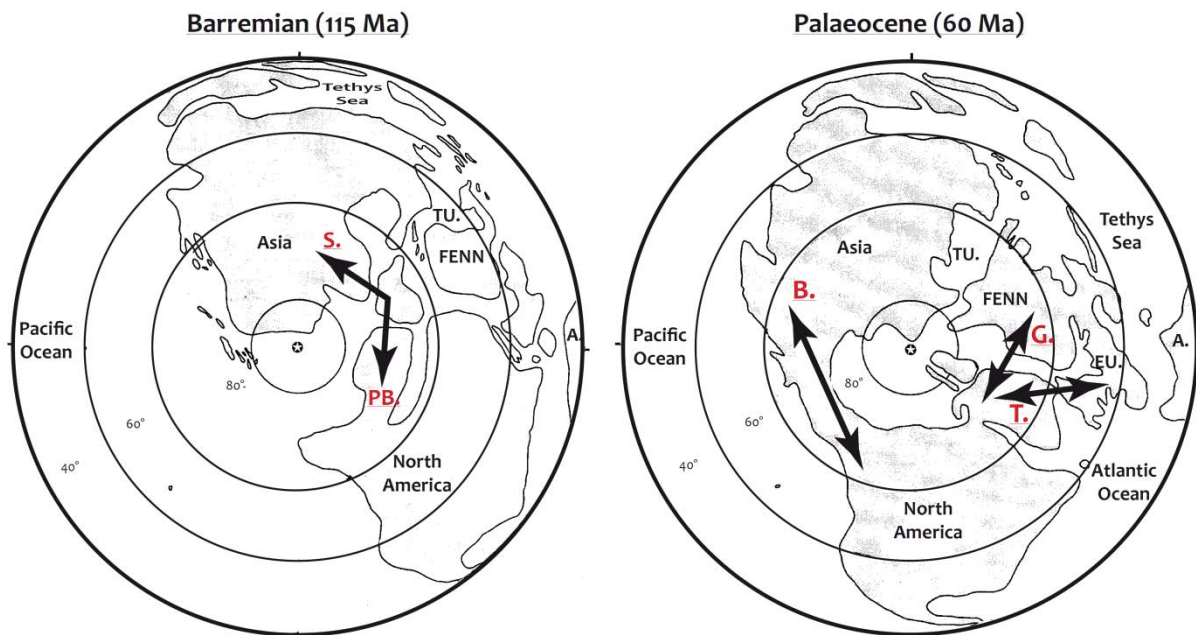


Fig. V.4: Palaeogeographic reconstruction with the major land bridges of the Northern Hemisphere in polar projection during the Early Cretaceous (left) and the Palaeocene (right) modified according to LePage (2003a). The major land bridges: S.: Spitsbergen Corridor; PB.: Protoberingia; B.: Beringian Corridor; G.: DeGeer Route; T.: Thulian Route. TU.: Turgai Strait; A.: Africa; FENN.: Fennoscandia; EU.: Europe.

As a result of another cooling from the Pliocene to Pleistocene, *Pinus* species migrated towards lower latitudes where the temperature was higher (Ferguson, 1967). *Cathaya* genus, which was widely distributed in Asia, Europe and North America during the Palaeogene, retreated to North America (Late Miocene) and to Europe (Pleistocene; Liu and Basinger, 2000) and was finally confined in mountainous region of south-western China with only one remaining species.

After the Pleistocene, populations of Pinaceae were largely reduced. However, *Pseudotsuga* and *Abies*, which displayed little role in the Cenozoic palaeoflora composition, became more prevalent during the Quaternary (Hermann, 1985; Farjon, 1990).

1.3. Chemotaxonomy

Available data on terpenoid composition of extant Pinaceae representatives is summarized here. These data mainly focus on the composition of monoterpenoids (C₁₀), sesquiterpenoids (C₁₅) and diterpenoids (C₂₀).

The Pinaceae species synthesize high proportions of monoterpenoids that constitute the major components of resin and leaf oils (Yatagai and Sato, 1986). Chemicals like α - and β -pinene, limonene, bornyl acetate, carene, camphene, camphor, myrcene are the major compounds commonly produced by all species (Norin, 1972; Wagner et al., 1989; Petrakis et al., 2001; Kurose et al., 2007; Judzentiene and Kupcinskiene, 2008).

Sesquiterpenoids are mainly characterized by the presence of longicyclanes and sativanes compounds. It seems that these compounds are only synthesized by Pinaceae species (Otto and Wilde, 2001). Other sesquiterpenoids like humulanes, germacrane, terpinanes, cadinanes, caryophyllanes, ylanganes, guaianes, longifolanes, copaanes and bourbonenes are also produced by extant Pinaceae species. All these terpenoids occurred as unsaturated hydrocarbons, alcohols and/or acids (Norin, 1972; Agarwal and Rastogi, 1984; Yatagai and Sato, 1986; Otto and Wilde, 2001). Furthermore, except for longicyclanes and sativanes, the other mentioned sesquiterpenoids are rather common in other conifers, like Araucariaceae, Cupressaceae, Podocarpaceae (Otto and Wilde, 2001).

Diterpenoids are mainly characterized by the abundance of **abietanes**. These tricyclic diterpenoids are mainly represented by abietanoic acids. More than 60 acids, like abietic acid, dehydroabietic acid, palustric acid, neoabietic acid, hydroxydehydroabietic acids and hydroxyabietic acid are reported in extant Pinaceae species (e.g. Agarwal and Rastogi, 1984; Ohtsu et al., 2000, 2001; Otto and Wilde, 2001; Barreto et al., 2005; Otto et al., 2007; Wu et al., 2010). Abietanes are also found as alcohols, like dehydroabietol and abietinol, as well as hydrocarbons like dehydroabietane, abietadienes and norabietadienes. Diterpenoids are also characterized by the presence of labdanes. Concerning the biological labdanes, lambertianic

acid, abienol and 13-epimanol are mainly synthesized by *Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* and *Pinus* (Norin, 1972; Barrero et al., 2005), whereas pinifolic, dehydropinifolic, communic and imbricatolonic acids are more specific to *Pinus* (Norin, 1972; Zinkel and Clarke, 1985; Zinkel et al., 1985; Song et al., 1995).

Macrocyclic diterpenoids like **cembranes** are also known as specific biomolecules for Pinaceae. Cembranes were mainly reported in species of *Picea*, *Pinus*, *Larix* and *Pseudotsuga* (Otto and Wilde, 2001), but are also found in one Cupressaceae species (Adams, 1991). **Pimaranes** and **isopimaranes** are also reported in extant Pinaceae species. However, distribution of pimaranes seems to be limited to *Larix*, *Picea*, *Pinus* and *Cedrus* species. They are mainly detected as pimaric acids and isopimaric acids, and related hydrocarbons like pimaradienes and isopimaradienes (Agarwal and Rastogi, 1981; Zinkel et al., 1985; Otto and Wilde, 2001; Otto et al., 2007).

2. SAMPLES

22 Pinaceae species were used for this study and are represented by 4 *Abies*, 3 *Cedrus*, 4 *Larix*, 5 *Picea*, 4 *Pinus*, 1 *Pseudotsuga* and 1 *Tsuga* (Tab. V.1).

Genre	Section	Species	Geographical range	Samples provenance
<i>Pinus</i> Linnaeus, 1753	<i>Pinus</i>	<i>sylvestris</i> Linnaeus, 1753 Com.: Scots pine	Europe, Asia	Botanical Garden of Montet, France
		<i>nigra</i> J.F. Arnold 1785 Com.: European black pine, Austrian pine, Crimean pine	SE, C & E Europe, North America	
	<i>Quinque- foliae</i>	<i>koraiensis</i> Siebold et Zuccarini 1842 Syn.: <i>Pinus strobus</i> Com.: Korean cedar, Korean Pine	Northern China, North Korea, South Korea, the Far East of Russian, central Japan	
		<i>wallichiana</i> A.B. Jackson 1938 Com.: Bhutan Pine; Himalayan white pine	Afghanistan, Pakistan, Nepal, India, SW China	
<i>Pseudo- tsuga</i> Carrière, 1867		<i>menziesii</i> (Mirbel) Franco 1950 Syn.: <i>Abies menziesii</i> Com.: Douglas Fir, Oregon Pine	Canada, Mexico, United States	Botanical Garden of Montet, France
<i>Tsuga</i> (Endlicher) Carrière, 1855		<i>canadensis</i> (Linnaeus) Carrière 1855 Syn.: <i>Pinus canadensis</i> Com.: Canada hemlock, hemlock spruce.	Canada, Georgia, United States	Botanical Garden of Montet, France

Genre	Section	Species	Geographical range	Samples provenance
Abies (Plin. ex Tourn.) Miller, 1754	Momi	firma Siebold et Zuccarini, 1842 Syn.: <i>Pinus firma</i> Com.: Momi fir	Japan	
	Piceaster	pinsapo Boissier, 1838 Com.: Spanish silver spruce, Spanish fir	Spain	Botanical Garden of Montet, France
	Pindrau	spectabilis (D. Don) Spach, 1841 Syn.: <i>Pinus spectabilis</i> , <i>Pinus webbiana</i> Com.: East Himalayan fir	East Nepal, central and western Himalaya, eastern Afghanistan	
	Elate	veitchii Lindley, 1861 Syn.: <i>Picea veitchii</i> or <i>Pinus veitchii</i> Com.: Veitch's silver fir	Japan	Botanical Garden of Lyon, France
Cedrus Trew, 1755		atlantica (Endlicher) Manetti Syn.: <i>C. africana</i> Com.: Atlas cedar	Morocco, Algeria	Botanical Garden of Montet, France
		decussata (D. Don.) G. Don. Syn.: <i>C. indica</i> Com.: Deodar, Himalaya cedar	India, China, Nepal, Pakistan	
		libani A. Rich Syn.: <i>C. libanotica</i> Com.: Lebanese cedar, cedar of Lebanon	Lebanon, Syrian Arab Republic, Turkey	Botanical Garden of Lyon, France
Larix Miller, 1754		gmelinii (Ruprecht) Kuzeneva 1920 Com.: Dahurian larch	Northern China, North Korea, Mongolia, Russia	Botanical Garden of Lyon, France
		kaempferi (Lambert) Carrière 1856 Com.: Japanese larch	Japan	Botanical Garden of Montet, France
		laricina (DuRoi) K. Koch 1873 Com.: American larch, eastern larch, black larch, red larch	North America	Botanical Garden of Lyon, France
		sibirica Ledebour 1833 Syn.: <i>L. russica</i> Com.: Siberian larch, Russian larch	Western Russia, western China, Mongolia	
Picea A. Dietrich 1824		abies (Linnaeus) Karsten 1881 Syn.: <i>Pinus abies</i> Com.: Norway spruce, European spruce	N, C & E Europe	Botanical Garden of Montet, France
		abies nidiformis (subsp. <i>abies</i>) Com.: Epicea nain		
	Picea	mariana (Miller) Britton Sterns, et Poggenburg 1888 Syn.: <i>Abies mariana</i> Com.: Black spruce, bog spruce, swamp spruce	Canada, USA	Botanical Garden of Lyon, France
		orientalis (Linnaeus) Link Syn.: <i>Pinus orientalis</i> Com.: Oriental spruce, Caucasian spruce	Armenia, Azerbaijan, Georgia, Turkey	Botanical Garden of Montet, France
	Pungentes	pungens Engelmann 1879 Com.: Blue spruce, Colorado blue spruce, white spruce, etc.	USA	

Tab. V.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of selected Pinaceae species.

3. RESULTS

As this study mainly focused on the palaeochemotaxonomy of Pinaceae, the molecular signature of artificially matured plants was more particularly examined. This signature was assessed with the examination of the aliphatic fractions obtained using LiAlH₄ during the maturation together with the aromatic and polar fractions obtained without LiAlH₄. Aliphatic, aromatic and polar fractions of the extracts from the fresh plant samples have also been studied.

3.1. Sesquiterpenoid composition of artificially matured Pinaceae

Farnesane is identified in the aliphatic fractions of plant pyrolysates. It is an acyclic sesquiterpenoid and is derived from *trans*- and *cis*- farnesols and torreyol that are widely distributed in fresh Pinaceae representatives. Within the different matured Pinaceae species, farnesane shows significant abundance in the representatives of *Abies*, *Tsuga*, *Cedrus* and *Larix* (Fig. V.5). In the case of *Pinus*, *Picea* and *Pseudotsuga*, farnesane generally show trace amount, except for *Pinus sylvestris* and *Pinus wallichiana*. Furthermore, due to its low molecular weight (212 Da), the variability of the relative proportion of farnesane between the different matured Pinaceae representatives could be related to its partial volatilization during experimental procedures rather than to the intrinsic variability within each representative.

Bisabolanes are detected as saturated bisabolanes in the aliphatic fraction and as dihydro-*ar*-curcumene in the aromatic fraction (Fig. V.5 and Fig. V.6). *Ar*-curcumene is also recovered in the aromatic fraction of *Cedrus atlantica*. The bisabolanes derive from bisabolol and/or curcumene that were respectively identified in the polar and aliphatic fractions in the extracts of fresh Pinaceae representatives. Bisabolanes represent one of the major sesquiterpenoids for most matured *Picea* and *Pinus* representatives, while they are minor compounds for *Larix*, *Pseudotsuga* and *Tsuga* species (Tab. V.2). Concerning *Abies* and *Cedrus*, the bisabolanes show very low amount or are even absent, except for *Abies firma* and *Cedrus atlantica* in which these compounds show higher proportion (Tab. V.2).

Cadalanes represent the main sesquiterpenoids and display diversified forms in maturated Pinaceae representatives (**Tab. V.2**). Saturated cadalanes like muurolanes, cadinanes and amorphanes as well as aromatic cadalanes like calamene, calamenene and cadalene are respectively detected in the aliphatic and aromatic fractions (**Fig. V.5** and **Fig. V.6**). These compounds derived from biological precursors like amorphenes, cadinenes, muurolenes, calacorene and cadinols that are commonly found in the fresh Pinaceae representatives. Two norcadalenes, 1-isopropyl-4-methylnaphthalene and 1-isopropyl-7-methylnaphthalene, are also detected in all maturated Pinaceae representatives (**Fig. V.6**; **Fig. V.7 a** and **b**). These norcadalenes are probably formed by the demethylation of biological cadalanes during the maturation. Furthermore, these two norcadalenes display different distribution in maturated Pinaceae species. It is worth to note that 1-isopropyl-7-methylnaphthalene is only recovered in maturated *Abies firma* in low amount (**Fig. V.6**).

Eudesmanes are detected in the aliphatic fractions of most maturated Pinaceae representatives. They are identified as 4 α (H)-eudesmane and/or 4 β (H)-eudesmane according to the mass spectra published by [Alexander et al. \(1983\)](#). These compounds derive from biological precursors like β -eudesmol and/or selinenes that are widespread in fresh Pinaceae representatives. Relative proportions of eudesmanes show some high variability in maturated *Pinus* and *Picea* representatives. They represent the major sesquiterpenoids in maturated *Pinus sylvestris*, *Pinus wallichiana* and *Picea mariana*, whereas they show only trace amount in the other representatives of *Pinus* and *Picea*. Regarding the other genera, the eudesmanes show higher amount in maturated *Abies* and *Tsuga* species and are only at trace level or even absent in the case of *Cedrus* and *Pesudotsuga* (**Fig. V.5**; **Tab. V.2**).

A compound, showing a mass spectrum characterized by a molecular ion as its base peak at m/z 184 and a characteristic ion at m/z 169, is detected in each maturated Pinaceae representative (**Fig. V.7 c**). According to the Wiley275 database, this mass spectrum corresponds to **chamazulene**. It is generally detected in small amount in most plant pyrolyzates. In the case of *Picea karainesis* and *Picea wallichiana*, the chamazulene was found with higher amount (**Fig. V.6**; **Tab. V.2**).

Other bicyclic compounds like di- and trimethyl-naphthalenes are also identified in most matured Pinaceae representatives. They show high amount in *Pinus* and *Picea* species and low amount for the other matured Pinaceae species. Pentamethyl-dihydroindenes are generally found as minor compounds in most matured Pinaceae, especially in *Cedrus* where they are detected only in trace level (**Fig. V.6; Tab. V.2**).

In addition, another compound showing a molecular ion at m/z 184 and a base peak at m/z 169 is also detected in the aromatic fraction of *Abies firma* (**Fig. V.6, Fig. V.7 d**). This compound is found with low amount and is not recovered in other matured Pinaceae species except for *Abies firma* (**Fig. V.6**).

The investigated Pinaceae species show generally similar sesquiterpenoid distribution. Slight intrageneric variability related to the relative abundance of several compounds could be pointed out. Occurrence and relative proportion of the identified sesquiterpenoids in each representative are given in **Tab. V.2**.

3.2. Diterpenoid composition of artificially matured Pinaceae

Three isomers of **labdanes** ($C_{20}H_{38}$) are identified with significant relative abundance in the aliphatic fractions (**Fig. V.8**). These bicyclic diterpenoids derive from manool, oxide manool, 13-epimanool, hydroxyl-epimanool, oxide manoyl as well as labdadienol, that are widely distributed in the fresh Pinaceae representatives (**Norin, 1972; Barrero et al., 2005**). Saturated labdanes represent one of the major diterpenoids in matured *Abies*, *Pinus*, *Picea* and *Tsuga* species, whereas in the case of *Larix*, *Pseudotsuga* and in particularly *Cedrus*, the labdanes are found in relatively lower amount (**Tab. V.2**).

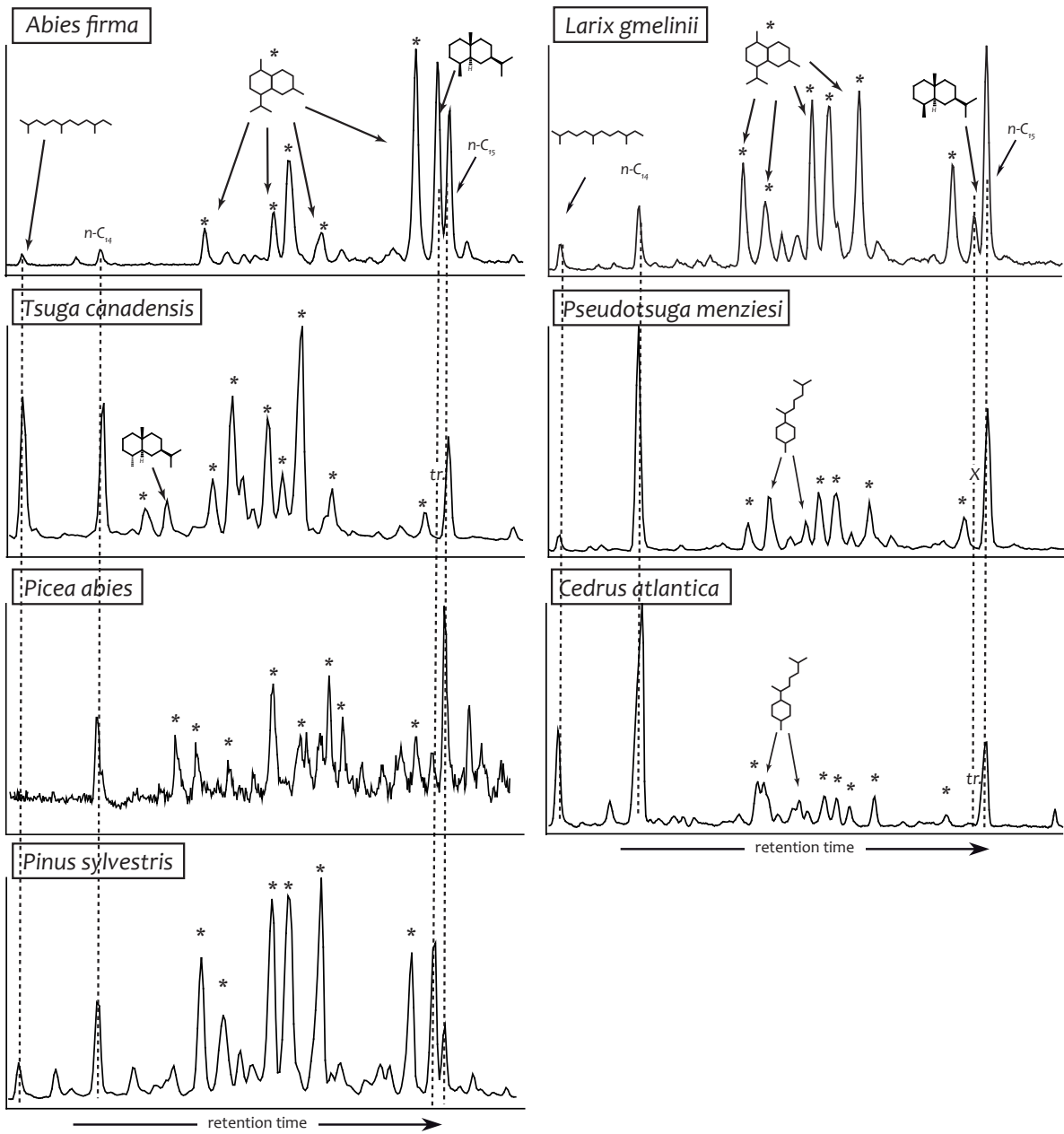


Fig. V.5: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH₄. X: absence of compound; tr.: at trace level; *: cadalane- type compounds.

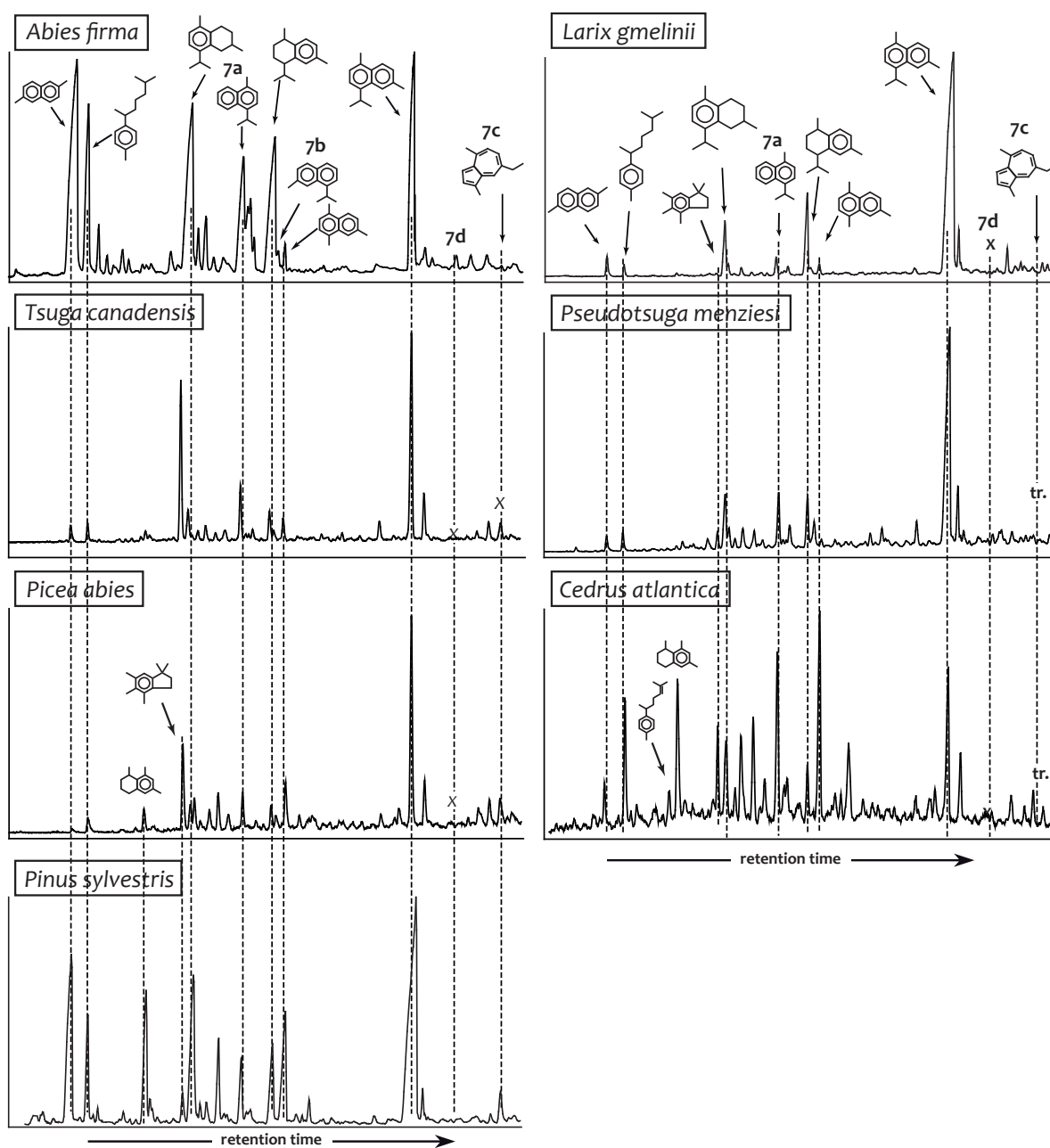


Fig. V.6: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . The mass spectra of 7a, 7b, 7c and 7d, are given in Fig. 7. X: absence of compound; tr.: at trace level.

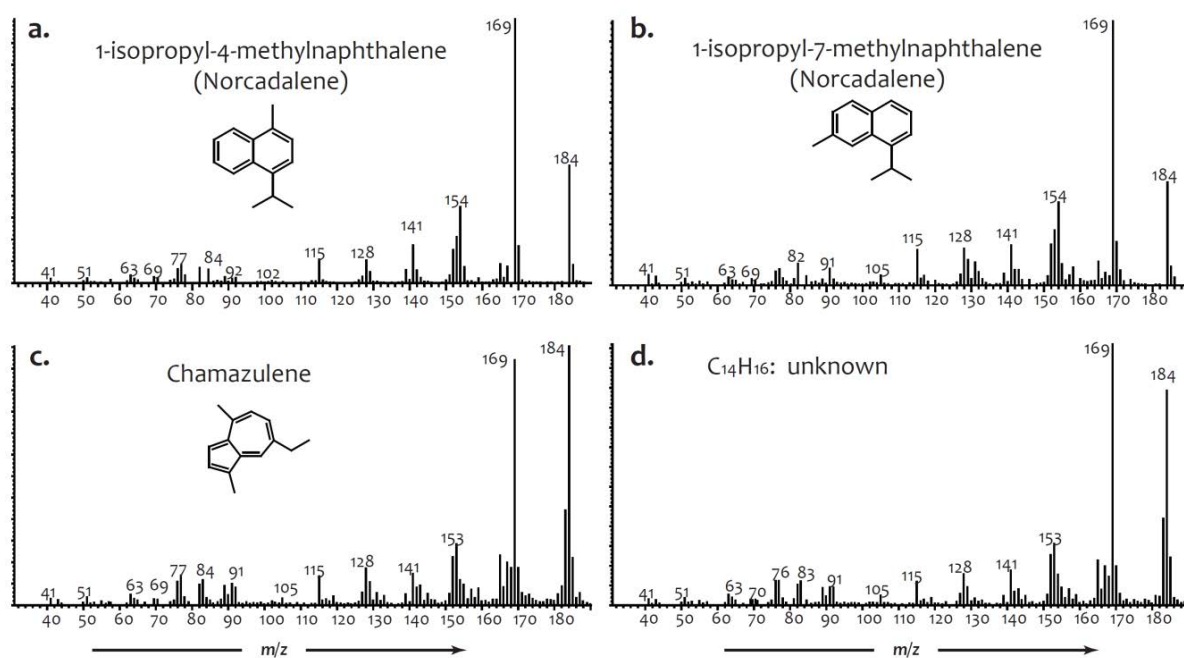


Fig. V.7: Mass spectra of some Pinaceae sesquiterpenoids. a.:1-isopropyl-4-methylnaphthalene (norcadalene) (identified from mass spectrum in Singh et al., 1994); b.: tentatively identified norcadalene (identified from mass spectrum in Singh et al., 1994); c.: chamazulene (identified according to Wiley275 database); d.: unidentified sesquiterpenoid, $C_{14}H_{16}$.

Abietanes are widespread and display diversified forms in the matured Pinaceae representatives. In the aliphatic fraction of plant pyrolysates (pyrolysis with $LiAlH_4$), a compound, which is characterized by a molecular ion at m/z 276 ($C_{20}H_{36}$) and a base peak at m/z 163, is detected (Fig. V.8). This compound is assigned to abietane according to the mass spectrum published by Philp (1985). A series of compounds, showing similar mass spectra that characterized by a molecular ion at m/z 262 ($C_{19}H_{34}$) and a base peak at m/z 109, are also detected in the aliphatic fraction of matured Pinaceae representatives. By comparison of their mass spectra with that published by Philp (1985), these compounds are identified as norabietanes. In the aromatic fractions (pyrolysis without $LiAlH_4$), related abietanes are respectively identified as 19- and 18-norabieta-8,11,13-trienes, bisnorsimonellite, dehydroabietane, 1,2,3,4-tetrahydroretene, simonellite, retene, as well as 2- and 9-methylretenes. In addition to the saturated and aromatic abietanes, several biological precursors like dehydroabietic acid, dehydroabietol and dehydroabietal are also identified and show significant amount in the polar fraction of plant pyrolysates (pyrolysis without

LiAlH₄; **Fig. V.10**). Phenolic abietanes like sugiol, ferruginol and hinokiol, that are also known as biological precursors of abietanes in conifer species, are absent in fresh or matured Pinaceae representatives. Abietanes compounds, including saturated, aromatic and polar, represent the major diterpenoids and show high amount in all matured Pinaceae species.

Pimaranes / isopimaranes are also commonly found in the Pinaceae representatives. No distinction has been made between pimaranes showing a "normal" skeleton and pimaranes showing an "iso" skeleton. All these compounds, whatever they belong to the *normal*- or the *iso*- pimaranes, are here mentioned as pimaranes. In the aliphatic fractions, pimaranes and norpimaranes, which are respectively characterized by molecular ions at *m/z* 276 and 262 and base peaks at *m/z* 109 and 163, were identified in accordance to the mass spectra published by Livsey et al. (1984), Philp (1985) and Noble et al. (1986). In the aromatic fraction, owing to the aromatization of the C-ring during maturation that leads to the loss of an ethylene unit, the pimarane and / or isopimaranes are identified as 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene and pimanthrene (Otto et al., 2002a; Tuo and Philp, 2005; **Fig. 9 A and B**). These compounds derive mainly from unsaturated pimaranes that are commonly found in fresh Pinaceae representatives. Low amount of biological pimaranes are found in fresh Pinaceae representatives and their matured derivatives (**Tab. V.2**).

Moreover, a compound characterized by a molecular ion at *m/z* 276 (C₂₀H₃₆) and a base peak at *m/z* 191 was detected in the aliphatic fraction many matured Pinaceae representatives. Its mass spectrum is highly similar to that of isocopalane published by Philp (1985; **Fig. V.11 a**). Isocopalane is a saturated tricyclic diterpenoid also called 8,9,10-trimethyl-podocarpene. It has been previously artificially synthesized from sclareol and isocopallic acids by Ungur et al. (1999, 2000). Isocopallic acids do not have a wide distribution but were reported in some Pinaceae species by Mateus (2009). It is therefore possible that isocopalane detected in our matured Pinaceae species could derive from these acids. Isocopalane shows significant relative abundance in matured *Abies* and *Tsuga* and a low abundance in matured *Picea* and *Pinus*. Isocopalane is absent in matured *Larix* and *Pseudotsuga* (**Tab. V.2**).

Moreover, four compounds showing similar mass spectra characterized by a molecular ion at m/z 280 ($C_{20}H_{40}$) and a base peak at m/z 55 were detected with high amount in the aliphatic fractions of plant pyrolysates (**Fig. V.11 b**). Their common characteristic ion at m/z 236 (M^+-44) corresponds to the loss of an isopropyl unit ($-C_3H_4$). According to Widey275 database, these four compounds could assign to cembranes. Cembranes derived from cembrene, isocembrene (thunbergene), cembrol and thunbergol that are widely distributed in the fresh *Larix*, *Pseudotsuga*, *Picea* and *Pinus* representatives (Otto and Wilde, 2001). Occurrence of cembranes is restricted to matured *Larix*, *Pseudotsuga*, *Picea* and *Pinus* species. Cembranes are the major compounds in matured *Larix* and *Pseudotsuga* and have lower abundance in *Picea* and *Pinus* representatives (**Fig. V.8, Tab. V.2**).

A compound, characterized by a molecular ion at m/z 276 ($C_{20}H_{36}$) and base peak at m/z 123, shows significant abundance in the aliphatic fraction in most matured Pinaceae representatives (**Fig. V.10 and V.11 c**). This compound is here just identified as a C_{20} -tricyclic diterpenoid since its precise structure has not been determined.

Diterpenoids distribution displayed some variability among the matured Pinaceae representatives. The occurrence and relative abundance of identified diterpenoids in each pyrolyzed Pinaceae species are given in **Tab. V.2**.

3.3. Triterpenoid composition of artificially matured Pinaceae

Triterpenoids like gammaceranes and lanostanes were also identified in some matured Pinaceae species. Compared to the sesquiterpenoids and diterpenoids that are widely distributed in matured Pinaceae species, occurrence of gammaceranes and lanostanes is highly restricted to matured *Abies firma* and they were found only in low amount in the aliphatic fraction. The triterpenoids were absent in the other pyrolyzed *Abies* representatives, in which gammaceranes, lanostanes as well as serratanes could also be found in fresh species according to published chemotaxonomic data (e.g. Hasegawa et al., 1987; Otto and Wilde, 2001; Kim et al., 2004; Le Milbeau et al., 2013).

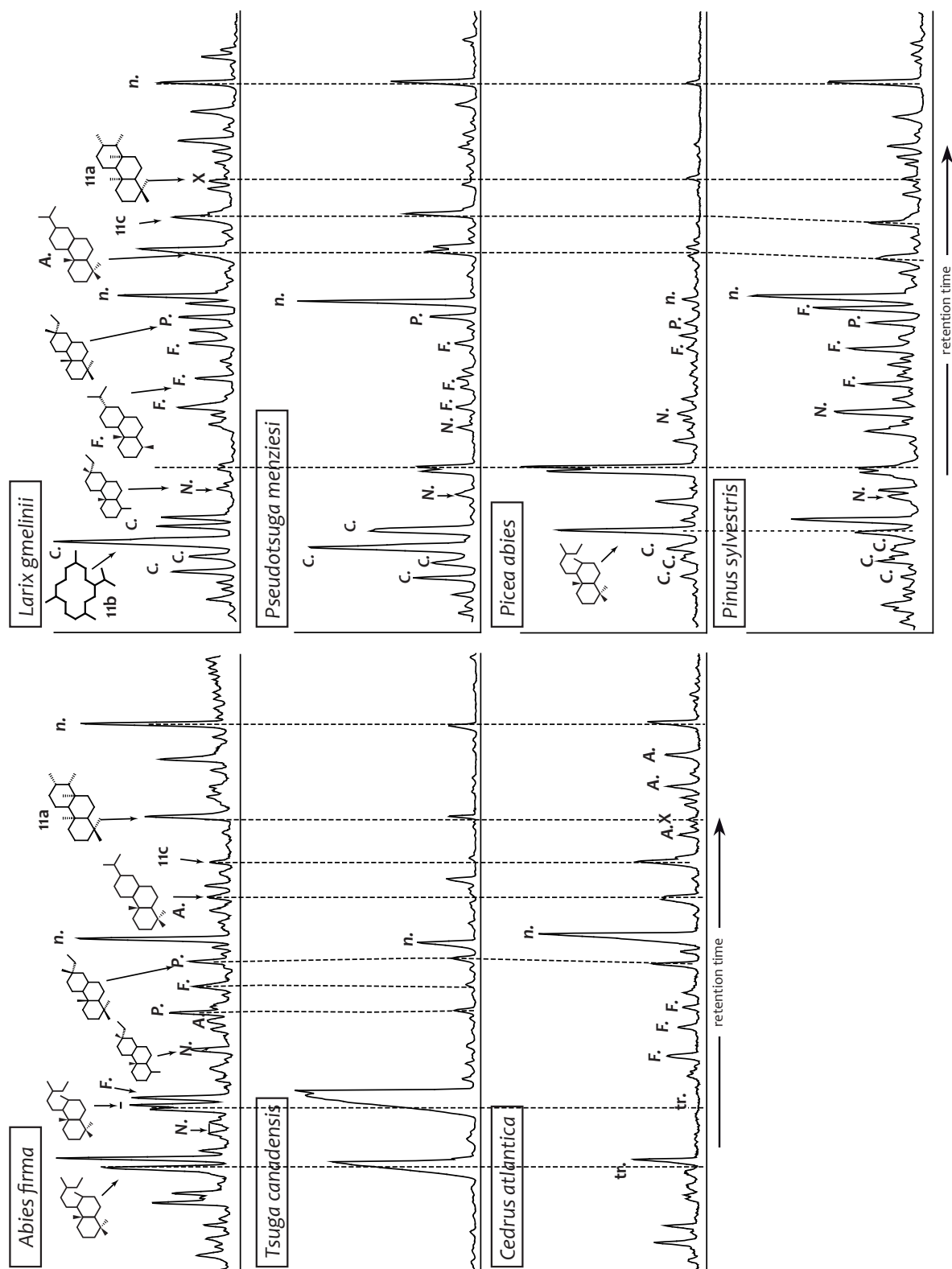


Fig. V.8: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH_4 . N.: Norpimaranes; P.: Isopimaranes; A.: Abietanes; F.: Norabietanes; n.: n-alkanes; C.: Cembranes; X: absence of compound; tr.: at trace level. The mass spectra of 11a, 11b and 11c are given in Fig. 11.

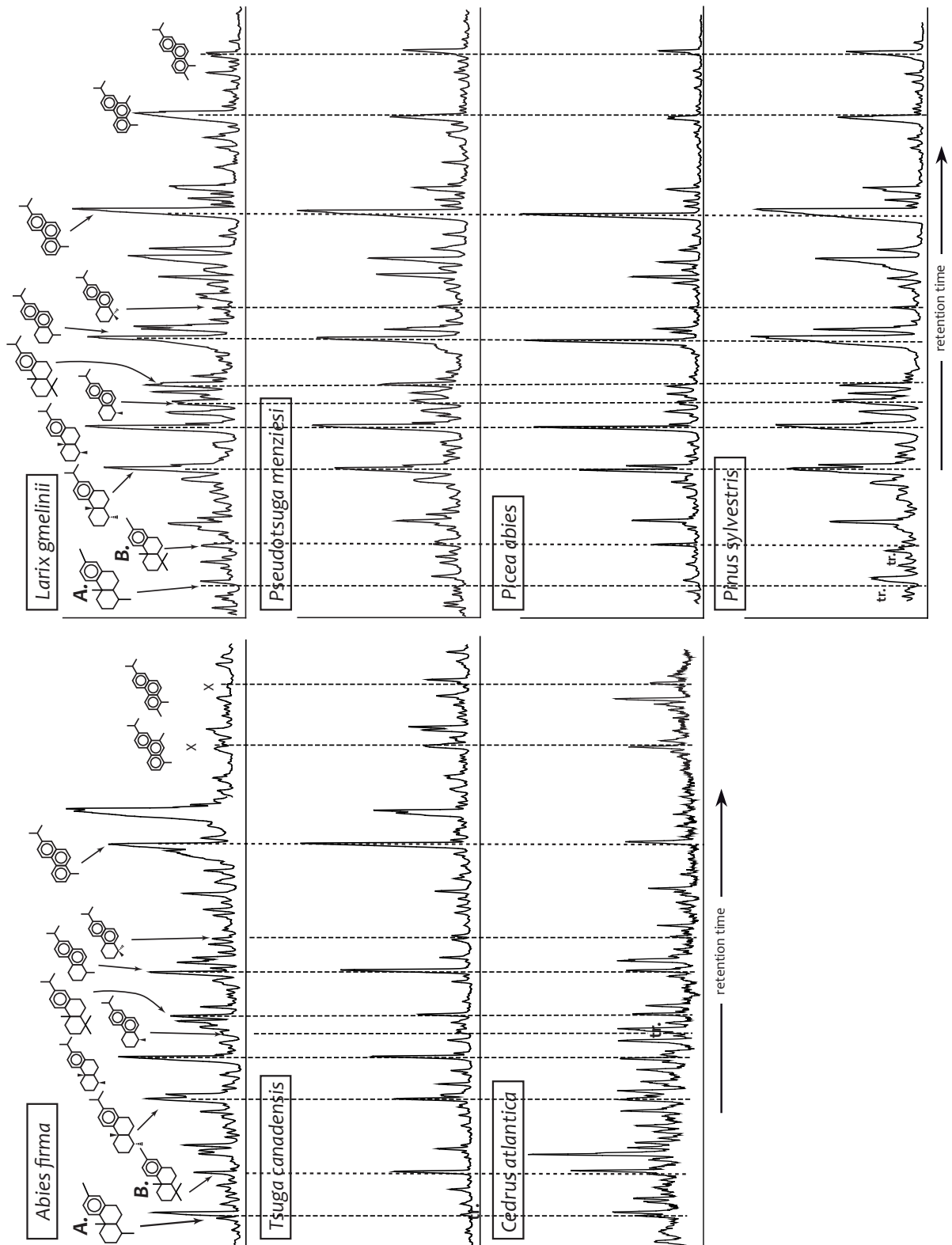


Fig. V.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Pinaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level. A.: 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene; B.: 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene.

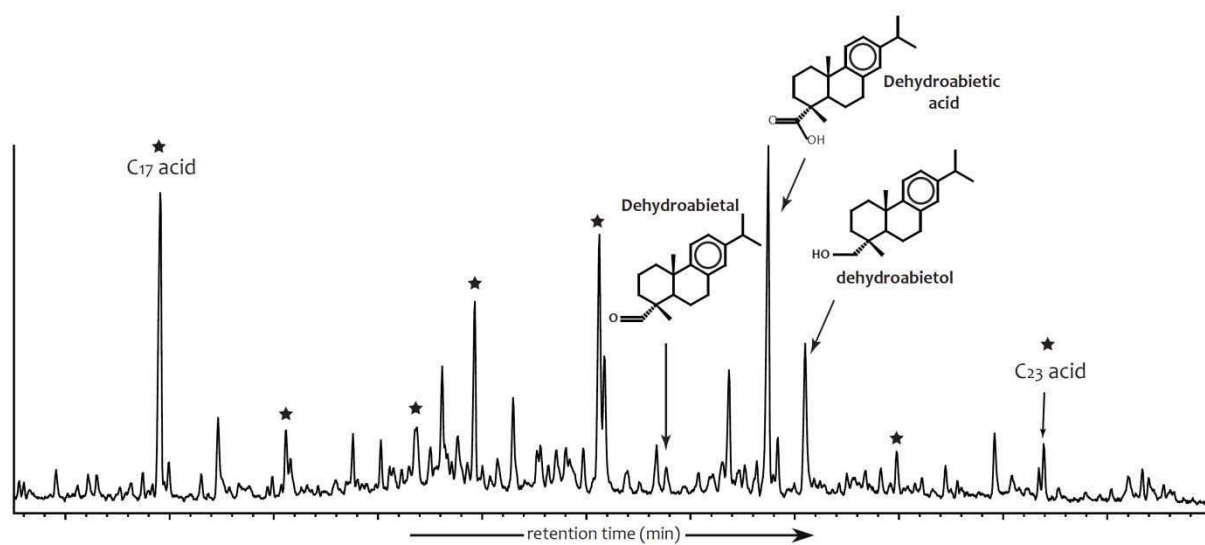


Fig. V.10: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Pinus sylvestris* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 .

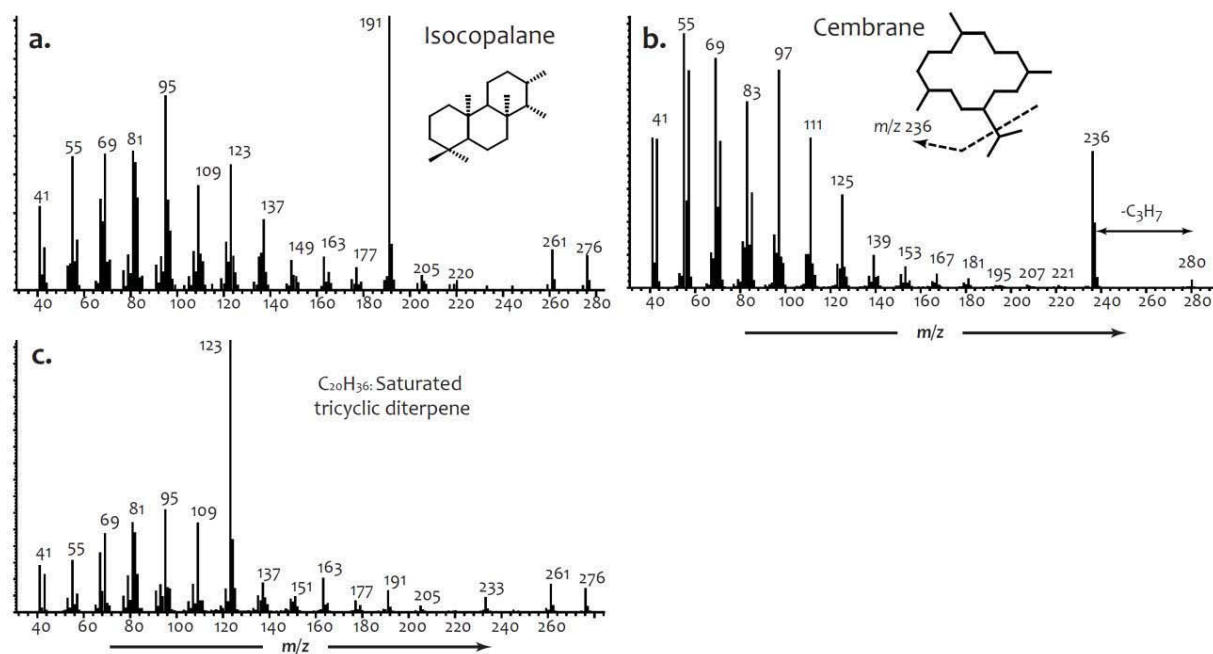


Fig. V.11: Mass spectra of some Pinaceae diterpenoids. a.: isocopalane (identified from spectrum in Philp (1985); b.: cembrane (identified using Wiley275 database); c.: unidentified saturated tricyclic diterpenoid, $\text{C}_{20}\text{H}_{36}$.

Class of structure	Sesquiterpenoids								Diterpenoids							
	Farnesane	Bisabolanes	Eudesmanes	Cadalanes	Chamazulene	Pentamethyl-dihydroindenes	Di- & Trimethylnaphthalenes	Labdanes	phenolic	acid	(iso)Pimaranes	Isoprenalene	Membranes			
Abies	<i>firma</i>	++	++	+++	+	+	++	++	/	++++	++	++	/			
	<i>pinsapo</i>	+	+	+++	+	+	tr.	+	/	++++	+	/	/			
	<i>spectabilis</i>	++	tr.	++	+++	+	tr.	++	/	++++	+	tr.	/			
	<i>veitchii</i>	tr.	tr.	tr.	+++	tr.	+	++	/	++++	tr.	+	/			
Tsuga	<i>canadensis</i>	++	+	+	+++	+	+	+++	/	+++	+	+	/			
	<i>gmelinii</i>	+	+	+	+++	+	tr.	+	/	++++	+	/	+++			
	<i>kaempferi</i>	+	+	+	+++	+	tr.	+	/	++++	+	/	+++			
Larix	<i>laricina</i>	+	+	+	+++	+	tr.	+	/	++++	+	/	+++			
	<i>sibirica</i>	+	+	+	+++	+	tr.	+	/	++++	+	/	+++			
Pseudotsuga	<i>menziesii</i>	+	+	/	+++	+	tr.	++	/	++++	+	/	+++			
	<i>abies</i>	/	+	+	+++	+	+	+++	/	++++	+	+	+			
Picea	<i>ab. nidiformis</i>	/	+	+	+++	+	+	+++	/	++++	+	+	+			
	<i>mariana</i>	/	++	++	+++	tr.	++	+++	/	++++	+	+	+			
	<i>orientalis</i>	/	+	/	++	+	++	+++	/	++++	+	+	+			
	<i>pungens</i>	/	+	tr.	+++	+	++	++	/	++++	+	+	tr.			
	<i>nigra</i>	/	++	/	+++	+	+++	++	/	++++	+	+	+			
Pinus	<i>sylvestris</i>	+	++	++	+++	+	+++	++	/	++++	+	/	+			
	<i>karainesis</i>	/	+	/	+++	+	+++	++	/	++++	+	+	+			
	<i>wallichiana</i>	+	++	++	+++	+	+++	++	/	++++	+	+	+			
Cedrus	<i>atlantica</i>	+	++	tr.	++	+	++	tr.	/	++++	+	tr.	/			
	<i>deussata</i>	+	+	tr.	++	tr.	tr.	tr.	/	++++	+	tr.	/			
	<i>libani</i>	tr.	tr.	tr.	+++	tr.	tr.	tr.	/	++++	+	tr.	/			

Tab. V.2: Major detected sesqui- and di- terpenoids types detected in Pinaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH₄ as reducing agent.

4. DISCUSSION

The molecular signature of artificially fossilized Pinaceae was assessed by the artificial maturation of 22 extant Pinaceae representatives using confined pyrolysis. The 22 obtained molecular signatures allows to distinguish shared molecular features, which are common to each representative of this family, from the other molecular features that are specific to some Pinaceae taxa.

4.1. Shared molecular features of fossil Pinaceae

The molecular signature of fossil Pinaceae is characterized by the presence of many aliphatic, aromatic and oxygenated sesquiterpenoids. Several classes are represented like bisabolanes, cadalanes, eudesmanes, chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes. Bisabolanes (saturated bisabolanes, dihydro-*ar*-curcumene) and cadalanes (saturated cadalanes, calamene, calamenene, cadalene, norcadalenes) represent the more abundant sesquiterpenoids. Most of these compounds are reputed to be synthesized by almost all conifer species and cannot be used to distinguish the fossil Pinaceae from other fossil conifers. However, this statement has to be tempered for chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes because their occurrences within the plant kingdom remain unclear.

The molecular signature of fossil Pinaceae is also characterized by the presence of diterpenoids that are mainly made of abietanes. They are represented by abietane, norabietanes, aromatic abietanoids (like 1,2,3,4-tetrahydroretene, simonellite, methyl-retenes and retene). Oxygenated abietanes are only represented by dehydroabietic acid and no phenolic or keto-phenolic abietanes were recovered. Dehydroabietic acid may be directly synthesized by the Pinaceae but is mainly produced during the early degradation of abietanoic acids (e.g. abietic acid). This indicates that abietanoic acids are the only biological precursors of diagenetic abietanes in Pinaceae fossils. This is consistent with previous studies on the palaeochemotaxonomy of the Pinaceae family (Otto and Simoneit, 2001, 2002; Otto et al., 2007). Since most of the other conifer families are characterized by the presence of phenolic or keto-phenolic abietanes (e.g. ferruginol, sugiol), the abundance of dehydroabietic acid together with the absence of (keto-)phenolic abietanes can be an argument for a

Pinaceae origin for an unidentified conifer fossil. In addition to abietanes, other diterpenoids belonging to labdane and pimarane classes are systematically present in Pinaceae. Labdanes and pimaranes are common compounds for all conifer families and thus cannot be used as a criterion for discriminating the different conifer families.

As for the other conifer families, triterpenoids are not synthesized by the Pinaceae. However, this has to be tempered because gammaceranes and lanostanes are detected in trace amount in only one Pinaceae species (*Abies firma*). In addition, according to the literature, serratanes are also reported in several *Pinus* and *Picea* species (e.g. Otto and Wilde, 2001; Kim et al., 2004; Le Milbeau et al., 2013) but these compounds were not identified in this study, neither in fresh nor in pyrolyzed *Pinus* and *Picea* representatives. However, whatever their occurrence and amount, triterpenoids do not have any meaningful palaeochemotaxonomic value for the Pinaceae family compared to the sesquiterpenoids and diterpenoids.

Moreover, tetracyclic diterpenoids (*ent*-beyerane, phyllocladanes and kauranes) that are well-known conifer biomarkers are absent in the matured Pinaceae representatives. Their absence could be used to distinguish fossil Pinaceae from fossil conifers belonging to the other families.

4.2. Intergeneric variability in the molecular signature of matured Pinaceae

In addition to these shared molecular features, some other molecular characteristics are specific to a restricted number of Pinaceae taxa. For instance, cembranes are reported in some Pinaceae genera while the other do not display such macrocyclic compounds. Occurrences of cembranes are limited to *Picea*, *Pinus*, *Larix* and *Pseudotsuga* genera. Every species are associated to cembranes and no cembranes has been recovered in the pyrolysates of the representatives of the other genera. This distribution among the different genera of the Pinaceae family is consistent with those summarized in previous

chemotaxonomic studies (Otto and Wilde, 2001). However, the usefulness of cembranes as specific biomarkers for these four Pinaceae genera should be corroborated in further studies. Indeed, in previously studies achieved by Otto and Simoneit (2002) and Otto et al. (2007) on the molecular composition of fossil *Pseudotsuga* and *Pinus* species, no cembrane was actually mentioned.

Isocopalane is another diterpenoid that could be used to distinguish some Pinaceae genera to the others. Its biological precursor is still unclear and compounds having an isocopalane skeleton are rarely found in vascular plants. De Miranda et al. (1981) proposed that isocopalane originates from marine organisms. In the plant kingdom, isocopallic acid can be a precursor of isocopalane since it has an isocopalane skeleton and detected in fresh Pinaceae species by Mateus (2009). Isocopalane is present in moderate abundance or in trace in *Abies*, *Tsuga*, *Picea*, *Pinus* and *Cedrus* species while it is systematically absent from *Larix* and *Pseudostuga* species.

Then, isocopalane and cembranes seem to be key criterions that may be used to discriminate the different Pinaceae genera. *Larix*, *Pseudotsuga*, *Picea* and *Pinus* form a subdivision within the Pinaceae that could be distinguished from the other Pinaceae genera by the presence of cembranes. Moreover, within these four genera, *Larix* and *Pseudotsuga* show also high molecular affinity and could be distinguished from *Picea* and *Pinus* by the higher amount of cembranes and the absence of isocopalane (Tab. V.2). *Larix* can be distinguished from *Pseudotsuga* by the occurrence of eudesmanes that are restricted to the first one. However, as the molecular signature of *Pseudotsuga* is based on only one representative, care must be taken concerning its molecular signature. No obvious molecular distinction could be pointed out between *Picea* and *Pinus* in this study (Tab. V.2).

Abies, *Tsuga* and *Cedrus* constitute the second subdivision within the Pinaceae that differs from the previous one by the absence of cembranes. *Abies* and *Tsuga* show similar molecular patterns. Like *Pseudotsuga*, the molecular signature of *Tsuga* is based on only one representative so care must be taken concerning its molecular signature. Furthermore, besides the similarities between these three genera, *Tsuga* and *Abies* could be distinguished from *Cedrus* by the higher abundance of isocopalane and eudesmanes (Tab. V.2). The

molecular signature of *Cedrus* differs from those of *Abies* and *Tsuga* by its lower proportion of isocopalane, eudesmanes and di/trimethyl-naphthalenes.

Wang et al. (2000) established the phylogenetic relationship between the different Pinaceae genera. Three phylogenetic groups have been distinguished by these authors. The first one regroups *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* and *Larix*. The second one regroups *Abies* and *Tsuga*. The third one is only composed of *Cedrus*. It is worth to note that this phylogenetic classification fits very well with the palaeochemotaxonomical classification proposed in this study (Fig. V.12).

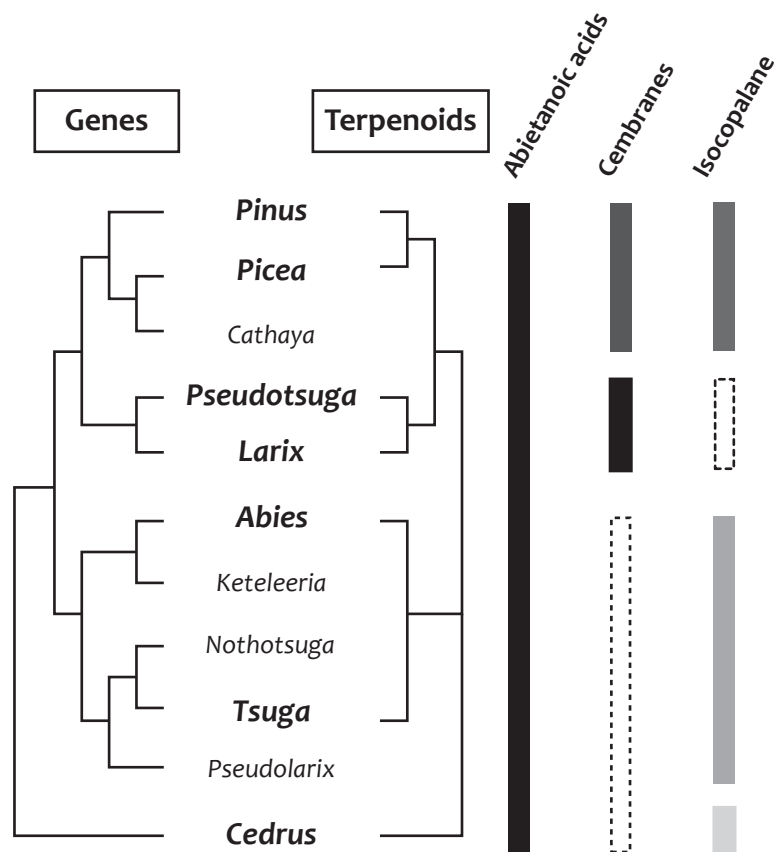


Fig. V.12: Phylogenetic relationship of Pinaceae obtained from gene sequences (left) according to (Wang et al., 2000), and established taxonomic relationship (right) according to terpenoid composition (this study). ■ : higher proportion ; ■ : significant proportion ■ : low proportion ; □ : absence.

However, these consistencies are not supported by the chemotaxonomic relationships achieved via the composition of seed oil fatty acids. Indeed, [Wolff et al. \(1997b, 2001\)](#) made different gatherings in which *Larix* and *Picea* constitute a first group while *Pinus*, *Tsuga* and *Pseudotsuga* form another one. *Abies* and *Cedrus* constitute a third and a fourth group.

Chapitre VI

**DETERMINATION DE LA SIGNATURE
MOLECULAIRE DES CONIFERES FOSSILES
PAR LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE
EXPERIMENTALE – PARTIE 3 :
CUPRESSACEAE ET TAXODIACEAE**

Chapitre VI. : Determination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paléochimiotaxonomie expérimentale – partie 3 : Cupressaceae et Taxodiaceae

1. SOME GENERALITIES ABOUT THE CUPRESSACEAE AND TAXODIACEAE

The Cupressaceae, also called cypress, form a conifer family that displays a worldwide distribution covering all continents except Antarctica. They are evergreen trees and shrubs and represent a major component of current forests. Nowadays, the distribution of the Taxodiaceae is restricted to subtropical and warm temperate areas, in particular in East Asia, North America and Australia. Cupressaceae and Taxodiaceae have a close phylogenetic relationship. They are considered as sister groups and formed a monophyletic conifer lineage according to 28S rRNA gene sequences (**Fig. VI.1**; [Stefanović et al., 1998](#)).

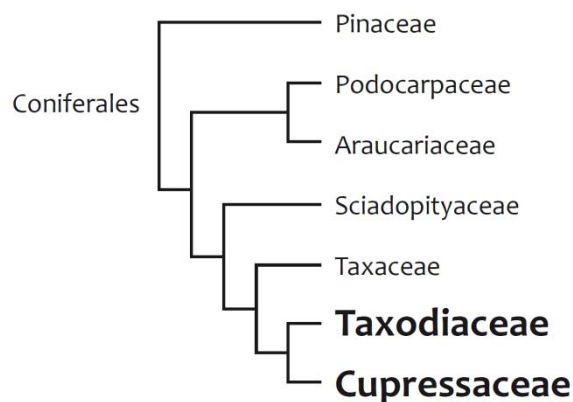


Fig. VI.1: Phylogenetic relationship of Cupressaceae and Taxodiaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequences according to [Stefanović et al. \(1998\)](#).

1.1. Taxonomy, geographical distribution and living environment

The Taxodiaceae and Cupressaceae families were considered as two independent conifer families according to the precladistic view proposed by Pilger (1926). Later, according to numerous morphological, anatomical and molecular (proteins) investigations, these two families are supported being a same family called Cupressaceae *sensu lato* (s.l.) (Hart, 1987; Stefanović et al., 1998; Gadek et al., 2000; Kusumi et al., 2000; Yang et al., 2012). More than 162 species are referenced and classified within 24 genera (15 for Cupressaceae and 9 for Taxodiaceae; Fig. VI.2; Gadek et al., 2000). Only three genera from the Cupressaceae (*Callitris*, *Cupressus* and *Juniperus*) possess more than 10 living species. As much as 19 genera (from both the Cupressaceae and Taxodiaceae) are monotypic (Farjon, 2005).

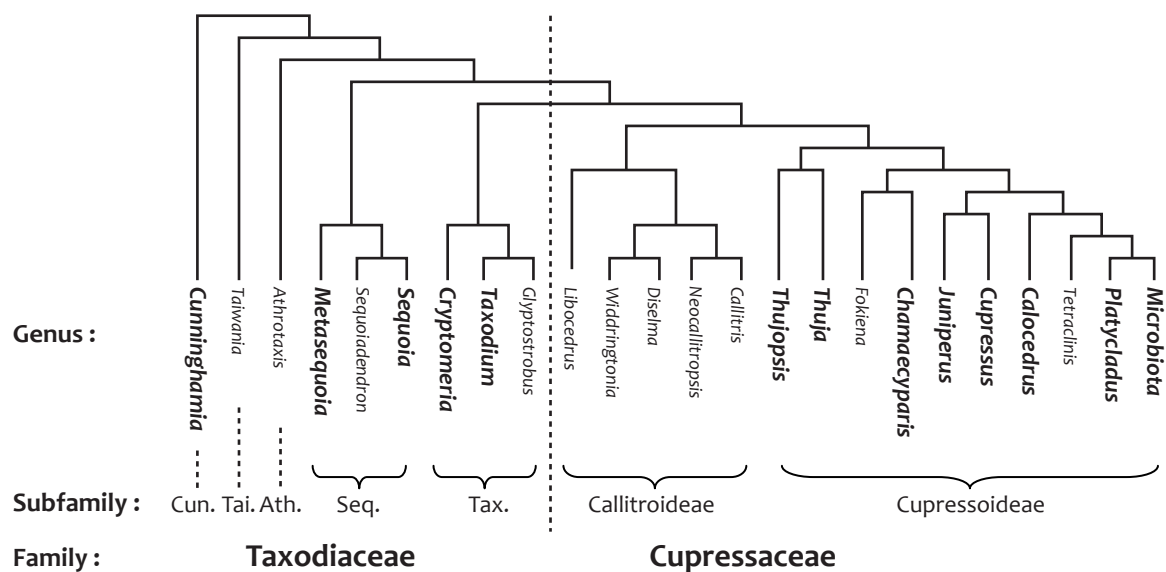


Fig. VI.2: Phylogenetic relationships of the extant Cupressaceae and Taxodiaceae families based on the morphological and cpDNA evidences (modified from Gadek et al. (2000)). Cun.: Cunninghamioideae; Tai.: Taiwanioideae; Ath.: Athrotaxoideae; Seq.: Sequoioideae; Tax.: Taxodioideae.

In this study, we consider the Cupressaceae and the Taxodiaceae as two different, but phylogenetically related, families.

The Cupressaceae family consists of two subfamilies: the Cupressoideae and the Callitroideae (Fig. VI.2). They differ from their DNA patterns and their geographical distributions (Mao et al., 2012).

The **Cupressoideae** live in the Northern Hemisphere and are reputed for their cold resistance (-20°C to -40°C). This subfamily is made of 10 genera.

Microbiota and **Platyclusus** are both monotypic evergreen shrubs. They are respectively represented by *Microbiota decussata* and *Platyclusus orientalis* originating from Russia and China (Tab. VI.2). *Microbiota* preferentially occupies the mountainous forest located between 300 m to 1400 m, whereas *Platyclusus* is generally found between 300 m and 3300 m. Furthermore, despite the tolerance to high altitude of *Platyclusus*, it is less cold-resistant (about -25°C) than *Microbiota* (down to -40°). **Calocedrus** is a sister group of *Microbiota* and *Platyclusus*. The four living species of *Calocedrus* are widely distributed in Eastern Asia and in the temperate regions of North America.

Cupressus and **Juniperus** possess more than ten living species. Both of these two genera have a large range of geographical distributions in the Northern Hemisphere, respectively in the semi-arid regions for *Juniperus* and in from cool temperate to subtropical areas for *Cupressus*.

Chamaecyparis and **Thuja** have restricted distributions and are endemic to some specific regions in the Northern Hemisphere. The six living species of *Chamaecyparis* mostly occur in coastal mountainous regions (500 m - 3000 m altitude) in North America and Southeast Asia, where the climate is mild and temperate. Furthermore, all *Chamaecyparis* species can tolerate a temperature down to -20°C . Regarding *Thuja* genus, their habitats essentially occur from coastal to mountainous regions in North America (2 species) and East Asia (3 species), where the climate is moist and cool (Farjon, 1990). *Thuja occidentalis* is known as the most cold-resistant species (down to -40°C). **Thujopsis**, a sister group of *Thuja*, is a monotypic genus (*Thujopsis dolabrata*). Trees of *Thujopsis* are endemic to cool (down to -20°C) and moist from coastal lowland to mountainous regions in Japan.

The **Callitroideae** live in the Southern Hemisphere. It is composed of five genera that are endemic in warm-temperate and moist regions like South Australia, New Zealand, New Caledonia, Tasmania, and also in southeast part of Africa.

The **Taxodiaceae** family consists of five sub-families: Cunninghamioideae, Taiwanioidae, Athrotaxoideae, Sequoioideae and Taxodioideae (**Fig. VI.2**).

Taxodium is represented by two living species. They are native to the wetlands of southeastern North America, Mexico and Guatemala. **Cryptomeria**, a sister group of *Taxodium*, is a monotypic genus (*Cryptomeria japonica*). Trees of *Cryptomeria* are endemic to mountainous regions (500 m to 2500 m) in China and Japan, where the climate is tropical and the soils are well drained.

Sequoia and **Sequoiadendron** show some close phylogenetic relationship with the **Metasequoia** genus. They are all monotypic genera and are endemic to some specific regions. *Sequoia sempervirens* and *Sequoiadendron giganteum* are both native to western America. The former is confined to coastal areas in southwestern Oregon and northwestern California. The latter is restricted to California between 900 m to 2700 m altitude. Regarding *Metasequoia glyptostroboides*, it is restricted to the shady mountainous regions of central China (700-1500 m) where the climate is cool-temperate and wet. **Cunninghamia** is the basal clade of the Taxodiaceae family (**Fig. VI.2**). *Cunninghamia* species are endemic to the mountainous regions of central China and northern Viet-Nam (200-2800 m).

1.2. Evolution of Cupressaceae and Taxodiaceae through geological times

Divergence (appearance) and early evolution of Cupressaceae and Taxodiaceae are associated to the major events of continent drift, like the break-up of Pangea and the separation of continental landmasses (Miller Jr, 1977; Yao et al. 1997; Li and Yang, 2002; Escapa et al., 2008; Mao et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Based on the evolutionary statistic analysis (Bayesian probability) and available fossil records, divergence of Taxodiaceae from the Cupressaceae occurred during the Late Permian and Early Triassic, when the supercontinent of Pangea was still in place (Stockey et al., 2005; Escapa et al., 2008; Mao et al., 2012; Zhang et al., 2012). The first authentic Taxodiaceae species was found in sedimentary rocks dated from the Early-Middle Triassic (Yao et al., 1997). During the Triassic and the Jurassic, *Taxodiaceae* were subdivided into seven subfamilies.

The **Cunninghamioideae** (the most basal) and **Taiwanoideae** subfamilies appeared during the Late Triassic and Early Jurassic (Rothwell et al., 2011; Bosma et al., 2012; Fig. VI.3). According to the Ancestral Area Reconstructions (AAR) by Mao et al. (2012), Cunninghamioideae may originate from Asia. The divergence of the Taiwanoideae from its sister lineage may coincide with the separation of Asia and North America about 200 My ago. Later, the sub-families **Athrotaxidoideae**, **Sequoioideae** and **Taxodioideae** were then successively individualized from their sister lineage and expanded in North America (Endo, 1951; Heusser, 1990; Escapa et al., 2008). The Cupressaceae family appeared at about -124 My. Its two sub-families, the **Callitroideae** and the **Cupressoideae**, diverged during the break-up of Gondwana from Laurasia (Fig. VI.3). The phylogenetic separation induced by the movement of landmasses leads to the emergence of the Callitroideae in Gondwana and the Cupressoideae in Laurasia.

The diversification of Taxodiaceae and Cupressaceae reached its maximum during the Cretaceous period. Then, the population of Taxodiaceae and Cupressaceae was dramatically reduced during the two successive cooling events of the Oligo-Miocene and the Plio-Pleistocene. Cunninghamioideae and Taiwanoideae were widely distributed in the Northern Hemisphere during the Early Cretaceous. Their geographical distributions were then largely reduced and are presently confined to Asia. Sequoioideae and Taxodioideae were widespread in the Northern Hemisphere and in Australia during the Cretaceous and the Early Cenozoic before being reduced to southern North America and Eastern Asia with five living species (LePage et al., 2005). Athrotaxidoideae, which displayed a worldwide distribution during Cretaceous, are presently represented by three living species in Australia. Regarding the Cupressaceae family, most genera of the Callitroideae subfamily became endemic to some specific regions of the South Hemisphere. Cupressoideae, despite their cold-resistance,

showed also a significant reduction of their population during the two Cenozoic cooling events. However, the reduction of the Taxodiaceae and Cupressaceae populations during the Cenozoic should be more probably related to an increase of aridity rather than a temperature decrease (LePage, 2003b; Mao et al., 2010).

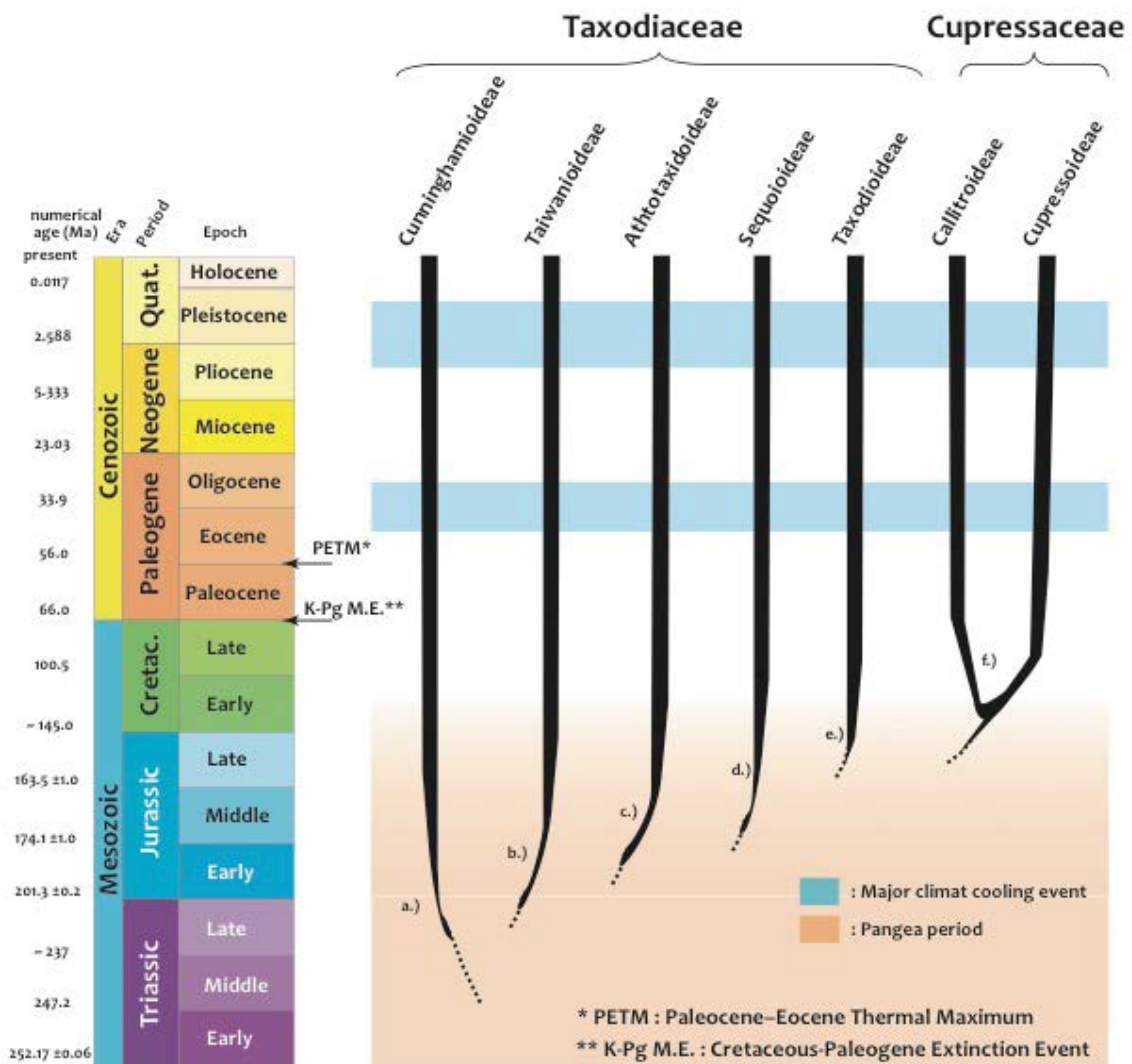


Fig. VI.3: Emergence and evolution of the Cupressaceae and Taxodiaceae families. Compilation of data based on a.) : Bosma et al. (2012); b.): Rothwell et al. (2011); c.): Escapa et al. (2008); d.): Endo (1951); e.): Heusser (1990); f.): Li and Yang (2002).

1.3. Chemotaxonomy

The bioterpenoid composition of the Cupressaceae and Taxodiaceae is highly detailed by Erdtman and Norin (1966) and throughout a series of publications called 'The chemistry of

the natural order cupressales' (e.g. Enzell and Erdtman, 1958; Norin, 1961; Chow and Erdtman, 1962 a, b). All these authors pointed out that both the Cupressaceae and Taxodiaceae show similar terpenoid feature. Some of them could be served as specific biomolecules for the Cupressaceae and/or Taxodiaceae. Available data are here summarized.

Many sesquiterpenoids synthesized by Cupressaceae and Taxodiaceae like acoranes, chamigranes, cedranes, cuparenes, tropolones and thujopsanes have a high chemotaxonomic specificity. Indeed, **cedrane**- and **thujopsane** are only biosynthesized by Cupressaceae and Taxodiaceae species (e.g. Erdtman and Norin, 1966; Thomas, 1970; Cheng and Tsai, 1972; Otto and Wilde, 2001). **Acoranes**, **chamigranes**, **cuparanes** and **tropolones** occur only in the Cupressaceae species (Enzell and Erdtman, 1958; Norin, 1961; Cheng and von Rudloff, 1970; Hasegawa and Hirose, 1981; Raldugin et al., 1981; Cool et al., 1998; Otto and Wilde, 2001). Other sesquiterpenoids like bisabolanes, eudesmanes, cubenanes, guiananes, ylanganes, himachalanes, longifolanes, longipiananes and longibornanes are also commonly found in the Cupressaceae and Taxodiaceae species. However, these compounds are also synthesized by other conifers like Pinaceae and Podocarpaceae (Otto and Wilde, 2001). So, they do not provide any valuable chemotaxonomic information. These sesquiterpenoids are reported as alcohols, acids and/or as unsaturated hydrocarbons in living plants.

The molecular signature of the Cupressaceae and the Taxodiaceae is also characterized by their diversity of diterpenoids. They are made up of a series of diversified tricyclic diterpenoids belong to abietane, pimarane, totarane, sempervirane and rimuane classes. Polar **abietane** are characterized by the presence of both abietanoic acids and phenolic abietanes (e.g. Chow and Erdtman, 1962a; Otto et al., 1997, 2002b; Otto and Simoneit, 2001; Narita and Yatagai, 2006). Similar distribution of abietanes is also reported in other conifer families like Araucariaceae and Podocarpaceae families (Otto and Wilde, 2001). However, one abietanoic acid, callistrisic acid, seems to be only synthesized by Cupressaceae and more particularly by some species of *Juniperus* and *Callitris* genera (Carman and Deeth, 1967, 1971; Gough, 1968; Tabacik-Wlotzka and Poisson, 1971).

Totaranes and **semperviranes** are widely distributed in Cupressaceae species as phenols (Chow and Erdtman, 1962b; Otto and Wilde, 2001). Within the Taxodiaceae family,

occurrence of totaranes and semperviranes is restricted to *Cryptomeria* (Otto and Wilde, 2001). Rimuanes display a restricted distribution since they are only biosynthesized by a limited number of genera like *Thuja* and *Thujopsis* for the Cupressaceae and *Athrotaxis* for the Taxodiaceae (Erdtman and Norin, 1966; Kitadani et al., 1974; Su et al., 1996; Takahashi et al., 2001). Owing to their restricted occurrence, totarane, semperviranes and rimuanes can be considered as specific for the Cupressaceae and Taxodiaceae families.

Both pimaranes and isopimaranes are reported in the Cupressaceae and Taxodiaceae families (Otto and Wilde, 2001). Labdanes are mainly synthesized as acids (like isocupressic and *trans*-communic acids) and alcohols (like manool). However, owing to their ubiquitous presence in almost all conifer representatives, labdanes do not provide any relevant chemotaxonomic information (Tabacik-Wlotzka and Laporthe, 1968; Gough and Mills, 1974; Hasegawa and Hirose, 1981; Fang et al., 1993; Lee et al., 1995; Vichi et al., 2008). Many tetracyclic diterpenoids like beyeranes, phylocladanes and kauranes are also reported in the Cupressaceae and Taxodiaceae. These compounds are known as alcohols and unsaturated hydrocarbons and are widely distributed among the Cupressaceae, whereas their occurrence in the Taxodiaceae seems to be restricted to *Cryptomeria* (Su et al., 1996; Otto and Wilde, 2001).

Triterpenoids of the chamaecydin class are also reported in some Cupressaceae and Taxodiaceae of *Chamaecyparis* and *Cryptomeria* genera (Hirose et al., 1983; Su et al., 1993).

2. SAMPLES

Leaves and twigs of 25 the Cupressaceae and Taxodiaceae species were investigated. They include 18 Cupressaceae species: 1 *Calocedrus*, 4 *Chamaecyparis*, 1 *Cupressocyparis* (hybridisation from *Chamaecyparis*), 2 *Cupressus*, 5 *Juniperus*, 1 *Microbiota*, 1 *Platycladus*, 1 *Thujopsis*, and 2 *Thuja*, as well as 7 Taxodiaceae species: 1 *Cryptomeria*, 2 *Cunninghamia*, 1 *Metasequoia*, 1 *Sequoia* and 2 *Taxodium*. More details on the investigated species, their

phylogenetic relationships, native geographic distributions and their provenances are given in the in **Tab. VI.1** and **Tab. VI.2**. Sampling is believed to be representative of the intrinsic diversity of the Cupressaceae and Taxodiaceae families.

Family	Genre	Species	Geographical range	Samples provenance
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i> D. Don, 1839	<i>japonica</i> D. Don, 1839 Com.: Japanese cedar	China, Japan	
	<i>Cunninghamia</i> (Lambert) Hooker, 1827	<i>konishii</i> Hayata, 1908 <i>lanceolata</i> (Lambert) Hooker, 1827 Com.: China fir	China, Taiwan (China), Vietnam and Laos	
	<i>Metasequoia</i> Hu et Cheng, 1948	<i>glyptostroboides</i> Hu et Cheng, 1948 Com.: Dawn redwood, water fir, water larch	China	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
	<i>Sequoia</i> (D. Don) Endlicher, 1847	<i>sempervirens</i> (D. Don) Endlicher, 1847 Syn.: <i>Taxodium sempervirens</i> Com.: Coast redwood, redwood, California redwood	United States (SW Oregon, NW California)	
	<i>Taxodium</i> Richard, 1810	<i>distichum</i> (L.) Richard, 1810 Syn.: <i>Cupressus disticha</i> Com.: Baldcypress, cypress, swamp cypress	Georgia, United States	
		<i>mucronatum</i> Tenore, 1853 Com.: Montezuma cypress, Mexican cypress	Guatemala, Mexico, United States	Botanical Garden of Lyon (Fr.)

Tab. VI.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Taxodiaceae species in this study.

Family	Genre	Section	Species	Geographical range	Samples provenance
Cupressaceae	<i>Calocedrus</i> Kurz, 1873		<i>decurrens</i> (Torrey) Florin, 1956 Syn.: <i>Libocedrus decurrens</i> Com.: Incense Cedar	Mexico, western United States	
			<i>lawsoniana</i> (A. Murray) Parlatore, 1864 Syn.: <i>Cupressus lawsoniana</i> Com.: Ginger Pine, Lawson's Cypress, Port-Orford Cedar	West coast of North America	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
	<i>Chamaecyparis</i> Spach, 1841		<i>nootkatensis</i> David Don, 1824 Syn.: <i>Callitropsis nootkatensis</i> Com.: Nootka Cypress, Yellow Cypress, and Alaska Cypress	United States (California / Oregon)	
			<i>obtusa</i> (Siebold et Zuccarini) Endlicher, 1847 Syn.: <i>Retinospora obtusa</i> Com.: Hinoki Cypress	Japan, Taiwan (China)	Botanical Garden of Lyon (Fr.)
			<i>pisifera</i> (Siebold et Zuccarini) Endlicher Com.: sawara false-cypress, sawara cypress	Japan	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
			<i>leylandii</i> (A. B. Jacks. & Dallim.) Farjon, 2002 Syn.: <i>Cupress leylandii</i> Com.: Cypres de Leyland	Great Britain	
	<i>Cupressocyparis</i> Farjon, 2002				
	<i>Cupressus</i> Linnaeus, 1753	<i>Hesperocyparis</i>	<i>arizonica</i> Greene, 1882 Syn.: <i>Cupressus benthamii</i> , <i>Callitropsis arizonica</i> Com.: Arizona or roughbark Arizona cypress	Mexico, Southern United States	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
		<i>Cupressus</i>	<i>sempervirens</i> Linnaeus, 1753 Syn.: <i>Cupressus horizontalis</i> Com.: Mediterranean cypress, Italian cypress	Greece, Iran, Turkey	
	<i>Juniperus</i> Linnaeus, 1753	<i>Chinensioides</i>	<i>chinensis</i> Linnaeus, 1767 Com.: Chinese Juniper	China, Japan, North and South Korea, Myanmar, Russia, Taiwan (China)	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
		<i>Juniperoides</i>	<i>communis</i> Linnaeus, 1753 Com.: Common juniper, genévrier commun	Eurasia, North America	
		<i>Oxycedroides</i>	<i>oxycedrus</i> Linnaeus, 1753 Com.: Prickly Juniper	Europe, West Asia	
		<i>Phoenicioides</i>	<i>phoenicea</i> Linnaeus, 1753 Com.: Phoenician juniper	Mediterranean region, North Africa, Middle East	Botanical Garden of Lyon (Fr.)
		<i>Virginioides</i>	<i>virginiana</i> Linnaeus, 1753 Com.: Eastern redcedar, red or eastern juniper	Canada, Georgia, United States	
	<i>Microbiota</i> Komarov, 1923		<i>decussata</i> Komarov, 1923 Com.: Russian arborvitae	Russia	
	<i>Platycladus</i> (Linnaeus) Franco, 1949		<i>orientalis</i> (Linnaeus) Franco, 1949 Com.: Chinese or oriental arborvitae	Central Asia and Western China, Russia	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
	<i>Thujopsis</i> Siebold et Zuccarini, 1844		<i>dolabrata</i> Siebold et Zuccarini, 1844 Com.: hiba arborvitae	Japan	
	<i>Thuja</i> Linnaeus, 1753		<i>occidentalis</i> Linnaeus, 1753 Com.: Northern white-cedar, thuier cèdre, etc.	NE United States, Canada SE	Botanical Garden of Lyon (Fr.)
			<i>plicata</i> D. Don in Lambert, 1824	U.S. / Canada West	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)

Tab. VI.2: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Cupressaceae in this study.

3. RESULTS

Aliphatic, aromatic and polar fractions of fresh and artificially matured Cupressaceae and Taxodiaceae representatives were analysed. Because this study mainly focused on the palaeochemotaxonomic patterns of these families, the fractions obtained from artificially matured plants were more carefully studied.

3.1. Sesquiterpenoid composition of artificially matured Cupressaceae

3.1.1. Acyclic and monocyclic sesquiterpenoids

Farnesane was identified in the aliphatic fraction of plant pyrolysates (**Fig. VI.4**). It derives from biological precursors like farnesol that are synthesized by most of the Cupressaceae species. Farnesane shows significant abundance in most matured Cupressaceae representatives, but it is detected in trace level, if not absent, in *Microbiota*, *Platycladus* and *Calocedrus*. However, as indicated in the previous chapters, its relative abundance may be probably due to its partial volatilization during experimentation.

Bisabolanes are present as saturated bisabolanes and dihydro-*ar*-curcumene (respectively detected in the aliphatic and aromatic fractions; **Tab. VI.3** and **Fig. VI.5**). These monocyclic sesquiterpenoids derive from β -bisabolene, curcumene and zingiberene that are present in the extract of fresh representatives. Bisabolanes are detected as major compounds in matured *Platycladus*, *Calocedrus* and *Cupressocyparis* as well as in most species of *Chamaecyparis*. They represent the major sesquiterpenoids in *Juniperus virginiana* and *Cupressus arizonica* whereas they are minor compounds in *Juniperus phoenicea* and *Cupressus sempervirens*. In the case of *Thujopsis* and *Thuja*, bisabolanes are present in low abundance (**Tab. VI.3**).

3.1.2. Bicyclic sesquiterpenoids

Cadalanes are identified as cadalanes, muurolanes and amorphanes in the aliphatic fraction as well as calamene, calamenene, cadalene and one norcadalene (1-isopropyl-4-methylnaphthalene) in the aromatic fraction of plant pyrolysates (**Fig. VI.4** and **Fig. VI.5**). These compounds mainly derive from cadinenes, muurolenes, amorphenes and cadinols that are widespread in the fresh representatives. Cadalanes (like cadalanes, calamene, calamenene, cadalene) represent the major sesquiterpenoids in most Cupressaceae representatives, except for *Calocedrus decurrens*, *Platyclusus orientalis* and *Thuja occidentalis*, in which they are found in low amount (**Tab. VI.3**).

Cuparanes like cuparene and cuparenol are respectively identified in the aromatic and polar fractions of plant pyrolysates. Their identification was achieved by comparison of their mass spectra with those published by [Grantham and Douglas \(1980\)](#) and [Philp \(1985\)](#) (**Fig. VI.5** and **Fig. VI.6 b**). They are also recovered in the organic extracts of fresh representatives. Cuparanes are present in high amount in *Microbiota*, *Calocedrus* and most *Chamaecyparis* pyrolysates. They are generally absent or are only found in trace amount in *Cupressocyparis*, *Juniperus*, *Cupressus*, *Thuja*, *Thujopsis* and *Platyclusus*, as well as in one species of *Chamaecyparis* (*Ch. nootkatensis*; **Fig. VI.5**). This distribution of cuparanes displays some inconsistency with the available chemotaxonomic data since it indicates that cuparanes are synthesized by all Cupressaceae species (e.g. [Erdtman and Norin, 1966](#); [Otto and Wilde, 2001](#)).

Two drimanes were detected in significant abundance in the aliphatic fraction of *Microbiota decussata*. Biological drimanes are synthesized by a large range of vascular plants including angiosperms and gymnosperms (e.g. [Fukuyama et al., 1980](#); [Philp et al., 1981](#); [Jansen and de Groot, 1991](#); [Malheiros et al., 2001](#); [Asakawa et al., 2012](#)). However, occurrence of drimanes in pyrolyzed plants is limited to *Microbiota decussata* in this study.

4 α (H)-eudesmane and 4 β (H)-eudesmane are detected in the aliphatic fractions of matured Cupressaceae representatives (**Fig. VI.4**). Their biological precursors like eudesmols and selinenes are widely distributed in living Cupressaceae. They represent the

major sesquiterpenoids in *Cupressocyparis*, *Cupressus* and *Thujopsis*, whereas they were found in low amount, if not absent, in *Calocedrus*, *Chamaecyparis*, *Microbiota* and *Platycladus*. A high variability of their abundances is observed among the *Juniperus* representatives. Indeed, eudesmanes were found in high amount in *Juniperus virginiana* and are detected only at trace level in *Juniperus phoenicea* (Tab. VI.3).

Other bicyclic sesquiterpenoids like chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes were detected in all plant pyrolysates (Fig. VI.5). The former shows high amount in most matured *Cupressocyparis*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Platycladus*, *Thujopsis* and *Thuja* representatives. In the case of *Calocedrus* and *Chamaecyparis*, chamazulene is found only at trace level. Pentamethyl-dihydroindenes are also identified in low amount in most matured Cupressaceae representatives (Tab. VI.3).

3.1.3. Tricyclic and other sesquiterpenoids

A compound characterized by a molecular ion at m/z 206 and a base peaks at m/z 82 was detected in the aliphatic fraction of matured Cupressaceae representatives (pyrolysis with LiAlH_4 , Fig. VI.6 c). It is identified as cedrane by comparison with the mass spectrum published by Grantham and Douglas (1980). Moreover, its unsaturated form, cedrene, was also identified according to another mass spectrum published by Grantham and Douglas (1980) and it was found in many matured Cupressaceae representatives (Fig. VI.4 and Fig. VI.6 d). The identified cedranes in plant pyrolysates are mainly derived from α -cedrol which is widely distributed in the fresh Cupressaceae representatives. Cedrane and α -cedrene were found in high amount in *Calocedrus*, *Microbiota* and *Platycladus* but are absent or in trace level in *Juniperus*, *Thujopsis* and *Thuja* (Tab. VI. 3). Cedranes are generally found in trace level, if not absent, in most *Chamaecyparis* and *Cupressus* representatives, except for *Chamaecyparis obtusa* and *Cupressus sempervirens* in which cedranes are among the major sesquiterpenoids.

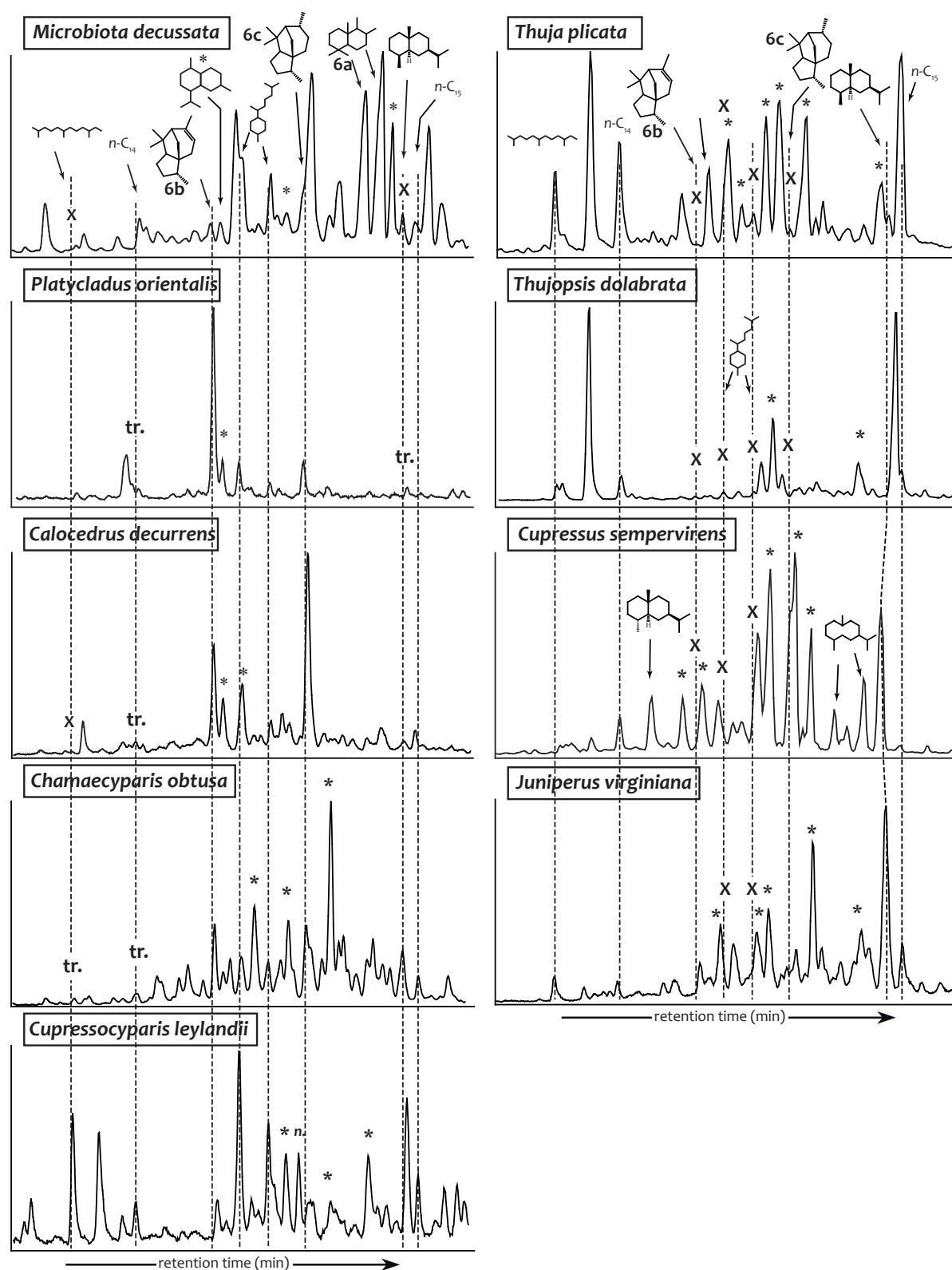


Fig. VI.4: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH_4 . The mass spectra of 6a, 6b, 6c are given in Fig. VI. 6. X: absence of compound; tr: at trace level; *: cadalane- type compounds.

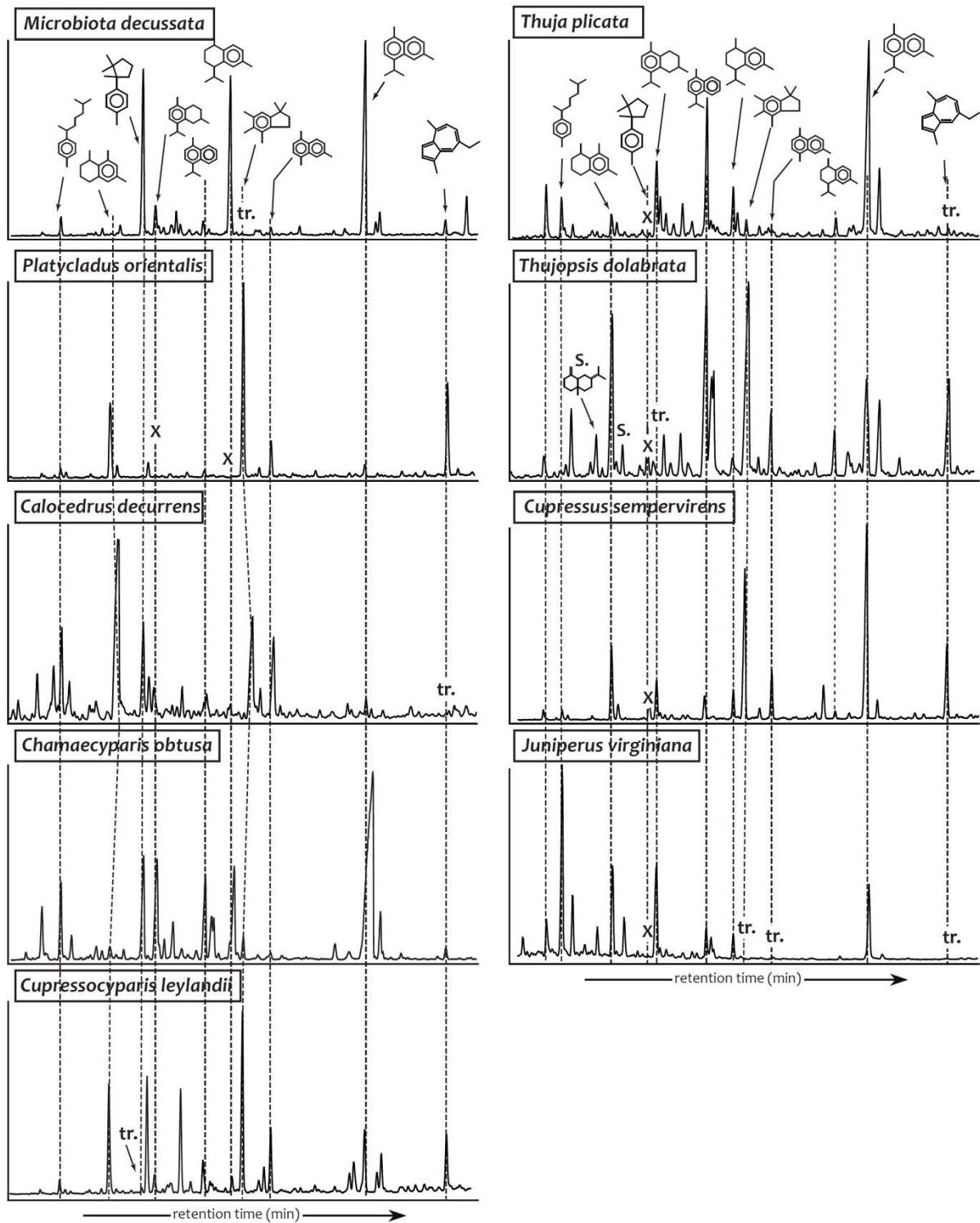


Fig. VI.5: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aromatic fractions of pyrolysis products of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level; S.: selinenes.

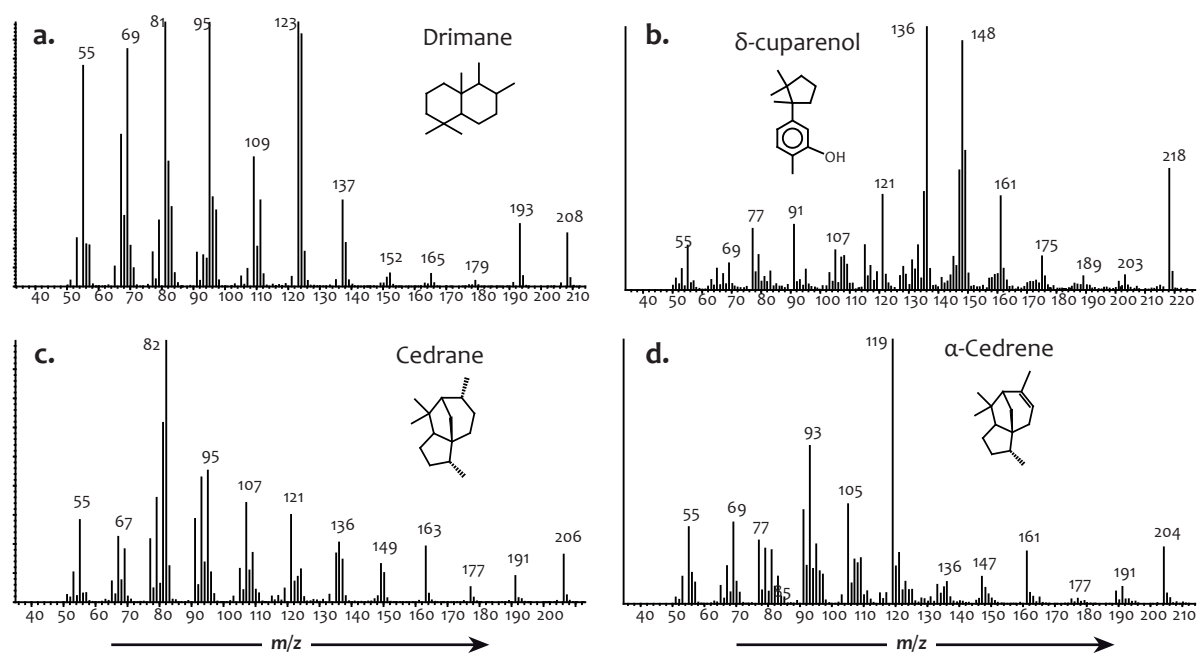


Fig. VI.6: Mass spectra of some identified Cupressaceae sesquiterpenoids. a.: tentatively identified drimane (identified from spectrum in Alexander et al. (1983)); b.: δ -cuparenol; c.: cedrane; d.: α -cedrene (identified from spectra in Grantham and Douglas (1980)).

3.2. Diterpenoid composition of artificially matured Cupressaceae

3.2.1. Bicyclic diterpenoids

Labdanes are the only bicyclic diterpenoids detected in the aliphatic fraction of Cupressaceae representatives (pyrolysis with LiAlH_4). Labdanes represent the major diterpenoids in matured *Calocedrus*, *Cupressus*, *Cupressocyparis*, *Thujopsis* and in most matured *Juniperus*. They are present in low abundance in matured *Chamaecyparis* and are detected in trace level in *Microbiota* and *Platycladus* (Fig. VI.7).

3.2.2. Tricyclic diterpenoids

Abietanes

Saturated abietane and norabietanes, as well as aromatic abietanes like 19- and 18-norabieta-8,11,13-trienes, bisnorsimonellite, bisnorabietatriene, methyl-bisnorabietatriene,

1,2,3,4-tetrahydroretene, dehydroabietane, simonellite, bisnorsimonellite and retene, are respectively identified in the aliphatic and aromatic fractions of plant pyrolysates (**Fig. VI.7** and **Fig. VI.8**). Abietanes represent the major diterpenoids in all matured Cupressaceae species (**Tab. VI.3**).

In addition to the saturated and aromatic abietanes, abietanoic acids and phenolic abietanes are also identified in the polar fractions of plant pyrolysates. Indeed, in these polar fractions, dehydroabietic acid, dehydroabietal, 16,17-bisnordehydroabietic acid (identified as methyl-ester-16,17-bisnordehydroabietate) and 7-oxodehydroabietic acid (identified as methyl-ester-7-oxodehydroabietate) were recovered. Moreover, a compound showing a mass spectrum rather similar to that of dehydroabietic acid was detected in the polar fraction of *Juniperus* pyrolysates (**Fig. VI.9**, **Fig. VI.10 a** and **b.**). The difference with the mass spectrum of dehydroabietic acid is about the relative intensity of the ion M^+-15 (m/z 299) compared to the molecular ion (m/z 314). This matches very well with mass spectra published by [Simoneit \(1977\)](#) and [Anderson \(2006\)](#) assigned to dehydrocallitrisic acid. Dehydrocallitrisic is an isomer of dehydroabietic acid and epimer at C-18 (acid group with a β configuration).

Moreover, related compounds like 16,17-bisnordehydrocallitrisic acid (identified as methyl-ester-16,17-bisnordehydrocallitrisate) and dehydrocallitrisal are also identified in the polar fractions of *Juniperus* pyrolysates. The identification of these compounds was achieved by comparison with the mass spectra published by [Enzell and Wahlberg \(1969\)](#) and [Anderson \(2006\)](#) (**Fig. VI.9**, **Fig. VI.10 c** and **e**). It is worth to note that the occurrence of callitrisic compounds is highly limited to a restricted number of *Juniperus* species. They are found in high amount in *J. phoenicea*, at trace level in *J. communis* and are absent in *J. oxycedrus* (**Tab. VI.3**).

In addition to abietanoic and callitrisic acids, phenolic abietanes like hinokiol, sugiol and ferruginol are also detected in the polar fractions of matured Cupressaceae species and display higher relative proportion than abietanoic acids (**Fig. VI.9**). This is true for most of the Cupressaceae representatives except for *Juniperus* and *Calocedrus* in which higher amounts of abietanoic acids were found (**Tab. VI.3**).

Totaranes

Three compounds, with mass spectra sharing the same molecular ion at m/z 286 and base peak at m/z 271, are detected in the polar fraction of matured Cupressaceae representatives. By comparison with the mass spectra published by Le Métayer et al. (2008), these compounds are assigned to semperviol, totarol and ferruginol (Fig. VI.9). 3 α -Hydroxytotarol was also identified (Fig. VI.9). These compounds are among the major diterpenoids in most matured Cupressaceae representatives, except for *Calocedrus* and *Juniperus*, in which totaranes and semperviranes show lower amount (Tab. VI.3). The same polar compounds are also widely distributed in fresh Cupressaceae representatives. According to the diagenetic pathway of totarol and semperviol that was previously proposed by Otto et al. (1997) and Tuo and Philp (2005), totarol and semperviol could be transformed into diaromatic totarane and diaromatic sempervirane. However, in the current study, these degraded biaromatic compounds have not been detected in matured Cupressaceae species.

Rimuanes

A compound showing a mass spectrum characterized by a molecular ion at m/z 276 and a base peak at m/z 95 is detected in the aliphatic fraction of matured *Cupressocyparis*, *Chamaecyparis*, *Thujopsis* species and also in *Thuja occidentalis* (Fig. VI.12 a). Its characteristic ion at m/z 247 ($M^+ - 29$) corresponds to the loss of an ethylene unit ($-C_2H_5$) and the ion at m/z 109 corresponds to the loss of a dimethylated cyclohexane group. By comparison with the spectra published by Philp (1985) and Noble et al. (1986), this compound can be assigned to tetrahydromuene or rimuane. Rimuanes were found in trace amount in matured *Cupressocyparis*, *Thujopsis*, *Thuja* and numerous representatives of *Chamaecyparis*, except for *Chamaecyparis nootkatensis*. They are absent in the other Cupressaceae representatives (Tab. VI.3).

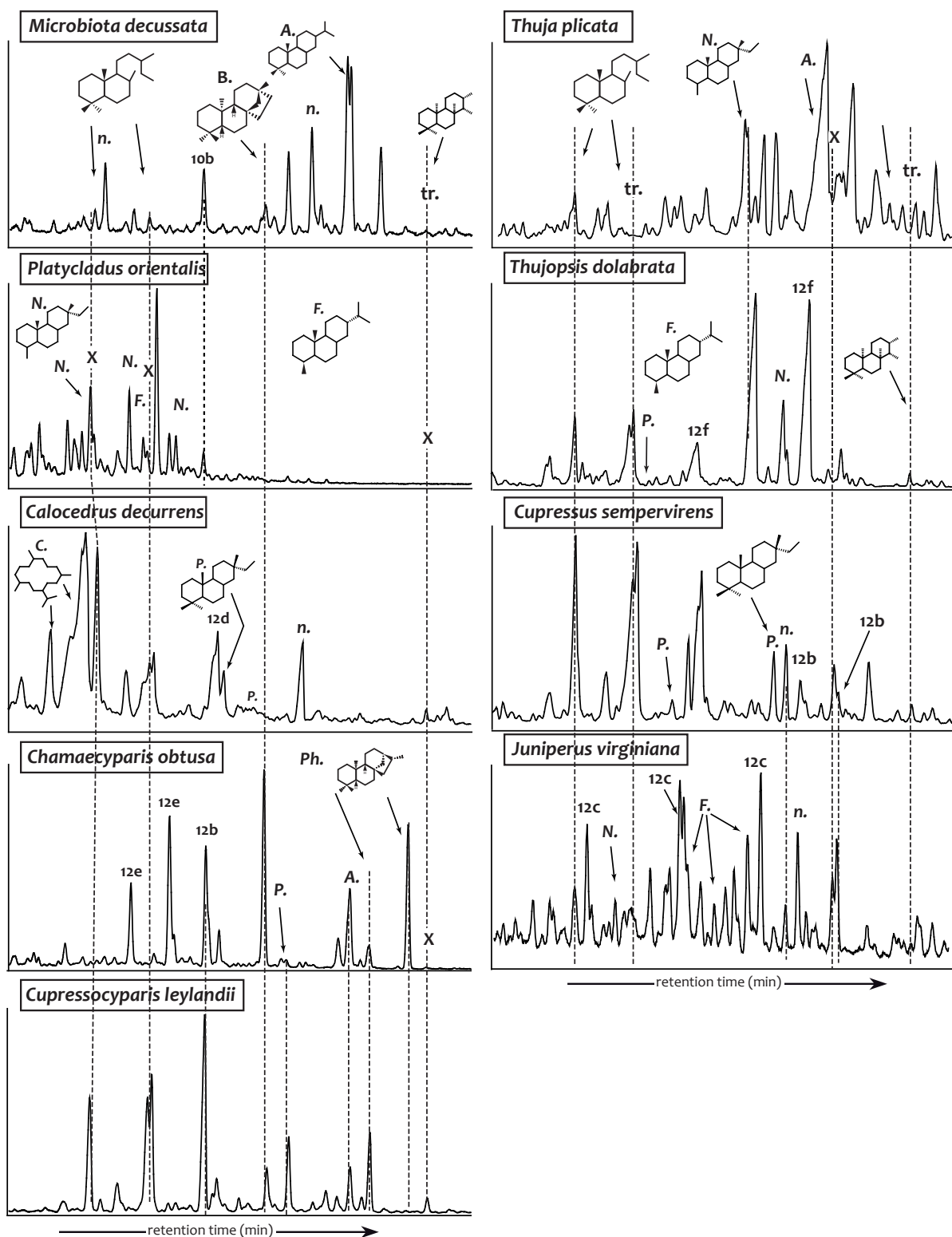


Fig. VI.7: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis with LiAlH_4 . The mass spectra of compounds 12b, 12c, 12d, 12e and 12f are given in the Fig. VI.12. N.: Norpimaranes; P.: Pimaranes; A.: Abietanes; B: ent-beyerane; F.: Norabietanes; Ph: Phyllocladane; n.: n-alkanes; X: absence of compound; tr: at trace level.

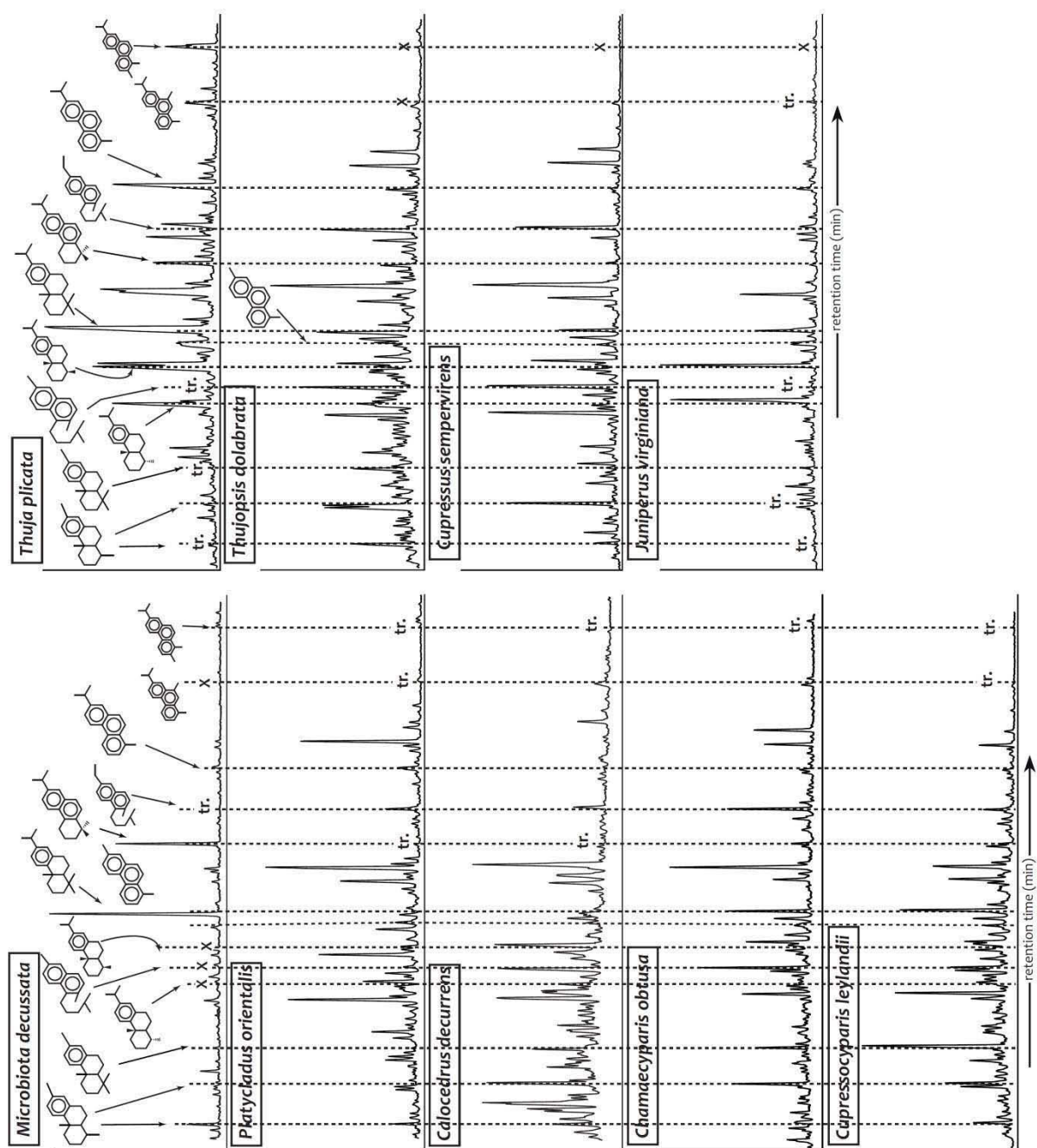


Fig. VI.8: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aromatic fractions of Cupressaceae representatives obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . X: absence of compound; tr: at trace level.

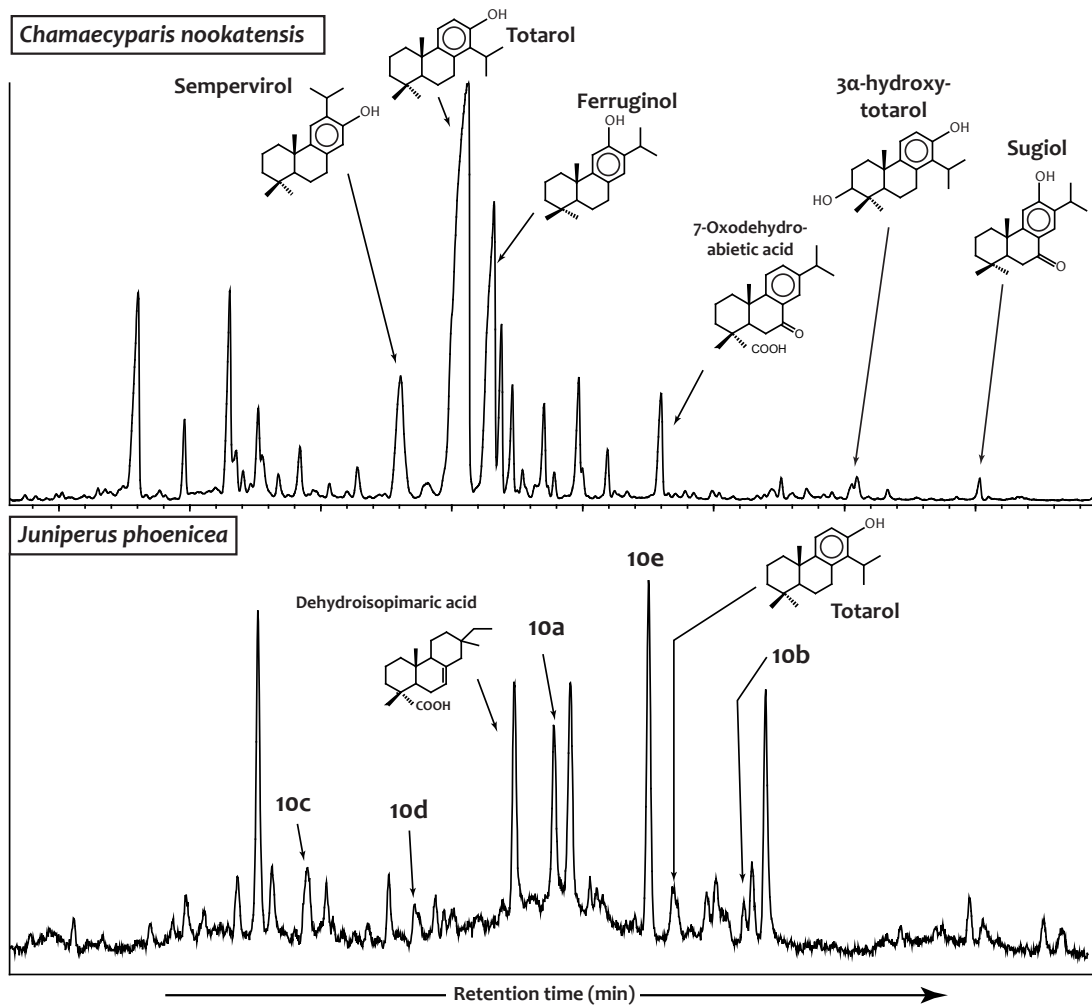


Fig. VI.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Chamaecyparis nookatensis* and *Juniperus phoenicea* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . Mass spectra of 10a ~ 10e are given in the Fig. VI.10.

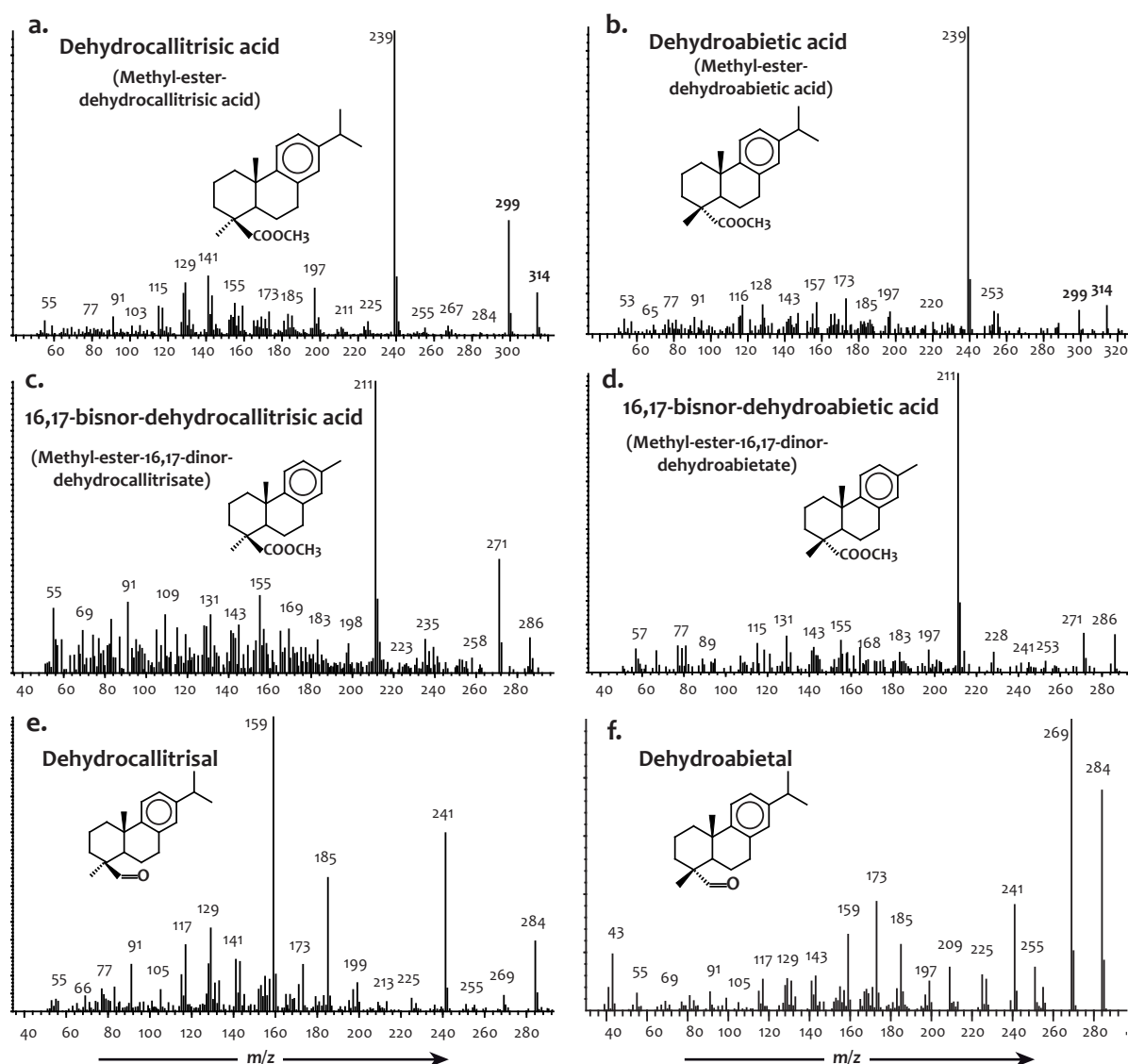


Fig. VI.10: Mass spectra of abietic and callitricis acids. a.: dehydrocallitricis acid (identified as methyl-ester-dehydrocallitricis acid); b.: dehydroabietic acid (identified as methyl-ester-dehydroabietic acid); c.: 16,17-bisnor-dehydrocallitricis acid (identified as methyl-ester-16,17-bisnordehydrocallitrisate); d.: 16,17-bisnor-dehydroabietic acid (identified as methyl ester 16,17-bisnordehydroabietate); e.: dehydrocallitrisal; f.: dehydroabietaal.

Pimaranes and isopimaranes

In the aliphatic fraction (pyrolyzed with LiAlH_4), two series of compounds showing mass spectra that match very well that of isopimarane and norisopimarane were identified according to the mass spectra published by Philp (1985) and Noble et al. (1986) (Fig. VI.7). Dehydroisopimaric acid (identified as methyl-ester-dehydroisopimaric acid) was also

identified in the polar fractions of plant pyrolysates. According to the postulated diagenetic pathway of isopimaranes modified from [Tuo and Philp \(2005\)](#) (**Fig. VI.11**), aromatic pimaranes/isopimaranes were identified as bisnorsimonellite, 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene and pimanthrene (**Fig. VI.8**). These degraded pimaranes/isopimaranes mainly originate from isopimaradiene, hydroxyl-isopimarene, 13-isopimaric acid (identified as methyl-ester-13-isopimarate), pimaral and pimaric acid that were found in the fresh representatives. Pimarane/isopimaranes represent one of the major diterpenoids of the matured Cupressaceae species (**Tab. VI.3**).

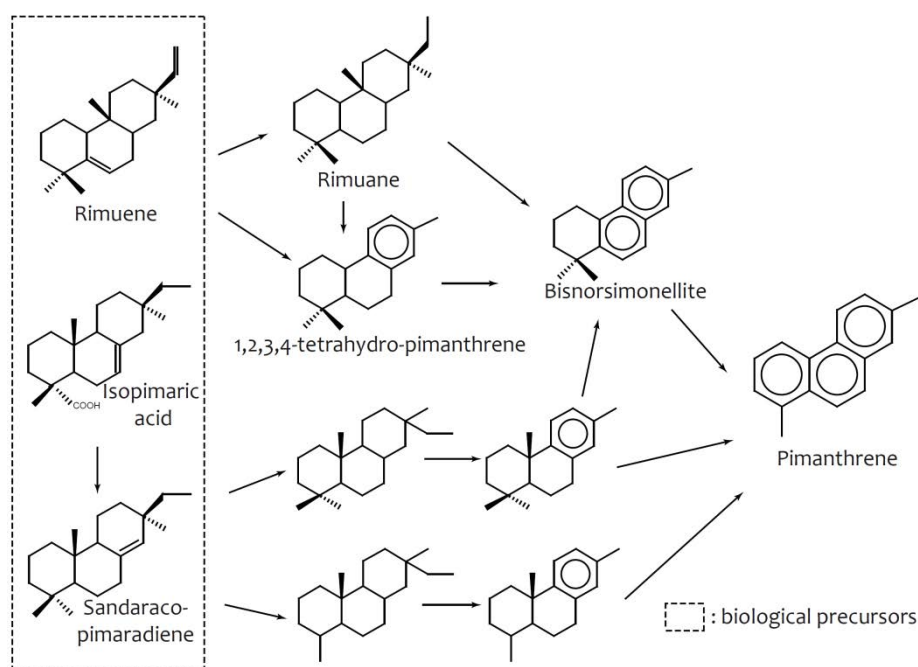


Fig. VI.11: Postulated diagenetic pathway of rimuanes and isopimaranes modified from [Tuo and Philp \(2005\)](#).

Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons

Two isohexyl alkylaromatic compounds, 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene were identified in the aromatic fraction of matured Cupressaceae species (**Fig. VI.8**). The identification was done by comparison with the mass spectra published by [Ellis et al. \(1996\)](#). They are tricyclic diterpenoids and are characterized by the presence of an open A-ring. Owing to their unusual carbon skeleton, the

biological precursor of these compounds are still unknown. Furthermore, according to Ellis et al. (1996), 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene may originate from tricyclic diterpenoids through a series of thermal transformations like aromatization and rearrangement of a methyl group followed by an A-ring opening process (Ellis et al., 1996). Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons represent the major identified diterpenoids in the pyrolysates of all species of the *Calocedrus*, *Cupressopsis*, *Cupressus*, *Platycladus*, *Thujopsis*, *Thuja* genera, and in most *Chamaecyparis* and *Juniperus* species. In *Microbiota deodara* as well as some species of *Chamaecyparis* and *Juniperus* (e.g. *Ch. nootkatensis* and *J. virginiana*), isohexyl alkylaromatic hydrocarbons were found in low amount, if not absent (Tab. VI.3).

3.2.3. Tetracyclic diterpenoids

Tetracyclic compounds are also found in the matured Cupressaceae species in various relative abundances. They are identified as *ent*-beyerane, phyllocladanes and *ent*-kauranes in the aliphatic fractions of plant pyrolysates (pyrolysis with LiAlH_4). These compounds derive from many biological precursors that are widespread in the extract of fresh representatives. *Ent*-beyerane is mainly detected in *Chamaecyparis*, *Thuja* and *Thujopsis* representatives in high amount. It is present at trace level in *Juniperus oxycedrus* and *Cupressocyparis leylandii*. The occurrence of phyllocladanes is restricted to some representatives of *Cupressocyparis* and *Chamaecyparis* genera. Concerning *ent*-kauranes, they are mainly recovered in *Cupressocyparis leylandii*, *Chamaecyparis nootkatensis*, *Chamaecyparis obtusa* and *Thuja plicata* (Tab. VI.3).

3.2.4. Other diterpenoids

Cembranes are also detected in matured Cupressaceae species. Their occurrence in the Cupressaceae representatives is restricted to the *Calocedrus* (*C. decurrens*; Fig. VI.7).

Some compounds recovered in the organic extracts of the matured Cupressaceae representatives remain unidentified. For example, compounds labeled 12b and 12c (Fig. VI.12)

are respectively characterized by molecular ions at m/z 274 ($C_{20}H_{34}$) and 260 ($C_{19}H_{32}$), base peaks at m/z 259 and 245 (M^+-15), and they share characteristic ions at m/z 163 and 189. These two compounds show high amount in many matured *Cupressus* and *Juniperus* species. Other unknown compounds, like those labeled **12d**, **12e** and **12f** in **Fig. VI.12**, show high relative abundance in several representatives (**Fig. VI.7**). Compound labeled **12f** was also identified in some matured Araucariaceae species (**Chapitre IV**) as an unknown diterpenoid.

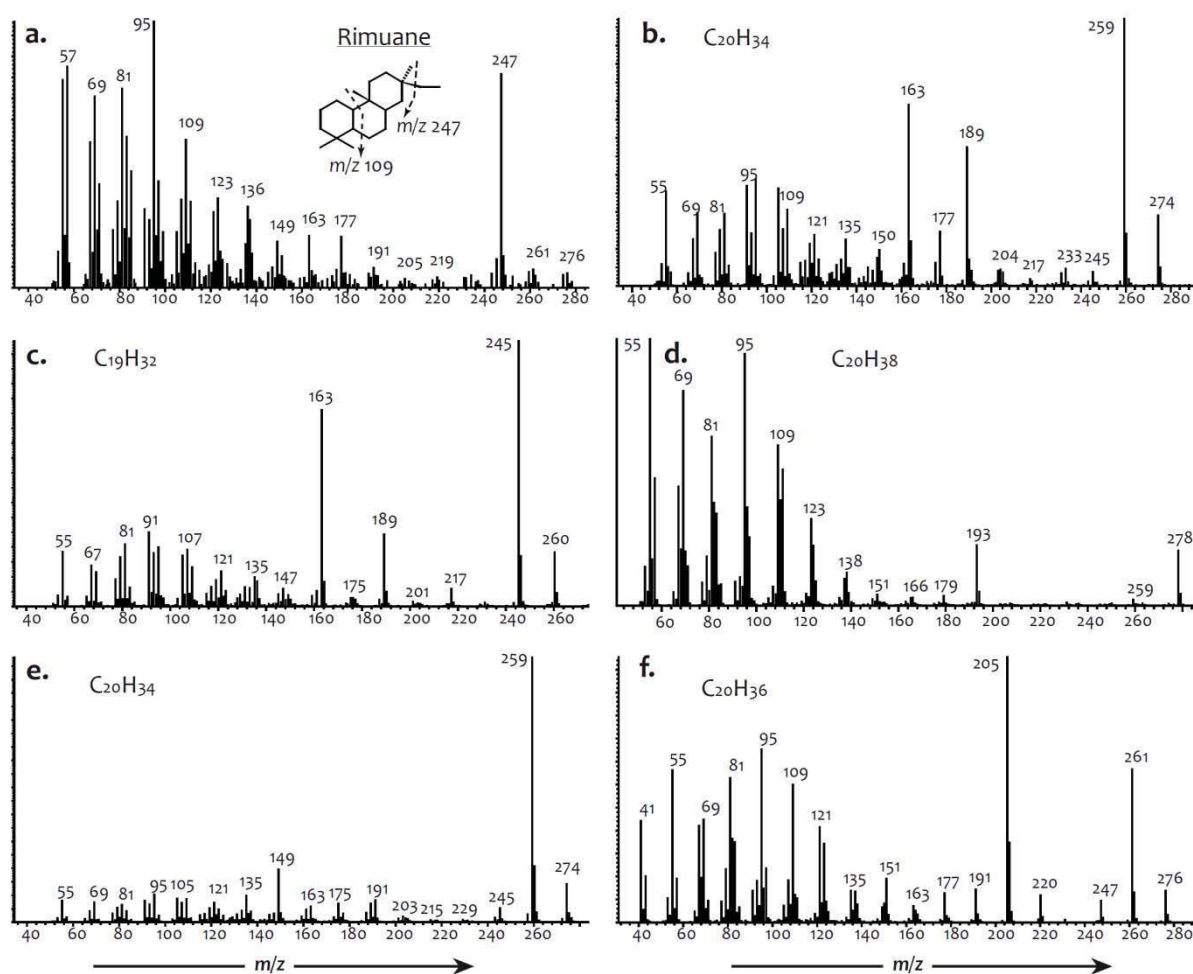


Fig. VI.12: Mass spectra of some Cupressaceae diterpenoids detected in the aliphatic fraction from pyrolysis with $LiAlH_4$. a.: tentatively identified as rimuane (according to Philp (1985); Noble et al., (1986); b., c., d., e., f. : unidentified and recurrent saturated diterpenoids.

3.3. Sesquiterpenoid composition of artificially matured Taxodiaceae

Sesquiterpenoids like farnesane, bisabolanes, eudesmanes, cedranes, cadalanes, chamazulene as well as pentamethyl-dihydroindenes are all detected in artificially matured Taxodiaceae representatives (Fig. VI.13). Farnesane shows high relative abundance in *Metasequoia glyptostroboides* and *Taxodium distichum*. It is relatively less abundant in the other representatives and is absent in the case of *Cryptomeria japonica* and *Cunninghamia konishii* (Tab. VII.4). Bisabolanes are identified as saturated bisabolane and dihydro-*ar*-curcumene that are found in most of the matured Taxodiaceae species, except for *Metasequoia* and *Sequoia*, in which they are present at trace level (Fig. VI.13 and Fig. VI.14). Eudesmanes represent the major sesquiterpenoids in *Cunninghamia*, *Metasequoia* and *Sequoia*. In *Cryptomeria* and *Taxodium*, eudesmanes are generally detected at trace level. Specific tricyclic sesquiterpenoids like cedranes are also identified in the matured Taxodiaceae species. They are identified as α -cedrane and α -cedrene. They represent the major sesquiterpenoids in *Metasequoia* and *Sequoia*, and display low amount in matured *Cryptomeria*, *Cunninghamia* and *Taxodium*. Cadalanes, identified as saturated cadalanes, calamene, calamenene, norcadalene and cadalene, represent the major sesquiterpenoids in all matured Taxodiaceae representatives. Concerning chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes, they represent the major sesquiterpenoids in *Cunninghamia* and *Sequoia* representatives.

3.4. Diterpenoid composition of artificially matured Taxodiaceae

Labdanes are detected in the aliphatic fraction (pyrolysis with LiAlH_4) of matured Taxodiaceae representatives (Fig. VI.14). They represent the major diterpenoids in *Cunninghamia lanceolata* and *Metasequoia glyptostroboides*. In the other representatives, labdanes are generally detected at trace level (Tab. VI.4).

Many **abietanes** were recovered in matured Taxodiaceae representatives. They are detected as saturated abietanes and norabietanes in the aliphatic fractions, and as 19- and 18-

norabieta-8,11,13-trienes, bisnorsimonellite, bisnorabietantriene, methyl-bisnorabietariene, tetrahydroretene, dehydroabietane, simonellite, bisnorsimonellite and retene in the aromatic fractions of plant pyrolysates (**Fig. VI.13** and **Fig. VI.14**). As for the Cupressaceae, phenolic abietanes (ferruginol and sugiol) display predominance over abietanoic acids. No callitricic abietane was found in the matured Taxodiaceae representatives. Abietanes represent the major diterpenoids in matured *Cryptomeria*, *Cunninghamia* and *Taxodium* genera, whereas they are detected as minor compounds in matured *Metasequoia* and *Sequoia* (**Tab. VI.4**).

Pimarane/isopimaranes are detected in matured Taxodiaceae representatives with various relative abundances. Saturated (isopimaranes and norisopimaranes) and aromatic isopimaranes (16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene and pimanthrene) represent the major diterpenoids in *Sequoia sempervirens*, but show low amount in the other representatives, especially in *Cunninghamia lanceolata* and *Taxodium distichum* (**Fig. VI.14**; **Tab. VI.4**).

Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons like 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene show high relative abundance in *Cunninghamia* representatives. Such tricyclic compounds with opened A-ring are found at trace level in other matured Taxodiaceae representatives.

Tetracyclic compounds like **phyllocladanes** and **ent-kauranes** are only present in matured *Cryptomeria*. *Ent-kauranes* are major diterpenoids, while phyllocladanes are only detected at trace level (**Tab. VI.4**). Moreover, *ent-beyerane* was also found but in a low relative abundance in matured *Sequoia*.

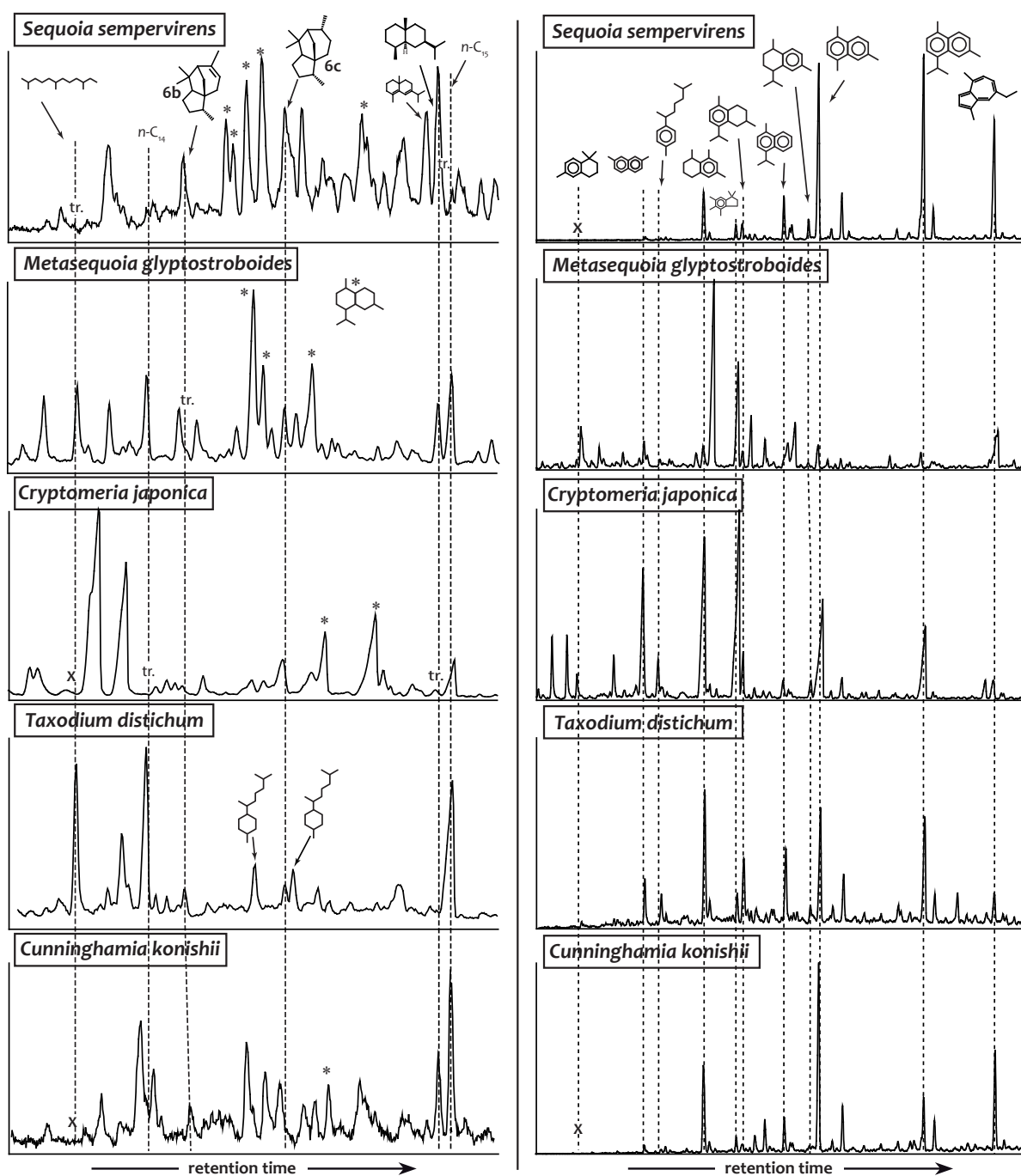


Fig. VI.13: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxodiaceae representatives obtained from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH_4 . The mass spectra of 6b and 6c are given in Fig. VI.6. X: absence of compound; tr.: at trace level; *: cadalane-type compounds.

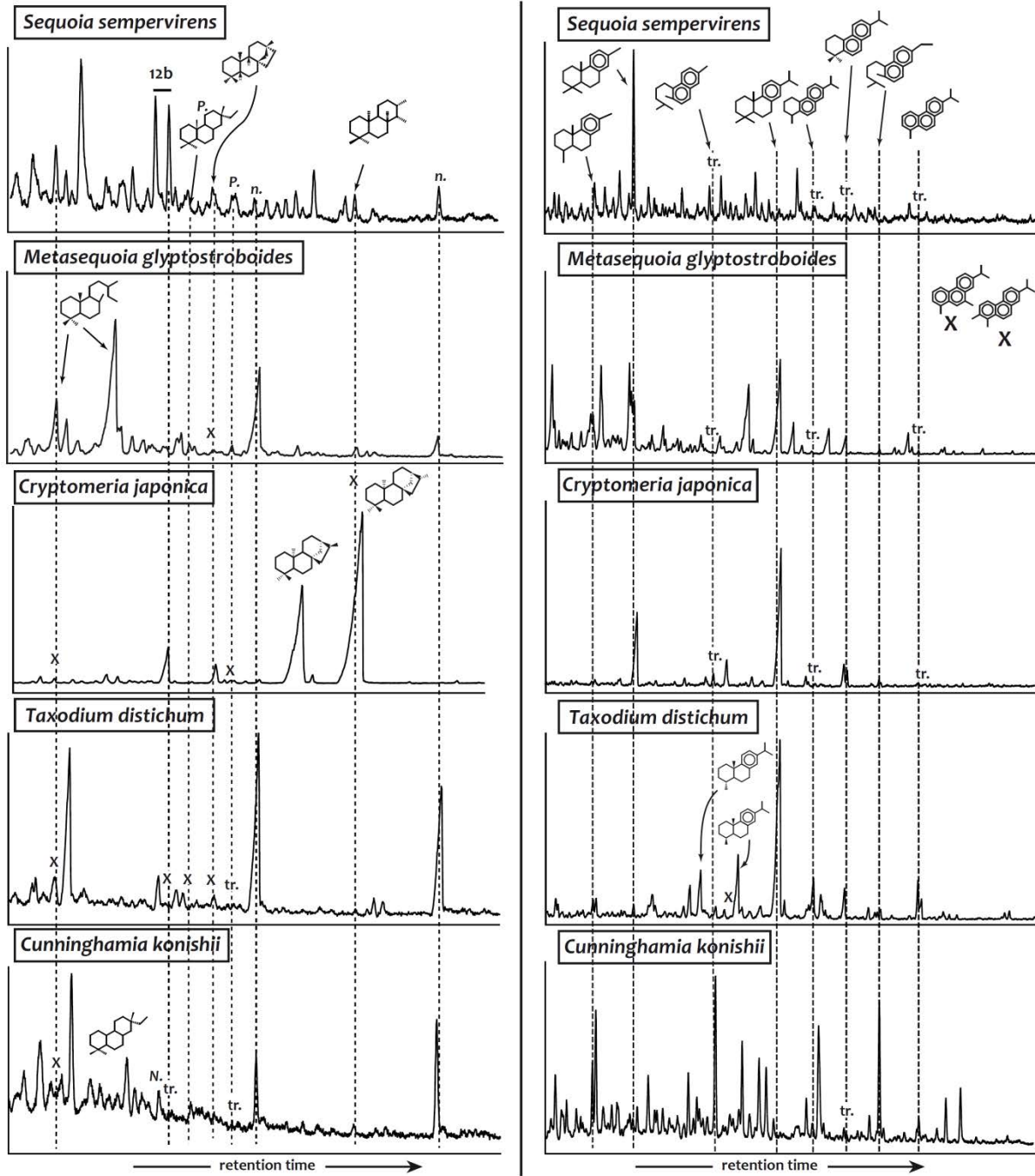


Fig. VI.14: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxodiaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH_4 . The mass spectrum of 12b is given in Fig. VI.12. X: absence of compound; tr.: at trace level.

Tab. VI.3: Major sesqui- and diterpenoid derivatives detected in maturated Cupressaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without (aromatic compounds) LiAlH_4 as reducing agent. Ph. : phenolic abietane ; Ab. : abietanoic acids ; C. : callitricic abietane

Class of structure	Sesquiterpenoids										Diterpenoids									
	Farneane	Bisabolanes	Eudesmanes	Cedranes	Cuparanes	Cadalanes	Chamazulenes	Pentamethyl-dihydroindenes	Labdanes	Abietanes	Pimaranes	Totaranes/sempevirane	Rimanes	Beyerane	Phyllociadanes	auranes	lembrane	isonexyli-alkylaromatic hydrocarbons		
	Ph.										Acids									
	Ab.										Cal.									
<i>Calocedrus</i>	tr.	++	/	+++	++	+	tr.	++	++	+	++	+	/	/	/	/	+++	+++		
<i>Microbiota</i>	/	/	+++	+++	+++	+++	tr.	tr.	tr.	+++	+	++	/	/	/	/	+	+		
<i>Platycladus</i>	/	/	+++	+	+	+	+	++	tr.	++	++	++	/	/	/	/	+++	+++		
<i>Thujaopsis</i>	+	+++	+++	/	/	++	/	+	++	++	+	++	tr.	+++	/	/	+++	+++		
<i>Thuja</i>	+	+	+	/	+	+	/	+	++	++	+	+	tr.	+++	/	/	+++	+++		
	+	++	++	/	/	+++	/	tr.	+	+++	+	++	tr.	++	/	+	++	++		
	+	++	tr.	+	+++	+++	tr.	tr.	+	++	tr.	++	tr.	+++	+	/	++	++		
	++	++	+	/	tr.	+++	tr.	tr.	+	++	++	+++	/	++	+	+	tr.	tr.		
	/	++	+	++	++	+++	+	tr.	+++	+	tr.	++	tr.	+++	+	++	+++	+++		
	++	++	+	tr.	++	+++	tr.	+	++	+	tr.	++	tr.	+++	/	/	++	++		
<i>Cupressocyparis</i>	++	++	++	tr.	tr.	+++	/	++	+++	+	++	+++	tr.	tr.	+	+	++	++		
<i>Cupressus</i>	tr.	++	+	tr.	/	+++	/	+	+++	+	++	++	/	/	+	/	++	++		
	tr.	tr.	++	++	/	+++	/	+	+++	+	++	++	/	/	+	/	+++	+++		
	+	++	+	/	/	+++	/	+	+	+	tr.	+	/	/	/	/	+	+		
	+	++	++	/	/	+++	/	++	+	+	+	/	/	/	/	/	++	++		
	+	+	+	+	tr.	+++	/	+	+++	+	tr.	/	+	+	/	/	+++	+++		
	tr.	tr.	tr.	tr.	/	+++	/	+	++	+	tr.	/	/	/	/	/	+++	+++		
	+	+++	+++	+	/	+++	/	tr.	++	+	+	+	/	/	/	/	tr.	tr.		

Tab. VI.4: Major detected sesqui- and diterpenoid derivatives detected in maturated Taxodiaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without LiAlH₄ (aromatic compounds).

Class of structure	Sesquiterpenoids											Diterpenoids										
	Farnesane	Bisabolanes	Eudesmanes	Cedranes	Cupranes	Cadalanes	Chamazulene	Pentamethyl-dihydroindenes	Labdanes	Abietanes	Pimaranes	Totarane /sempervitrans	Isocopalane	ent-beyerane	Phyllocladanes	ent-kauranes	Cembranes	Isohexylalicylaromatic hydrocarbons				
<i>Cryptomeria japonica</i>	/	+	tr.	+	/	++++	+	+	tr.	++	+	/	/	/	tr.	++++	/	tr.				
<i>Taxodium distichum</i>	+++	++	tr.	++	/	+++	++	++	tr.	+++	+	/	tr.	/	/	/	/	tr.				
<i>Taxodium mucronatum</i>	+	+	+	tr.	/	+++	+	tr.	tr.	+++	+	/	tr.	/	/	/	/	tr.				
<i>Sequoia sempervirens</i>	tr.	tr.	+++	+++	/	++++	+++	++	tr.	+	+++	/	+	+	/	/	/	tr.				
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	++	tr.	++	++	/	++	+	++	+++	+	++	/	tr.	/	/	/	/	tr.				
<i>Cunninghamia konishii</i>	/	tr.	++	+	/	++	++	++	tr.	++	+	/	+	/	/	/	/	++++				
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	+	++	+++	tr.	/	+++	++	+	+++	++	+	/	+	/	/	/	/	+++				

phenolic acid

4. DISCUSSION

The fossil molecular signature of the Cupressaceae and Taxodiaceae families is assessed throughout respectively 18 and 7 extant species using artificial maturation by confined pyrolysis. It was shown that the Cupressaceae and Taxodiaceae show similar molecular signature that is quite distinctive to the other conifer families. The Cupressaceae and Taxodiaceae display a remarkable diversity in sesqui- and diterpenoids. More than 20 different types of carbon skeletons are identified in this study ([Tab. VI.3](#) and [Tab. VI.4](#)). Both the Cupressaceae and Taxodiaceae show many compounds that are common and/or shared with one or several other conifer families. These two families, especially the Cupressaceae, exhibit also more specific compounds that are recognized as typical biomarkers.

4.1. Shared molecular signatures of matured Cupressaceae and Taxodiaceae

The Cupressaceae and Taxodiaceae are made up of bisabolanes, eudesmanes, cadalanes, cedranes, chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes. Matured Cupressaceae and Taxodiaceae are mainly characterized by the presence of **cedranes** (cedrane and α -cedrene).

Indeed, occurrence of cedrane/cedrenes is clearly restricted to the Cupressaceae and Taxodiaceae species and these compounds are generally absent in the other matured conifers species ([Chapter IV](#), [V](#) and [Chapter VII](#)). This reveals the relevant palaeochemotaxonomic meaning of cedranes, as it was already recognized by several authors. Yet, these compounds were frequently used to support a Cupressaceae and/or Taxodiaceae origin/contribution to Cretaceous coals, resins and ambers in previous studies (e.g. [Noble et al., 1985](#); [Otto et al., 2002a](#); [Marynowski et al., 2007](#); [Pereira et al., 2009](#)). Cedranes were also used by [Staccioli et al. \(1997\)](#) and [Otto et al. \(1999\)](#) to link the extinct *Taxodioxylon gypsaceum* and *Sphenolepis pecinovens* to the Taxodiaceae family.

Moreover, bisabolanes (saturated bisabolanes, dihydro-*ar*-curcumene), eudesmanes (4 α (H)-eudesmane, 4 β (H)-eudesmane) and cadalanes (saturated cadalanes, calamene,

calamenene, cadalene, norcadalenes) represent the major sesquiterpenoids. Chamazulene, pentamethyl-dihydroindenes were found in both of these two families but with low amount. However, due to the ubiquitous occurrence of bisabolanes, eudesmanes, cadalanes, chamazulene, pentamethyl-dihydroindenes in numerous conifers families like Araucariaceae, Pinaceae, Podocarpaceae (**Chapter IV, V and Chapter VII**), these compounds do not display any remarkable palaeochemotaxonomic significance, neither for the matured Cupressaceae nor for the Taxodiaceae family.

Fossil Cupressaceae and Taxodiaceae share also numerous diterpenoids that are represented by labdanes, pimaranes and abietanes (including abietanoic acids and phenolic abietanes). One of the main characteristics of the fossil Cupressaceae and Taxodiaceae is for the predominance of phenolic abietanes over abietanoic acids. The high amount phenolic abietanes, especially ferruginol, was even used by several authors as a specific molecular feature for fossil Cupressaceae and Taxodiaceae ([Otto et al, 1997, 2001](#); [Otto and Simoneit, 2001](#)).

Other diterpenoids like labdanes and pimaranes are also present but they do not carry any valuable palaeochemotaxonomic specificity within the conifers.

4.2. Distinctive molecular features of matured Cupressaceae and Taxodiaceae

In addition to these shared characteristics, each of these two families exhibits some particularities.

Matured Cupressaceae could be distinguished from the other families by the presence of **cuparanes**. The latter are presented by cuparene and cuparenol. Indeed, occurrence of the cuparanes is restricted to the Cupressaceae species and these compounds are not recovered in the other matured conifer species (**Chapter IV, V and VII**). They are

therefore recognized as specific biomarkers for the Cupressaceae family. This is in agreement with the available palaeochemotaxonomic data (e.g. [Grantham and Douglas, 1980](#); [Otto and Simoneit, 2001](#); [Haberer et al, 2006](#)). However, in this study, their presence is only attested in some genera like *Calocedrus*, *Microbiota*, *Platycladus* and *Chamaecyparis* (**Tab. VI.3**).

The Cupressaceae family is also characterized by the presence of high amount of **totaranes** and **semperviranes**. They are represented by totarol and sempervirol. Such compounds were not detected in Taxodiaceae species in this study, whereas they were reported in *Cryptomeria* fresh plant ([Otto and Wilde, 2001](#)).

Furthermore, some other compounds like **isohexyl alkylaromatic hydrocarbons** are found as major diterpenoids for the matured Cupressaceae and *Cunninghamia*, a Taxodiaceae genus. These compounds were also recovered in matured Araucariaceae, Podocarpaceae and Sciadopityaceae species (**Chapter IV, V and VII**), whereas these compounds are absent in the Pinaceae species (**Chapter V**). The biological precursor of such specific molecular structure with opened A-ring is still unknown.

4.3. Intergeneric variability in the molecular signature of matured Cupressaceae and Taxodiaceae

In addition some other specific molecular signatures that characterize one or several genera could also be pointed out.

Callitrisic compounds are restricted to *Juniperus* species. These compounds are absent in the other matured Cupressaceae species and *a fortiori* in other matured conifers. These epimers of abietanoic acids are mainly represented by dehydrocallitrisic acid, 16,17-bisnordehydrocallitrisic acid and dehydrocallitrisal that are found in all *Juniperus* pyrolysates. These compounds are probably produced from callitrisic acid that is found in fresh *Juniperus* species. After an advanced maturation, callitrisic compounds transformed into saturated abietanes, norabietanes and aromatic abietanoids. This restricted occurrence of callitrisic

compounds is in agreement with previous chemotaxonomic and organic geochemical studies (Tabacik-Wlotzka and Poisson, 1971; Anderson, 2006; Menor-Salván et al., 2010). Unfortunately, an advanced stage of maturation of callitrisic acids inevitably leads to the formation of abietanes and their relevant chemotaxonomical information is lost. Moreover, in addition to *Juniperus*, callitrisic compounds were also reported in the representatives of the *Callitris* genus (Carman and Deeth 1967, 1971; Anderson, 2006; Cox et al., 2007). Regrettably, this genus was not investigated in this study.

Rimuane is another diterpenoid that displays a particular distribution within the Cupressaceae genera. It is present in low amount in *Thuja*, *Thujopsis*, *Chamaecyparis* and *Cupressocyparis* pyrolysates and is absent in the other Cupressaceae genera. Its occurrence in *Thuja* and *Thujopsis* was reported in previous chemotaxonomic studies but not for *Chamaecyparis* and *Cupressocyparis* (Kitadani et al., 1974; Otto and Wilde, 2001; Takahashi et al., 2001). No rimuane was found in the pyrolysates of the Taxodiaceae representatives. This absence is also consistent with previous chemotaxonomic and palaeochemotaxonomic studies (Otto et al., 1997; Otto and Simoneit, 2001; Otto and Wilde, 2001; Stefanova, 2004). Rimuane was reported as a major hydrocarbon in fresh *Athrotaxis* (a Taxodiaceae genus that was not investigated in this study ; Appleton et al, 1970) but no rimuane was actually mentioned in previous studies on the terpenoid composition of fossil *Athrotaxis* (e.g. Otto and Simoneit, 2001; Otto et al., 2005).

Tetracyclic diterpenoids, represented by *ent*-beyerane, phyllocladanes and *ent*-kauranes, could be used to distinguish some Cupressaceae and Taxodiaceae genera. Tetracyclic diterpenoids are mainly found in *Thujopsis*, *Thuja*, *Chamaecyparis*, *Cupressocyparis*, *Cupressus* and *Juniperus*, and are absent in the other Cupressaceae genera. In the case of Taxodiaceae, they are found only in *Cryptomeria*. This distribution is in agreement with available chemotaxonomic data (Otto and Wilde, 2001; Dob et al., 2006). Moreover, *Thujopsis*, *Thuja* and *Chamaecyparis* display a different composition of tetracyclic diterpenoids than *Cryptomeria*. The former show high proportion of *ent*-beyerane and the latter is characterized by high proportion of *ent*-kauranes.

Cembranes are only present in *Calocedrus* among the other Cupressaceae genera. Cembranes mainly derive from cembranes that were reported in living *Chamaecyparis funebris*, but has not been mentioned in neither fresh nor fossil *Calocedrus* yet (Adams, 1991; Otto and Wilde, 2001; Otto et al., 2005). *Calocedrus* could be directly distinguished from the Pinaceae genera (*Picea*, *Pinus*, *Larix* and *Pseudotsuga*), which are also characterized by the occurrence of cembranes, by the presence of many biomarkers specific to Cupressaceae like cuparanes, cedranes, totaranes and phenolic abietanes. Isocopalane is found in all Taxodiaceae species except for *Cunninghamia* representatives.

Then, the occurrence of callitrisic compounds, rimuane, tetracyclic diterpenoids, cembranes and isocopalane seems to be a key criteria that may be used for the discrimination of the Cupressaceae and Taxodiaceae genera.

Calocedrus*, *Microbiota* and *Platyclusus form a first subdivision within the Cupressaceae genera. They are characterized by high proportions of cedranes and cuparanes as well as the absence of tetracyclic diterpenoids and eudesmanes. Within these three genera, ***Calocedrus*** could be distinguished from *Microbiota* and *Platyclusus* by the presence of cembranes and bisabolanes. However, since the molecular signature of *Calocedrus* is based on only one representative, care must be taken concerning its molecular signature. The major distinction between ***Microbiota*** and ***Platyclusus*** lies on the relative proportion of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons, since these compounds show higher proportion in *Microbiota*.

Cupressus* and *Juniperus show a close molecular affinity due to the scarcity of tetracyclic diterpenoids and cuparanes. They form therefore the second subdivision. ***Juniperus*** could be distinguished from ***Cupressus*** by the presence of callitrisic abietanes.

Chamaecyparis*, *Thuja* and *Thujopsis constitute the third subdivision. They differ by higher proportions of tetracyclic diterpenoids, in particular *ent*-beyeranes, and the presence of rimuane. Within these three genera, ***Chamaecyparis*** displays a distinct molecular pattern due to the higher diversity in tetracyclic diterpenoids (*ent*-beyerane, phyllocladanes and *ent*-kauranes) and significantly higher proportions of cedranes and cuparanes. *Thuja* and *Thujopsis* display low proportions of cedranes and cuparanes. Then, no obvious distinction between ***Thuja*** and ***Thujopsis*** could be pointed out.

Cupressocyparis displays a close molecular signature to *Chamaecyparis* due to the presence of rimuane and several tetracyclic diterpenoids. However, it differs from *Chamaecyparis* by a lower abundance of *ent*-beyeranes.

Molecular affinities between Taxodiaceae and Cupressaceae mainly lie on the presence of cedranes and the predominance of phenolic abietanes over abietanoic acids. Furthermore, the distinction between these two families could be done on the occurrence of cuparanes, rimuane and totaranes. These compounds are absent from the matured Taxodiaceae representatives. Moreover, isocopalane is also found in most Taxodiaceae genera and is absent in the Cupressaceae family.

Cryptomeria shows a distinctive molecular signature to the other Taxodiaceae genera. It is characterized by the presence of tetracyclic diterpenoids like *ent*-kauranes and phyllocladanes as well as the absence of isocopalane. These tetracyclic diterpenoids are absent from the other Taxodiaceae genera. **Cunninghamia** is the only Taxodiaceae genus that shows significant proportion of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons. The latter are only found at trace level in the other genera.

Regarding *Taxodium*, *Sequoia* and *Metasequoia*, no obvious distinction could be pointed out using the previously defined key criteria. However, **Taxodium** differs from **Sequoia** and **Metasequoia** by the predominance of phenolic abietanes over the abietanoic acids, whereas these two compound classes display similar proportion in *Sequoia* and *Metasequoia*. **Sequoia** shows close molecular affinity to **Metasequoia** and no significant distinction could be therefore highlighted.

Then, it is possible to compare these subdivisions established from palaeochemotaxonomy to the phylogenetic classification based on DNA sequencing. All the investigated Cupressaceae species belong to the Cupressoideae subfamily. This subfamily is subdivided into four different groups (Gadek et al., 2000). *Calocedrus*, *Microbiota* and *Platycladus* form the first one. *Cupressus* and *Juniperus* form the second one. The third group is only formed by *Chamaecyparis* and the fourth by *Thuja* and *Thujopsis*. It is worth to note that this phylogenetic classification is quiet similar to the palaeochemotaxonomic classification proposed in this study (Fig. VI.15). Regarding the Taxodiaceae family, the investigated species belong to three different groups according to the phylogenetic classification. *Taxodium* and *Crypromeria* form the first one (Taxodioleae subfamily). *Sequoia* and *Metasequoia* form the second group (Sequoioideae subfamily). *Cunninghamia* forms the third group and represents the Cunninghamioideae subfamily (Gadek et al., 2000). The phylogenetic classification of the Taxodiaceae family does not match very well with the palaeochemotaxonomic classification proposed in this study. The major discrepancy between these two classifications is related to *Taxodium* and *Crypromeria*. They belong to the same phylogenetic group, but display different molecular signatures (Fig. VI.15).

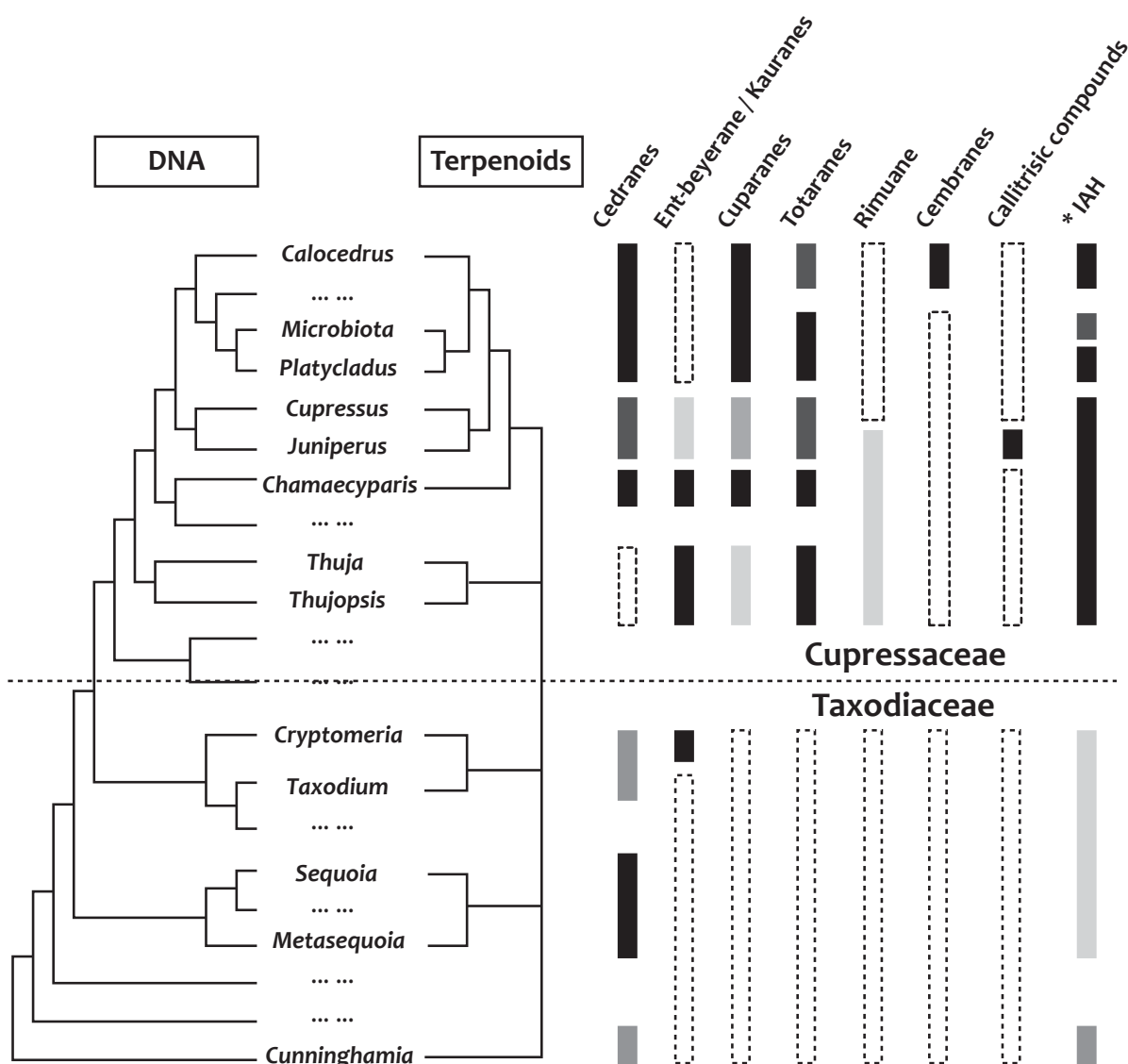


Fig. VI.15: Phylogenetic relationship of Cupressaceae and Taxodiaceae obtained from DNA (Gadek et al., 2000) and palaeochemotaxonomic classifications proposed in this study. *IAH: Isohexyl Alkylaromatic Hydrocarbons. ■: higher proportion; ■: significant high proportion; ■: significant proportion; ■: low proportion; □: absence.

Chapitre VII

**DETERMINATION DE LA SIGNATURE
MOLECULAIRE DES CONIFERES FOSSILES
PAR LA PALEOCHIMIOTAXONOMIE
EXPERIMENTALE – PARTIE 4 : TAXACEAE,
SCIADOPITYACEAE ET PODOCARPACEAE**

Chapitre VII. Determination de la signature moléculaire des conifères fossiles par la paleochimiotaxonomie expérimentale – partie 4 : Taxaceae, Sciadopityaceae et Podocarpaceae

1. SOME GENERALITIES ABOUT PODOCARPACEAE, TAXACEAE AND SCIADOPITYACEAE FAMILIES

1.1. Taxonomy, geographical distribution and living environment

Podocarpaceae

The **Podocarpaceae** live in tropical Australasian regions, South America and southeastern Asia. With more than 170 extant species, the Podocarpaceae family is the third-largest conifer family in terms of diversity. Within the different conifer families, Podocarpaceae has a close phylogenetic relationship to Araucariaceae (**Fig. VII.1 a**; [Setoguchi et al., 1998](#); [Quinn et al., 2002](#)). Its phylogenetic position within the conifers and the phylogenetic classification of its extant genera are given in **Figure VII.1**.

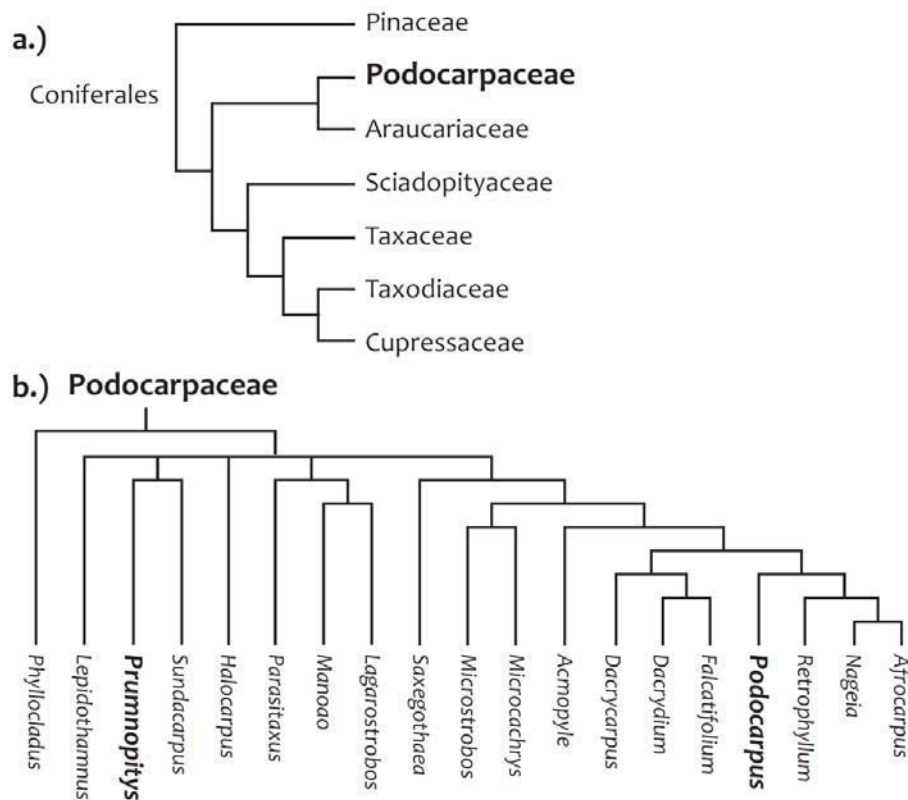


Fig. VII.1: a.) Phylogenetic relationship of Podocarpaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequencing (Stefanovic et al., 1998). b.) Phylogenetic relationships of extant Podocarpaceae genera according to Kelch (1998) and Conran et al. (2000).

Most of these 19 extant genera possess less than five living species. Five of them are monophyletic whereas *Podocarpus* and *Dacrydium* are the only genera to possess more than ten living species.

Podocarpus is the largest genus of the Podocarpaceae family with more than 100 well-defined species in the world. They are widely distributed in the South Hemisphere, more particularly in Australia, South America and South Asia. *Podocarpus* is a sister genus of *Afrocarpus*, *Nageia* and *Retrophyllum*.

Dacrydium, *Falcatifolium* and *Dacrycarpus* form a sister group with previously mentioned genera. About 21 living species of *Dacrydium* are widely distributed from southeastern Asia to the numerous Pacific islands.

Phyllocladus is the most basal genus of the Podocarpaceae family (Conran et al., 2000; Quinn et al., 2002). Its species live in Tasmania, Malaysia, New Guinea and New Zealand.

Taxaceae

Taxaceae live in the North Hemisphere and more particularly in Europe, south Asia and in the eastern and western parts of the USA. Their habitats occur from cool-temperate to tropical regions. Unlike the other conifer families, Taxaceae often lack of resin canals. This explains why the Taxaceae family was considered as an individual order named Taxales for a long time. However, recent genetic and micromorphological studies support that Taxaceae is actually a monophyletic conifer family having a close phylogenetic relationship with the Cupressaceae and Taxodiaceae families (Fig. VII.2a; Chase et al., 1993; Stefanović et al., 1998; Anderson and Owens, 1999; Quinn et al., 2002; Price, 2003; Hao et al., 2008). Nowadays, 26 well-defined Taxaceae species are regrouped into 6 genera and 3 subfamilies. *Taxus*, *Pseudotaxus* and *Austrotaxus* genera belong to the Taxaeae subfamily that is characterized by the absence of resin canals in their leaves. *Torreya* and *Amentotaxus* belong to the Torreyaeae subfamily while *Cephalotaxus* belongs to the Cephalotaxaceae. These two subfamilies are characterized by the presence of resin canals in their leaves. Phylogenetic relationships within the extant Taxaceae genera are given in Figure VII.2b (Cheng et al., 2000; Hao et al., 2008).

Taxus is composed of eight living species in the world. They are all allopatric and confined to moist temperate to tropical forests of the Northern Hemisphere.

Torreya is composed of six species found in China, Japan, California and Florida.

Most of the eleven *Cephalotaxus* species are evergreen trees. They are widely distributed in southeastern Asia.

Sciadopityaceae

Sciadopityaceae is composed of only one living species, *Sciadopitys verticillata*. It also includes the extinct fossil genus *Sciadopitytes* Menzel (Christophel, 1973; Yao et al., 1998). *Sciadopitys verticillata* has been classified within the Taxodiaceae family for a long time (Page,

1990). But, according to biochemical evidences, *Sciadopitys* was then considered as a monotypic family close to the Taxaceae, the Cupressaceae and the Taxodiaceae (Fig. VII. 2b; Brunsfeld et al., 1994; Stefanoviac et al., 1998). Nowadays, *Sciadopitys* is endemic to Japan and their trees grow in low-mid altitude forests (500-1000 m) where rainfall is sufficient for their development.

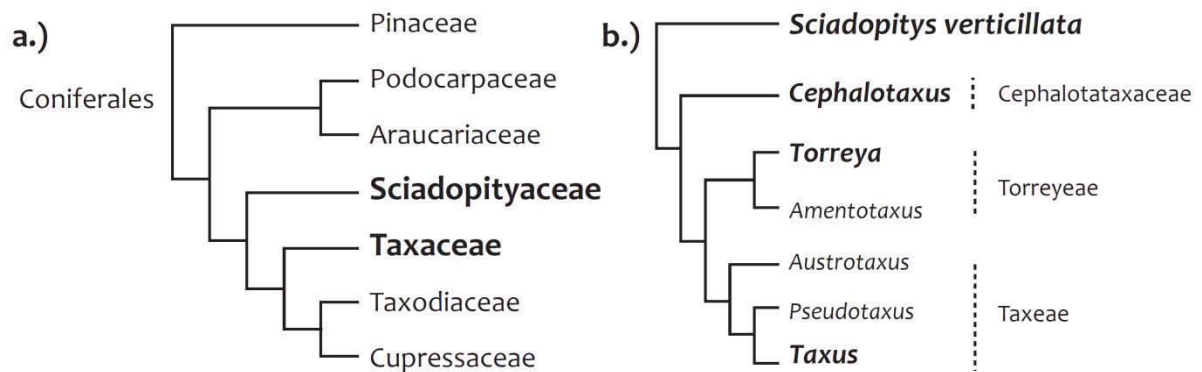


Fig. VII.2: a.) Phylogenetic relationship of Taxaceae and Sciadopityaceae with other existent conifer families based on 28S rRNA gene sequencing (Stefanoviac et al., 1998); b.) Phylogenetic relationships of extant Taxaceae and Sciadopityaceae genera according to Hao et al. (2008).

1.2. Evolution of the Podocarpaceae, Taxodiaceae and Sciadopityaceae through geological times

Podocarpaceae appeared during the Late Triassic in the Southern Hemisphere (Townrow, 1967, 1969). It was followed shortly after by the emergence of the Sciadopityaceae and Taxaceae families in Europe (Bock, 1969; Won and Renner, 2006; Fig. VII.3). From the Jurassic to the Cretaceous, the Podocarpaceae progressively diversified. Their palaeogeographic distribution extended towards the Northern Hemisphere then covered a large range of climates, from warm temperate to winter wet regions (Reymanówna, 1987; Gnaedinger, 2007). Their fossils were found in many Jurassic and Cretaceous sedimentary rocks from Central Europe, Central Asia, South America, Africa and Australia (Gomolitzky, 1962; Townrow, 1967, 1969; Krassilov, 1974; Gnaedinger, 2007). During this period, **Sciadopityaceae** extended mainly in temperate regions of Eurasia and North

America (Stockey et al., 2005; Jiang et al., 2012) whereas **Taxaceae** colonized Europe, Asia and North America during the Mesozoic (Miller Jr, 1977; Hao et al., 2008).

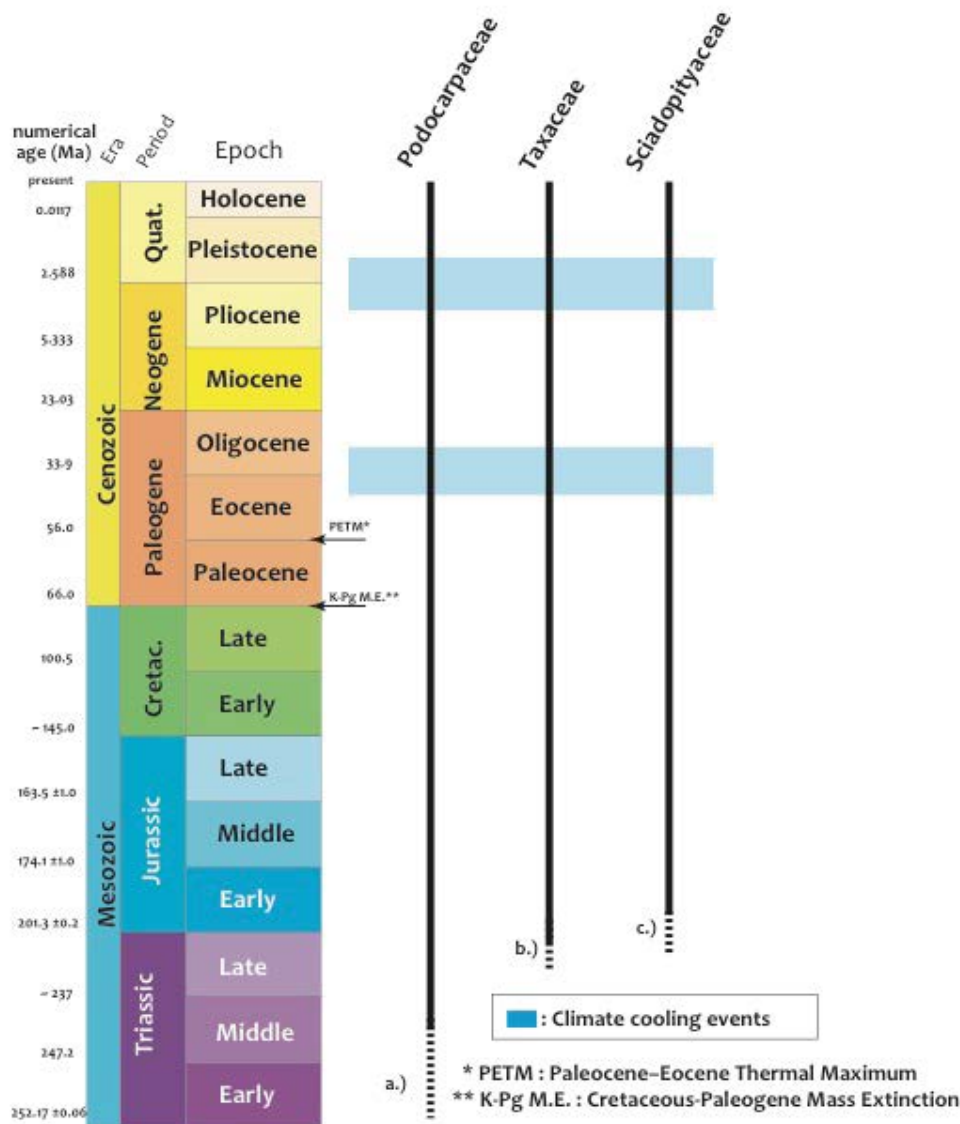


Fig. VII.3: Emergence and evolution of the Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae families. Compilation of data based on a.) Townrow (1967, 1969), b.) Bock (1969) and c.) Won and Renner (2006). Geologic time scale from the International Commission on Stratigraphy (ICS, version 2013/01).

During the Cenozoic, the Oligo-Miocene and the Plio-Pleistocene cooling events substantially affected the diversity and populations of the Podocarpaceae, Sciadopityaceae and Taxaceae (Fig. VII.3). During the Plio-Pleistocene cooling event, the decrease of temperature was also accompanied by an increase of aridity that caused significant reduction

of their population and diversity (Michaux et al., 1979; Hill and Carpenter, 1991). Distribution of the Taxaceae became restricted to several sites from the Northern Hemisphere. Podocarpaceae retreated from the Northern Hemisphere and became restricted to the Southeastern Asia (Jordan, 1995; Wagstaff, 2004; Jin et al., 2010). The distribution of Sciadopityaceae was dramatically reduced to the mid to high latitudes during the Pliocene before being confined to moist forests of Japan (Willard, 1994, 1996).

1.3. Chemotaxonomy

Available chemotaxonomic data on the terpenoid composition of extant Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae species is here summarized.

1.3.1. *Podocarpaceae*

A series of detailed studies, named 'Chemistry of the Podocarpaceae', were achieved by Briggs and Cain (1959), Cambie and Mander (1962), Cambie and Franich (1970). These authors focused on the chemical composition of a restricted number of Podocarpaceae genera like *Podocarpus* and *Dacrydium*. The available data about the chemotaxonomy of the Podocarpaceae is therefore incomplete.

The sesquiterpenoids composition of the Podocarpaceae family is characterized by the presence of longibornanes, longifolanes, longipinanes, caryphyllanes, humulanes, selinanes, elemanes and cadalanes (Berry et al., 1985; Hinkley et al., 1994; Otto and Wilde, 2001). As most of these sesquiterpenoids are synthesized by a large number of conifer species, they do not bear any valuable chemotaxonomic information.

The Podocarpaceae representatives synthesize many diterpenoids. Some diterpenic classes seem to be specific to this family, like podocarpanes. These tricyclic diterpenoids are mainly found as podocarpic acids in living Podocarpaceae. Owing to their restricted

occurrence within the conifers, podocarpanes seem to be specific to the Podocarpaceae family (Cambie et al., 1984; Lorimer and Weavers, 1987; Otto and Wilde, 2001). In addition to podocarpanes, other diterpenoids like labdanes, rimuane, pimaranes, isopimaranes, totaranes, abietanes (including both abietanoic acids and phenolic abietanes) and tetracyclic diterpenoids are also produced by extant Podocarpaceae species (Cambie and Mander, 1962; Aplin et al., 1963; Bennett and Cambie, 1966; Wenkert et al., 1974; de Paiva Campello et al., 1975; Cambie et al., 1983, 1984; Lorimer and Weavers, 1987; Grimalt et al., 1989)

1.3.2. Taxaceae

Extant Taxaceae species are reputed to synthesize low amount of terpenoids. Sesquiterpenoids like caryophyllanes, humulane, germacrene, elemene, eudesmanes and cadalanes are reported in the Taxaceae. They are mainly produced by *Cephalotaxus* species (Abdelkafi and Nay, 2012). In the other genera like *Taxus* and *Torreya*, only eudesmanes were reported in the first one and cadalanes in the second one (Otto and Wilde, 2001).

Taxaceae also synthesize diterpenoids like labdanes, isopimaranes and abietanes (phenolic abietanes and abietanoic acids). They are mainly produced by *Cephalotaxus* and *Torreya* species (Harrison and Asakawa, 1987; Orihara et al., 2002; Otto and Wilde, 2001). However, abietanes were also reported in *Taxus celebica* (Appendino, 1995).

Taxus and *Austrotaxus* species synthesize highly diversified alkaloids diterpenoids called taxanes. More than 30 different taxanes are reported and seem to be specific to these two genera (Prasain et al., 2001).

1.3.3. Sciadopityaceae

The terpenoid pattern of the Sciadopityaceae, obtained only from *Sciadopitys verticillata*, shows many similarities to those of the Taxodiaceae. *Sciadopitys* synthesizes cedranes that are also produced by Cupressaceae and Taxodiaceae. Additional terpenoids like

labdanes (*trans*-communic and lambertianic acids), abietanes, rimuanes, phyllocladanes and kauranes are also synthesized (Erdtman and Norin, 1966; Norin et al., 1973; Hasegawa and Hirose, 1985; Ueda et al., 1990). Moreover, *Sciadopitys verticillata* synthesizes verticillool, a megacyclic diterpenoid. This compound seems to be specific to this family (Erdtman and Norin, 1966; Karlsson et al., 1978; Otto and Wilde, 2001; Wang et al., 2009).

2. SAMPLES

3 Podocarpaceae species, 2 *Podocarpus* and 1 *Prumnopitys*, were used in this study. 5 Taxaceae species, 2 *Cephalotaxus*, 2 *Taxus* and 1 *Torreya*, were also studied. *Sciadopityaceae* is represented by its only living representative *Sciadopitys verticillata* (Tab. VII.1).

Family	Genus	Species	Geographical range	Samples provenance
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i> L'Heritier ex Persoon, 1807	<i>alpinus</i> R. Br. ex Hook. f. 1845 Syn.: <i>Nageia alpina</i> ; <i>Nageia parvifolia</i>	New South Wales, Victoria, Tasmania	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
		<i>totara</i> G. Benn. ex D. Don in Lambert, 1828 Syn.: <i>Nageia totara</i>	New Zealand	
	<i>Prumnopitys</i> Philippi, 1860	<i>andina</i> de Laubenfels, 1978 Syn.: <i>Podocarpus andina</i> (before the <i>Prumnopitys</i> was distinguished) Com. : Lleuque	Argentina, Chile	
Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys</i> Siebold et Zuccarini, 1842	<i>verticillata</i> Siebold et Zuccarini, 1842 Syn.: <i>Podocarpus verticillatus</i> (before the family was distinguished) Com. : Umbrella pine	Japan	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
Taxaceae	<i>Cephalotaxus</i> Siebold et Zuccarini ex Endlicher, 1842	<i>fortunei</i> Hooker, 1850 Syn.: <i>C. kaempferi</i> Com.: Plum-yew, Chinese plum yew	Northern Myanmar, China	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
		<i>harringtonia</i> K. Koch 1873 Syn.: <i>Taxus harringtonii</i> Com.: Inugaya, Japanese plum yew, cow's-tail pine	Japan	Botanical Garden of Lyon (Fr.)
	<i>Taxus</i> Linnaeus, 1753	<i>baccata</i> Linnaeus, 1753 Com.: English yew or European yew	Europe, NW Africa, northern Iran and SW Asia	Botanical Garden of Montet (Nancy, Fr.)
		<i>brevifolia</i> Nuttall 1849 Com.: Pacific yew or western yew	NW of North America	
<i>Torreya</i> Arnott, 1838	<i>nucifera</i> Siebold et Zuccarini, 1846 Com.: Kaya	Japan		

Tab. VII.1: Taxonomic relationships, geographical range and provenance of investigated Podocarpaceae, Sciadopityaceae and Taxaceae species.

3. RESULTS

In order to assess the palaeochemotaxonomy of the Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae, the molecular signatures of artificially matured plants were more carefully examined. The molecular patterns of each family were achieved by the examination of the aliphatic fractions obtained using LiAlH_4 during the maturation as well as the aromatic and polar fractions obtained via maturations made without this reducing agent. Moreover, aliphatic, aromatic and polar fractions of the fresh plant samples have also been studied.

3.1. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Podocarpaceae

3.1.1. Sesquiterpenoids

Farnesane is identified in the aliphatic fractions. It displays significant relative abundance in the *Prumnopitys* and is at trace level in the *Podocarpus* representatives (Fig. VII.4). Bisabolanes are detected in the aliphatic and aromatic fractions (Fig. VII.4). They derive from bisabolol that is widely distributed in the polar fraction of the fresh Podocarpaceae extracts.

Cadalanes represent the major sesquiterpenoids. They are represented by saturated cadalanes in the aliphatic fractions as well as by calamene, calamenene, one norcadalene (1-isopropyl-4-methylnaphthalene) and cadalene in the aromatic fractions of plant pyrolysates (Fig. VII.4). These compounds derive from biological precursors like cadinenes, muurolenes, amorphenes and cadinols that are commonly found in the fresh Podocarpaceae representatives. Other sesquiterpenoids like ionene, chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes were also identified (Fig. VII.5). Ionene shows high relative abundance in *Prumnopitys andina*. Chamazulene and pentamethyl-dihydroindenes show significant amount in *Podocarpus* representatives but are absent in the *Prumnopitys*. The relative abundance of sesquiterpenoids varies from one species to another. Occurrence and relative proportion of these sesquiterpenoids in each Podocarpaceae representative are given in Table VII.2.

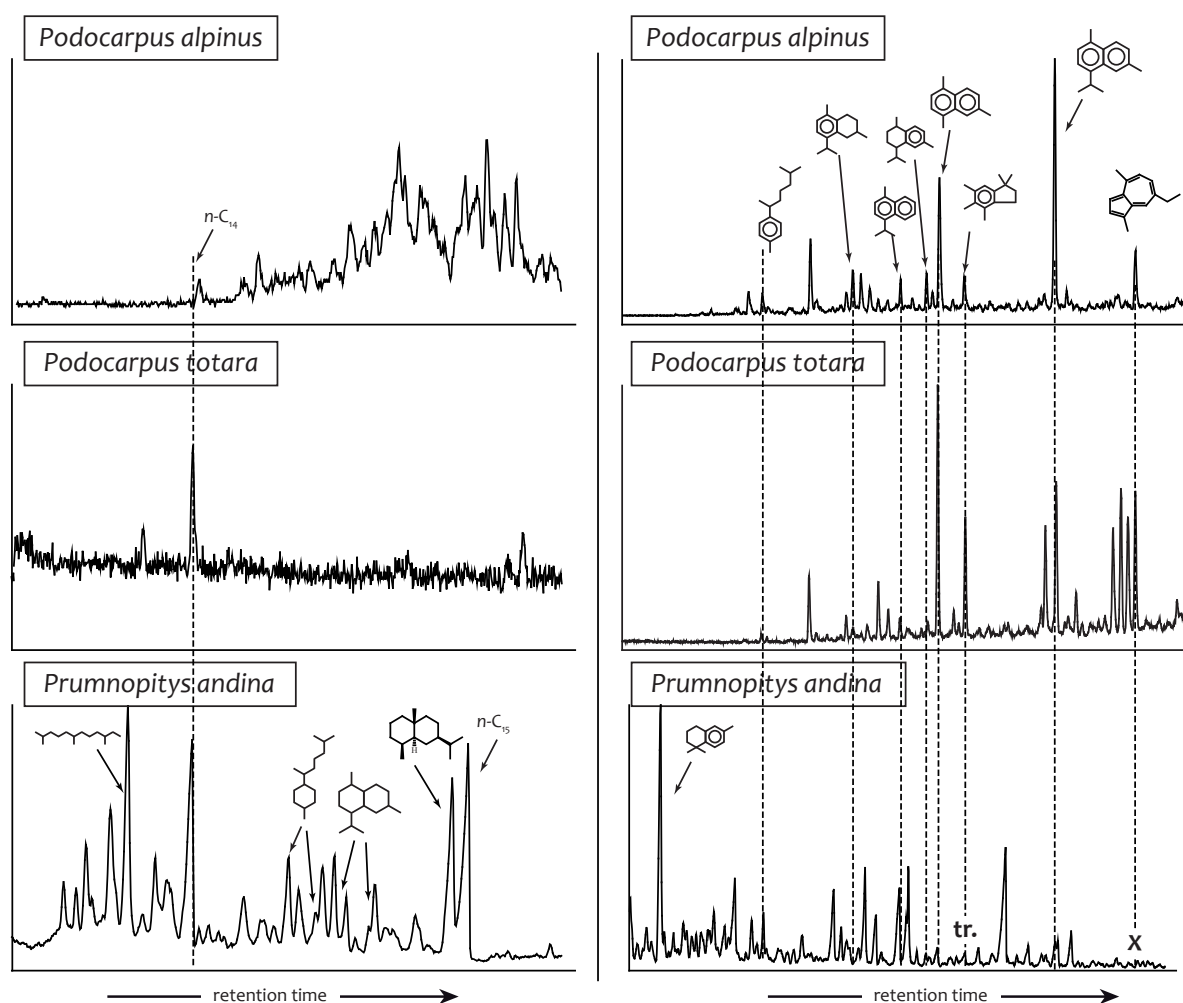


Fig. VII.4: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Podocarpaceae representatives obtained from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level.

3.1.2. Diterpenoids

Labdanes have been detected in the aliphatic fractions of matured Podocarpaceae representatives (Fig. VII.5). They derive from oxide-epimanoyl and labdanoic acids that are widely distributed in the polar fractions of the fresh representatives. These labdanes show significant relative abundances in *Podocarpus totara* and *Prumnopitys andina* but occur at trace levels in *Podocarpus alpinus*.

Abietanes represent the major diterpenoids in all Podocarpaceae representatives, except for *Podocarpus alpinus*. They are identified as saturated abietanes and norabietanes in the aliphatic fractions (low relative abundance) as well as 19- and 18-norabieta-8,11,13-trienes, tetrahydroretene, dehydroabietane, simonellite, retene and 2- and 9-methylretenes in the aromatic fractions of plant pyrolysates (Fig. VII.5). Some oxygenated abietanes like abietanoic acids (dehydroabietic acid) and (keto-)phenolic abietanes (ferruginol, sugiol, hinokiol and abieta-8,11,13-trien-7-one) also show significant amount in the polar fraction of each plant pyrolysate. Phenolic abietanes, more particularly ferruginol and sugiol, show higher relative abundance than abietanoic acids in *Prumnopitys*. Abietanoic acids predominate over the phenolic abietanes in *Podocarpus* (Fig. VII.6).

Pimaranes/isopimarane are also detected. Since no distinction has been made between "normal" pimaranes and their "iso" epimers, these compounds are all identified as pimaranes here. The pimaranes are mainly identified as 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene and pimanthrene that show significant relative abundances in the aromatic fractions (Fig. VII. 5). Dehydropimaric acid (identified as methyl-ester-dehydroabietate) was also identified in the polar fractions of the plant pyrolysates, more particularly for the *Podocarpus* species (Fig. VII.6). These degraded pimaranes derive from unsaturated pimaranes and pimaric acids that are commonly found in the fresh representatives. In addition, pimaranes represent the major diterpenoids in *Podocarpus alpinus* and are minor constituents in the other matured representatives.

Rimuane is also detected in the aliphatic fractions of matured Podocarpaceae representatives (Fig. VII.5). Identification of saturated rimuane is based on the mass spectrum published by Noble et al. (1986). It mainly derives from rimuene that shows high relative abundance in the aliphatic fractions of the fresh representatives. Rimuane displays significant relative abundance in the *Podocarpus* species and occurs at trace levels in the *Prumnopitys* (Fig. VII.5).

Totaranes are also detected in matured *Podocarpus* representatives. They are identified as totarol in low relative abundance in the polar fractions (Fig. VII.6). Diaromatic totarane, that should be produced during the thermal degradation of totarol after Tu and

Philp (2005), was not detected in the matured Podocarpaceae representatives. No totarane was detected in the *Prumnopitys*, neither in the pyrolysate nor in the fresh sample (Fig. VII.6).

In addition, two isohexyl alkylaromatic compounds, 2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene, were also identified in the aromatic fraction of Podocarpaceae representatives (Fig. VII.5). They were also recovered in some other matured conifer species, like Araucariaceae, Cupressaceae and Taxodiaceae (Chapters IV, VI). They are detected in significant relative abundances in *Podocarpus* and at trace levels in *Prumnopitys*.

Tetracyclic diterpenoids, represented by *ent*-beyerane, phyllocladanes and *ent*-kauranes, are also detected in the aliphatic fractions of matured Podocarpaceae species (Fig. VII.5). Moreover, 16-homo-phyllocladane is also identified in accordance to the mass spectrum published by Noble et al. (1986) (Fig. IV. 8e). These compounds derive from tetracyclic diterpenes like beyerene, phyllocladene and kaurene found in high amount in the saturated fractions of fresh plant samples. Phyllocladanes and *ent*-beyerane were respectively only found in *Podocarpus alpinus* and *Podocarpus totara*. *Ent*-kauranes are found in both matured *Podocarpus totara* and *Prumnopitys andina*. These tetracyclic diterpenoids represent major diterpenoids in the matured Podocarpaceae extracts.

Some unidentified compounds were detected in matured Podocarpaceae representatives. They are all characterized by a molecular ion at m/z 274 and share the same base peak at m/z 259 ($M^+ - 14$; Fig. VII. 7 b and c). These unknown compounds, labeled 7a, 7b and 7c in Figure VII. 7, are detected in high relative abundances in *Podocarpus totara* (Fig. VII. 5). They are identified as C_{20} -tetracyclic diterpanes and no precise structure has been determined yet.

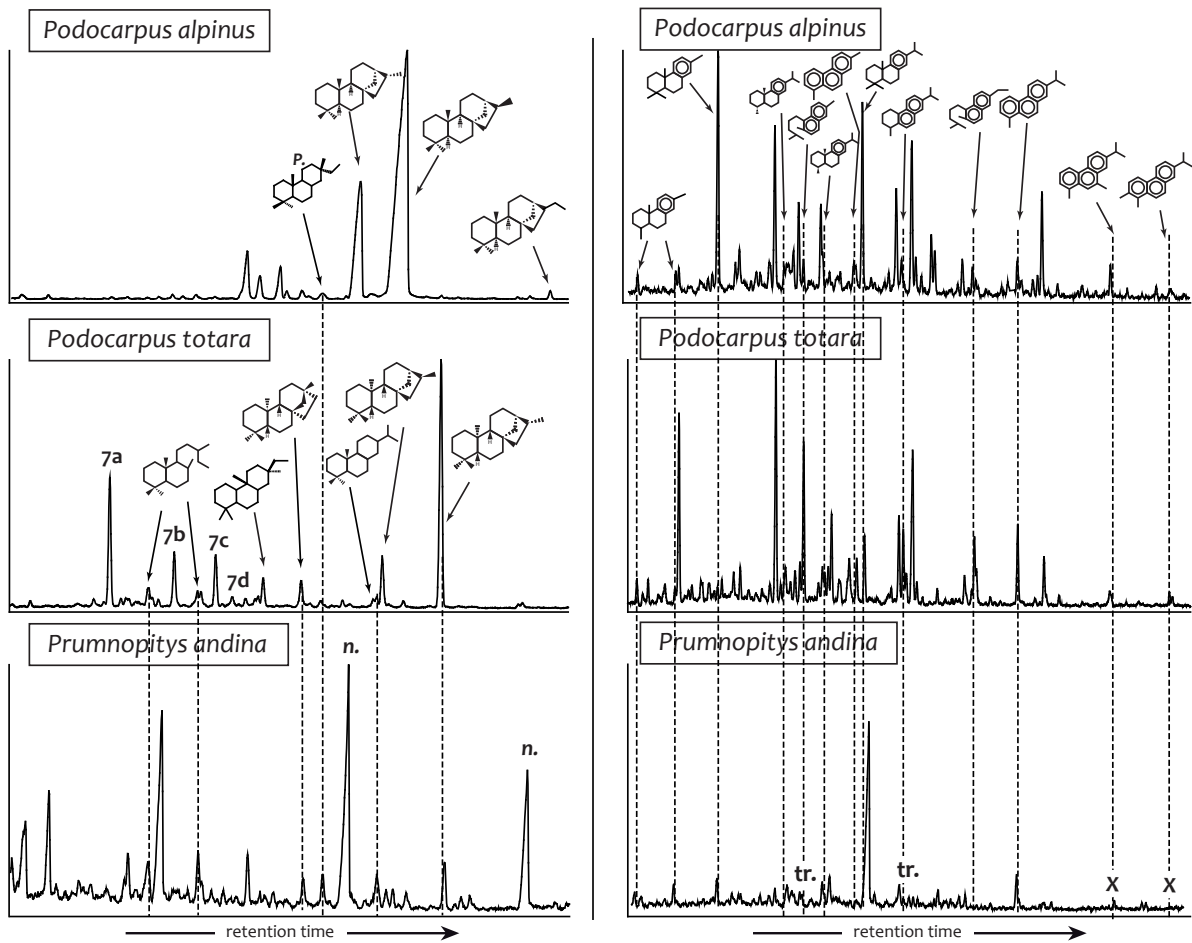


Fig. VII.5: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Podocarpaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . Mass spectra of 7a, 7b, 7c and 7d are given in the Fig. VII.7. P.: pimaranes; X: absence of compound; tr.: at trace level.

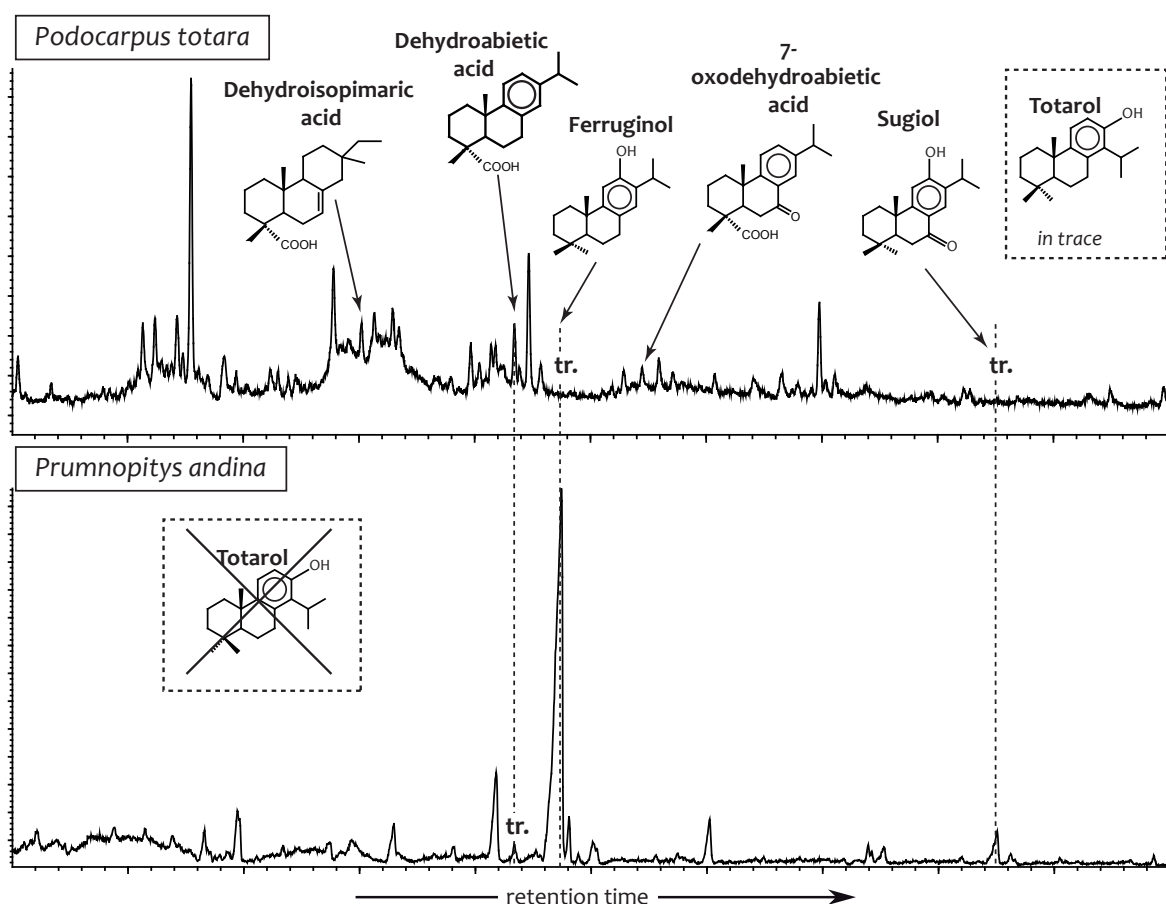


Fig. VII.6: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Podocarpus totara* and *Prumnopitys andina* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 . Dehydroabietic acid identified as methyl-ester-dehydroabietic acid; 7-oxo-dehydroabietic acid identified as methyl-ester-7-oxo-dehydroabietic acid); dehydroisopimaric acid identified as methyl-ester-dehydroisopimaric acid.

3.2. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Taxaceae

3.2.1. Sesquiterpenoids

Farnesane and bisabolanes are detected in several matured Taxaceae representatives (Fig. VII. 8). Farnesane was detected in both matured *Cephalotaxus* and *Torreya* representatives while dihydro-*ar*-curcumene is mainly found in *Torreya nucifera*. No saturated bisabolane was identified in the extract of matured Taxaceae species. These sesquiterpenoids represent minor components in *Cephalotaxus* and *Torreya* representatives and are absent in the other genera.

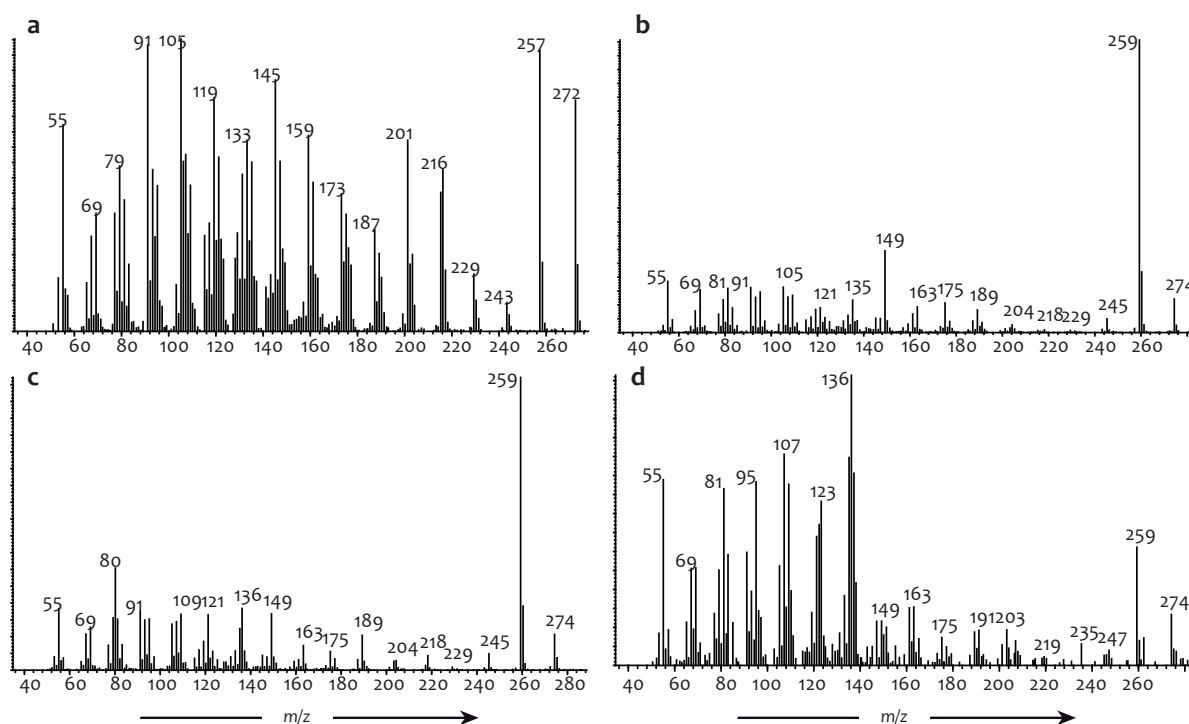


Fig. VII.7: Mass spectra of some Podocarpaceae diterpenoids. a.: unidentified tricyclic compound $C_{20}H_{32}$; b., c. and d.: unidentified $C_{20}H_{34}$ tricyclic compounds.

Cadalanes are the only sesquiterpenoids that are detected with significant abundance in all matured Taxaceae representatives. They are identified as saturated cadalanes in the aliphatic fractions as well as calamene, calamenene, norcadalene and cadalene in the aromatic fractions (Fig. VII. 8). They derive from cadinenes, muurolenes, amorphenes found in the extracts of the fresh Taxaceae.

3.2.2. Diterpenoids

Labdanes are identified in the aliphatic fractions of Taxaceae pyrolysates (Fig. VII. 9). They derive from manool and torulosol that were identified in the polar fractions of the fresh representatives. They show significant relative abundances in matured *Torreya nucifera* and are absent in the other Taxaceae representatives.

Abietanes are found as the major diterpenoids in several matured Taxaceae species. They are detected in significant amount as saturated abietanes and norabietanes in the aliphatic fractions of matured *Taxus baccata* and *Torreya nucifera* as well as 19- and 18-norabieta-8,11,13-trienes, bisnorsimonellite, tetrahydroretene, dehydroabietane, simonellite, retene and 2- and 9-methylretenes in the aromatic fractions of matured *Cephalotaxus* and *Torreya* species (Fig. VII. 9). In addition, some oxygenated abietanes represented by (keto-)phenolic abietanes (abieta-8,11,13-trien-7-one, ferruginol, sugiol) and abietanoic acids also show significant amount in the polar fractions of plant pyrolysates (Fig. VII. 10). Phenolic abietanes display higher amounts than abietanoic acids in matured *Cephalotaxus* representatives. Inversely, abietanoic acids display higher amounts than phenolic abietanes in *Torreya*. The degraded abietanes represent the major diterpenoids for most *Cephalotaxus* and *Torreya* representatives. In *Taxus*, abietanes were only found in *T. baccata* and not in *T. brevifolia*.

Pimaranes are detected in low amount in matured *Torreya* and *Cephalotaxus*. They are identified as saturated pimaranes in the aliphatic fractions, and as 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene as well as pimanthrene in the aromatic fractions (Fig. VII. 9). These compounds mainly derived from unsaturated pimaranes that are found in significant amounts in the extract of fresh *Torreya nucifera*. Most matured Taxaceae species are generally characterized by their scarcity in terpenoids. Occurrence and relative proportion of identified sesqui- and diterpenoids in each representative are given in Table VII.2.

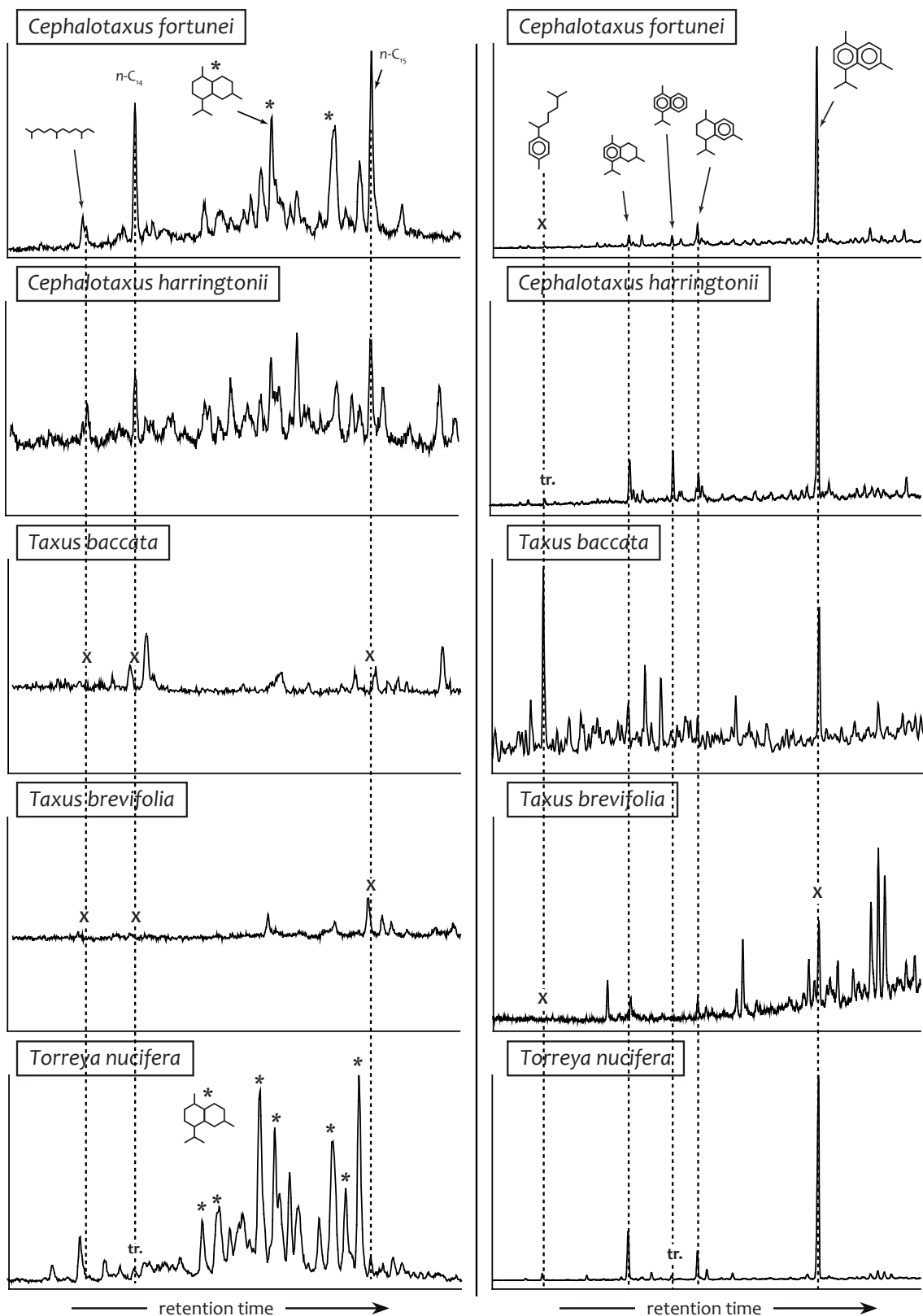


Fig. VII.8: Partial chromatograms (sesquiterpenoids retention time window) of aliphatic (left) and aromatic (right) fractions of Taxaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . X: absence of compound; tr.: at trace level.

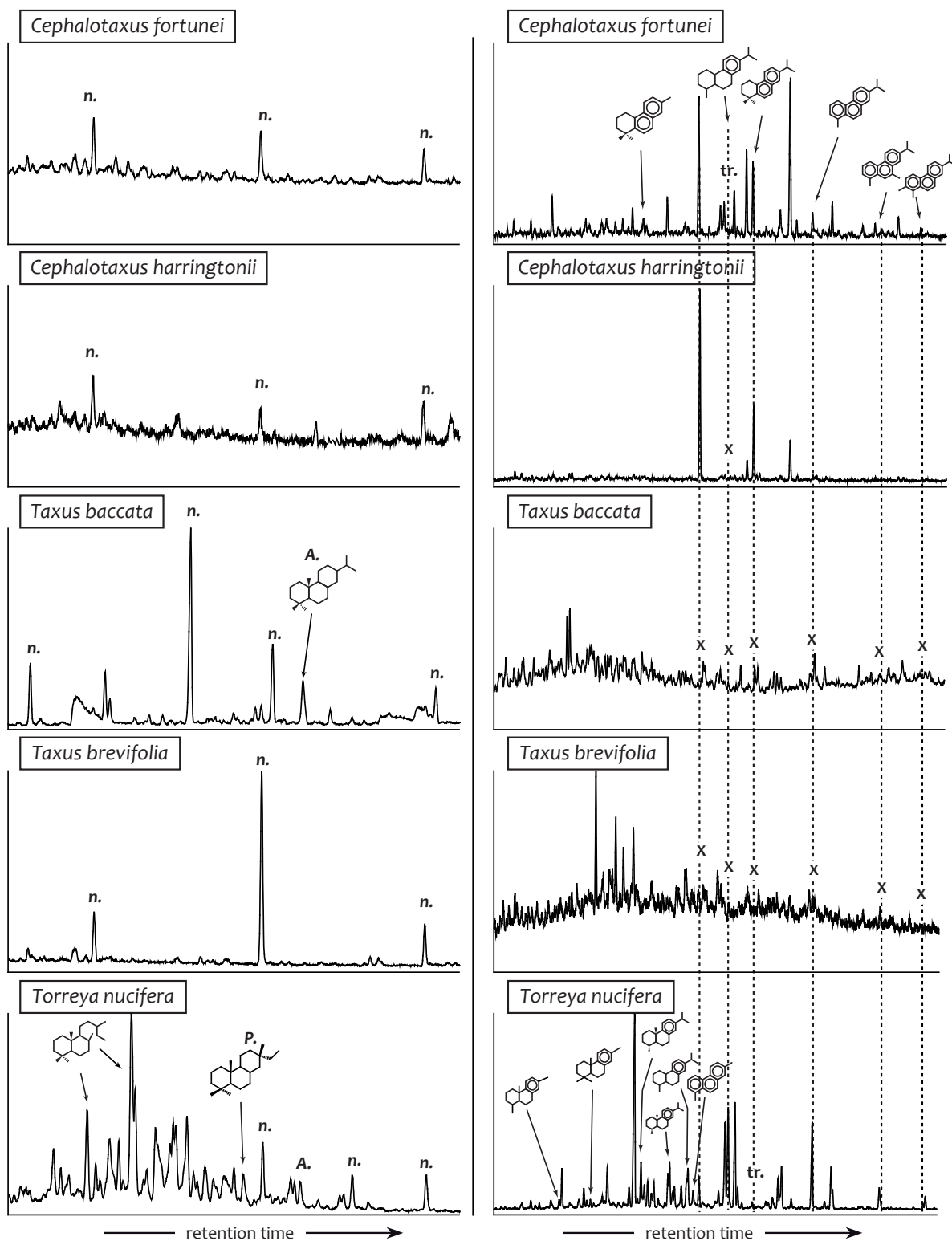


Fig. VII.9: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of aliphatic (left) aromatic (right) fractions of Taxaceae representatives from the pyrolysis with (aliphatic, left) and without (aromatic, right) LiAlH_4 . P.: pimaranes; A.: Abietanes; n.: n-alkanes; X: absence of compound; tr.: at trace level.

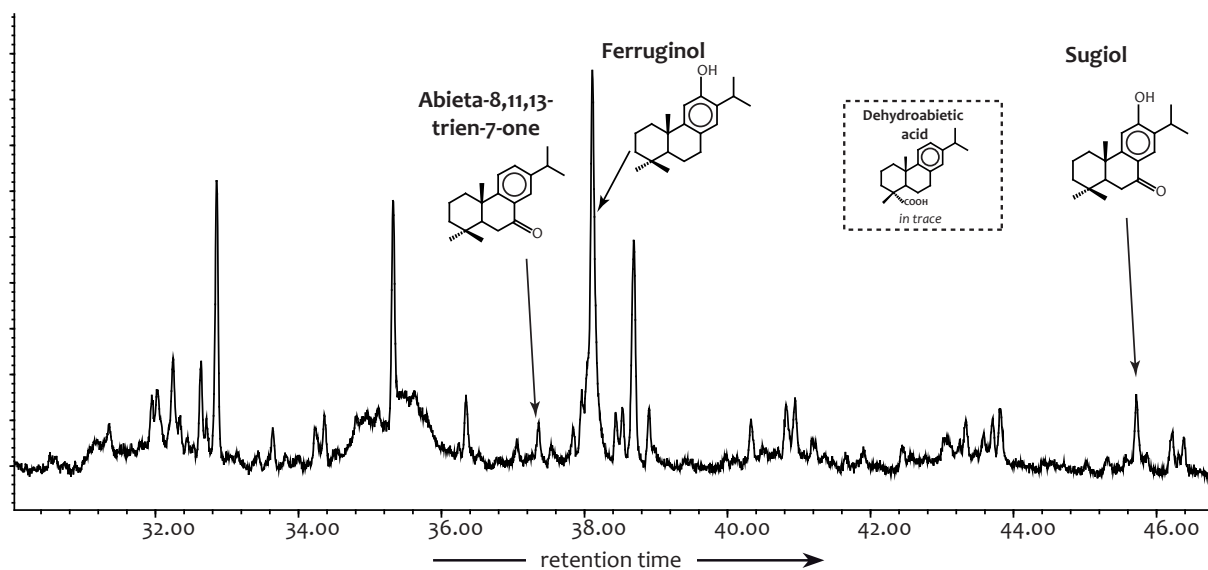


Fig. VII.10: Partial chromatograms (diterpenoids retention time window) of polar fractions of *Cephalotaxus fortunei* obtained from the pyrolysis without LiAlH_4 .

3.3. Sesquiterpenoid and diterpenoid compositions of artificially matured Sciadopityaceae

Dihydro-*ar*-curcumene and many cadalanes are found in the extract of matured *Sciadopitys verticillata*. Dihydro-*ar*-curcumene is present in low amount and cadalanes represent the predominant sesquiterpenoids. Pentamethyl-dihydroindenes and trimethyl-naphthalenes are found in low amount in the aromatic fraction (Fig. VII. 11). Labdanes, abietanes (19- and 18-norabieta-8,11,13-trienes, 10,13-bisnorabieta-8,11,13-triene, tetrahydroretene, dehydroabietane, simonellite and retene, as well as ferruginol and dehydroabietic acid), pimaranes (saturated pimarane, 16,17,18-trisnorabieta-8,11,13-triene, 16,17,19-trisnorabieta-8,11,13-triene and pimanthrene) represent most of the diterpenoids (Fig. VII. 11 b and d). Oxygenated abietanes were found only at trace level in the polar fractions. Other diterpenoids like rimuane, tetracyclic diterpenoids (phyllocladananes and ent-kauranes) and isohexyl alkylaromatic hydrocarbons (2,6-dimethyl-1-(4-methylpentyl)naphthalene and 6-ethyl-2-dimethyl-1-(4-methylpentyl)-naphthalene) display only low amount (Fig. VII. 11 b and d).

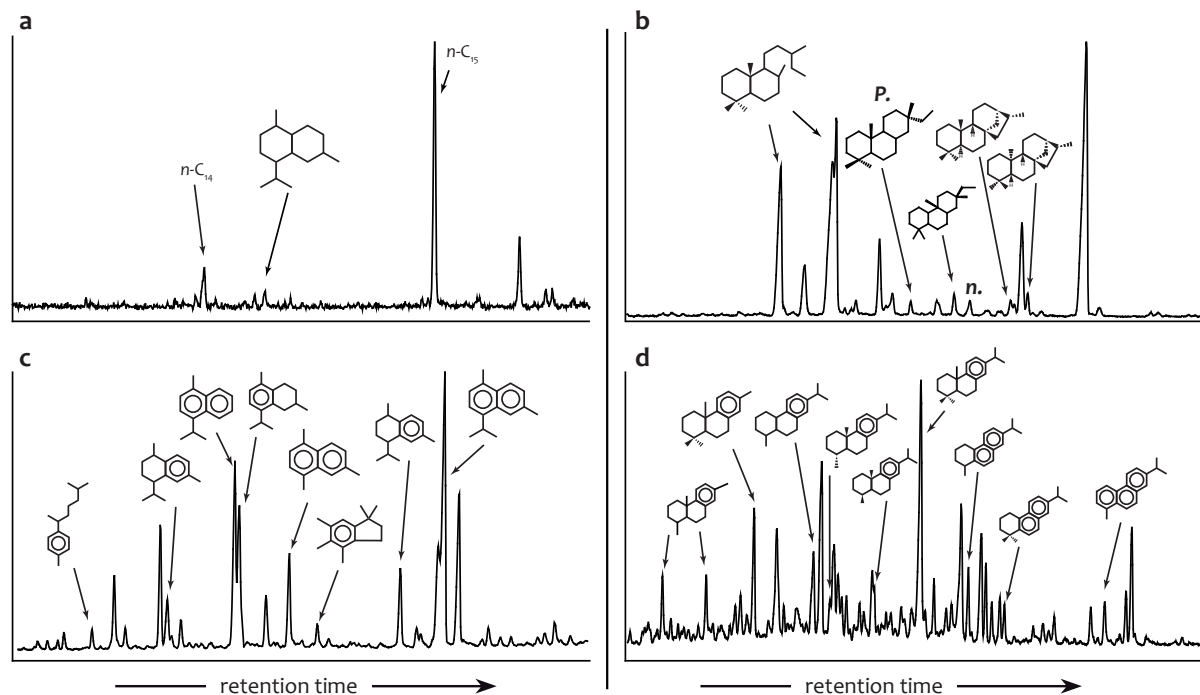


Fig. VII.11: Partial chromatograms (sesquiterpenoid (a, c) and diterpenoid (b, d) retention time windows) of aliphatic (a, b) and aromatic (c, d) fractions of *Sciadopitys verticillata* obtained from the pyrolysis with (aliphatic) and without (aromatic) LiAlH_4 . P.: pimaranes.

4. DISCUSSION

The molecular signature of artificially fossilized *Sciadopityaceae* and *Taxaceae* were respectively assessed by the artificial maturation of *Sciadopitys verticillata* and 5 extant *Taxaceae* representatives using confined pyrolysis. Owing to the small number of investigated *Podocarpaceae* representatives, only a partial insight on the molecular signature of matured *Podocarpaceae* can be presented.

Family	Genera	Species	Sesquiterpenoids							Diterpenoids									
			Farnesane	Bisabolanes	Eudesmanes	Cadalanes	Chamazulenes	Pentamethyl-dihydroindenes	Labdanes	Isohexyl alkyaromatic hydrocarbons	Abietanes	Rimuanes	Totaranes	Pimaranes	Podocarpanes	Ent-beyerane	Phyllocladanes	Ent-kauranes	
Podocarpaceae	Podocarpus	<i>alpinus</i>	/	+	/	+++	+	+	tr.	+	+	++	+	+	++	/	/	+++	/
		<i>totara</i>	/	tr.	/	+++	++	++	+	++	+	++	+	+	+	/	+	/	+++
	Prumnopitys	<i>andina</i>	+	+	++	++	/	tr.	+	tr.	+++	+	tr.	/	+	/	+	/	++
Sciadopityaceae	Sciadopitys	<i>verticillata</i>	/	+	/	++	/	++	++	tr.	tr.	++	+	/	++	/	/	++	+
Taxaceae	Cephalotaxus	<i>fortunei</i>	+	/	/	+++	/	/	/	/	++	+	/	/	tr.	/	/	/	/
		<i>harringtonia</i>	+	tr.	/	+++	/	/	/	/	+	+	/	/	tr.	/	/	/	/
	Taxus	<i>baccata</i>	/	+	/	++	/	/	/	/	tr.	/	/	/	/	/	/	/	/
		<i>brevifolia</i>	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	Torreya	<i>nucifera</i>	+	tr.	/	+++	/	tr.	++	/	+	++	/	/	++	/	/	/	/

Tab. VII.2: Major sesquiterpenoid and diterpenoid types detected in Podocarpaceae, Taxaceae and Sciadopityaceae representatives after confined pyrolysis with (saturated compounds) and without LiAlH₄ (aromatic compounds) as reducing agent.

4.1. An insight into the molecular features of matured Podocarpaceae

The molecular signature of matured Podocarpaceae displays some consistencies with our current knowledge in the chemotaxonomy and palaeochemotaxonomy of the Podocarpaceae (Alplin et al., 1963; Grimalt et al., 1989; Otto and Wilde, 2001; Cox et al., 2007). Their chemotaxonomic and palaeochemotaxonomic characteristics are the presence of tetracyclic diterpenoids, rimuane, totaranes and abietanes including phenolic abietanes and abietanoic acids. These specific molecular features allow their distinction from most of the other conifer families, except for Cupressaceae. However, more species should be examined in a further study in order to make clear the actual molecular signature of fossil Podocarpaceae.

4.2. Molecular features of matured Taxaceae

The molecular signature of Taxaceae is characterized by the scarcity of terpenoids. All recovered sesquiterpenoids and diterpenoids in Taxaceae species are ubiquitous in most conifers and no obvious specific molecular pattern could be actually pointed out. However, it seems possible to discriminate the different Taxaceae genera. *Torreya* and *Cephalotaxus* show close molecular affinities and could be distinguished from the *Taxus* by the presence of pimaranes and abietanes. Moreover, *Torreya* may also be distinguished from *Cephalotaxus* by the presence of labdanes, higher amount of pimaranes and the predominance of abietanoic acids over phenolic abietanes. However, since only one *Torreya* species was investigated in this study, care should be taken concerning the molecular signature of this genus. Then, *Taxus* differs from *Torreya* and *Cephalotaxus* by the absence of abietanes and pimaranes.

4.1. An insight into the molecular features of matured Podocarpaceae

The molecular signature of **matured** Podocarpaceae displays some consistencies with our current knowledge in the chemotaxonomy and palaeochemotaxonomy of the Podocarpaceae (Alplin et al., 1963; Grimalt et al., 1989; Otto and Wilde, 2001; Cox et al., 2007). Their chemotaxonomic and palaeochemotaxonomic characteristics are the presence of tetracyclic diterpenoids, rimuane, totaranes and abietanes including phenolic abietanes and abietanoic acids. These specific molecular features allow their distinction from most of the other conifer families, except for Cupressaceae. However, more species should be examined in a further study in order to make clear the actual molecular signature of fossil Podocarpaceae.

4.2. Molecular features of matured Taxaceae

The molecular signature of Taxaceae is characterized by the scarcity of terpenoids. All recovered sesquiterpenoids and diterpenoids in Taxaceae species are ubiquitous in most conifers and no obvious specific molecular pattern could be actually pointed out. However, it seems possible to discriminate the different Taxaceae genera. *Torreya* and *Cephalotaxus* show close molecular affinities and could be distinguished from the *Taxus* by the presence of pimaranes and abietanes. Moreover, ***Torreya*** may also be distinguished from ***Cephalotaxus*** by the presence of labdanes, higher amount of pimaranes and the predominance of abietanoic acids over phenolic abietanes. However, since only one *Torreya* species was investigated in this study, care should be taken concerning the molecular signature of this genus. Then, ***Taxus*** differs from *Torreya* and *Cephalotaxus* by the absence of abietanes and pimaranes.

4.3. Molecular features of matured Sciadopityaceae

Sciadopitys verticillata is characterized by the presence of many sesquiterpenoids like bisabolanes, cadalanes and pentamethyl-dihydroindenes as well as diterpenoids like labdane, rimuanes, pimaranes, abietanes, tetracyclic diterpenoids and isohexyl alkylaromatic hydrocarbons. These compounds are widely distributed in matured conifers and cannot be used for distinguish fossil Sciadopityaceae from the other fossil conifers (**Chapters IV, V, VI**). However, despite these similarities, differences could be pointed out between Sciadopityaceae and other families like Podocarpaceae, Cupressaceae and Taxodiaceae. For instance, Sciadopityaceae could be distinguished from most of the Cupressaceae and Podocarpaceae species by the absence of totarane. The predominance of abietanoic acids on phenolic abietanes could also allow to distinguish them from the Cupressaceae. Distinction between the Sciadopityaceae and the Taxodiaceae can be made using the occurrence of rimuane since it is present in Sciadopityaceae but not in Taxodiaceae (**Chapter VI**).

In addition, according to Erdtman and Norin (1966) and Karlsson et al. (1978), megacyclic diterpenoids like verticillol displays high chemotaxonomic significance for the Sciadopityaceae family. In this study, no possible compound could be attributed to such carbon skeleton in neither fresh nor pyrolysate plant material.

Conclusion Générale & Perspectives

Conclusion générale

68 espèces appartenant aux 7 familles actuelles de conifères ont fait l'objet de maturations artificielles dans ce travail. Ces maturations avaient pour objet de préciser la signature moléculaire de l'équivalent "fossilisé" de chacune de ces espèces. Puis, il s'agissait d'en faire une synthèse afin de déterminer la signature moléculaire typique de chaque famille de conifères "fossiles", et qui permettrait notamment de les distinguer les unes des autres. Il s'agissait également d'évaluer la variabilité inter- et intragénérique pour chacune de ces familles.

Plus de 20 classes structurales appartenant aux sesqui- et aux diterpénoïdes ont été identifiées au cours de ce travail (**Tab. C.1** et **Tab. C.2**). La grande majorité des sesquiterpénoïdes ne présente pas de spécificité paléochimiotaxonomique, c'est-à-dire qu'ils se retrouvent associés à la plupart des signatures moléculaires obtenues. En revanche, certains diterpénoïdes portent une spécificité paléochimiotaxonomique et peuvent donc être utilisés pour déterminer les origines botaniques.

Les signatures moléculaires des différentes familles :

La famille des Pinaceae peut être différenciée des autres familles par la forte proportion des acides abiétanoïques couplée à l'absence des abiétanes phénoliques (**Tab. C.2**). Certains genres de Pinaceae peuvent être distingués par la présence et la proportion relative des cembranes. Ils sont abondants chez *Larix* et *Pseudotsuga*, moins abondant chez *Picea* et *Pinus* et absents chez *Abies*, *Tsuga* et *Cedrus*. De plus, *Larix* et *Pseudotsuga* peuvent être différenciés des autres Pinaceae par l'absence d'isocopalane.

La famille des Araucariaceae est surtout caractérisée par la prédominance des diterpénoïdes tétracycliques. Les abiétanes oxygénés sont en majorité des acides abiétanoïques même si des abiétanes phénoliques peuvent aussi être présents. Les hydrocarbures isohexylalkyl aromatiques sont aussi abondants. Ces caractéristiques permettent de les distinguer nettement des autres familles de conifères (**Tab. C.2**). De plus, le genre *Agathis* présente deux types de signatures distinctes, qui sont basées sur la présence des diterpénoïdes tétracycliques et la proportion relative des hydrocarbures isohexylalkyl aromatiques. Le genre *Wollemia* présente une grande diversité en diterpénoïdes aromatiques qui demeurent actuellement non identifiés. Le genre *Araucaria* se distingue par de plus fortes proportions en phyllocladanes. En outre, les *Araucaria* qui appartiennent à la section *Eutecta* peuvent être distingués des autres *Araucaria* par une abondance plus forte en pimaranes.

Les familles des Cupressaceae et des Taxodiaceae présentent des signatures moléculaires assez similaires et se caractérisent par une plus forte diversité des sesqui- et diterpénoïdes. Ils peuvent être distingués des autres conifères par la présence de cédranes (sesquiterpénoïdes). Les Cupressaceae présentent également des signatures qui leur sont propres, tels que la présence des cuparanes, la forte proportion en totaranes et en semperviranes, ainsi que les abiétanes provenant principalement d'abiétanes phénoliques (**Tab. C.2**). La présence d'ent-béyeranes et la proportion relative des cédranes permettent de discriminer les variabilités intergénériques des Cupressaceae : *Calocedrus-Microbiota-Platycladus*, *Juniperus-Cupressus*, *Chamaecyparis-Thujopsis-Thuja*. De plus, *Juniperus* et *Calocedrus* peuvent respectivement être distingués des autres Cupressaceae par la présence d'abiétanes callitrisiques et de cembranes. Les Taxodiaceae présentent une faible variabilité intergénérique. Seul *Cryptomeria* se différencie des autres par la présence de diterpénoïdes tétracycliques et une plus forte proportion en abiétanes phénoliques (**Tab. C.2**).

La famille des Taxaceae est caractérisée par une très faible abondance en terpénoïdes. Seulement 6 classes structurales sont identifiées parmi les représentants de cette famille. Parmi elles, seuls les cadalanes et les abiétanes présentent des proportions relatives significatives (**Tab. C.1** et **Tab. C.2**). *Torreya* se distingue de *Cephalotaxus* par des proportions relatives plus importantes en pimaranes et en labdanes.

La signature moléculaire de **la famille de Sciadopityaceae** est obtenue sur la base de la seule espèce vivant actuellement. Elle se caractérise par la présence des phyllocladanes, pimaranes, labdanes et aussi des abiétanes provenant majoritairement d'acides abiétanoïques.

La signature moléculaire de **la famille des Podocarpaceae** reste imprécise du fait du faible nombre d'espèces investiguées. Elle semble caractérisée par des diterpénoïdes tétracycliques (essentiellement des ent-kauranes) et des abiétanes phénoliques (**Tab. C.2**). D'autres diterpénoïdes comme les totaranes et les rimuanes sont détectés avec des abondances modestes.

Regroupements interfamiliaux et intergénériques :

Des affinités moléculaires entre les différentes familles peuvent être mises en avant par la présence de biomarqueurs discriminants ou par la proportion relative de certains composés terpéniques. Les biomarqueurs qui permettent de discriminer les variabilités interfamiliales sont présentés dans le **Tab. C.3**.

Les Cupressaceae et les Taxodiaceae présentent de fortes affinités entre eux notamment par la présence des cédranes et la prédominance des abiétanes phénoliques sur les acides abiétanoïques. Les Cupressaceae présentent aussi une forte affinité moléculaire avec les Podocarpaceae du fait de la présence concomitante de diterpénoïdes tétracycliques (dans certains genres seulement) et de totaranes. Les Sciadopityaceae ont une affinité moléculaire plus proche des Araucariaceae (comme le montre la prédominance des acides abiétanoïques sur les abiétanes phénoliques) que des Cupressaceae, Taxodiaceae et des Podocarpaceae. De plus, les Sciadopityaceae et les Araucariaceae ont en commun une forte proportion en diterpénoïdes tétracycliques et plus particulièrement en phyllocladanes. Les Taxaceae se distinguent des autres familles par leur pauvreté en terpénoïdes. Les Pinaceae se distinguent également des autres familles par l'abondance des acides abiétanoïques couplée à l'absence d'abiétanes phénoliques. De plus, les Cupressaceae, les Taxodiaceae, les Podocarpaceae, les Araucariaceae et les Sciadopityaceae peuvent aussi se distinguer des Taxaceae et des Pinaceae par la présence des hydrocarbures isohexyl alkylaromatiques.

Family	Genus	Farnesane	Bisabolanes	Eudesmanes	Cedranes	Cuparanes	Cadalanes	Chamazulene	Pentamethyl-dihydroindenes	Di- & Trimethyl-naphthalenes
Pinaceae	<i>Abies</i>	●	●	●	/	/	●	○	●	●
	<i>Tsuga</i>	●	○	○	/	/	●	○	○	●
	<i>Larix</i>	○	○	○	/	/	●	/	tr.	tr.
	<i>Pseudotsuga</i>	○	○	/	/	/	●	/	○	tr.
	<i>Picea</i>	tr.	○	●	/	/	●	○	○	●
	<i>Pinus</i>	tr.	●	●	/	/	●	○	○	●
	<i>Cedrus</i>	○	●	tr.	/	/	●	○	○	●
Araucariaceae	<i>Agathis</i>	●	○	○	/	/	●	●	○	○
	<i>Araucaria</i>	●	●	●	/	/	●	●	●	○
	<i>Wollemia</i>	●	○	●	/	/	●	/	○	○
Cupressaceae	<i>Calocedrus</i>	tr.	●	/	●	●	○	tr.	●	tr.
	<i>Microbiota</i>	/	/	/	●	●	●	●	tr.	●
	<i>Platycladus</i>	/	/	/	●	○	○	○	●	●
	<i>Thujopsis</i>	○	●	●	/	/	●	/	/	●
	<i>Thuja</i>	○	●	●	/	/	●	/	/	●
	<i>Chamaecyparis</i>	●	●	○	●	●	●	tr.	○	○
	<i>Cupressocyparis</i>	●	●	●	tr.	tr.	●	●	●	●
	<i>Cupressus</i>	tr.	●	●	●	/	●	○	○	●
	<i>Juniperus</i>	○	●	●	●	tr.	●	○	○	●
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i>	/	○	tr.	○	/	●	○	○	●
	<i>Taxodium</i>	●	●	○	●	/	●	●	●	●
	<i>Sequoia</i>	tr.	tr.	●	●	/	●	●	●	●
	<i>Metasequoia</i>	●	tr.	●	●	/	●	○	●	○
	<i>Cunninghamia</i>	○	●	●	○	/	●	●	●	●
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i>	/	○	/	/	/	●	●	●	●
	<i>Prumnopitys</i>	○	○	●	/	/	●	/	tr.	●
Taxaceae	<i>Cephalotaxus</i>	○	/	●	/	/	●	/	/	/
	<i>Taxus</i>	/	/	/	/	/	●	/	/	/
	<i>Torreya</i>	○	tr.	/	/	/	●	/	/	/
Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys</i>	/	○	/	/	/	●	/	●	●

Tab. C.1 : Composition et distribution des sesquiterpénoïdes dans les différentes familles de conifères. ● : composés majeurs ; ○ : composés mineurs ; ● : proportions variables ; tr. : à l'état de trace ; / : absence.

Family	Genus	Labdanes	Abietanes		Pimaranes	Totaranes	Rimuane	Ent-beyerane	Phyllocladanes	Ent-kauranes	Isocopalane	Cembranes	Isohexyl alkylaromatic hydrocarbons	
			Ph.	Ab.										
				Ab.										Cal.
Pinaceae	<i>Abies</i>	●	/	●	/	●	/	/	/	/	●	/	/	
	<i>Tsuga</i>	●	/	●	/	○	/	/	/	/	○	/	/	
	<i>Larix</i>	○	/	●	/	○	/	/	/	/	/	●	/	
	<i>Pseudotsuga</i>	●	/	●	/	○	/	/	/	/	/	●	/	
	<i>Picea</i>	●	/	●	/	○	/	/	/	/	/	○	○	/
	<i>Pinus</i>	●	/	●	/	○	/	/	/	/	/	○	○	/
	<i>Cedrus</i>	tr.	/	●	/	○	/	/	/	/	/	tr.	/	/
Araucariaceae	<i>Agathis</i>	●	tr.	●	/	○	/	/	●	○	●	/	/	●
	<i>Araucaria</i>	●	tr.	●	/	○	/	/	●	●	●	tr.	/	●
	<i>Wollemia</i>	○	tr.	●	/	tr.	/	/	○	/	●	/	/	●
Cupressaceae	<i>Calocedrus</i>	●	○	○	/	○	○	/	/	/	/	●	●	
	<i>Microbiota</i>	tr.	●	○	/	○	●	/	/	/	/	/	○	
	<i>Platycladus</i>	tr.	●	○	/	●	●	/	/	/	/	/	●	
	<i>Thujopsis</i>	●	●	○	/	○	●	tr.	●	/	/	/	●	
	<i>Thuja</i>	○	●	○	/	○	●	tr.	●	/	○	/	●	
	<i>Chamaecyparis</i>	○	●	○	/	●	●	tr.	●	○	●	/	●	
	<i>Cupressocyparis</i>	●	●	○	/	●	●	tr.	tr.	○	○	/	●	
	<i>Cupressus</i>	●	●	○	/	●	●	/	/	○	/	/	●	
	<i>Juniperus</i>	●	○	○	●	●	○	/	/	/	/	/	/	●
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria</i>	tr.	●	○	/	●	/	/	/	tr.	●	/	/	tr.
	<i>Taxodium</i>	tr.	●	○	/	●	/	/	/	/	/	tr.	/	tr.
	<i>Sequoia</i>	tr.	○	○	/	●	/	/	○	/	/	○	/	tr.
	<i>Metasequoia</i>	●	○	○	/	●	/	/	/	/	/	tr.	/	tr.
	<i>Cunninghamia</i>	●	●	○	/	●	/	/	/	/	/	○	/	●
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i>	○	○	●	/	●	○	○	○	●	●	/	/	●
	<i>Prumnopitys</i>	○	●	○	/	○	/	/	○	/	●	/	/	tr.
Taxaceae	<i>Cephalotaxus</i>	tr.	●	●	/	tr.	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>Taxus</i>	tr.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>Torreya</i>	●	○	●	/	●	/	/	/	/	/	/	/	/
Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys</i>	●	tr.	●	/	●	/	○	/	●	/	/	/	○

Tab. C.2 : Composition et distribution des diterpénoïdes dans les différentes familles de conifères. ● : composés majeurs ; ○ : composés mineurs ; ● : proportions variables ; tr. : à l'état de trace ; / : absence.

Ces affinités et variabilités basées sur les différentes signatures moléculaires obtenues sur les 68 espèces de conifères ont permis de réaliser des regroupements interfamiliaux (Fig. C.1). Les Cupressaceae et Taxodiaceae forment un groupe soeur avec les Podocarpaceae. L'ensemble de ces trois familles forme un groupe soeur du groupe composé des Araucariaceae et de Sciadopityaceae. Les Taxaceae et les Pinaceae représentent deux groupes indépendants.

Cette classification paléochimiotaxonomique montre une certaine incohérence avec la classification phylogénétique. En effet, dans la classification phylogénétique, la famille des Taxaceae est considérée comme une famille sœur des Cupressaceae et des Taxodiaceae, alors que les deux familles ne montrent pas d'affinité moléculaire notable. Les Podocarpaceae apparaissent relativement proches des Araucariaceae dans la classification phylogénétique alors que la signature moléculaire des Podocarpaceae est plus proche de celle des Cupressaceae et des Taxodiaceae. Par contre, les Pinaceae constituent bel et bien une famille relativement éloignée des autres dans les classifications phylogénétiques et paléochimiotaxonomiques.

Familles	Terpénoïdes discriminants	
	Majeurs	Inter- et intragénériques
Pinaceae	Abiétanes (exclusivement acides abiétanoïques)	Cembranes et isocopalane
Araucariaceae	Diterpénoïdes tétracycliques	Phyllocladanes et isopimaranes
Taxaceae	Peu de terpénoïdes (cadalane, abiétanes)	Pimaranes et labdanes
Sciadopityaceae *	Phyllocladanes, pimaranes, labdanes	
Podocarpaceae **	<i>Ent</i> -kauranes, phyllocladane abiétanes (acide = phénolique), totaranes	Totaranes
Cupressaceae	Cédranes, cuparanes, totarane et abiétanes phénoliques	Ent-beyranes, cédranes, cuparanes, cembranes, abiétanes callitrisique
Taxodiaceae	Cédranes, abiétanes phénoliques	<i>Ent</i> -kauranes, IHAH ¹

Tab. C.3 : Terpénoïdes discriminants des conifères qui permettent de faire les distinctions interfamiliales et intergénériques. * : famille monotypique (une seule espèce), ** : échantillonnage peu représentatif ; ¹: IHAH : hydrocarbures isoheptyl-alkylaromatiques.

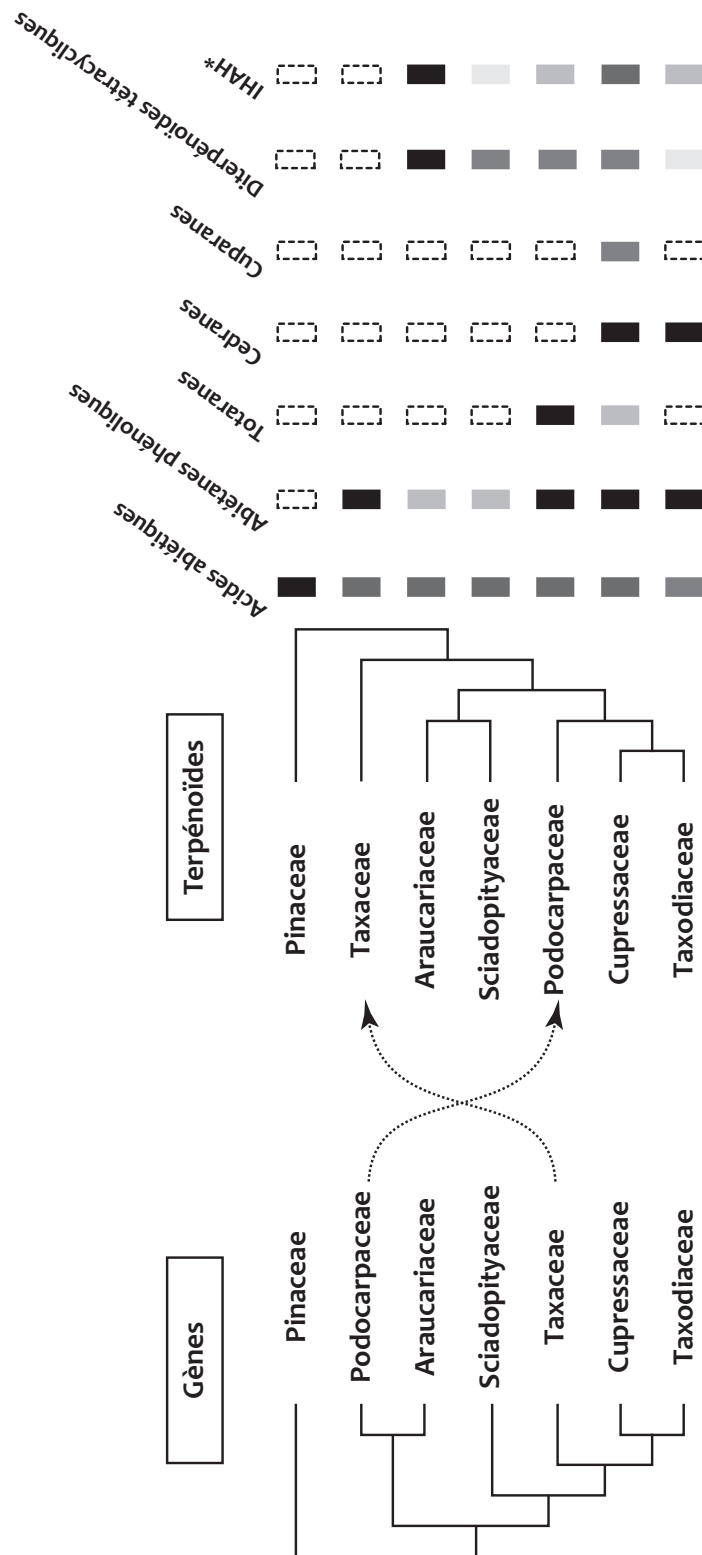


Fig. C. 1 : Comparaison entre la classification phylogénétique (Stefanović et al., 1998) et la classification paléochimiotaxonomique (basée sur la composition des terpénoïdes obtenue par maturation artificielle) des différentes familles de conifère.*: IHAH: hydrocarbures isoheptyl-alkylaromatiques.

Des regroupements **intergénériques** sont également proposés sur la base de la présence et de la proportion relative de certains terpénoïdes discriminants (**Tab. C.3**) pour les familles des Pinaceae, des Cupressaceae et des Taxodiaceae (**Fig. V.13 ; Fig. VI. 15**). Ce sont les cembranes et l'isocopalane qui permettent de discriminer les différents genres de Pinaceae, ainsi que l'ent-béyerane, les cédranes, le cuparane, les abiétanes callitrisiques et les hydrocarbures isohexylalkylaromatiques qui permettent de différencier les différents genres de Cupressaceae et Taxodiaceae. Ces regroupements intergénériques des plantes artificiellement fossilisées montrent une certaine cohérence avec les classifications phylogénétiques (voir les discussions dans les **chapitres V. et VI, Fig. V.13; Fig. VI. 15**).

PERSPECTIVES

Au travers de cette étude expérimentale, une base de données paléochimiotaxonomiques a été établie. Cette base de données associe des biomarqueurs moléculaires de plantes à leurs origines botaniques. Cependant cette base de données reste encore à améliorer et à compléter. En effet, si certaines familles et si certains genres sont bien représentés par l'échantillon de 68 espèces de conifères, d'autres le sont beaucoup moins. C'est par exemple le cas des Podocarpaceae car seulement 3 espèces ont été étudiées alors qu'il s'agit de la troisième plus grande famille de conifères. C'est également le cas de la famille des Cupressaceae qui est composée de deux sous-familles (Cupressoideae et Callitroideae). Dans cette étude, les espèces étudiées appartiennent essentiellement à la sous-famille des Cupressoideae. Il serait donc souhaitable de compléter cet échantillon par des espèces appartenant aux Callitroideae. Il serait également intéressant d'étudier d'autres plantes, telles que des angiospermes ou des plantes primitives. A terme, d'autres organismes vivants n'appartenant pas au règne végétal pourraient être investigués, comme par exemple des animaux et surtout des bactéries.

L'un des objectifs de ce travail était de préciser l'évolution diagénétique de bioterpénoïdes à forte spécificité chimiotaxonomique. Cette évolution diagénétique est notamment bien connue pour certains composés synthétisés spécifiquement par certaines plantes. C'est par exemple le cas de l'acide abiétique, qui est synthétisé en quantité par les Pinaceae. Sa transformation progressive, via la formation de nombreux intermédiaires, en rétène et en norabiétanes a été décrite à de nombreuses reprises ([Laflamme et Hites, 1978](#) ; [Wakeham et al., 1980](#) ; [Simoneit, 1986](#) ; [Otto et Simoneit, 2001, 2002](#) ; [Marchand-Geneste et Carpy, 2003](#)). Cependant, l'évolution diagénétique de nombreux autres composés, tout aussi spécifiques, demeure peu/pas connue. C'est par exemple le cas du totarol et du sempervirol. L'une des approches qui permettrait de mieux cerner l'évolution diagénétique serait de réaliser des maturations artificielles sur ces composés purs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A :

- Abdelkafi, H., Nay, B., 2012.** Natural products from *Cephalotaxus* sp.: chemical diversity and synthetic aspects. *Natural Product Reports* 29, 845-869.
- Achari, R.G., Shaw, G., Holleyhead, R., 1973.** Identification of ionene and other carotenoid degradation products from the pyrolysis of sporopollenins derived from some pollen exines, a spore coal and the Green River shale. *Chemical Geology* 12, 229-234.
- Adams, R., 1991.** Cedar wood oil—Analyses and properties, in: Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.), *Essential oils and waxes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 159-173.
- Agarwal, P.K., Rastogi, R.P., 1981.** Terpenoids from *Cedrus decussata*. *Phytochemistry* 20, 1319-1321.
- Agrawal, P.K., Rastogi, R.P., 1984.** Chemistry of the true cedars. *Biochemical Systematics and Ecology* 12, 133-144.
- Alexander, R., Bastow, T.P., Fisher, S.J., Kagi, R.I., 1995.** Geosynthesis of organic compounds: II. Methylation of phenanthrene and alkylphenanthrenes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4259-4266.
- Alexander, R., Kagi, R. I., Noble, R., 1983.** Identification of the bicyclic sesquiterpenes drimane and eudesmane in petroleum. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 5, 226-228.
- Alexander, R., Kagi, R.I., Noble, R., Volkman, J.K., 1984.** Identification of some bicyclic alkanes in petroleum. *Organic Geochemistry* 6, 63-72.
- Alvin, K.L., 1960.** Further conifers of the Pinaceae from the Wealden formation of Belgium, in: Belgique, I.R.d.S.N.d. (Ed.), pp. 146: 141-139.
- Anderson, E., Owens, J.N., 1999.** Analyzing the reproductive biology of *Taxus*: should it be included in Coniferales? *Acta Horticulturae* 615, 233-234.
- Anderson, K., 2006.** The nature and fate of natural resins in the geosphere. XII. Investigation of C-ring aromatic diterpenoids in Raritan amber by pyrolysis-GC-matrix isolation FTIR-MS. *Geochemical Transactions* 7, 1-9.
- Anderson, K., Winans, R.E., Botto, R.E., 1992.** The nature and fate of natural resins in the geosphere—II. Identification, classification and nomenclature of resinites. *Organic Geochemistry* 18, 829-841.
- Aplin, R.T., Cambie, R.C., Rutledge, P.S., 1963.** The taxonomic distribution of some diterpene hydrocarbons. *Phytochemistry* 2, 205-214.
- Appendino, G., 1995.** The phytochemistry of the yew tree. *Natural Product Reports* 12, 349-360.

-
- Appleton, R.A., McCrindle, R., Overton, K.H., 1970.** The diterpenes from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 9, 581-583.
- Ares, J.R., Aguey-Zinsou, K.F., Porcu, M., Sykes, J.M., Dornheim, M., Klassen, T., Bormann, R., 2008.** Thermal and mechanically activated decomposition of LiAlH₄. *Materials Research Bulletin*, 43, 1263-1275.
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., Harinantenaina, L., Toyota, M., Nishiki, M., Bardon, A., Nii, K., 2012.** Distribution of drimane sesquiterpenoids and tocopherols in liverworts, ferns and higher plants: Polygonaceae, Canellaceae and Winteraceae species. *Natural Product Communications* 7, 685-692.
- Auras, S., Wilde, V., Scheffler, K., Hoernes, S., Kerp, H., Püttmann, W., 2006.** Aromatized arborane/fernane hydrocarbons as biomarkers for Cordaites. *Naturwissenschaften* 93, 616-621.
- Axsmith, B.J., Andrews, F.M., Fraser, N.C., 2004.** The structure and phylogenetic significance of the conifer *Pseudohirmerella delawarensis* nov. comb. from the Upper Triassic of North America. *Review of Palaeobotany and Palynology* 129, 251-263.
- Axsmith, B.J., Jacobs, B.F., 2005.** The conifer *Frenelopsis ramosissima* (Cheirolepidiaceae) in the Lower Cretaceous of Texas: systematic, biogeographical, and paleoecological implications. *International Journal of Plant Sciences*, 166, 327-337.
- Axsmith, B.J., Krings, M., Waselkov, K., 2004.** Conifer pollen cones from the Cretaceous of Arkansas: implications for diversity and reproduction in the Cheirolepidiaceae. *Journal of Paleontology* 78, 402-409.

B :

- Barrero, A.F., Quílez del Moral, J.F., Mar Herrador, M., Arteaga, J.F., Aksira, M., Benharref, A., Dakir, M., 2005.** Abietane diterpenes from the cones of *Cedrus atlantica*. *Phytochemistry* 66, 105-111.
- Bastow, T.P., Alexander, R., Kagi, R.I., 1997.** Identification and analysis of dihydro-arcurcumene enantiomers and related compounds in petroleum. *Organic Geochemistry* 26, 79-83.
- Bateman, R.M., Crane, P.R., DiMichele, W.A., Kenrick, P.R., Rowe, N.P., Speck, T., Stein, W.E., 1998.** Early evolution of land plants: phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 263-292.
- Bechtel, A., Sachsenhofer, R.F., Kolcon, I., Gratzer, R., Otto, A., Püttmann, W., 2002.** Organic geochemistry of the Lower Miocene Oberdorf lignite (Styrian Basin, Austria): its relation to petrography, palynology and the palaeoenvironment. *International Journal of Coal Geology* 51, 31-57.
- Beck, C.B., 1976.** Current status of the Progymnospermopsida. *Review of Palaeobotany and Palynology* 21, 5-23.

- Beck, C.W., 1974.** Archaeological Chemistry, in: Gould Robert, F. (Ed.), *Advances in Chemistry Series*. American Chemical Society, Washington DC.
- Bennett, C.R., Cambie, R.C., 1966.** Chemistry of the Podocarpaceae—XI: Reductions of totarol. *Tetrahedron* 22, 2845-2860.
- Berry, K.M., Perry, N.B., Weavers, R.T., 1985.** Foliage sesquiterpenes of *Dacrydium cupressinum*: identification, variation and biosynthesis. *Phytochemistry* 24, 2893-2898.
- Binder, R., Applewhite, T., Kohler, G., Goldblatt, L., 1962.** Chromatographie analysis of seed oils. Fatty acid composition of castor oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 39, 513-517.
- Bird, A.E., Marshall, A.C., 1969.** Structure of chlorflavonin. *Journal of the Chemical Society* 19, 2418-2420.
- Blokhina, N.I., Afonin, M.A., Popov, A.M., 2006.** Fossil wood of *Keteleerioxylon kamtschatkiense* sp. nov. (Pinaceae) from the Cretaceous of the northwestern Kamchatka Peninsula. *Paleontological Journal* 40, 678-686.
- Bock, W., 1969.** The American Triassic Flora and Global Distribution. Geological Center, Pennsylvania.
- Bordoloi, M., Shukla, V.S., Nath, S.C., Sharma, R.P., 1989.** Naturally occurring cadinenes. *Phytochemistry* 28, 2007-2037.
- Bosma, H.F., Kunzmann, L., Kvaček, J., van Konijnenburg-van Cittert, J.H.A., 2012.** Revision of the genus *Cunninghamites* (fossil conifers), with special reference to nomenclature, taxonomy and geological age. *Review of Palaeobotany and Palynology* 182, 20-31.
- Brenner, G., 1996.** Evidence for the earliest stage of angiosperm pollen evolution: a paleoequatorial section from Israel, in: Taylor, D.W., Hickey, L.J. (Eds.), *Flowering Plant Origin, Evolution and Phylogeny*. Springer US, pp. 91-115.
- Briand, A., Kornprobst, J.-M., Al-Easa, H.S., Rizk, A.F.M., Toupet, L., 1997.** (-)-Paniculatol, a new ent-labdane bromoditerpene from *Laurencia paniculata*. *Tetrahedron Letters* 38, 3399-3400.
- Brideaux, W., McIntyre, D., 1975.** Miospores and microplankton from Aptian-Albian rocks along Horton River, district of Mackenzie. *Bull Geol Surv Can* 252, 1-85.
- Briggs, L., Cain, B., 1959.** Chemistry of the Podocarpaceae—I: Constituents of the heartwood of *Podocarpus spicatus*. *Tetrahedron* 6, 143-144.
- Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Wu, M.Z., Fookes, C.J.R., Forster, P.I., 2000.** The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*). *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 563-578.
- Brunsfeld, S.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Strenge, D.D., Ranker, T.A., 1994.** Phylogenetic Relationships Among the Genera of Taxodiaceae and Cupressaceae: Evidence from rbcL Sequences. *Systematic Botany* 19, 253-262.

C :

- Cambie, R.C., Cox, R.E., Croft, K.D., Sidwell, D., 1983.** Phenolic diterpenoids of some Podocarps. *Phytochemistry* 22, 1163-1166.
- Cambie, R.C., Cox, R.E., Sidwell, D., 1984.** Phenolic diterpenoids of *Podocarpus ferrugineus* and other podocarps. *Phytochemistry* 23, 333-336.
- Cambie, R.C., Franich, R., 1970.** Chemistry of the Podocarpaceae. XXIV. Ring-A modifications of Abieta-8, 11, 13-trien-18-oic acid. *Australian Journal of Chemistry* 23, 93-105.
- Cambie, R.C., Mander, L.N., 1962.** Chemistry of the Podocarpaceae—VI : Constituents of the heartwood of *Podocarpus totara* g. benn. *Tetrahedron* 18, 465-475.
- Caputo, R., Dovinola, V., Mangoni, L., 1974a.** New diterpenes from *Araucaria cunninghami*. *Phytochemistry* 13, 475-478.
- Caputo, R., Dovinola, V., and Mangoni, L. 1974b.** New labdane diterpenes from *Araucaria cooki*. *Phytochemistry* 13, 471-474.
- Caputo, R., Mangoni, L., 1974.** Diterpenes from *Araucaria bidwilli*. *Phytochemistry* 13, 467-470.
- Caputo, R., Mangoni, L., Monaco, P., Pelosi, L., Previtiera, L., 1976.** Neutral diterpenes from *Araucaria bidwilli*. *Phytochemistry* 15, 1401-1402.
- Carman, R., Deeth, H., 1967.** Diterpenoids. XIV. 4-Epidehydroabietic acid from the oleoresin of *Callitris columellaris* F. Muell. *Australian Journal of Chemistry* 20, 2789-2793.
- Carman, R., Deeth, H., 1971.** Diterpenoids. XXVI. A new diterpenoid acid from the oleoresin of *Callitris columellaris*. *Australian Journal of Chemistry* 24, 353-359.
- Castro, M.A., Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., Feliciano, A.S., 1996.** The distribution of lignanoids in the order coniferae. *Phytochemistry* 41, 995-1011.
- Chaloner, W.G., 1967.** Spores and land-plant evolution. *Review of Palaeobotany and Palynology* 1, 83-93.
- Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Rouquette, N., Adam, P., Barbotin, C., de Rozières, M.-F., Tchaplà, A., Albrecht, P., 2007.** The canopic jars of Rameses II: real use revealed by molecular study of organic residues. *Journal of Archaeological Science* 34, 957-967.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.-L., 1993.** Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80, 528-580.
- Cheng, Y., Nicolson, R.G., Tripp, K., Chaw, S.-M., 2000.** Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 353-365.
- Cheng, Y.S., Tsai, M.D., 1972.** Terpenes and sterols of *Cunninghamia konishii*. *Phytochemistry* 11, 2108-2109.

- Cheng, Y.S., von Rudloff, E., 1970.** Two new diterpenoid oxides from the leaf oil of *Chamaecyparis nootkatensis*. *Tetrahedron Letters* 11, 1131-1132.
- Chow, Y.-L., Erdtman, H., 1962a.** The chemistry of the natural order cupressales. XXXXIII. The structure and configuration of hinokiol and hinokione. *Acta Chemica Scandinavica* 16, 1296-1300.
- Chow, Y.-L., Erdtman, H., 1962b.** The chemistry of the natural order cupressales. XXXXV. The structure and configuration of totarol and totarolone. *Acta Chemica Scandinavica* 16, 1305-1310.
- Christophel, D.C., 1973.** *Sciadopitophyllum canadense* gen. et sp. nov.: a new conifer from western Alberta. *American Journal of Botany* 60, 61-66.
- Cleal, C.J., Thomas, B.A., 2009.** An Introduction to plant fossils. Cambridge University Press, New York.
- Coiffard, C., Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Dilcher, D.L., 2012.** Rise to dominance of angiosperm pioneers in European Cretaceous environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 20955-20959.
- Colombini, M.P., Giachi, G., Modugno, F., Ribechini, E., 2005.** Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt). *Microchemical Journal* 79, 83-90.
- Connan, J., Nissenbaum, A., 2003.** Conifer tar on the keel and hull planking of the Ma'agan Mikhael Ship (Israel, 5th century BC): identification and comparison with natural products and artefacts employed in boat construction. *Journal of Archaeological Science* 30, 709-719.
- Conran, J.G., Wood, G.M., Martin, P.G., Dowd, J.M., Quinn, C.J., Gadek, P.A., Price, R.A., 2000.** Generic relationships within and between the gymnosperm families Podocarpaceae and Phyllocladaceae based on an analysis of the chloroplast gene *rbcL*. *Australian Journal of Botany* 48, 715-724.
- Cool, L.G., Hu, Z.-L., Zavarin, E., 1998.** Foliage terpenoids of Chinese *Cupressus* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26, 899-913.
- Cox, R.E., Yamamoto, S., Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2007.** Oxygenated di- and tricyclic diterpenoids of southern hemisphere conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 342-362.
- Crane, P.R., 1987.** Vegetational consequences of the angiosperm diversification, in: Friis, E.M., Chaloner, W.G., Crane, P.R. (Eds.), *The origins angiosperms and their biological consequences*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 107-144.
- Crane, P.R., Friis, E.M., Pedersen, K.R., 1995.** The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* 374, 27-33.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000.** Natural products (secondary metabolites), in: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists Rockwill, MD, pp. 1250-1318.
- Cunningham, A., Gay, I.D., Oehlschlager, A.C., Langenheim, J.H., 1983.** ¹³C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. *Phytochemistry* 22, 965-968.

D :

- de Leeuw, J.W.D., Largeau, C., 1993.** A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal, and petroleum formation, in: Engel, M.H., Macko, S.A. (Eds.), *Organic geochemistry: Principles and applications*. Plenum Publishing, New York, pp. 23-72.
- de Leeuw, J.W.D., Van Bergen, P.F., Van Aarssen, B.G.K., Gatellier, J.-P.L.A., Damste, J.S.S., Collinson, M.E., Ambler, R.P., Macko, S., Curry, G.B., Eglinton, G., Maxwell, J.R., 1991.** Resistant biomacromolecules as major contributors to kerogen [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 333, 329-337.
- de Miranda, D.S., Brendolan, G., Imamura, P.M., Gonzalez Sierra, M., Marsaioli, A.J., Ruveda, E.A., 1981.** Stereoselective synthesis of the enantiomer of the novel marine diterpene isoagatholactone, ent-13(16),14-spongiadien-12.alpha.-ol, and the parent hydrocarbon isocopalane from methyl isocopalate. *The Journal of Organic Chemistry* 46, 4851-4858.
- de Paiva Campello, J., Fonseca, S.F. 1975.** Diterpenes from *Araucaria angustifolia*, *Phytochemistry*, 14, 2299-2300.
- de Paiva Campello, J., Fonseca, S.F., Chang, C.-J., Wenkert, E., 1975.** Terpenes of *Podocarpus lambertius*. *Phytochemistry* 14, 243-248.
- Delevoryas, T., Hope, R.C., 1973.** Fertile Coniferophyte remains from the Late Triassic Deep River Basin, North Carolina. *American Journal of Botany* 60, 810-818.
- Dembitsky, V.M., Tolstikov, G.A., 2004.** Natural halogenated sesquiterpenes from marine organisms. *Chemistry for Sustainable Development* 12, 1-12.
- Dettmann, M.E., Clifford, H.T., 2005.** Biogeography of Araucariaceae. Australia and New Zealand Forest Histories: N°2 Araucarian Forests. (Ed. John Dargavel), 1-9.
- Devon, T.K., Scott, A.I., 1972.** Handbook of naturally occurring compounds. Academic Press New York.
- Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C., 2006.** Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. *Pharmaceutical biology* 44, 1-6.
- Durand, B., 1980.** Kerogen: Insoluble organic matter from sedimentary rocks. Editions technip.
- Dutta, S., Mallick, M., Kumar, K., Mann, U., Greenwood, P.F., 2011.** Terpenoid composition and botanical affinity of Cretaceous resins from India and Myanmar. *International Journal of Coal Geology* 85, 49-55.
- Dzou, L.I.P., Noble, R.A., Senftle, J.T., 1995.** Maturation effects on absolute biomarker concentration in a suite of coals and associated vitrinite concentrates. *Organic Geochemistry* 23, 681-697.

E :

- Eckert, A.J., Hall, B.D., 2006.** Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for *Pinus* (Pinaceae): Phylogenetic tests of fossil-based hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 166-182.
- Edwards, D., Fanning, U., 1985.** Evolution and Environment in the Late Silurian-Early Devonian: The Rise of the Pteridophytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 309, 147-165.
- Edwards, D., Feehan, J., 1980.** Records of *Cooksonia*-type sporangia from late Wenlock strata in Ireland. *Nature* 287, 41-42.
- Edwards, D., Selden, P.A., 1992.** The development of early terrestrial ecosystems. *Botanical Journal of Scotland* 46, 337-366.
- Elias, V.O., De Barros, A.M.A., de Barros, A.B., Simoneit, B.R.T., Cardoso, J.N., 1997.** Sesquiterpenoids in sediments of a hypersaline lagoon: A possible algal origin. *Organic Geochemistry* 26, 721-730.
- Ellis, L., Singh, R.K., Alexander, R., Kagi, R.I., 1995.** Identification and occurrence of dihydro-*ar*-curcumene in crude oils and sediments. *Organic Geochemistry* 23, 197-203.
- Ellis, L., Singh, R.K., Alexander, R., Kagi, R.I., 1996.** Formation of isohexyl alkylaromatic hydrocarbons from aromatization-rearrangement of terpenoids in the sedimentary environment: A new class of biomarker. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 4747-4763.
- Endo, S., 1951.** A record of *Sequoia* from the Jurassic of Mancuria. *Botanical Gazette* 113, 228-230
- Enright, N.J., Ogden, J., Rigg, L.S., 1999.** Dynamics of forests with Araucariaceae in the western Pacific. *Journal of Vegetation Science* 10, 793-804.
- Enzell, C., Erdtman, H., 1958.** The chemistry of the natural order cupressales. XXI. Cuparene and cuparenic acid, two sesquiterpenic compounds with a new carbon skeleton. *Tetrahedron* 4, 361-368.
- Enzell, C., Wahlberg, I., 1969.** Mass spectrometric studies of diterpenes. *Acta Chemica Scandinavica* 23, 871-891.
- Erdtman, H., 1963.** Some aspects of chemotaxonomy. *Pure and Applied Chemistry*, 6, 679-708.
- Erdtman, H., Norin, T., 1966.** The chemistry of the order cupressales. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 24, 207-287.
- Escapa, I., Cúneo, R., Axsmith, B., 2008.** A new genus of the Cupressaceae (*sensu lato*) from the Jurassic of Patagonia: Implications for conifer megasporangiate cone homologies. *Review of Palaeobotany and Palynology* 151, 110-122.

F :

- Falcon-Lang, H.J., 2003.** Anatomically-preserved cordaitalean trees from Lower Pennsylvanian (Langsettian) dryland alluvial-plain deposits at Joggins, Nova Scotia. *Atlantic Geology* 39, 225-261.
- Falcon-Lang, H.J., 2005.** Small cordaitalean trees in a marine-influenced coastal habitat in the Pennsylvanian Joggins Formation, Nova Scotia. *Journal of the Geological Society* 162, 485-500.
- Falcon-Lang, H.J., MacRae, R.A., Csank, A.Z., 2004.** Palaeoecology of Late Cretaceous polar vegetation preserved in the Hansen Point Volcanics, NW Ellesmere Island, Canada. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 212, 45-64.
- Fang, J.-M., Lee, C.-K., Cheng, Y.-S., 1993.** Diterpenes from leaves of *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry* 33, 1169-1172.
- Farrella, N., Lucotte, M., Louchouart, P., Roulet, M., 2001.** Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajos, Brazilian Amazon. *Organic Geochemistry* 32, 1443-1458.
- Farjon, A., 1990.** Pinaceae. Drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeletz Scientific Books, , Königstein.
- Farjon, A., Page, C.N., Schellevis, N., 1993.** A preliminary world list of threatened conifer taxa. *Biodiversity and Conservation*, 2, 304-326.
- Farjon, A., 2005.** A monograph of Cupressaceae and *Sciadopitys*. Royal Botanic Gardens, Kew, Royaume-Uni.
- Ferguson, D.K., 1967.** On the phytogeography of coniferales in the European Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 3, 73-110.
- Florin, R., 1951.** Evolution in Cordaites and Conifers. *Acta Horti Bergiani*, 15, 285-388.
- Forsman, J., Hunt, J.M., 1958.** Insoluble organic matter (kerogen) in sedimentary rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 15, 170-182.
- Frankis, M.P., 1989.** Generic inter-relationships in Pinaceae. *Notes of the Royal Botanical Garden of Edinburgh* 45, 527-548.
- Friis, E.M., Pedersen, K.R., Crane, P.R., 2000.** Reproductive structure and organization of basal angiosperms from the Early Cretaceous (Barremian or Aptian) of western Portugal. *International Journal of Plant Sciences* 161, 169-182.
- Fukuyama, Y., Sato, T., Asakawa, Y., Takemoto, T., 1980.** A potent cytotoxic warburganal and related drimane-type sesquiterpenoids from *Polygonum hydropiper*. *Phytochemistry* 21, 2895-2898.

G:

- Gadek, P.A., Alpers, D.L., Heslewood, M.M., Quinn, C.J., 2000.** Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach. *American Journal of Botany* 87, 1044-1057.
- Gehlert, R., Schöppner, A., Kindl, H., 1990.** Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*: purification and induction in response to fungalo infection. *Molecular plant-microbe interactions* 3, 444-449.
- Gerstel, J., Thunell, R.C., Zachos, J.C., Arthur, M.A., 1986.** The Cretaceous/Tertiary Boundary Event in the North Pacific: Planktonic Foraminiferal Results from Deep Sea Drilling Project Site 577, Shatsky Rise. *Paleoceanography* 1, 97-117.
- Gnaedinger, S., 2007.** Podocarpaceae woods (Coniferales) from middle Jurassic La Matilde formation, Santa Cruz province, Argentina. *Review of Palaeobotany and Palynology* 147, 77-93.
- Gomankov, A., 2009.** Pollen evolution in cordaites and early conifers. *Paleontological Journal* 43, 1245-1252.
- Gomolitzky, N., 1962.** *Podocarpophyllum*, a new genus of conifers from the Jurassic coal-bearing deposits of Angren in central Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 47, 1029-1032.
- Gornall, R.J., Bohm, B.A., 1978.** Angiosperm flavonoid evolution: A reappraisal. *Systematic Botany* 3, 353-368.
- Gough, L., 1968.** Callitrisic acid: a new diterpenoid. *Tetrahedron Letters* 3, 295-298.
- Gough, L., Mills, J., 1972.** The composition of succinite (Baltic amber). *Nature* 239, 527-528.
- Gough, L.J., Mills, J.S., 1974.** Diterpenes of *Calocedrus decurrens*. *Phytochemistry* 13, 1612-1613.
- Grantham, P.J., Douglas, A.G., 1980.** The nature and origin of sesquiterpenoids in some tertiary fossil resins. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1801-1810.
- Grice, K., Backhouse, J., Alexander, R., Marshall, N., Logan, G.A., 2005.** Correlating terrestrial signatures from biomarker distributions, $\delta^{13}\text{C}$, and palynology in fluvio-deltaic deposits from NW Australia (Triassic–Jurassic). *Organic Geochemistry* 36, 1347-1358.
- Grimalt, J.O., Simoneit, B.R.T., Hatcher, P.G., 1989.** Chemical affinities between the solvent extractable and the bulk organic matter of fossil resin associated with an extinct Podocarpaceae. *Phytochemistry* 28, 1167-1171.
- Gupta, N.S., Michels, R., Briggs, D.E.G., Collinson, M.E., Evershed, R.P., Pancost, R.D., 2007.** Experimental evidence for the formation of geomacromolecules from plant leaf lipids. *Organic Geochemistry* 38, 28-36.
- Gupta, N.S., Michels, R., Briggs, D.E.G., Evershed, R.P., Pancost, R.D., 2006.** The organic preservation of fossil arthropods: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 2777-2783.

H :

- Haberer, R.M., Mangelsdorf, K., Wilkes, H., Horsfield, B., 2006.** Occurrence and palaeoenvironmental significance of aromatic hydrocarbon biomarkers in Oligocene sediments from the Mallik 5L-38 Gas Hydrate Production Research Well (Canada). *Organic Geochemistry* 37, 519-538.
- Halstead, L.B., 1990.** Cretaceous—Tertiary (Terrestrial), in: Briggs, D.E.G., Crowther, P.R. (Eds.), *Palaeobiology—a synthesis*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 203-206.
- Han, L., Huang, X., Sattler, I., Dahse, H.-M., Fu, H., Lin, W., Grabley, S., 2004.** New diterpenoids from the marine mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Journal of Natural Products* 67, 1620-1623.
- Hao, D., Xiao, P., Huang, B., Ge, G., Yang, L., 2008.** Interspecific relationships and origins of Taxaceae and Cephalotaxaceae revealed by partitioned Bayesian analyses of chloroplast and nuclear DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 276, 89-104.
- Harrison, L.J., Asakawa, Y., 1987.** 18-Oxoferruginol from the leaf of *Torreya nucifera*. *Phytochemistry* 26, 1211-1212.
- Hart, J.A., 1987.** A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *Journal of the Arnold Arboretum* 68, 269-307.
- Hasegawa, S., Hirose, Y., 1981.** Terpenoids from the seed of *Thujopsis dolabrata*. *Phytochemistry* 20, 508-510.
- Hasegawa, S., Hirose, Y., 1985.** Diterpenes from the seed of *Sciadopitys verticillata*. *Phytochemistry* 24, 2041-2046.
- Hasegawa, S., Kaneko, N., Hirose, Y., 1987.** Triterpenes from the seed of *Abies firma*. *Phytochemistry* 26, 1095-1099.
- Hauteville, Y., Michels, R., Malartre, F., Trouiller, A., 2006a.** Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France). *Organic Geochemistry* 37, 610-625.
- Hauteville, Y., Michels, R., Lannuzel, F., Malartre, F., Trouiller, A., 2006b.** Confined pyrolysis of extant land plants: A contribution to palaeochemotaxonomy. *Organic Geochemistry* 37, 1546-1561.
- Hedges, J.I., Clark, W.A., Cowie, G.L., 1988.** Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay. *Limnology and Oceanography* 33, 1116-1136.
- Hedges, J.I., Mann, D.C., 1979.** The lignin geochemistry of marine sediments from the southern Washington coast. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1809-1818.
- Hegnauer, R., 1967.** Chemical characters in plant taxonomy: some possibilities and limitations. *Pure and Applied Chemistry* 14, 173-187.
- Heim, A., Hofmann, A., Schmidt, M.W.I., 2010.** Forest-derived lignin biomarkers in an Australian oxisol decrease substantially after 90 years of pasture. *Organic Geochemistry* 41, 1219-1224.

- Henry T. A., 1949.** The plant alkaloids, 4 ed. London : J. & A. Churchill.
- Hermann, R.K., 1985.** The genus *Pseudotsuga*: ancestral history and past distribution. Corvallis, OR, USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University.
- Hermesen, E.J., Taylor, T.N., Taylor, E.L., 2007.** A voltzialean pollen cone from the Triassic of Antarctica. *Review of Palaeobotany and Palynology* 144, 113-122.
- Heusser, L.E., 1990.** Northeast Asian pollen records for the last 150,000 years from deep-sea cores V28-304 and RC14-99 taken off the Pacific coast of Japan. *Review of Palaeobotany and Palynology* 65, 1-8.
- Hill, R., Carpenter, R., 1991.** Evolution of *Acropyle* and *Dacrycarpus* (Podocarpaceae) foliage as inferred from macrofossils in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 4, 449-479.
- Hilton, J., Bateman, R.M., 2006.** Pteridosperms are the backbone of seed-plant phylogeny. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 133, 119-168.
- Hinkley, S.F.R., Perry, N.B., Weavers, R.T., 1994.** Confirmation of structure and absolute stereochemistry of 9-epi- β -caryophyllene from *Dacrydium cupressinum*. *Phytochemistry* 35, 1489-1494.
- Hirose, Y., Hasegawa, S., Ozaki, N., Iitaka, Y., 1983.** Three new terpenoid quinone methides from the seed of *Chamaecyparis obtusa*. *Tetrahedron Letters* 24, 1535-1538.
- Huang, Z.Q., Davis, M.R., Condon, L.M., Clinton, P.W., 2011.** Soil carbon pools, plant biomarkers and mean carbon residence time after afforestation of grassland with three tree species. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 1341-1349.

I:

- Iwashina, T., 2000.** The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research* 113, 287-299.

J:

- Jacob, J., Disnar, J.-R., Arnaud, F., Chapron, E., Debret, M., Lallier-Vergès, E., Desmet, M., Revel-Rolland, M., 2008.** Millet cultivation history in the French Alps as evidenced by a sedimentary molecule. *Journal of Archaeological Science* 35, 814-820.

- Jacob, J., Disnar, J.-R., Boussafir, M., Spadano Albuquerque, A.L., Sifeddine, A., Turcq, B., 2005. Pentacyclic triterpene methyl ethers in recent lacustrine sediments (Lagoa do Caçó, Brazil). *Organic Geochemistry* 36, 449-461.
- Jacobs, B.F., Kingston, J.D., Jacobs, L.L., 1999. The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 590-643.
- Jaffé, R., Hausmann, K.B., 1995. Origin and early diagenesis of arborinone/isoarborinol in sediments of a highly productive freshwater lake. *Organic Geochemistry* 22, 231-235.
- Jaffré, T., 1995. Distribution and ecology of the conifers of New Caledonia, Ecology of the Southern Conifers, N. J. Enright and R. S. Hill ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 171-196.
- Jansen, B.J.M., de Groot, A., 1991. The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids. *Natural Product Reports* 8, 309-318.
- Jiang, Z., Wang, Y., Zheng, S., Zhang, W., Tian, N., 2012. Occurrence of *Sciadopitys*-like fossil wood (Coniferales) in the Jurassic of western Liaoning and its evolutionary implications. *Chinese Science Bulletin* 57, 569-572.
- Jin, J., Qiu, J., Zhu, Y.a., Kodrul, T., 2010. First fossil record of the genus *Nageia* (Podocarpaceae) in south China and its phytogeographic implications. *Plant Systematics and Evolution* 285, 159-163.
- Jones, W.G., Hill, K.D., Allen, J.M., 1995. *Wollemia nobilis*, a new living Australian genus and species in the Araucariaceae. *Telopea* 6, 173-176.
- Jordan, G.J., 1995. Extinct conifers and conifer diversity in the Early Pleistocene of western Tasmania. *Review of Palaeobotany and Palynology* 84, 375-387.
- Judzentiene, A., Kupcinskiene, E., 2008. Chemical composition on essential oils from needles of *Pinus sylvestris* L. grown in northern Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 20, 26-29.
- Jussieu, A.L., 1778. Genera plantarum secundum ordines naturales disposita juxta methodum in Horto regio Parisiensi exaratam anno 1774, L'Herissant, Paris, 1978.

K :

- Karlsson, B., Pilotti, A.-M., Söderholm, A.-C., Norin, T., Sundin, S., Sumimoto, M., 1978. The structure and absolute configuration of verticillol, a macrocyclic diterpene alcohol from the wood of *Sciadopitys verticillata* sieb. et zucc. (Taxodiaceae). *Tetrahedron* 34, 2349-2354.
- Kelch, D., 1998. Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18S rDNA. *American Journal of Botany* 85, 986.
- Keller, A.M., Hendrix, M.S., 1997. Paleoclimatologic analysis of a Late Jurassic petrified forest, southeastern Mongolia. *Palaios* 12, 282-291.

- Kershaw, P., Wagstaff, B., 2001.** The southern conifer family Araucariaceae: History, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, 397-414.
- Kenrick, P., Crane, P.R., 1997.** The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33-39.
- Killops, S.D., Killops, V.J., 2005.** An introduction to organic geochemistry. John Wiley & Sons.
- Kim, H.J., Choi, E.H., Lee, I.-S., 2004.** Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*. *Phytochemistry* 65, 2545-2549.
- King, G.M., 1991.** Terrestrial tetrapods and the end Permian event: a comparison of analyses. *Historical Biology* 5, 239-255.
- Kitadani, M., Kabuto, C., Sakai, K., Yoshikoshi, A., Kitahara, Y., 1974.** Backbone rearrangement in dolabradiene. *Chemistry letters* 9, 963-966.
- Klymiuk, A.A., Stockey, R.A., 2012.** A Lower Cretaceous (Valanginian) seed cone provides the earliest fossil record for *Picea* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 99, 1069-1082.
- Knoll, A.H., 1984.** Patterns of extinction in the fossil record of vascular plants, In: Nitechi, M. H. (Ed.) *Extinctions*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 21-68.
- Kranz, H.D., Mikš, D., Siegler, M.-L., Capesius, I., Sensen, C.W., Huss, V.A., 1995.** The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 41, 74-84.
- Krassilov, V., 1974.** *Podocarpus* from the Upper Cretaceous of eastern Asia and its bearing on the theory of conifer evolution. *Palaeontology* 17, 365-370.
- Krassilov, V., 1978.** Late Cretaceous gymnosperms from Sakhalin and the terminal Cretaceous event. *Palaeontology* 21, 893-905.
- Kurose, K., Okamura, D., Yatagai, M., 2007.** Composition of the essential oils from the leaves of nine *Pinus* species and the cones of three of *Pinus* species. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 10-20.
- Krassilov, V.A., 1974.** *Podocarpus* from the Upper Cretaceous of eastern Asia and its bearing on the theory of conifer evolution. *Palaeontology* 17, 365-370.
- Krassilov, V.A., 1978.** Araucariaceae as indicators of climate and paleolatitudes. *Review of Palaeobotany and Palynology* 26, 113-124.
- Kunzmann, L., 2007a.** Neue Untersuchungen zu *Araucaria* Jussieu aus der europäischen Kreide. *Palaeontographica Abteilung B: Palaeophytologie* 276, 97-131.
- Kunzmann, L., 2007b.** Araucariaceae (Pinopsida): Aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 246, 257-277.
- Kusumi, J., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Tachida, H., 2000.** Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences. *American Journal of Botany* 87, 1480-1488.

L :

- Laflamme, R.E., Hites, R.A., 1978.** The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 289-303.
- Landais, P., Michels, R., Poty, B., Monthioux, M., 1989.** Pyrolysis of organic matter in cold-seal pressure autoclaves. Experimental approach and applications. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 16, 103-115.
- Langenheim, J.H., 1969.** Amber: a botanical inquiry. *Science* 163, 1157-1169.
- Langenheim, J.H., 1994.** Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1223-1280.
- Lavrieux, M., Jacob, J., LeMilbeau, C., Zocatelli, R., Masuda, K., Bréheret, J.-G., Disnar, J.-R., 2011.** Occurrence of triterpenyl acetates in soil and their potential as chemotaxonomical markers of Asteraceae. *Organic Geochemistry* 42, 1315-1323.
- Le Métayer, P., Schaeffer, P., Adam, P., Albrecht, P., Roussé, S., Düringer, P., 2008.** An unprecedented condensation pathway leading to the formation of phenolic C₄₀ bis-diterpenoids in sediments from the Lower Oligocene of the Rhine Rift Valley. *Organic Geochemistry* 39, 658-675.
- Le Milbeau, C., Lavrieux, M., Jacob, J., Bréheret, J.-G., Zocatelli, R., Disnar, J.-R., 2013.** Methoxy-serratenes in a soil under conifers and their potential use as biomarkers of Pinaceae. *Organic Geochemistry* 55, 45-54.
- Lee, C.-K., Fang, J.-M., Cheng, Y.-S., 1995.** Norditerpenes from *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry* 39, 391-394.
- Leeming, R., Nichols, P.D., 1998.** Determination of the sources and distribution of sewage and pulp-fibre-derived pollution in the Derwent Estuary, Tasmania, using sterol biomarkers. *Marine and Freshwater Research* 49, 7-17.
- Lemoigne, Y., 1988.** La flore au cours des temps géologiques. Géobios Mémoire Spécial 2.
- LePage, B.A., 2001.** New species of *Picea* A. Dietrich (Pinaceae) from the middle Eocene of Axel Heiberg Island, Arctic Canada. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135, 137-167.
- LePage, B.A., 2003a.** The evolution, biogeography and palaeoecology of the Pinaceae based on fossil and extant representatives. *Acta Horticulturae* 615, 29-53.
- LePage, B.A., 2003b.** A new species of *Thuja* (Cupressaceae) from the Late Cretaceous of Alaska: implications of being evergreen in a polar environment. *American Journal of Botany* 90, 167-174.
- LePage, B.A., 2003c.** A new species of *Tsuga* (Pinaceae) from the middle Eocene of Axel Heiberg Island, Canada, and an assessment of the evolution and biogeographical history of the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141, 257-296.
- LePage, B.A., Basinger, J.F., 1995.** Evolutionary history of the genus *Pseudolarix* Gordon (Pinaceae). *International Journal of Plant Sciences* 156, 910-950.

- LePage, B.A., Yang, H., Matsumoto, M., 2005.** The Evolution and Biogeographic History of *Metasequoia*, in: LePage, B., Williams, C., Yang, H. (Eds.), *The Geobiology and Ecology of Metasequoia*. Springer Netherlands, pp. 3-114.
- Leppänen, H., Kukkonen, J.V.K., Oikari, A.O.J., 2000.** Concentration of retene and resin acids in sedimenting particles collected from a bleached kraft mill effluent receiving lake. *Water Research* 34, 1604-1610.
- Leppänen, H., Oikari, A., 1999.** Occurrence of retene and resin acids in sediments and fish bile from a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1498-1505.
- Lewis, L.A., McCourt, R.M., 2004.** Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 91, 1535-1556.
- Li, C., Yang, Q., 2002.** Divergence time estimates for major lineages of Cupressaceae (s. l.). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 40, 323-333.
- Li, H., 1953.** A reclassification of *Libocedrus* and Cupressaceae. *Journal of the Arnold Arboretum* 34, 17-35.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., 2001.** A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *Journal of Natural Products* 64, 1457-1459.
- Liu, Y.S., Basinger, J.F., 2000.** Fossil *Cathaya* (Pinaceae) pollen from the Canadian high arctic. *International Journal of Plant Sciences* 161, 829-847.
- Livsey, A., Douglas, A.G., Connan, J., 1984.** Diterpenoid hydrocarbons in sediments from an offshore (Labrador) well. *Organic Geochemistry* 6, 73-81.
- Looy, C.V., 2007.** Extending the range of derived Late Paleozoic conifers: *Lebowskia* gen. nov. (Majoniaceae). *International Journal of Plant Sciences* 168, 957-972.
- Lorimer, S.D., Weavers, R.T., 1987.** Foliage sesquiterpenes and diterpenes of *Podocarpus spicatus*. *Phytochemistry* 26, 3207-3215.
- Lu, Y., Hautevelle, Y., Michels, R., 2013.** Determination of the molecular signature of fossil conifers by experimental palaeochemotaxonomy—Part 1: The Araucariaceae family. *Biogeosciences* 10, 1943-1962.

M :

- Malheiros, A., Filho, V.C., Schmitt, C.B., Santos, A.R.S., Scheidt, C., Calixto, J.B., Monache, F.D., Yunes, R.A., 2001.** A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. *Phytochemistry* 57, 103-107.

-
- Mao, K., Hao, G., Liu, J., Adams, R.P., Milne, R.I., 2010.** Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytologist* 188, 254-272.
- Mao, K., Milne, R.I., Zhang, L., Peng, Y., Liu, J., Thomas, P., Mill, R.R., S. Renner, S., 2012.** Distribution of living Cupressaceae reflects the breakup of Pangea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 7793-7798.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D., 2006.** The Stereochemistry of Flavonoids, in: Grotewold, E. (Ed.), *The Science of Flavonoids*. Springer New York, pp. 1-46.
- Marchand-Geneste, N., Carpy, A., 2003.** Theoretical study of the thermal degradation pathways of abietane skeleton diterpenoids: aromatization to retene. *Journal of Molecular Structure: Theochem* 635, 55-82.
- Marynowski, L., Otto, A., Zatoń, M., Philippe, M., Simoneit, B., 2007.** Biomolecules preserved in ca. 168 million year old fossil conifer wood. *Naturwissenschaften* 94, 228-236.
- Mateus, E., 2009.** Characterization of *Pinus* spp. needles by gas chromatography and mass spectrometry: Application to plant-insect interactions, Faculty of Science and Technology, Universidade Nova de Lisboa, pp. 322.
- Maxwell, W.D., 1992.** Permian and Early Triassic extinction of non-marine tetrapods. *Palaeontology* 35, 571-583.
- McCourt, R.M., Delwiche, C.F., Karol, K.G., 2004.** Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 661-666.
- McElwain, J.C., Beerling, D.J., Woodward, F.I., 1999.** Fossil plants and global warming at the Triassic-Jurassic boundary. *Science* 285, 1386-1390.
- Menor-Salván, C., Najarro, M., Velasco, F., Rosales, I., Tornos, F., Simoneit, B.R.T., 2010.** Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian Basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleochemotaxonomic aspects. *Organic Geochemistry* 41, 1089-1103.
- Michaux, J., Suc, J.-P., Vernet, J.-L., 1979.** Climatic inference from the history of the Taxodiaceae during the Pliocene and the early Pleistocene in western Europe. *Review of Palaeobotany and Palynology* 27, 185-191.
- Miller Jr, C.N., 1976a.** Early evolution in the Pinaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology* 21, 101-117.
- Miller Jr, C.N., 1976b.** Two new pinaceous cones from the Early Cretaceous of California. *Journal of Paleontology* 50, 821-832.
- Miller Jr, C.N., 1977.** Mesozoic conifers. *The Botanical Review* 43, 217-280.
- Miller Jr, C.N., 1988.** The origin of modern conifer families, in: Beck, C.B. (Ed.), *Origin and evolution of gymnosperms*. Columbia University Press, New York (USA), pp. 444-486.
- Miller Jr, C.N., 1999.** Implications of fossil conifers for the phylogenetic relationships of living families. *The Botanical Review* 65, 239-277.
- Mongrand, S., Badoc, A., Patouille, B., Lacomblez, C., Chavent, M., Cassagne, C., Bessoule, J.-J., 2001.** Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 58, 101-115.

Monthioux, M., Landais, P., Monin, J.-C., 1985. Comparison between natural and artificial maturation series of humic coals from the Mahakam delta, Indonesia. *Organic Geochemistry* 8, 275-292.

N :

Narita, H., Yatagai, M., 2006. Terpenes from bogwood of *Cryptomeria japonica* D. Don and characterization of its ash. *Organic Geochemistry* 37, 818-826.

Noble, R.A., Alexander, R., Kagi, R.I., Knox, J., 1985. Tetracyclic diterpenoid hydrocarbons in some Australian coals, sediments and crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2141-2147.

Noble, R.A., Alexander, R., Kagi, R.I., Nox, J.K., 1986. Identification of some diterpenoid hydrocarbons in petroleum. *Organic Geochemistry* 10, 825-829.

Norin, T., 1961. The chemistry of the natural order cupressales. XXXX. The structure of thujopsene and hinokiic acid. *Acta Chemica Scandinavica* 15, 1676-1694.

Norin, T., 1972. Some aspects of the chemistry of the order Pinales. *Phytochemistry* 11, 1231-1242.

O :

Ohmoto, T., Ikuse, M., Natori, S., 1970. Triterpenoids of the gramineae. *Phytochemistry* 9, 2137-2148.

Ohtsu, H., Tanaka, R., In, Y., Matsunaga, S., Tokuda, H., Nishino, H., 2000. New abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi*. *Canadian Journal of Chemistry* 78, 31-40.

Ohtsu, H., Tanaka, R., In, Y., Matsunaga, S., Tokuda, H., Nishino, H., 2001. Abietane Diterpenoids from the Cones of *Larix kaempferi* and their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. *Planta Med* 67, 55-60.

Olawore, N.O., 2005. Analysis of the leaf oil of *Araucaria cunninghamii* sweet. Grown in Nigeria. *Journal of Essential Oil Research* 17, 459-461.

Orihara, Y., Yang, J.-W., Komiya, N., Koge, K., Yoshikawa, T., 2002. Abietane diterpenoids from suspension cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans*. *Phytochemistry* 59, 385-389.

- Otto, A., Kvacek, J., Goth, K., 1999.** Biomarkers from the taxodiaceous conifer *Sphenolepis Pecinovenssis* Kvaček and resin from bohemian Cenomanian. *Acta Palaeobotanica Suppl.* 2, 153-157.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2001.** Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 3505-3527.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2002.** Biomarkers of Holocene buried conifer logs from Bella Coola and north Vancouver, British Columbia, Canada. *Organic Geochemistry* 33, 1241-1251.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Rember, W.C., 2005.** Conifer and Angiosperm biomarkers in clay sediments and fossil plants from the Miocene Clarkia Formation, Idaho, USA. *Organic Geochemistry* 36, 907-922.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Wilde, V., 2007.** Terpenoids as chemosystematic markers in selected fossil and extant species of pine (*Pinus*, Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154, 129-140.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Wilde, V., Kunzmann, L., Püttmann, W., 2002a.** Terpenoid composition of three fossil resins from Cretaceous and Tertiary conifers. *Review of Palaeobotany and Palynology* 120, 203-215.
- Otto, A., Walther, H., Püttmann, W., 1997.** Sesqui- and diterpenoid biomarkers preserved in *Taxodium*-rich Oligocene oxbow lake clays, Weissenhofer basin, Germany. *Organic Geochemistry* 26, 105-115.
- Otto, A., White, J.D., Simoneit, B.R.T., 2002b.** Natural Product Terpenoids in Eocene and Miocene Conifer Fossils. *Science* 297, 1543-1545.
- Otto, A., Wilde, V., 2001.** Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers—A review. *The Botanical Review* 67, 141-238.

P :

- Page, C.N., 1990.** Gymnosperms (Coniferophytina), in: Kubitzki, K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 285-361.
- Pant, D.D., Osborne, R., 2002.** Fossil history and phylogeny, in: Pant, D.D., Osborne, R. (Eds.), *An introduction to gymnosperms, cycas, and cycadales*. Birbal Sahni Institute of Palaeobotany, Lucknow, India, pp. 267-307.
- Paull, R., Michaelsen, B.H., McKirdy, D.M., 1998.** Fernenes and other triterpenoid hydrocarbons in *Dicroidium*-bearing Triassic mudstones and coals from South Australia. *Organic Geochemistry* 29, 1331-1343.
- Pereira, R., San Gil, R.A.S., Carvalho, I.S., Fernandes, A.C.S., Azevedo, D.A., 2011.** Solid state ¹³C NMR analysis of Brazilian Cretaceous ambers. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 92-97.

- Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M., 2005.** The Biomarker Guide. , Second Edition ed. Cambridge University Press.
- Petrakis, P.V., Tsitsimpikou, C., Tzakou, O., Couladis, M., Vagias, C., Roussis, V., 2001.** Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 16, 249-252.
- Phillips, M.A., Croteau, R.B., 1999.** Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4, 184-190.
- Philp, R.P., 1985.** Fossil fuel biomarkers: Applications and spectra. pp. 294.
- Philp, R.P., Gilbert, T.D., Friedrich, J., 1981.** Bicyclic sesquiterpenoids and diterpenoids in Australian crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 1173-1180.
- Pietsch, M., König, W.A., 2000.** Enantiomers of sesquiterpene and diterpene hydrocarbons in *Araucaria* species. *Phytochemical Analysis* 11, 99-105.
- Pilger, R., 1926.** Coniferae, in: Engler, A. (Ed.), Die natürlichen Pflanzenfamilien, Berlin, Germany, pp. 121-403.
- Pott, C., Krings, M., Kerp, H., 2007.** First record of *Nilssoniopteris* (Gymnospermophyta, Bennettitales) from the Carnian (Upper Triassic) of Lunz, Lower Austria. *Palaeontology* 50, 1299-1318.
- Prasain, J.K., Stefanowicz, P., Kiyota, T., Habeichi, F., Konishi, Y., 2001.** Taxines from the needles of *Taxus wallichiana*. *Phytochemistry* 58, 1167-1170.
- Price, R.A., 2003.** Generic and familial relationships of the Taxaceae from *rbcl* and *matK* sequence comparisons. *Acta Horticulturae* 615, 235-237.

Q:

- Quinn, C., Price, R., Gadek, P., 2002.** Familial concepts and relationships in the conifer based on *rbcl* and *matK* sequence comparisons. *Kew Bulletin* 57, 513-531.

R:

- Raldugin, V.A., Storozhenko, V.G., Rezvukhin, A.I., Pentegova, V.A., Gorovoi, P.G., Baranov, V.I., 1981.** Terpenoids from plants of the family Cupressaceae. I. Sesquiterpene alcohols from the needles of *Microbiota decussata*. *Chemistry of Natural Compounds* 17, 124-129.

- Ran, J.-H., Wei, X.-X., Wang, X.-Q., 2006.** Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): Implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41, 405-419.
- Raup, D.M., 1979.** Size of the Permo-Triassic bottleneck and its evolutionary implications. *Science* 206, 217-218.
- Rees, P.M., Gibbs, M.T., Ziegler, A.M., Kutzbach, J.E., Behling, P.J., 1999a.** Permian climates: Evaluating model predictions using global paleobotanical data. *Geology* 27, 891-894.
- Rees, P.M., Ziegler, A.M., Valdes, P.J., 1999b.** Jurassic phytogeography and climates: new data and model comparisons., in: Hueber, F.M., Macleod, K.G., Wing, S.L. (Eds.), *Warm climates in Earth history*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 297-318.
- Reymanówna, M., 1987.** A Jurassic podocarp from Poland. *Review of Palaeobotany and Palynology* 51, 133-143.
- Robinson, R., 1955.** The structural relations of natural products. Oxford Univ. Press.
- Romanus, K., Van Neer, W., Marinova, E., Verbeke, K., Luypaerts, A., Accardo, S., Hermans, I., Jacobs, P., De Vos, D., Waelkens, M., 2008.** Brassicaceae seed oil identified as illuminant in Nilotic shells from a first millennium AD Coptic church in Bawit, Egypt. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 783-793.
- Rothwell, G.W., Mapes, G., Stockey, R.A., Hilton, J., 2012.** The seed cone *Eathiestrobus* gen. nov.: fossil evidence for a Jurassic origin of Pinaceae. *American Journal of Botany* 99, 708-720.
- Rothwell, G.W., Stockey, R.A., Mapes, G., Hilton, J., 2011.** Structure and relationships of the Jurassic conifer seed cone *Hughmillerites juddii* gen. et comb. nov.: Implications for the origin and evolution of Cupressaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology* 164, 45-59.

S :

- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry* 91, 621-632.
- Sakai, A., Larcher, W., 1987.** Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin.
- Sakintuna, B., Lamari-Darkrim, F., Hirscher, M., 2007.** Metal hydride materials for solid hydrogen storage: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 32, 1121-1140.
- Salatino, A., Gottlieb, O.R., 1981.** Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the Genisteae. *Biochemical Systematics and Ecology* 9, 267-273.
- Salisbury, R.A., 1807.** XIV. The characters of several genera in the natural order of Conifers: with remarks on their stigmata and cotyledons. *Transactions of the Linnean Society of London* 8, 308-317.

- Sanduja, R., Martin, G.E., Weinheimer, A.J., Alam, M., Hossain, M.B., van der Helm, D., 1984.** Secondary metabolites of the coelenterate *Echinopora lamellosa*. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 21, 845-848.
- Saxton, W.T., 1913.** The classification of conifers. *New Phytologist* 12, 242-262.
- Schirone, B., Piovesan, G., Bellarosa, R., Pelosi, C., 1991.** A taxonomic analysis of seed proteins in *Pinus* spp. (Pinaceae). *Plant Systematics and Evolution* 178, 43-53.
- Schmitz, F.J., Michaud, D.P., Schmidt, P.G., 1982.** Marine natural products: parguerol, deoxyparguerol, and isoparguerol. New brominated diterpenes with modified pimarane skeletons from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Journal of the American Chemical Society* 104, 6415-6423.
- Schorn, H.E., 1994.** A preliminary discussion of fossil larches (*Larix*, Pinaceae) from the Arctic. *Quaternary International* 22-23, 173-183.
- Scott, A.C., 1974.** The earliest conifer. *Nature* 251, 707-708.
- Scott, A.C., Chaloner, W.G., 1983.** The earliest fossil conifer from the Westphalian B of Yorkshire. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - mathematical and physical sciences* 220, 163-182.
- Setoguchi, H., Asakawa Osawa, T., Pintaud, J.-C., Jaffre, T., Veillon, J.-M., 1998.** Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *rbcl* gene sequences. *American Journal of Botany* 85, 1507-1516.
- Shen, T., Wang, X.-N., Lou, H.-X., 2009.** Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports* 26, 916-935.
- Simoneit, B.R.T., 1977.** Diterpenoid compounds and other lipids in deep-sea sediments and their geochemical significance. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 463-476.
- Simoneit, B.R.T., 1986.** Cyclic terpenoids of the geosphere, in: Johns, R.B. (Ed.), *Biological markers in the sedimentary records*. Elsevier, Amsterdam, pp. 43-99.
- Simoneit, B.R.T., 2005.** A review of current applications of mass spectrometry for biomarker/molecular tracer elucidations. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 719-765.
- Simoneit, B.R.T., Grimalt, J.O., Wang, T.G., Cox, R.E., Hatcher, P.G., Nissenbaum, A., 1986.** Cyclic terpenoids of contemporary resinous plant detritus and of fossil woods, ambers and coals. *Organic Geochemistry* 10, 877-889.
- Singh, R.K., Alexander, R., Kagi, R.I., 1994.** Identification and occurrence of norcadalenes and related compounds in crude oils and sediments. *Organic Geochemistry* 21, 249-256.
- Slimestad, R., 1998.** Amount of flavonols and stilbenes during needle development of *Picea abies*; variations between provenances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 225-238.
- Smith, P.M., 1976.** *The chemotaxonomy of plants*. Elsevier, New York.
- Song, Z., Liang, Z., Liu, X., 1995.** Chemical characteristics of oleoresins from Chinese pine species. *Biochemical Systematics and Ecology* 23, 517-522.
- Spicer, R.A., Shackleton, N.J., 1989.** Plants at the Cretaceous-Tertiary Boundary [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 325, 291-305.

- Staccioli, G., Menchi, G., Matteoli, U., 1997.** Degraded terpenes of *Taxodioxydon gypsaceum* and its likely original terpene composition. *Holz als Roh- und Werkstoff* 55, 337-338.
- Stafford, H.A., 1991.** Flavonoid evolution: An enzymic approach. *Plant Physiology* 96, 680-685.
- Staniek, A., Muntendam, R., Woerdenbag, H.J., Kayser, O., 2010.** Essential oil constituents derived from different organs of a relictual conifer *Wollemia nobilis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 131-135.
- Stankiewicz, B.A., Briggs, D.E.G., Michels, R., Collinson, M.E., Flannery, M.B., Evershed, R.P., 2000.** Alternative origin of aliphatic polymer in kerogen. *Geology* 28, 559-562.
- Stefanova, M., 2004.** Molecular indicator for *Taxodium dubium* as coal progenitor of "Chukurovo" lignite, Bulgaria. *Bulletin of the Geological Society of Greece* 36, 342-347.
- Stefanova, M., Markova, K., Marinov, S., Simoneit, B.R.T., 2005a.** Biomarkers in the fossils from the Miocene-aged Chukurovo lignite, Bulgaria: sesqui- and diterpenoids. *Bulletin of Geosciences* 80, 93-97.
- Stefanova, M., Markova, K., Marinov, S., Simoneit, B.R.T., 2005b.** Molecular indicators for coal-forming vegetation of the Miocene Chukurovo lignite, Bulgaria. *Fuel* 84, 1830-1838.
- Stefanović, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J., Masselot, M., 1998.** Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *American Journal of Botany* 85, 688-697.
- Stewart, W.W.N., Rothwell, G.W., 1993.** *Paleobotany and the Evolution of Plants*. Cambridge University Press.
- Stockey, R.A., 1982.** The Araucariaceae: An evolutionary perspective. *Review of Palaeobotany and Palynology* 37, 133-154.
- Stockey, R.A., 1994.** Mesozoic Araucariaceae: Morphology and systematic relationships. *Journal of Plant Research* 107, 493-502.
- Stockey, R.A., Hill, R.S., Kvacek, J., Rothwell, G.W., Kvacek, Z., 2005.** Fossil Record of Cupressaceae s. lat. A Monograph of Cupressaceae and *Sciadopitys*, in: Farjon, A. (Ed.). Royal Botanic Gardens, pp. 54-68.
- Su, W.-C., Fang, J.-M., Cheng, Y.-S., 1993.** Hexacarbocyclic triterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 34, 779-782.
- Su, W.-C., Fang, J.-M., Cheng, Y.-S., 1996.** Diterpenoids from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 41, 255-261.

T :

- Tabacik-Wlotzka, C., Laporthe, Y., 1968.** Diterpenes de *Juniperus phoenicea* l. II. acide hydroxy-12 labdene-8(20)oique-19. *Tetrahedron Letters* 9, 3141-3144.

- Tabacik-Wlotzka, C., Poisson, C., 1971.** Diterpenes de *Juniperus phoenicea*: Constituants mineurs. *Phytochemistry* 10, 1639-1645.
- Takahashi, K., Nagahama, S., Nakashima, T., Suenaga, H., 2001.** Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.--Analysis of neutral extracts (diterpene hydrocarbon). *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 839-848.
- Taylor, T.N., Taylor, E.L., Krings, M., 2009.** Paleobotany: The biology and evolution of fossil plants. Academic Press.
- Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Derenne, S., Largeau, C., 1989.** A reappraisal of kerogen formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53, 3103-3106.
- Thomas, B.R., 1969.** Kauri resins-modern and fossil. In: Eglinton, G., Murphy, M.T.J. (Eds.), *Organic Geochemistry – Methods and Results*. Springer, Berlin, 599–618.
- Thomas, B.R., 1970.** Modern and fossil plant resins, in: Harborne, J.B. (Ed.), *Phytochemical Phylogeny*. Academic Press, London, pp. 59-79.
- Tissot, B.P., Welte, D.H., 1984.** Petroleum formation and occurrence, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin and New York.
- Townrow, J.A., 1969.** Some lower Mesozoic Podocarpaceae and Araucariaceae, Gondwana Stratigraphy." IUGS Symposium, Buenos Aires UNESCO, Paris, pp. 159-184.
- Townrow, J.A., 1967.** Rissikia and mataia podocarpaceous conifers from lower Mesozoic of southern lands, Papers and proceedings of the Royal Society of Tasmania, pp. 103-138.
- Trigo, J.R., Leal, I.R., Matzenbacher, N.I., Lewinsohn, T.M., 2003.** Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil Senecio (Senecioneae: Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 1011-1022.
- Truswell, E., 1990.** Cretaceous and Tertiary Vegetation of Antarctica: A Palynological Perspective, in: Taylor, T., Taylor, E. (Eds.), *Antarctic Paleobiology*. Springer New York, pp. 71-88.
- Tuo, J., Philp, R.P., 2005.** Saturated and aromatic diterpenoids and triterpenoids in Eocene coals and mudstones from China. *Applied Geochemistry* 20, 367-381.
- Turmel, M., Pombert, J., Francois, Charlebois, P., Otis, C., Lemieux, C., 2007.** The green algal ancestry of land plants as revealed by the chloroplast genome. *International Journal of Plant Sciences* 168, 679-689.

U:

- Ueda, N., Dewa, N., Hayashida, Y., Yamamoto, J., Nakashima, R., 1990.** The diterpene hydrocarbons in the leaves of umbrella pine, *Sciadopitys verticillata* Sieb. et Zucc. *Chemistry Express* 5, 833-836.

- Upchurch Jr, G.R., Wolfe, J.A., 1987.** Mid-Cretaceous to Early Tertiary vegetation and climate: Evidence from fossil leave and woods, in: Friis, E.M., Chaloner, W.G., Crane, P.R. (Eds.), *The origins of angiosperms and their biological consequences*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 75-105.
- Ungur, N., Gavagnin, M., Mollo, E., Cimino, G., 1999.** Absolute stereochemistry of anisodorin 5. *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 1635-1636.
- Ungur, N., Gavagnin, M., Fontana, A., Cimino, G., 2000.** Synthetic studies on natural diterpenoid glyceryl esters. *Tetrahedron* 56, 2503-2512.

V:

- van Aarssen, B.G.K., Alexander, R., Kagi, R.I., 2000.** Higher plant biomarkers reflect palaeovegetation changes during Jurassic times. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 1417-1424.
- van Aarssen, B.G.K., Cox, H.C., Hoogendoorn, P., de Leeuw, J.W., 1990.** A cadinene biopolymer in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from South East Asia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 3021-3031.
- van Aarssen, B.G.K., Hessels, J.K.C., Abbink, O.A., de Leeuw, J.W., 1992.** The occurrence of polycyclic sesqui-, tri-, and oligoterpenoids derived from a resinous polymeric cadinene in crude oils from southeast Asia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 1231-1246.
- van der Ham, R.W.J.M., van Konijnenburg-van Cittert, J.H.A., Dortangs, R.W., Herengreen, G.F.W., van der Burgh, J., 2003.** *Brachyphyllum patens* (Miquel) comb. nov. (Cheirolepidiaceae?): remarkable conifer foliage from the Maastrichtian type area (Late Cretaceous, NE Belgium, SE Netherlands). *Review of Palaeobotany and Palynology* 127, 77-97.
- van der Ham, R.W.J.M., Jagt, J.W.M., Renkens, S., van Konijnenburg-van Cittert, J.H.A., 2010.** Seed-cone scales from the upper Maastrichtian document the last occurrence in Europe of the Southern Hemisphere conifer family Araucariaceae. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 291, 469-473.
- van Krevelen, D.W., 1993.** *Coal: typology, physics, chemistry, constitution*. Elsevier.
- van Wyk, B.-e., Verdoorn, G.H., 1990.** Alkaloids as taxonomic characters in the tribe Crotalariaeae (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 18, 503-515.
- Vandenbroucke, M., Largeau, C., 2007.** Kerogen origin, evolution and structure. *Organic Geochemistry* 38, 719-833.
- Vichi, S., Aumatell, M.R., Buxaderas, S., López-Tamames, E., 2008.** Assessment of some diterpenoids in commercial distilled gin. *Analytica Chimica Acta* 628, 222-229.
- Vliex, M., Hagemann, H.W., Püttmann, W., 1994.** Aromatized arborane/fernane hydrocarbons as molecular indicators of floral changes in Upper Carboniferous/Lower Permian strata of

the Saar-Nahe Basin, southwestern Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 4689-4702.

W:

- Wagner, M.R., Clancy, K.M., Tinus, R.W., 1989.** Maturational variation in needle essential oils from *Pseudotsuga menziesii*, *Abies concolor* and *Picea engelmannii*. *Phytochemistry* 28, 765-770.
- Wagstaff, S.J., 2004.** Evolution and biogeography of the austral genus *Phyllocladus* (Podocarpaceae). *Journal of Biogeography* 31, 1569-1577.
- Wakeham, S.G., Schaffner, C., Giger, W., 1980.** Poly cyclic aromatic hydrocarbons in Recent lake sediments—II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 415-429.
- Wang, L., Lee, F.S.C., Wang, X.R., Yin, Y.F., Li, J.R., 2007.** Chemical characteristics and source implications of petroleum hydrocarbon contaminants in the sediments near major drainage outfalls along the coastal of Laizhou Bay, Bohai Sea, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 125, 229-237.
- Wang, X.Q., Tank, D.C., Sang, T., 2000.** Phylogeny and divergence times in Pinaceae: Evidence from three genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17, 773-781.
- Wang, Y.F., Su, X.H., Li, L.G., Wang, W., Zhang, M.L., Huo, C.H., Shi, Q.W., 2009.** Verticillane derivatives from natural sources. *Chemistry & Biodiversity* 6, 1661-1673.
- Wang, Y.-F., Xiang, Q.-P., Ferguson, D.K., Zastawniak, E., Yang, J., Li, C.-S., 2006.** A new species of *Keteleeria* (Pinaceae) in the Shanwang Miocene flora of China and its phytogeographic connection with North America. *Taxon* 55, 165-171.
- Waterman, P.G., 1975.** Alkaloids of the Tutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 3, 149-180.
- Watson, J., 1988.** The Cheirolepidiaceae, *Origin and evolution of Gymnosperms* ed. by Charles B. Beck. Columbia University Press, New York, pp. 382-447.
- Wei, H.X., Gao, W.Y., Tian, Y.J., Guan, Y.K., Huang, M.H., Cheng, D.L., 1997.** New eudesmane sesquiterpene and thiophene derivatives from the roots of *Rhaponticum uniflorum*. *Pharmazie* 52, 245-247.
- Wenkert, E., de Paiva Campello, J., McChesney, J.D., Watts, D.J., 1974.** Diterpenes of *Podocarpus ferrugineus* bark. *Phytochemistry* 13, 2545-2549.
- Willard, D.A., 1994.** Palynological record from the North Atlantic region at 3 Ma: vegetational distribution during a period of global warmth. *Review of Palaeobotany and Palynology* 83, 275-297.

- Willard, D.A., 1996.** 16. Pliocene–Pleistocene pollen assemblages from the Yermak Plateau, Arctic Ocean: Sites 910 and 911, *Proceedings of the Ocean Drilling Program* 151, 297-305.
- Willis, K.J., McElwain, J.C., 2002.** *The evolution of plants.* Oxford University Press Inc., New York.
- Wolfe, J.A., 1985.** Distribution of major vegetational types during the Tertiary. *Geophysical Monograph Series* 32, 357-375.
- Wolff, R.L., Comps, B., Marpeau, A.M., Deluc, L.G., 1997a.** Taxonomy of *Pinus* species based on the seed oil fatty acid compositions. *Trees - Structure and Function* 12, 113-118.
- Wolff, R., Deluc, L., Marpeau, A., 1996.** Conifer seeds: Oil content and fatty acid composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 765-771.
- Wolff, R.L., Deluc, L.G., Marpeau, A.M., Comps, B., 1997b.** Chemotaxonomic differentiation of conifer families and genera based on the seed oil fatty acid compositions: multivariate analyses. *Trees - Structure and Function* 12, 57-65.
- Wolff, R., Lavialle, O., Pédrone, F., Pasquier, E., Deluc, L., Marpeau, A., Aitzetmüller, K., 2001.** Fatty acid composition of Pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* 36, 439-451.
- Won, H., Renner, S.S., 2006.** Dating dispersal and radiation in the gymnosperm Gnetum (Gnetales)—clock calibration when outgroup relationships are uncertain. *Systematic Biology* 55, 610-622.
- Wu, L., Li, Y.L., Li, S.M., Yang, X.W., Xia, J.H., Zhou, L., Zhang, W.D., 2010.** Systematic phytochemical investigation of *Abies spectabilis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58, 1646-1649.
- Wu, Q.X., Shi, Y.P., Jia, Z.J., 2006.** Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural product reports : a journal of current developments in bio-organic chemistry* 23, 699-734.

X:

- Xiang, X., Cao, M., Zhou, Z., 2006.** Fossil history and modern distribution of the genus *Abies* (Pinaceae). *Acta Botanica Yunnanica* 28, 439-452.
- Xu, Y., Jaffé, R., Simoneit, B.R.T., 2008.** Oxygenated spiro-triterpenoids possibly related to arborenes in sediments of a tropical, freshwater lake. *Organic Geochemistry* 39, 1400-1404.

Y:

- Yang, Z.-Y., Ran, J.-H., Wang, X.-Q., 2012.** Three genome-based phylogeny of Cupressaceae s.l.: Further evidence for the evolution of gymnosperms and Southern Hemisphere biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64, 452-470.
- Yao, X., Taylor, T., Taylor, E., 1997.** A taxodiaceous seed cone from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany* 84, 343-354.
- Yao, X., Zhou, Z., Zhang, B., 1998.** Reconstruction of the Jurassic conifer *Sewardiodendron laxum* (Taxodiaceae). *American Journal of Botany* 85, 1289-1300.
- Yatagai, M., Sato, T., 1986.** Terpenes of leaf oils from Conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 469-478.
- Ying, T.-S., Zhang, Y.-L., Boufford, D.E., 1993.** The endemic genera of seed plants of China. Science Press Beijing.

Z :

- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001.** Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292, 686-693.
- Zhang, J.-W., D'Rozario, A., Wang, L.-J., Li, Y., Yao, J.-X., 2012.** A new species of the extinct genus *Austrohamia* (Cupressaceae s.l.) in the Daohugou Jurassic flora of China and its phytogeographical implications. *Journal of Systematics and Evolution* 50, 72-82.
- Zinkel, D.F., Clarke, W.B., 1985.** Resin acids of *Pinus resinosa* needles. *Phytochemistry* 24, 1267-1271.
- Zinkel, D.F., Magee, T.V., Walter, J., 1985.** Major resin acids of *Pinus nigra* needles. *Phytochemistry* 24, 1273-1277.

Annexe

Annexe I

Rang taxonomique botanique :

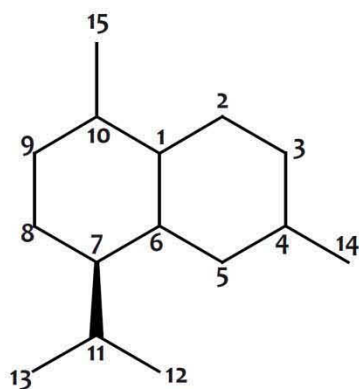
- **Règne** (Regnum)
 - **Division** ou **embranchement** ou **phylum** (Divisio or phylum)
 - **Classe** (Classis)
 - **Ordre** (Ordo)
 - **Famille** (Familia)
 - Tribu (Tibus)
 - **Genre** (Genus)
 - Section (Sectio)
 - Série (Series)
 - **Espèce** (Species)
 - Variété (Varietas)
 - Forme (Forma)

'International Code of Botanical Nomenclature' (ICBN) (McNeill et al., 2006).

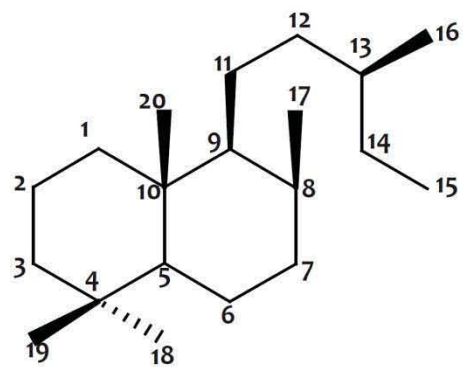
McNeill, J., Barrie, F.R., Burgdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., Nicolson, D.H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H., Turland, N.J., 2006. International code of botanical nomenclature (Vienna Code) : adopted by the Seventeenth International Botanical Congress, Vienna, Austria, July 2005. Koeltz Scientific Books, Königstein, Allemagne.

Annexe II

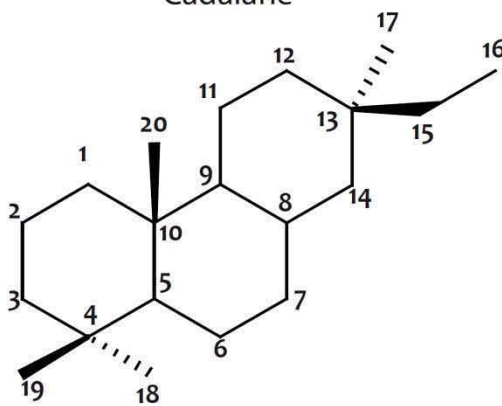
Numérotation des atomes de carbone des sesquiterpénoïdes de la classe des cadalanes ainsi que des diterpénoïdes des classes labdane, pimarane, abiétane et phyllocladane



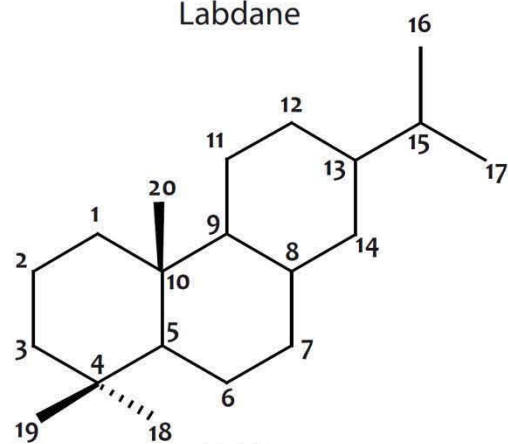
Cadalane



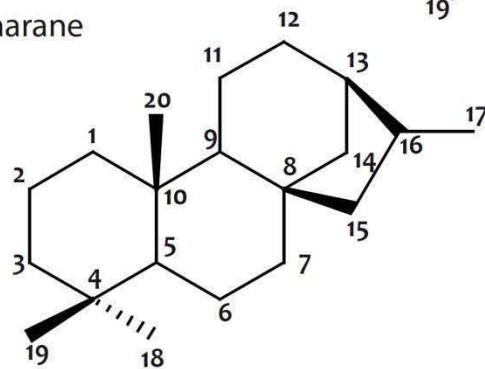
Labdane



Pimarane



Abiétane



Phyllocladane

