



Etude de la Composition
Chimique et de la Biodiversité
du *Calophyllum inophyllum* de
Polynésie française

Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
3. Isolement des molécules par chromatographie
4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
6. Conclusion Générale

Botanique

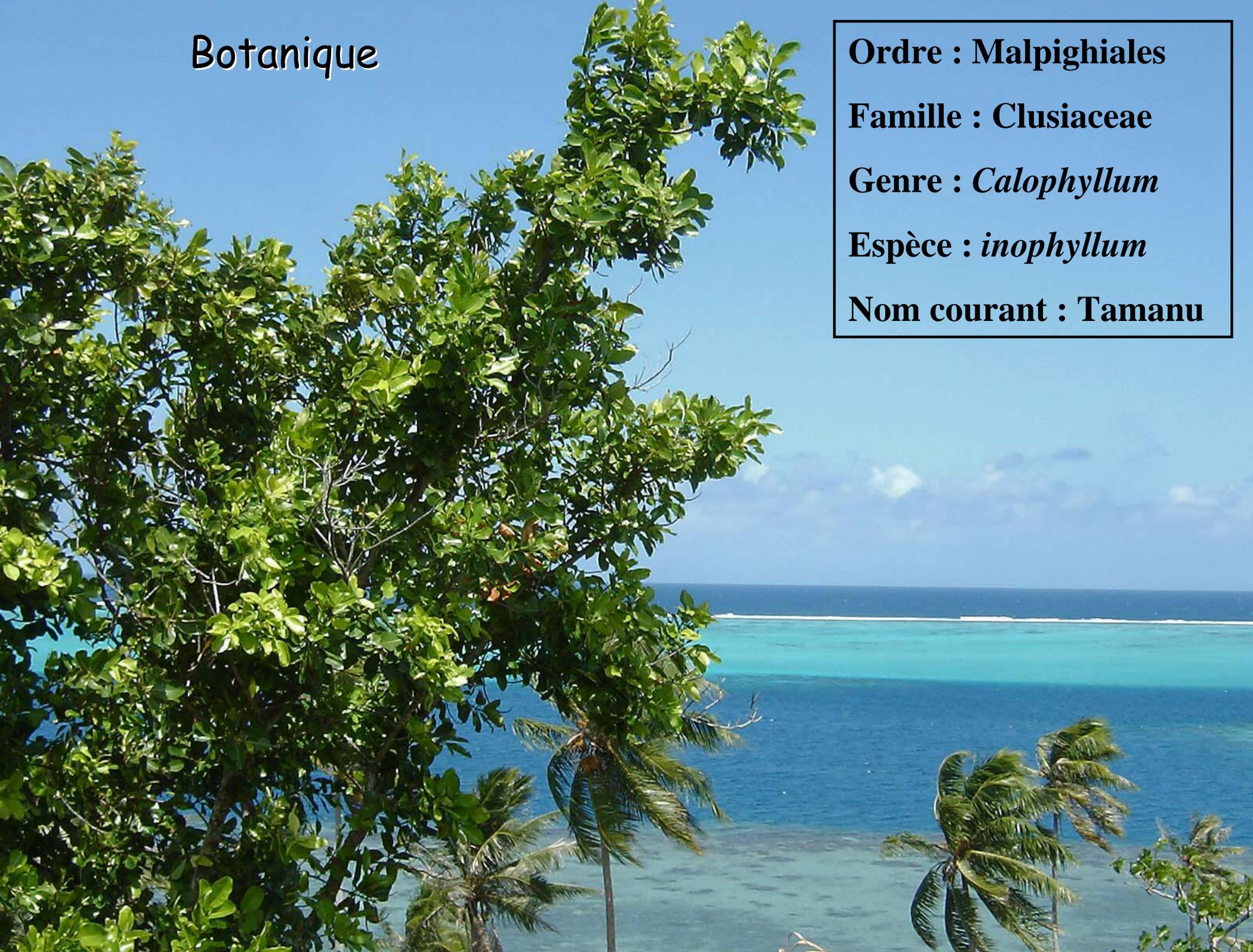
Ordre : Malpighiales

Famille : Clusiaceae

Genre : *Calophyllum*

Espèce : *inophyllum*

Nom courant : Tamanu





Fruits verts

Fruits mûrs ramassés sur le sol

Amande interne

Fleur



Rameau fleuri

Feuille



Ecorce

Ethnobotanique - Utilisations traditionnelles du Tamanu

- Le Tamanu : un arbre sacré
- Le Tamanu : un bois précieux

Umete en Tamanu



Origine : Nuku Hiva

- Le Tamanu : une plante de la pharmacopée traditionnelle polynésienne
- ✓ L'huile : traitement de toutes sortes d'affections de la peau comme les brûlures, les plaies, l'eczéma, etc.



Séchage des amandes au soleil avant pressage

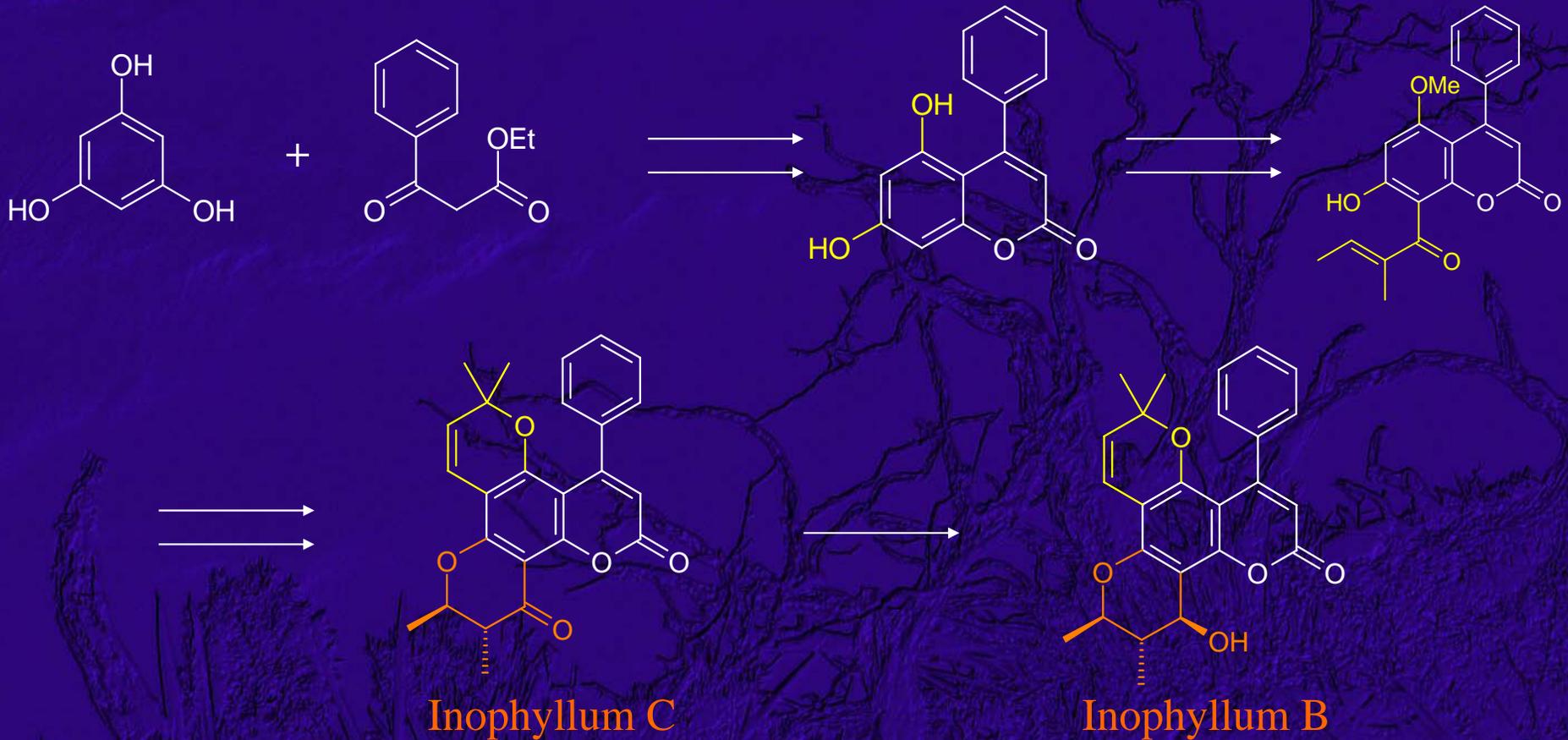
- ✓ Les décoctions de feuilles et d'écorces : traitement des maladies de peau et des conjonctivites



Utilisations modernes - Synthèse des molécules actives

Huile utilisée cliniquement depuis 1934

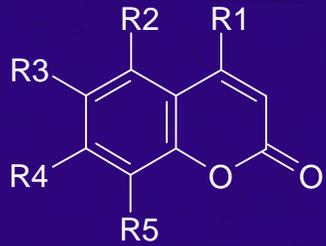
Synthèse de principes actifs :



Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
3. Isolement des molécules par chromatographie
4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
6. Conclusion Générale

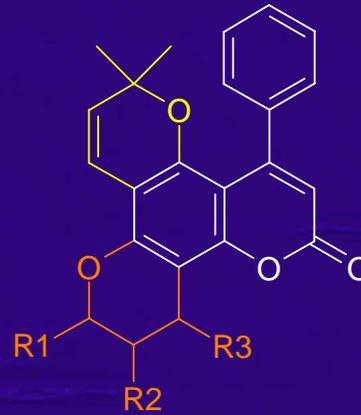
Les coumarines et les néo-flavonoïdes



Coumarines



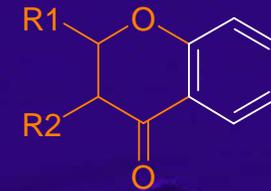
Néo-flavonoïdes



Phényl-coumarines



Hétérocycle
Chromanol



Hétérocycle
chromanone



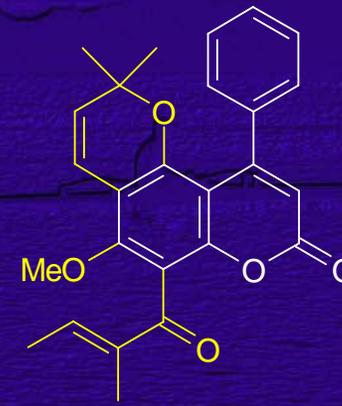
Inophyllum P



Inophyllum C



Inophyllum G1



Calophyllolide



Acide calophyllique

Les xanthones

Isolées à partir d'extraits de bois ou d'écorces

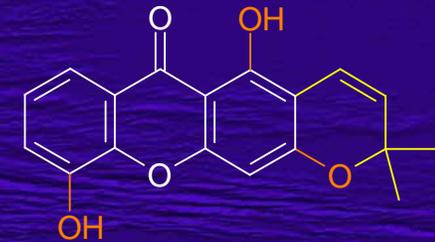
Quelques exemples classés par degré d'oxydation :



Mono-oxygénées :
4-hydroxy-xanthone



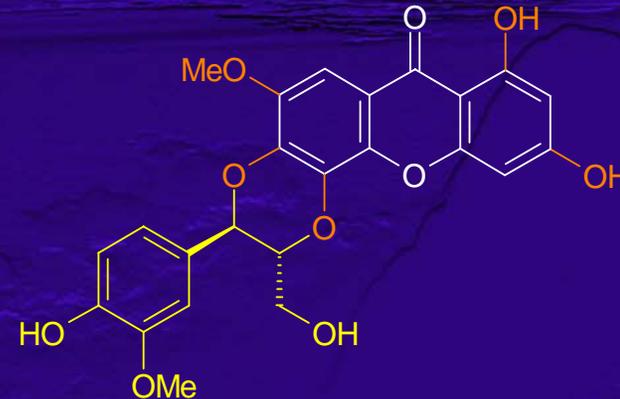
Di-oxygénées :
1-hydroxy-2-méthoxy-xanthone



Tri-oxygénées :
6-déoxy-jacareubine



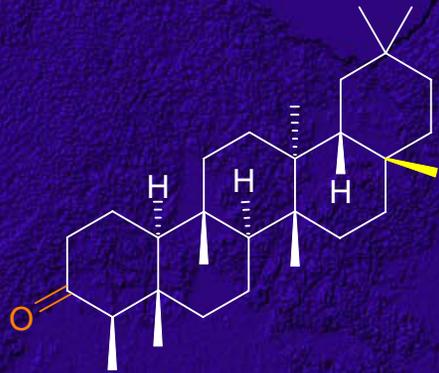
Tétra-oxygénées :
Calophynone



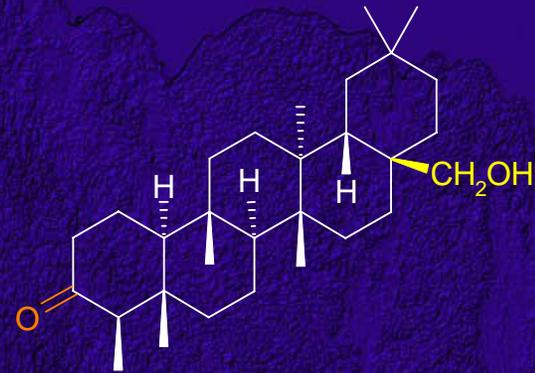
Penta-oxygénées :
Calophyllumine C

Les triterpènes

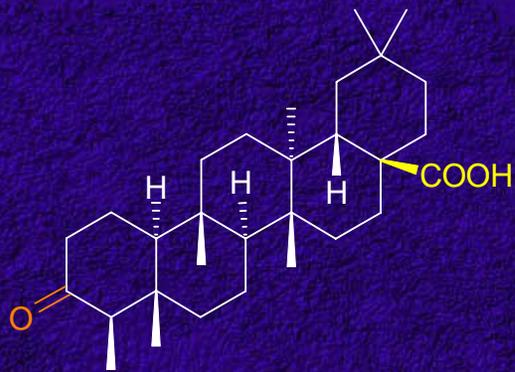
Isolés à partir d'extraits de feuilles



Friedeline



Canophyllol



Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque



Acide canophyllique

Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

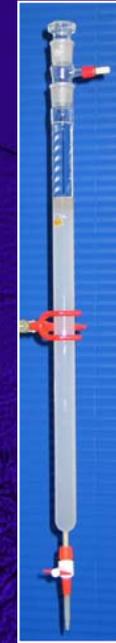
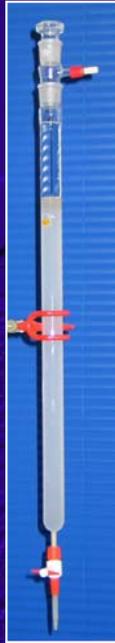
1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
 2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
 3. Isolement des molécules par chromatographie
 4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
 6. Conclusion Générale

Matériel Végétal : Feuilles sèches (2kg)

Extrait à l'acétate d'éthyle (140g)

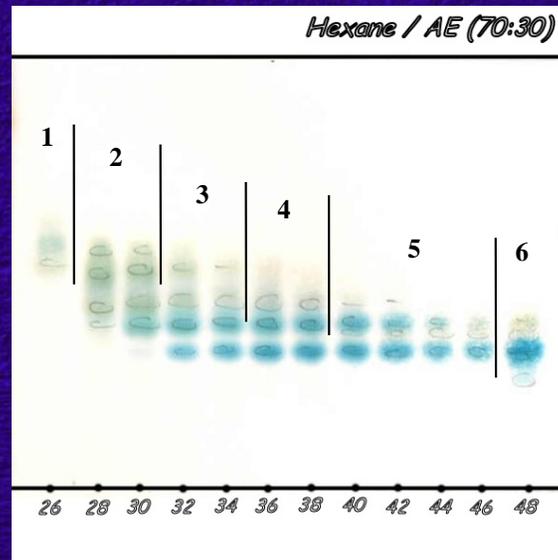
Extrait à l'hexane (25g)

Extrait purifié sur pré-colonne de silice



18 groupes

11 groupes



18 groupes

CLHP préparatives
RI ou DDL

CCM analytiques
de contrôle

Analyses structurales par
RMN ^1H , ^{13}C et 2D, et
par SM/SM

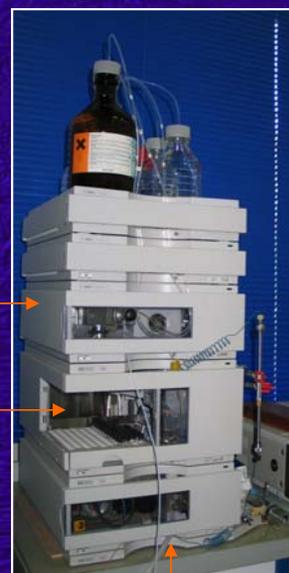
RI DDL Pompe Quaternaire



UV-VWD

Pompe
Quaternaire

Injecteur
Automatique



UV-DAD

11 groupes

CLHP préparatives RI,
DDL ou UV-VWD

CLHP analytiques
avec UV-DAD

Purifications éventuelles
sur CCM préparatives

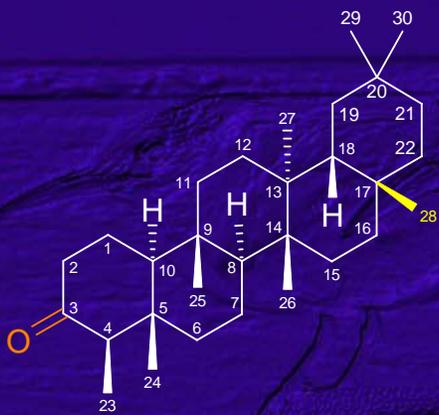
Analyses structurales par
RMN ^1H , ^{13}C et 2D, et
par SM/SM

Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

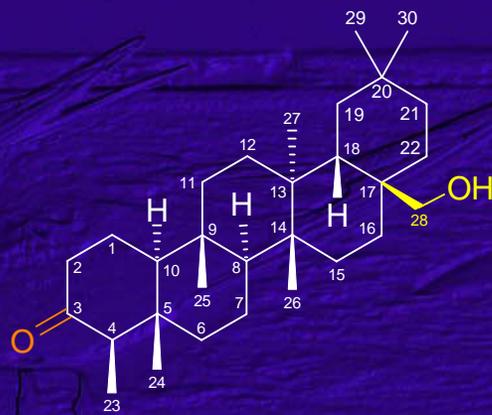
1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
 2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
 3. Isolement des molécules par chromatographie
 4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
 6. Conclusion Générale

Les triterpènes connus

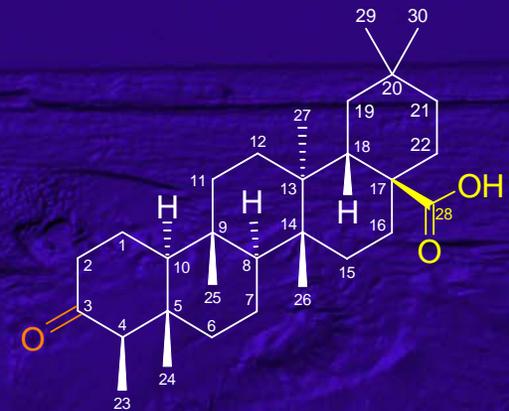
Cinq molécules isolées déjà décrites dans la littérature



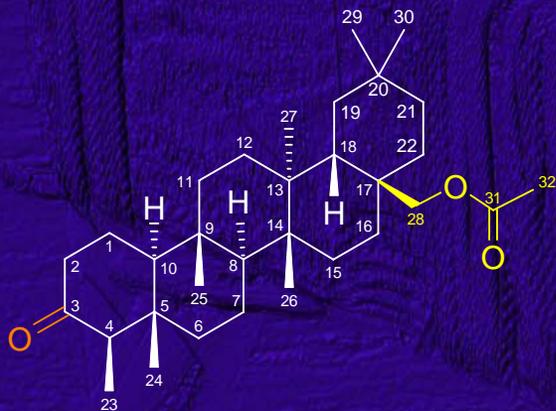
Friedeline



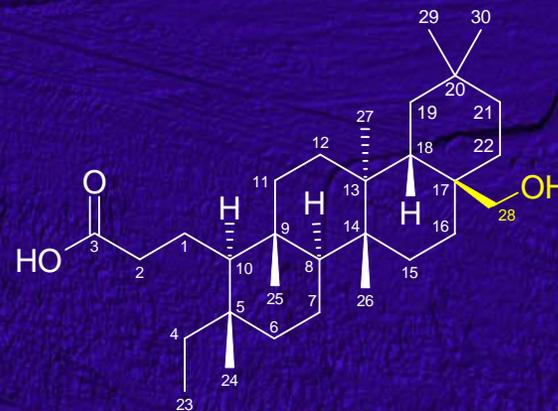
Canophyllol



Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque

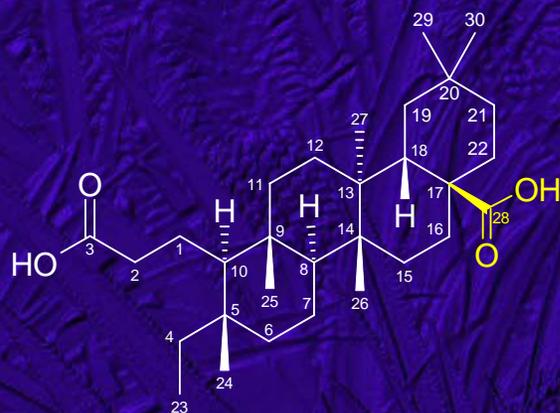


Acétate de canophyllol



Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque

Les nouveaux triterpènes



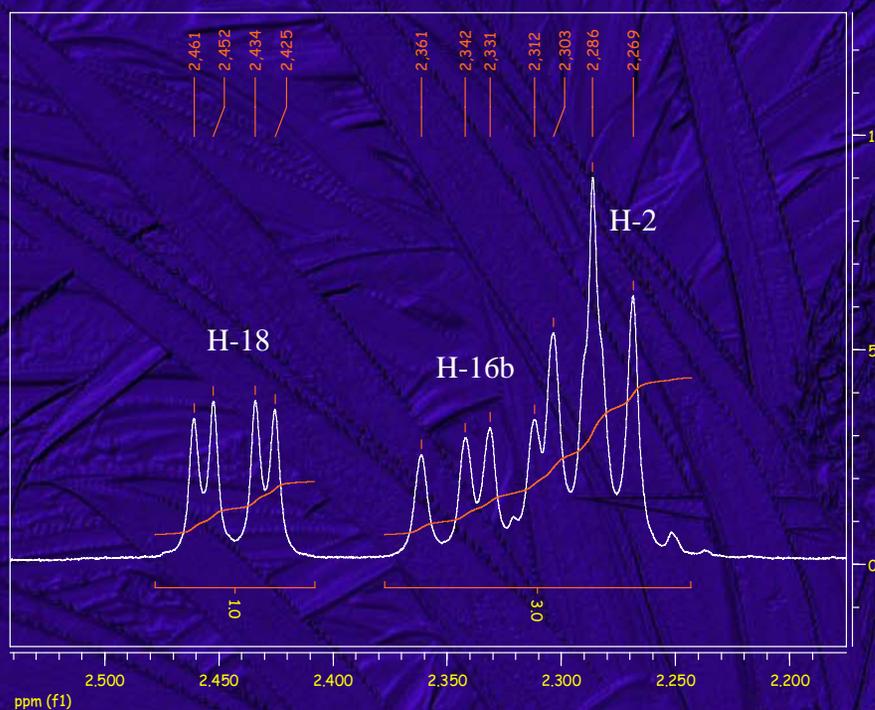
Formule brute : $C_{30}H_{50}O_4$

Masse molaire : 474 g.mol^{-1}

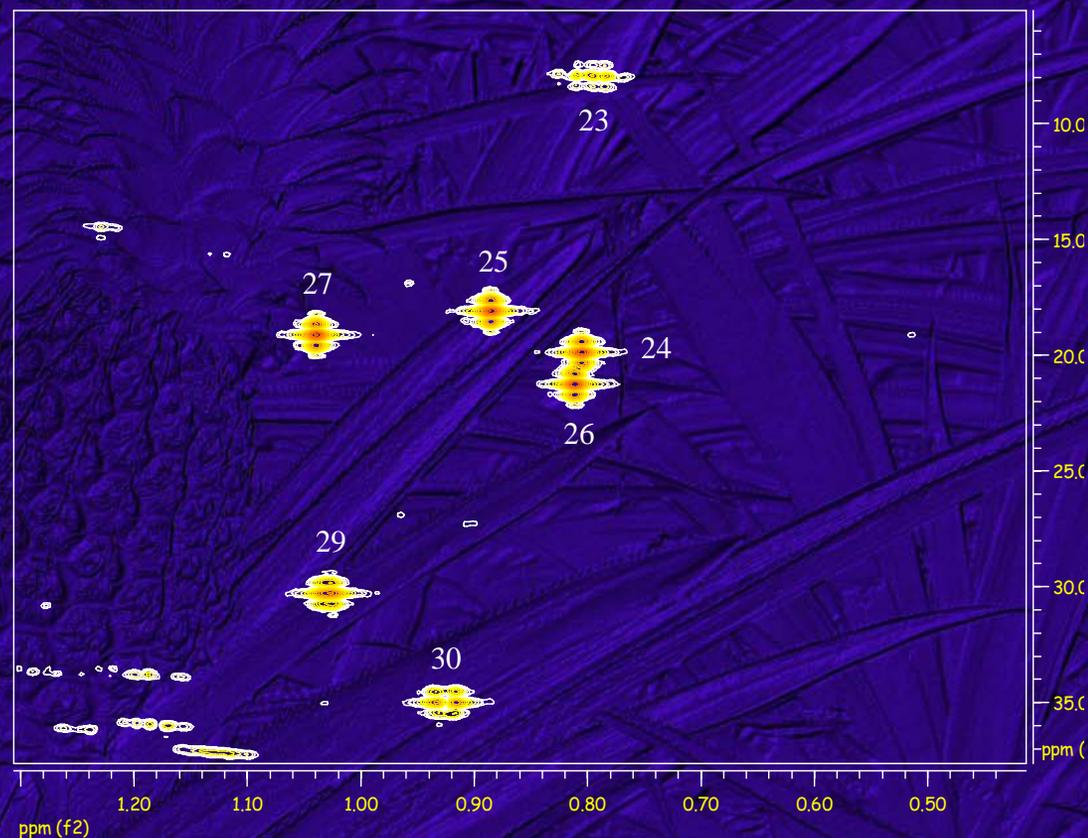
ESI-SM : $m/z [M+NH_4]^+ = 492$

$m/z [M-H]^- = 473$

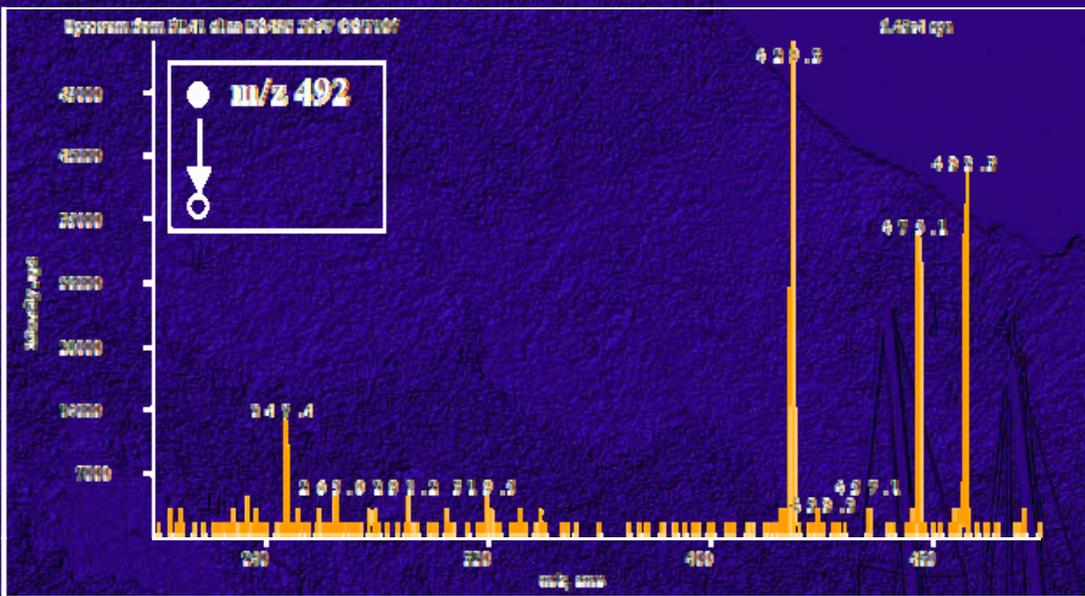
L'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque



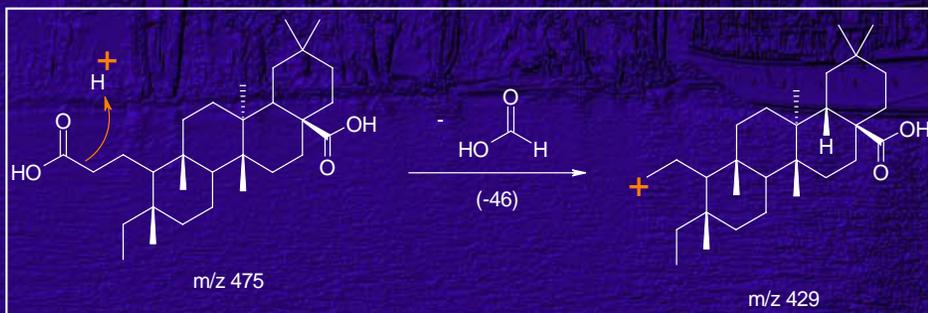
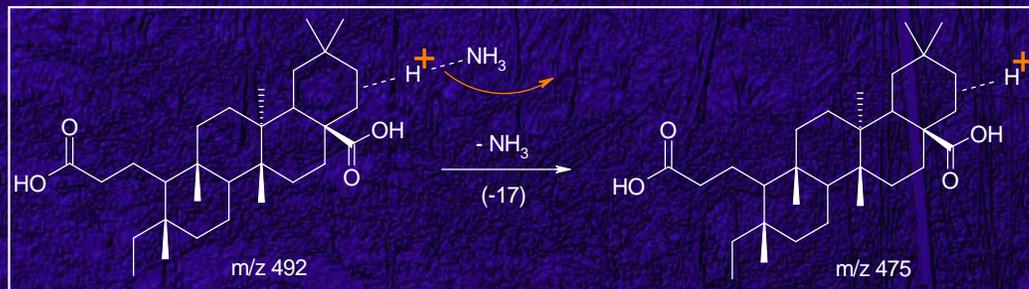
RMN 1H de l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque



RMN HMQC de l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque
(couplage direct proton / carbone)



Spectre des ions fragments de l'ion m/z 492 (SM/SM, mode positif)

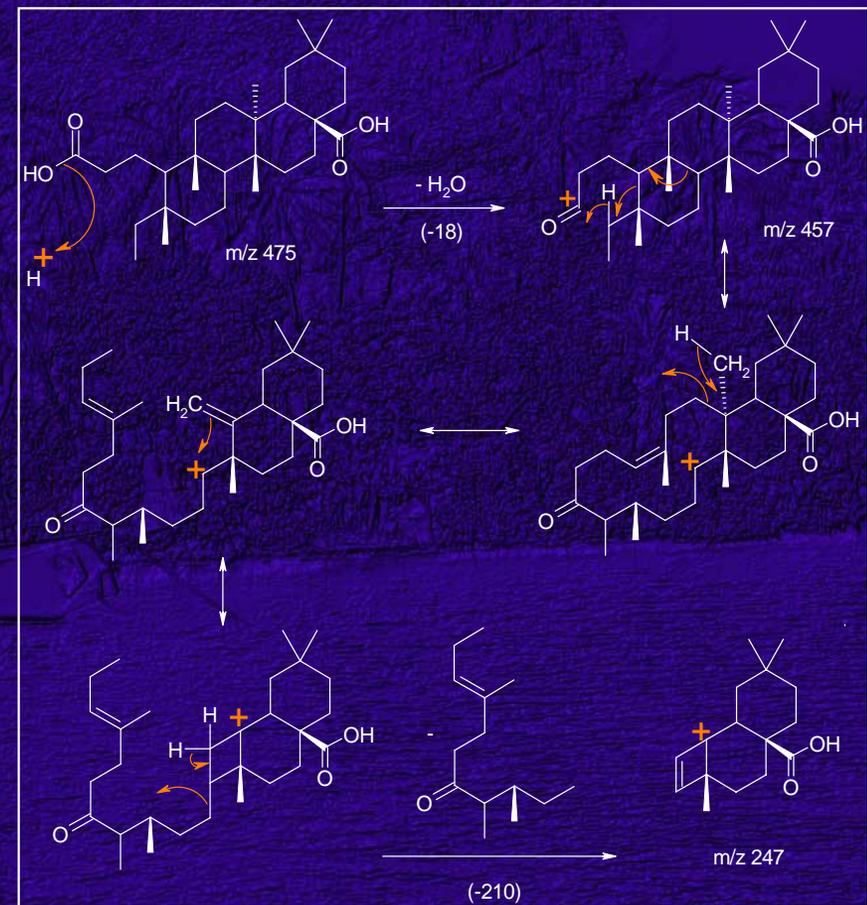


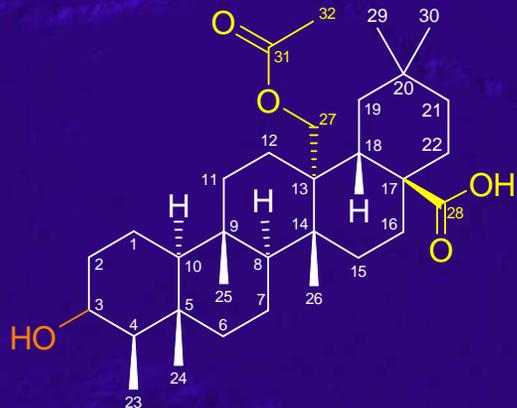
Mode positif :

Adduit ammonium : m/z 492

Ion pseudo-moléculaire : m/z 475

Ions fils en SM/SM : m/z 429, 247





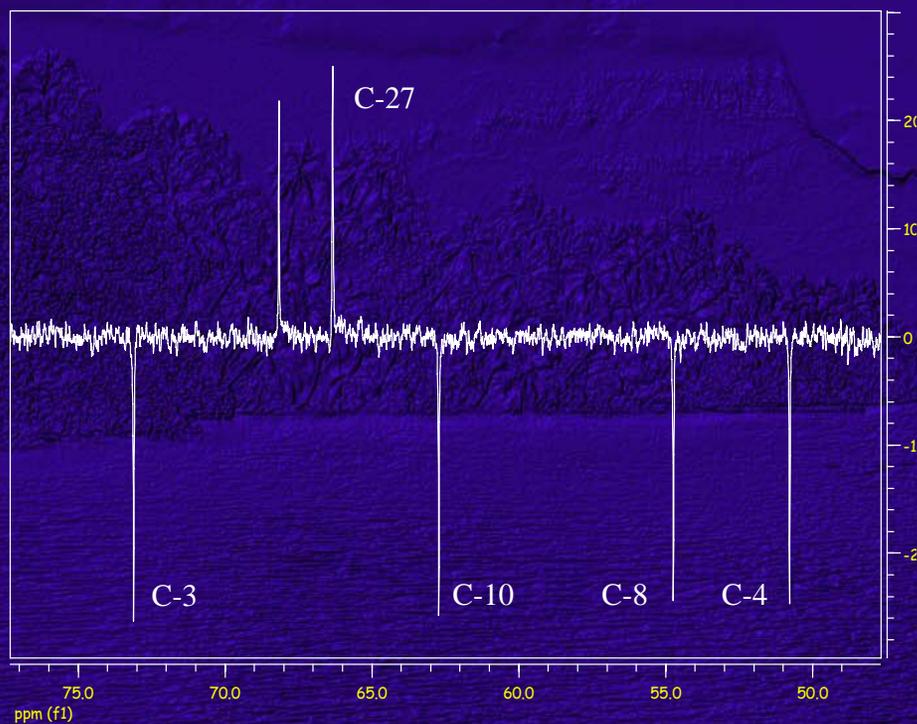
Formule brute : $C_{32}H_{52}O_5$

Masse molaire : 516 g.mol^{-1}

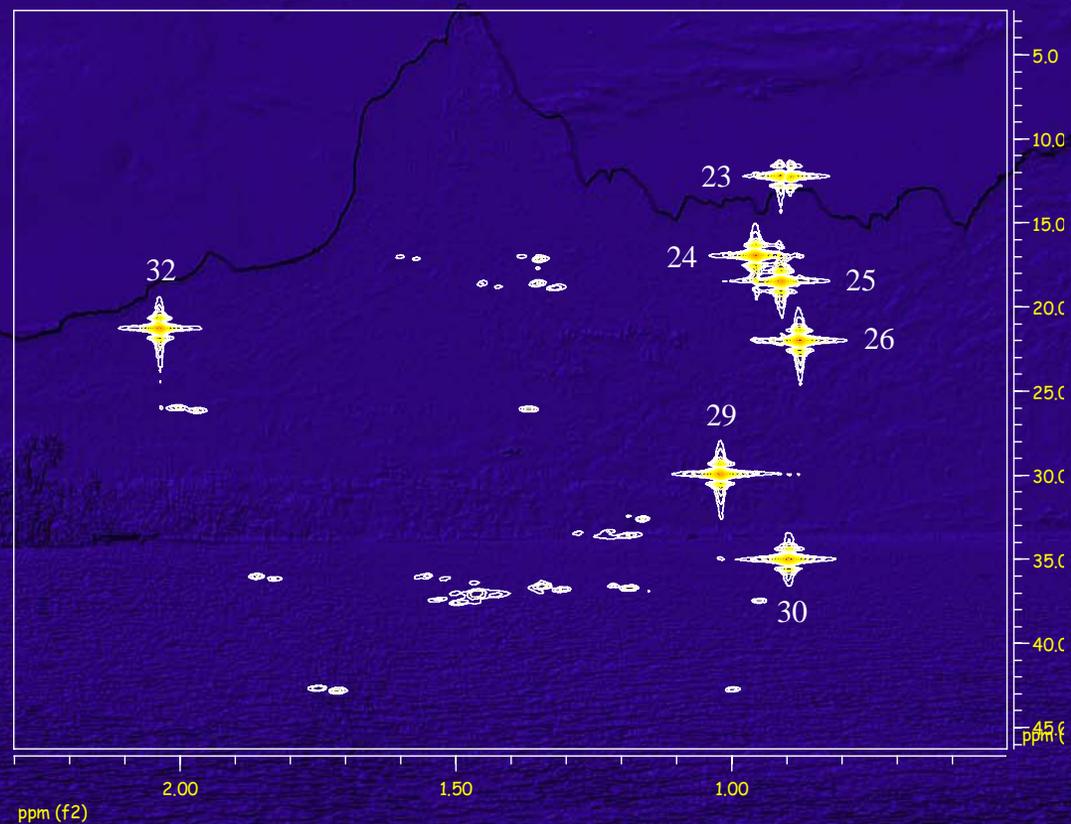
ESI-SM : $m/z [M+NH_4]^+ = 534$

$m/z [M-H]^- = 515$

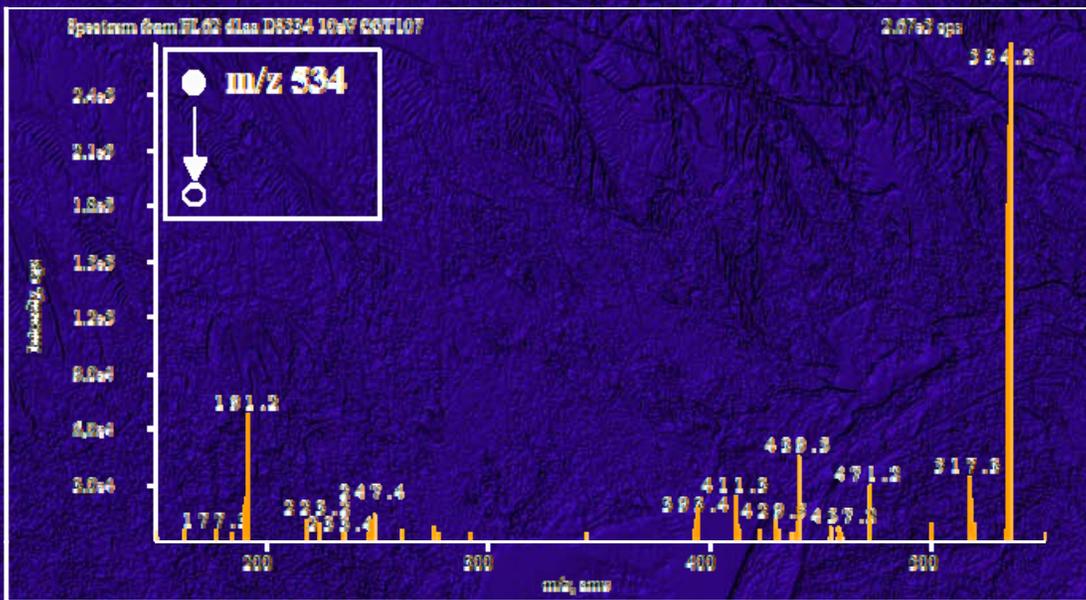
L'acide 27-acétoxy-canophyllique



RMN DEPT de l'acide 27-acétoxy-canophyllique



RMN HMQC de l'acide 27-acétoxy-canophyllique
(couplage direct proton / carbone)



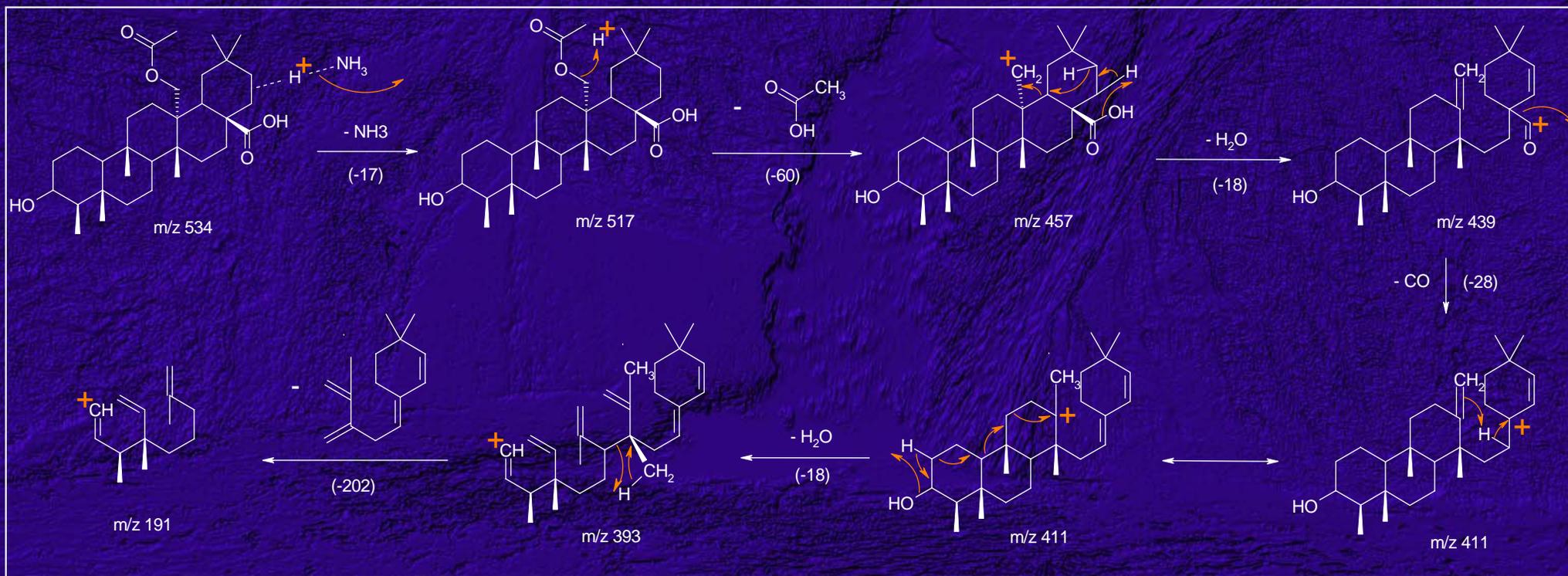
Spectre des ions fragments de l'ion m/z 534 (SM/SM, mode positif)

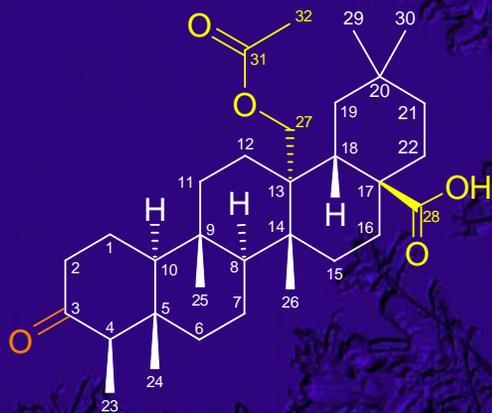
Mode positif :

Adduit ammonium : m/z 534

Ion pseudo-moléculaire : m/z 517

Ions fils en SM/SM : m/z 439, 191





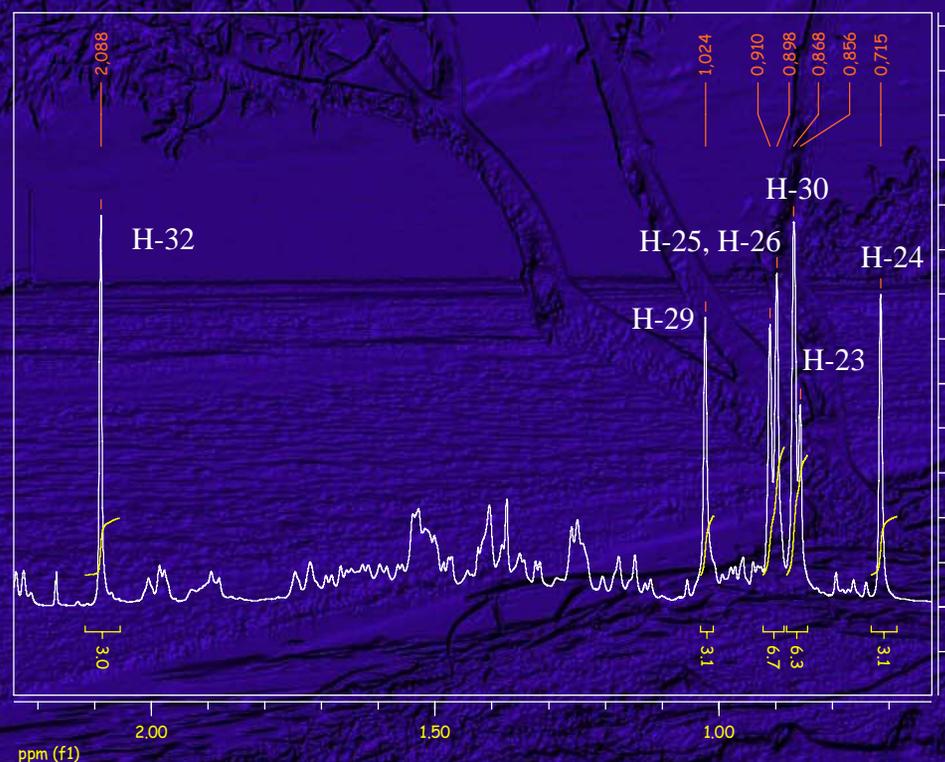
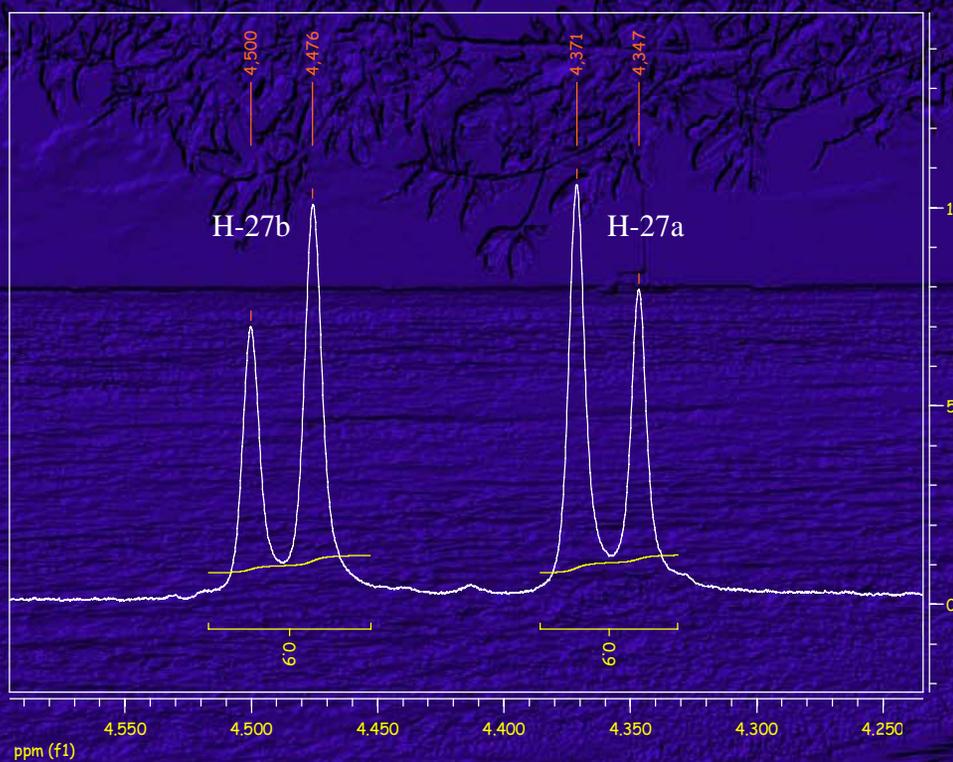
Formule brute : $C_{32}H_{50}O_5$

Masse molaire : 514 g.mol^{-1}

ESI-SM : $m/z [M+NH_4]^+ = 532$

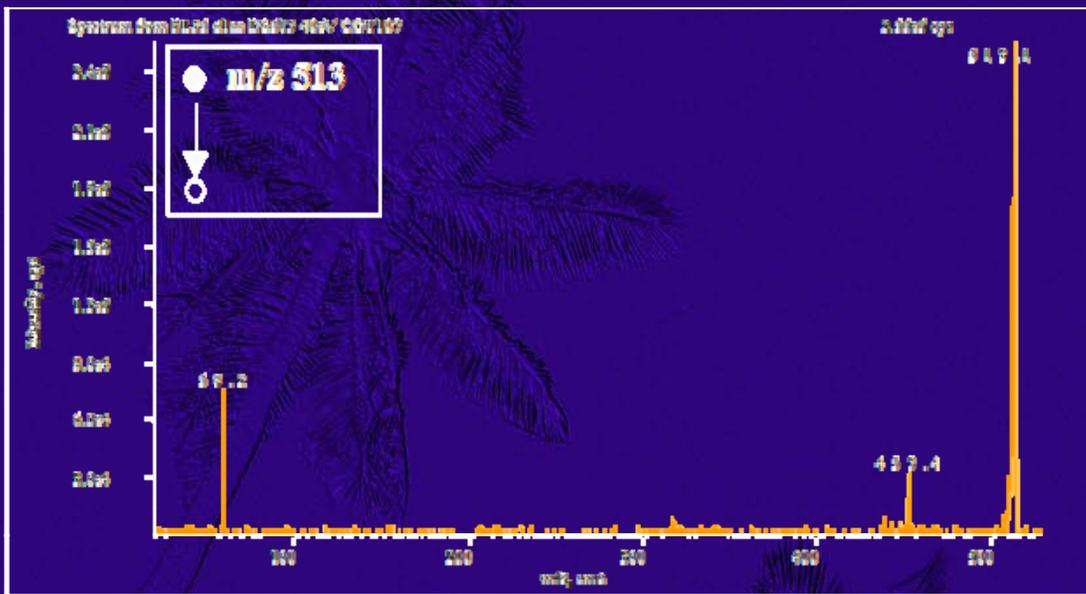
$m/z [M-H]^- = 513$

L'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque



RMN 1H de l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque

Réf : F. Laure, G. Herbette, R. Faure, J.-P. Bianchini, P. Raharivelomanana et B. Fogliani, « Structure of new secofriedelane and friedelane acids from *C. inophyllum* of French Polynesia », Magn. Reson. Chem., 2005, vol 43, n° 1, pp 65-68.

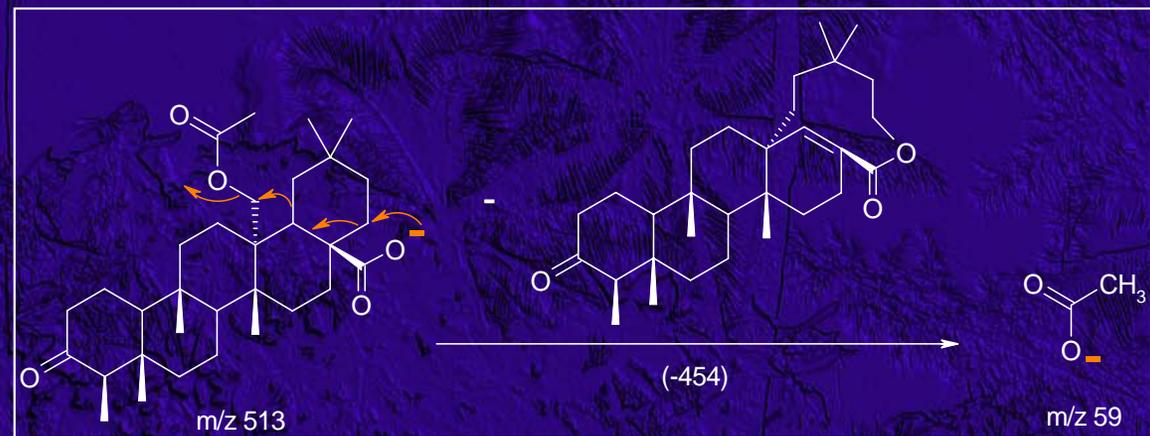
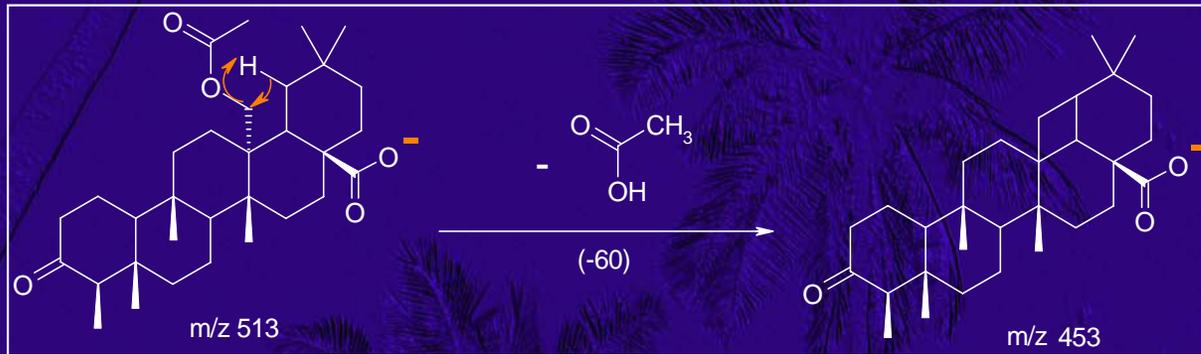


Spectre des ions fragments de l'ion m/z 513 (SM/SM, mode négatif)

Mode négatif :

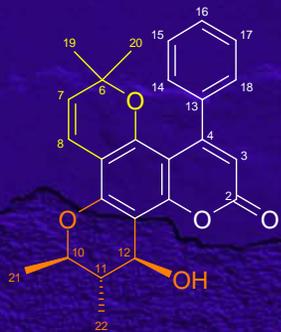
Ion pseudo-moléculaire : m/z 513

Ions fils en SM/SM : m/z 453, 59

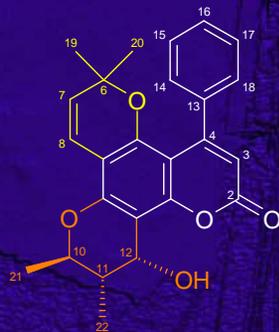


Les coumarines et les néo-flavonoïdes connus

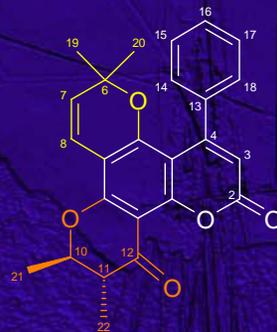
Cinq molécules isolées déjà décrites dans la littérature



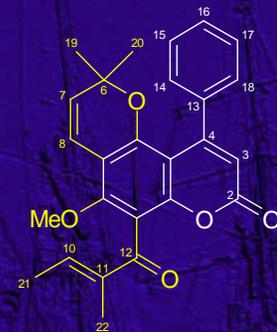
Inophyllum B



Inophyllum P



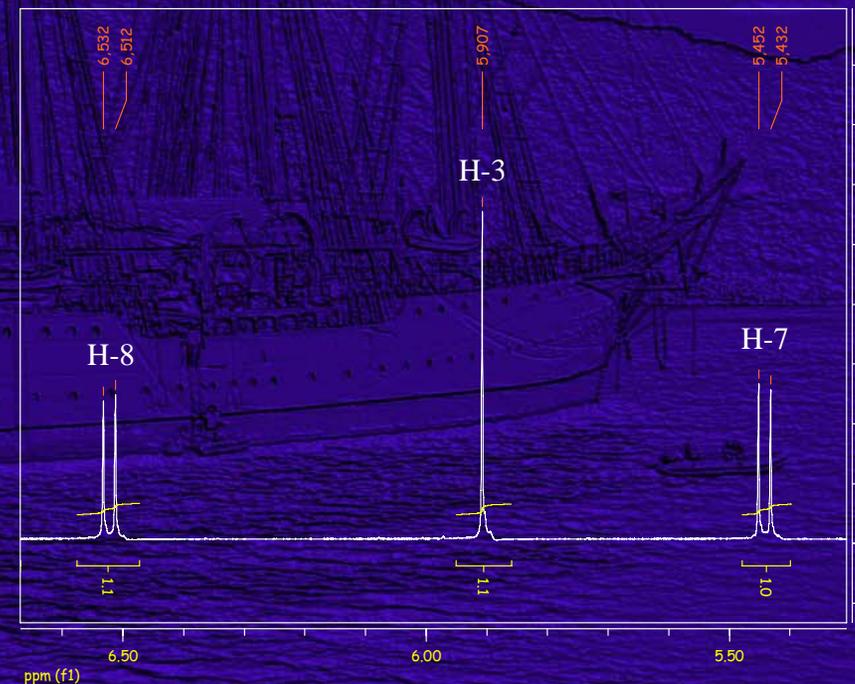
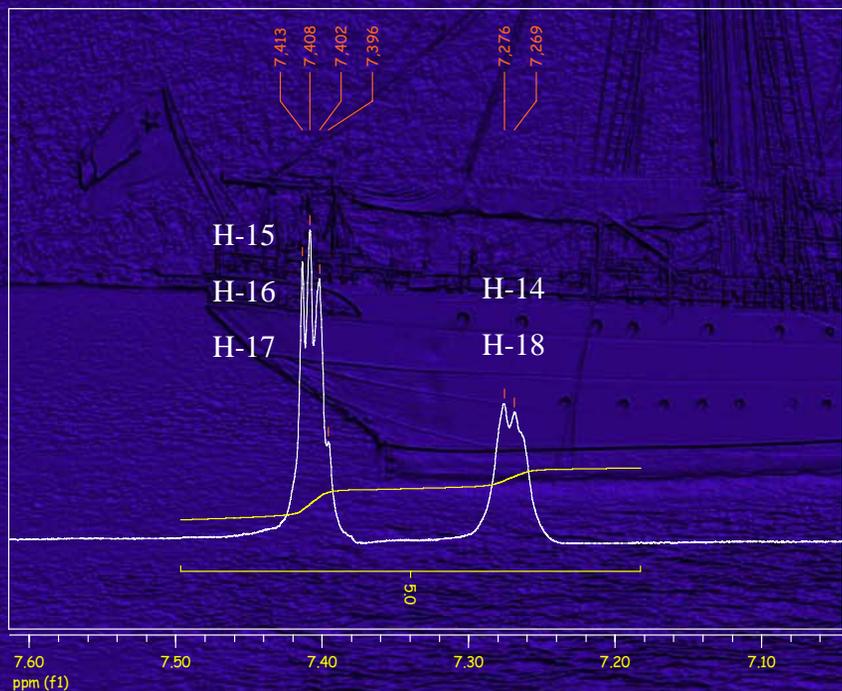
Inophyllum C



Calophyllolide

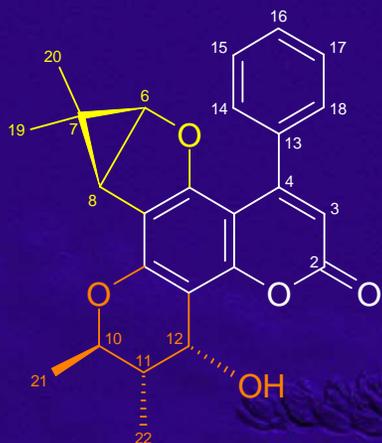
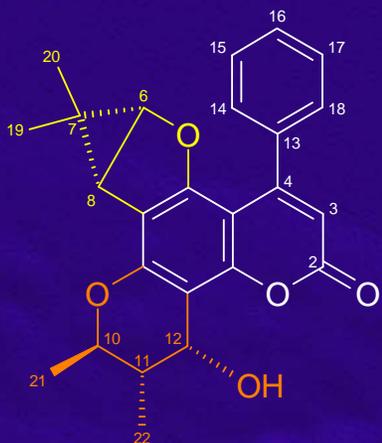


Acide calophyllique



RMN ^1H de l'inophyllum P : protons aromatiques et éthyléniques communs aux cinq molécules

Les nouvelles coumarines



Formule brute : $C_{25}H_{24}O_5$

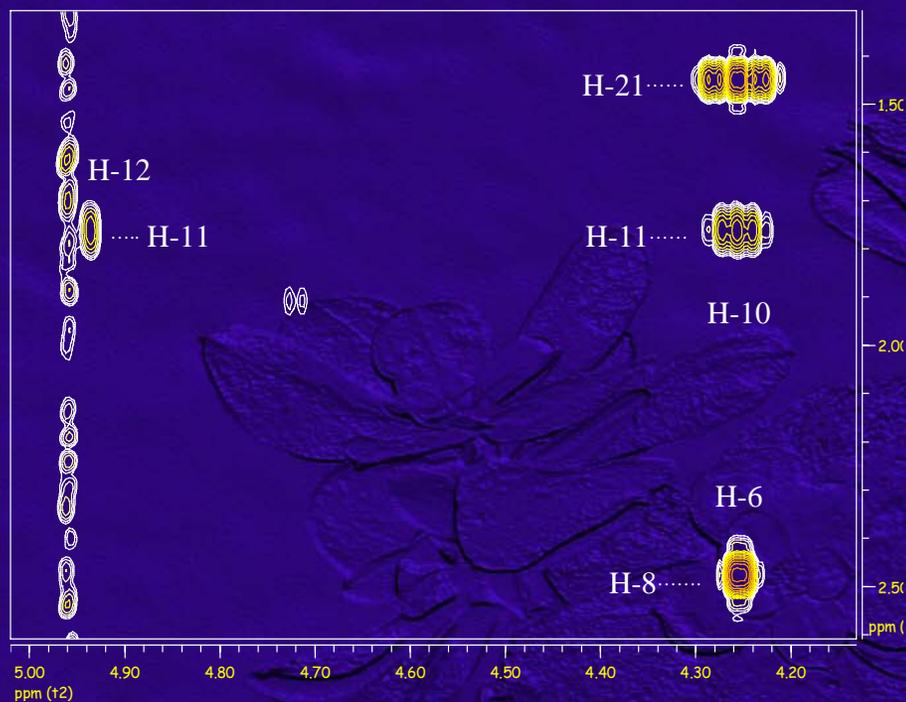
Masse molaire : $404 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

ESI-SM : $m/z [M+H]^+ = 405$

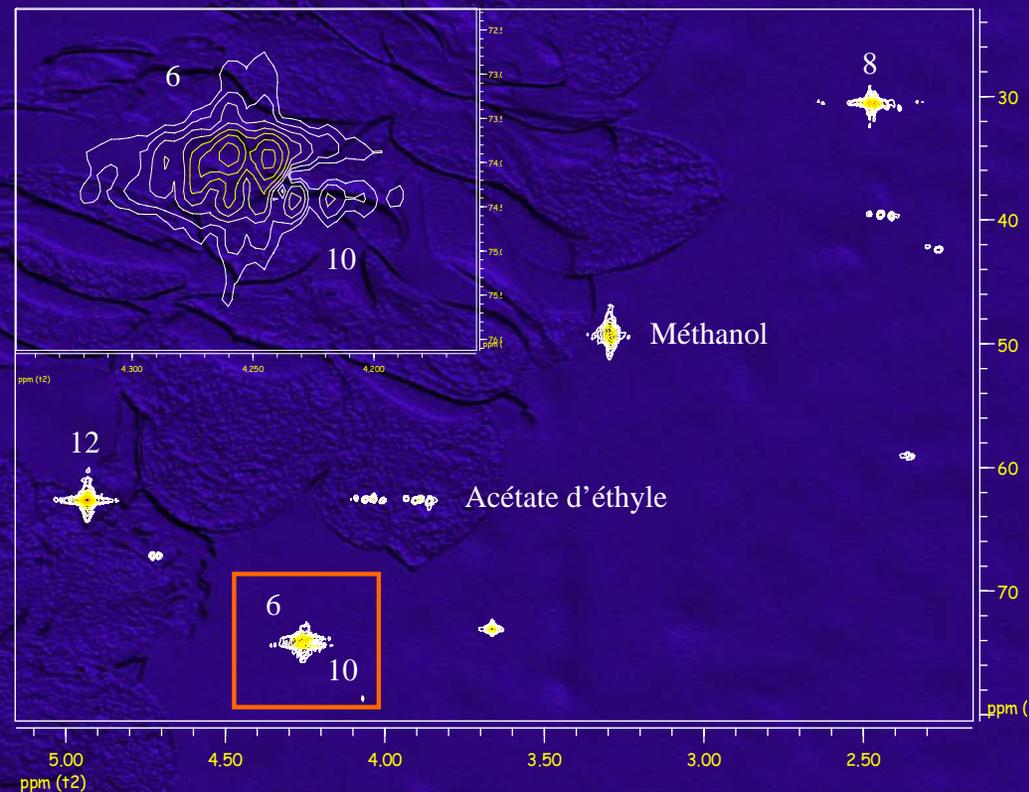
$m/z [M+NH_4]^+ = 422$

Inophyllum F1

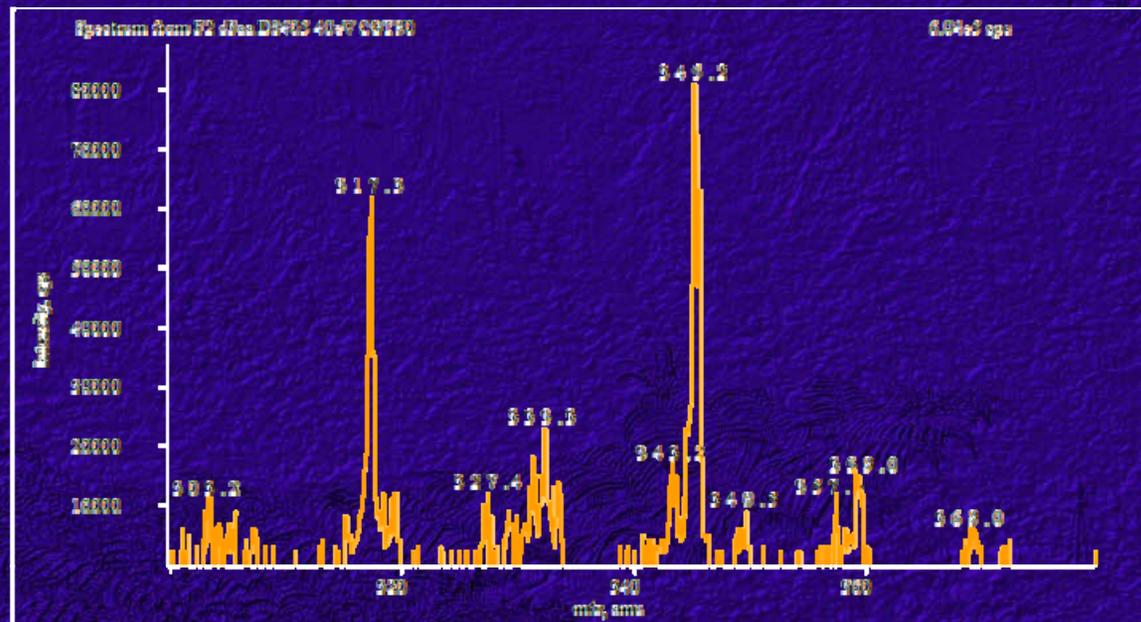
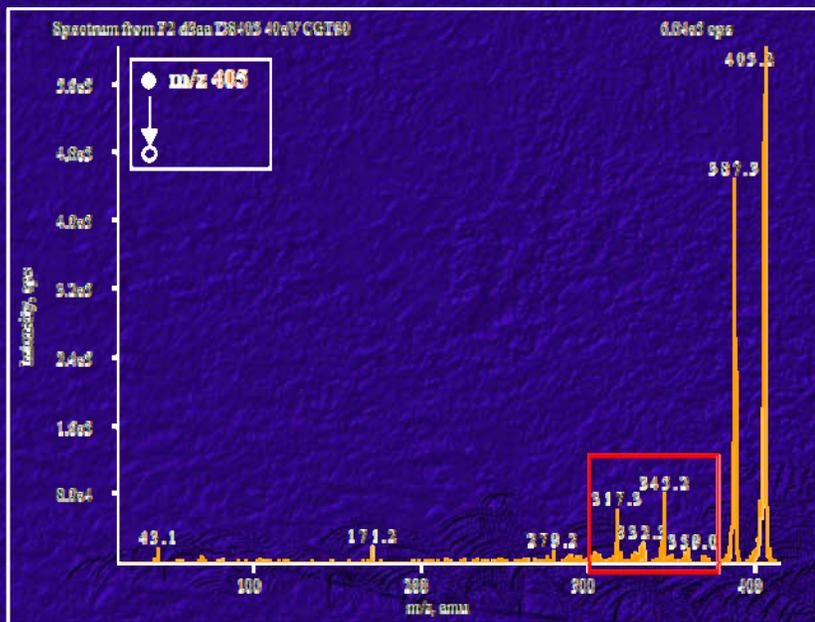
Inophyllum F2



RMN COSY ($^1H/^1H$) de l'inophyllum F2



RMN HMQC ($^1H/^13C$ direct) de l'inophyllum F2



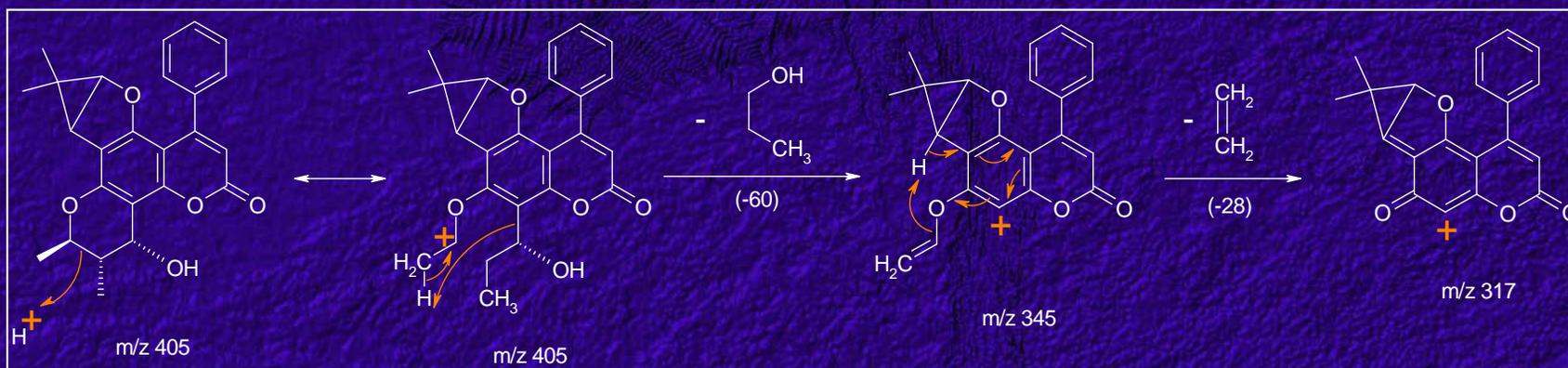
Spectre des ions fragments de l'ion m/z 405 (SM/SM, mode positif) ; agrandissement de la zone entre m/z 300 et m/z 380



Mode positif :

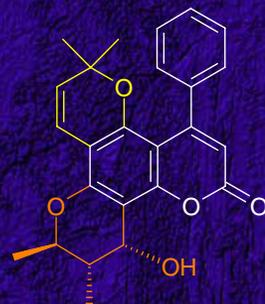
Ion pseudo-moléculaire : m/z 405

Ions fils en SM/SM : m/z 387, 345 et 317

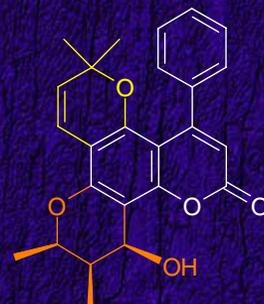




Inophyllum B



Inophyllum P



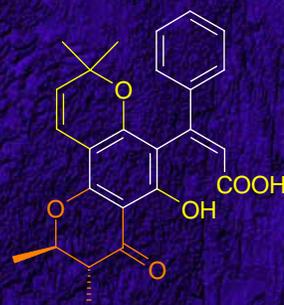
Inophyllum A



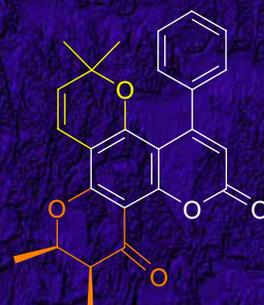
Inophyllum D



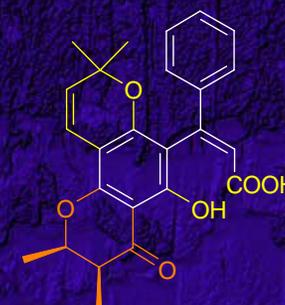
Inophyllum C



Acide calophyllique



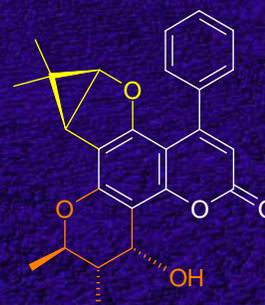
Inophyllum E



Acide isocalophyllique



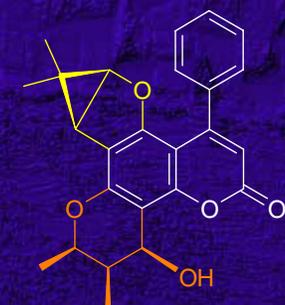
Inophyllum F1



Inophyllum F2



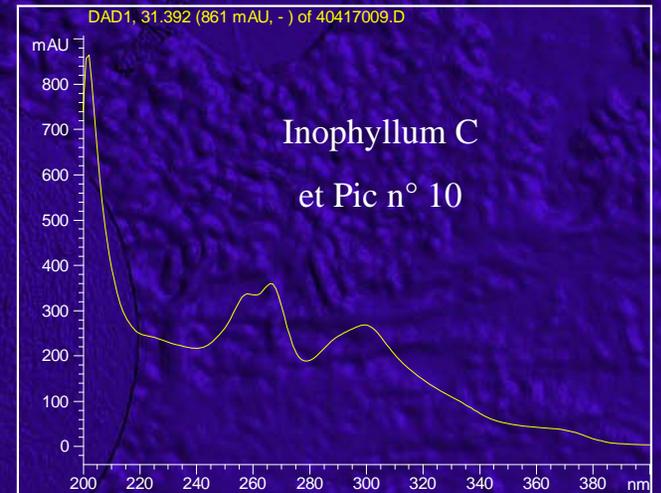
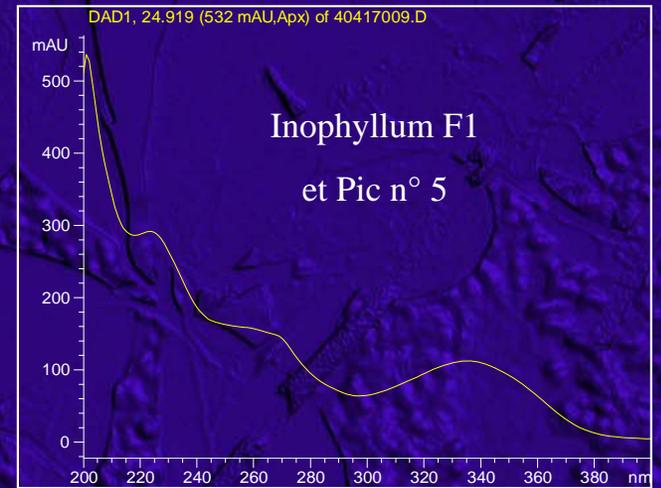
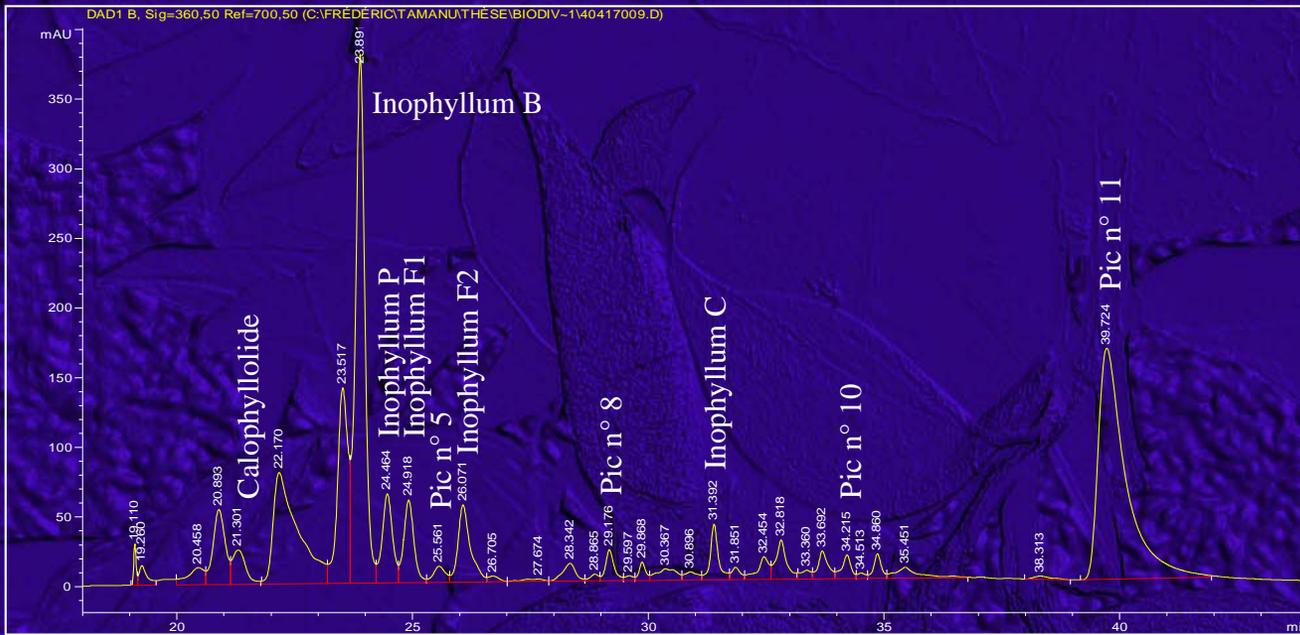
Inophyllum G1



Inophyllum G2

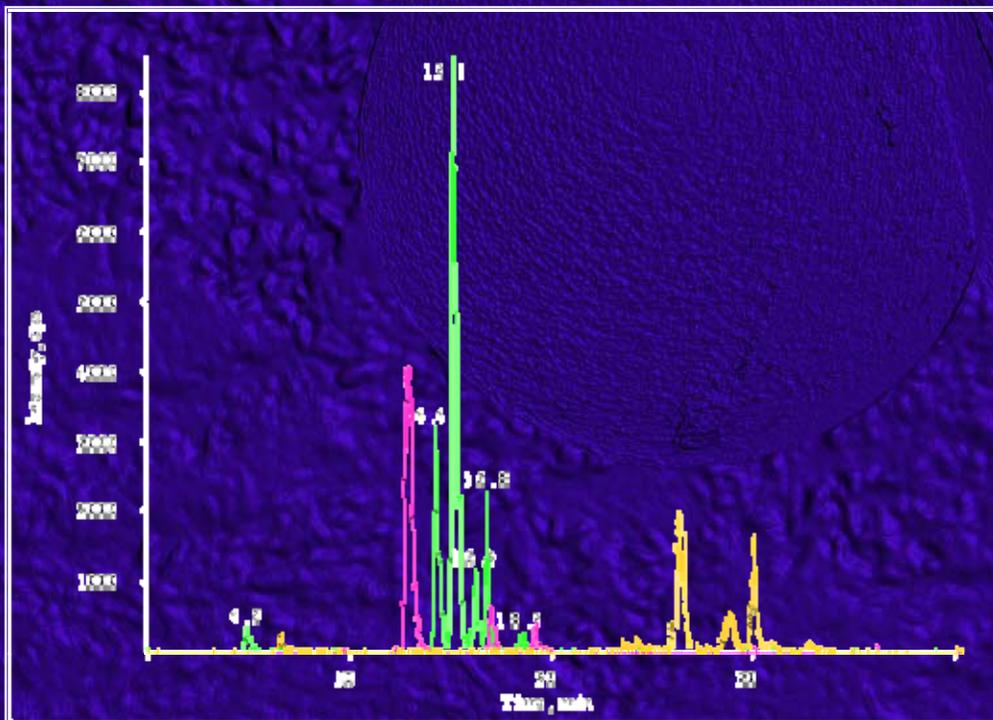
Molécules de **stéréochimie 10,11-trans** qui ont été isolées du *C. inophyllum* de Polynésie française

Molécules de **stéréochimie 10,11-cis** qui n'ont pas pu être isolées du *C. inophyllum* de Polynésie française



Chromatogramme CLHP-UV/DAD d'un échantillon brut de Tamanu

Spectres UV obtenus sur le chromatogramme ci-contre

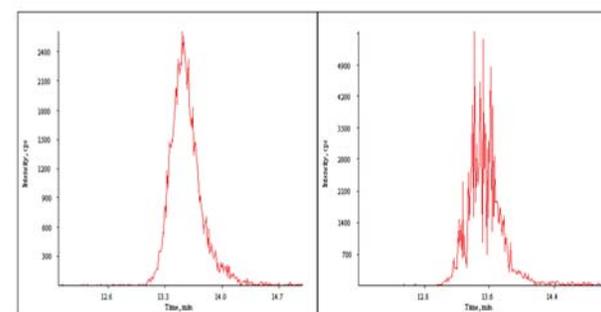
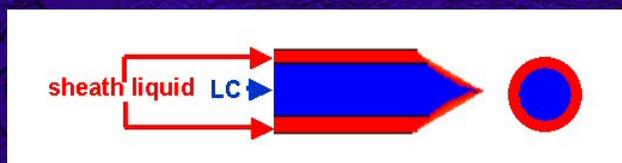
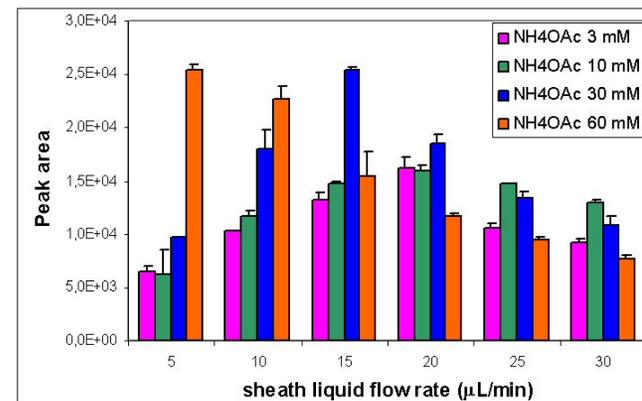
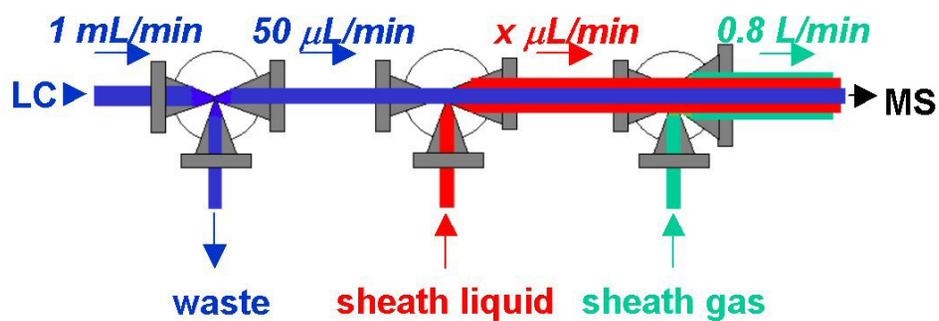


$m/z = 417 \rightarrow 361$ caractérisant le calophyllolide
 $m/z = 405 \rightarrow 387$ caractérisant les inophyllums B, P, F1, F2
 $m/z = 403 \rightarrow 347$ caractérisant l'inophyllum C

Chromatogramme CLHP-SM/SM d'un éch. brut de Tamanu

Méthode d'ionisation ESI à Gaine Liquide (Sheath Liquid)

Sheath Liquid Interface



sheath liquid
60mM NH₄OAC @ 5 µL/min

liquid junction
60mM NH₄OAC @ 20 µL/min

Références :

L. Charles, F. Laure, P. Raharivelomanana et J.-P. Bianchini, « Sheath liquid interface for the coupling of normal-phase liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and its application to the analysis of neoflavonoids », J. Mass Spectrom., 2005, vol 40, n° 1, pp 75-82.

Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
 2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
 3. Isolement des molécules par chromatographie
 4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
6. Conclusion Générale

Echantillonnage destiné à l'étude de la biodiversité

Nombre d'échantillons
de **feuilles** collectés :

Société : Tahiti(9),
Moorea(12), Tetiaroa(11),
Raiatea(7), Tahaa(7), Bora
Bora(3), Maupiti(6)

Tuamotu : Rangiroa(16),
Hao(4), Manihi(2)

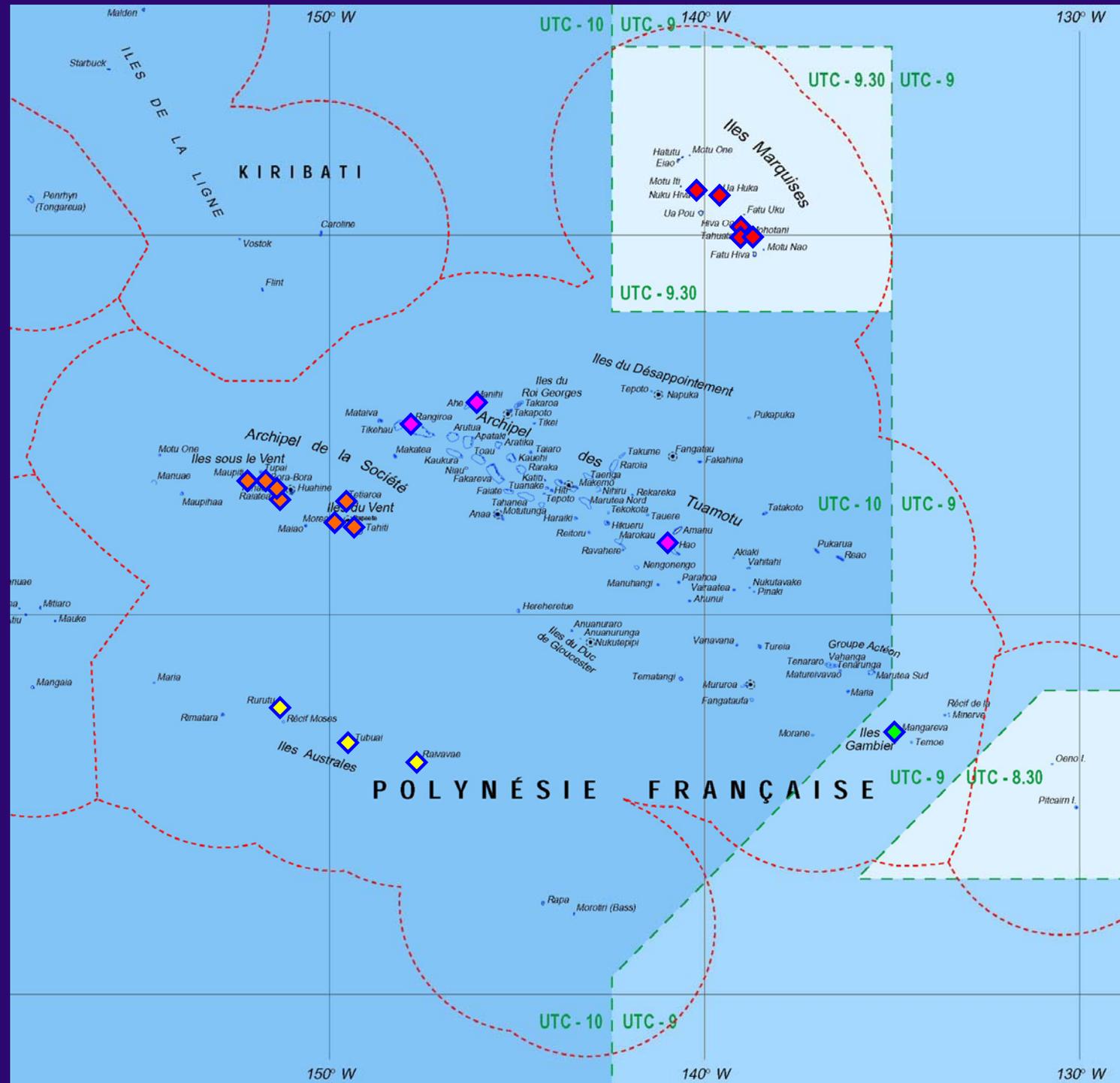
Marquises : Nuku Hiva(13),
Hiva Oa(14), Motane(6), Ua
Huka(4), Tahuata(10)

Australes : Raivavae(4),
Rurutu(5), Tubuai(3)

Gambier : Mangareva(2)

Etranger : Hawaii(4), Fiji(1)

Total : 143 échantillons



Echantillonnage destiné à l'étude de la biodiversité

Nombre d'échantillons
d'**huiles** collectés :

Société : Tahiti(2),
Moorea(3), Huahine(1),
Raiatea(13), Tahaa(3), Bora
Bora(1), Maupiti(10)

Tuamotu : Rangiroa(7),
Manihi(2), Fangatau(1),
Fakarava(1), Takaroa(2)

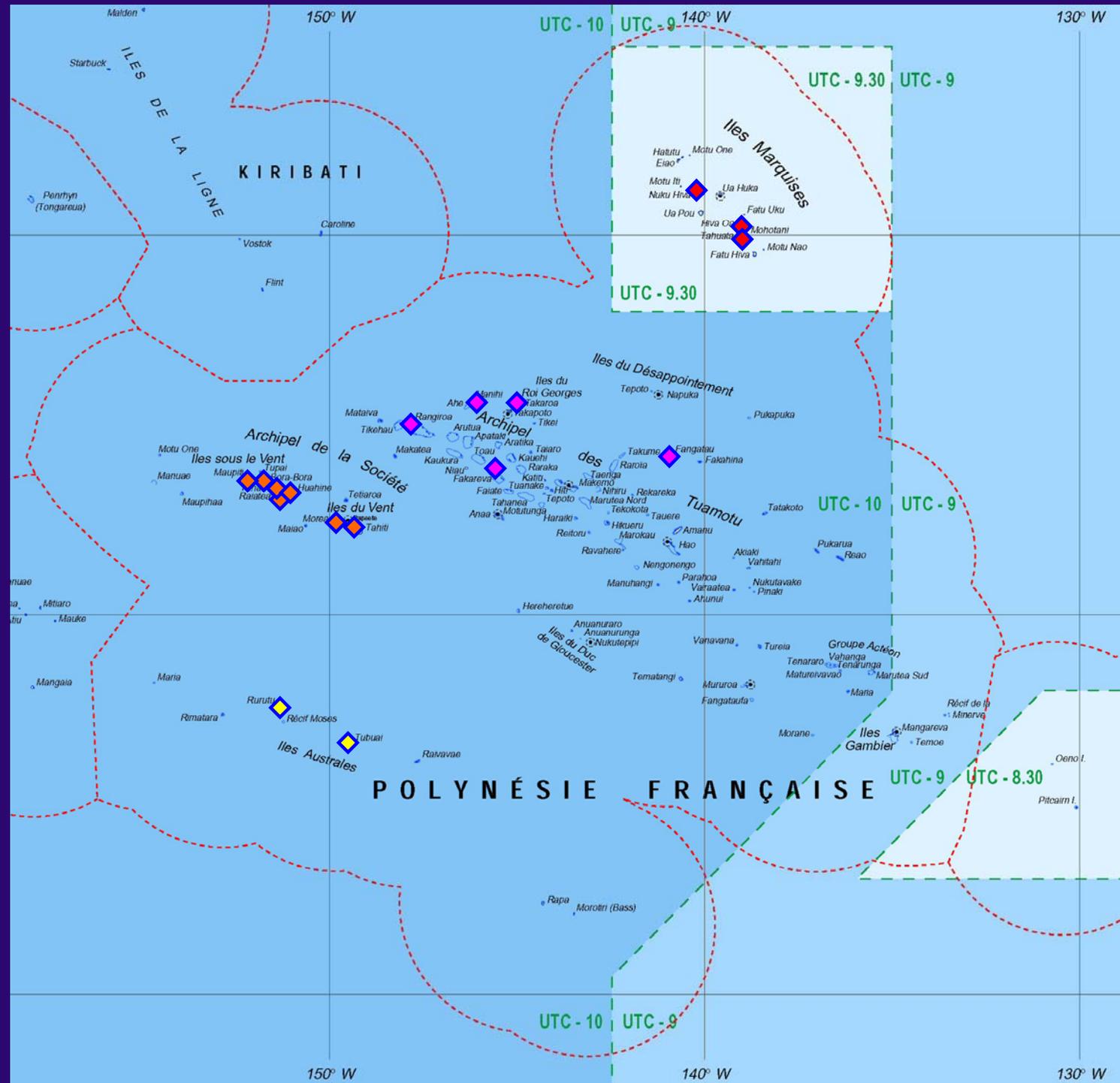
Marquises : Nuku Hiva(1),
Hiva Oa(1), Tahuata(4)

Australes : Rurutu(1),
Tubuaiti(1)

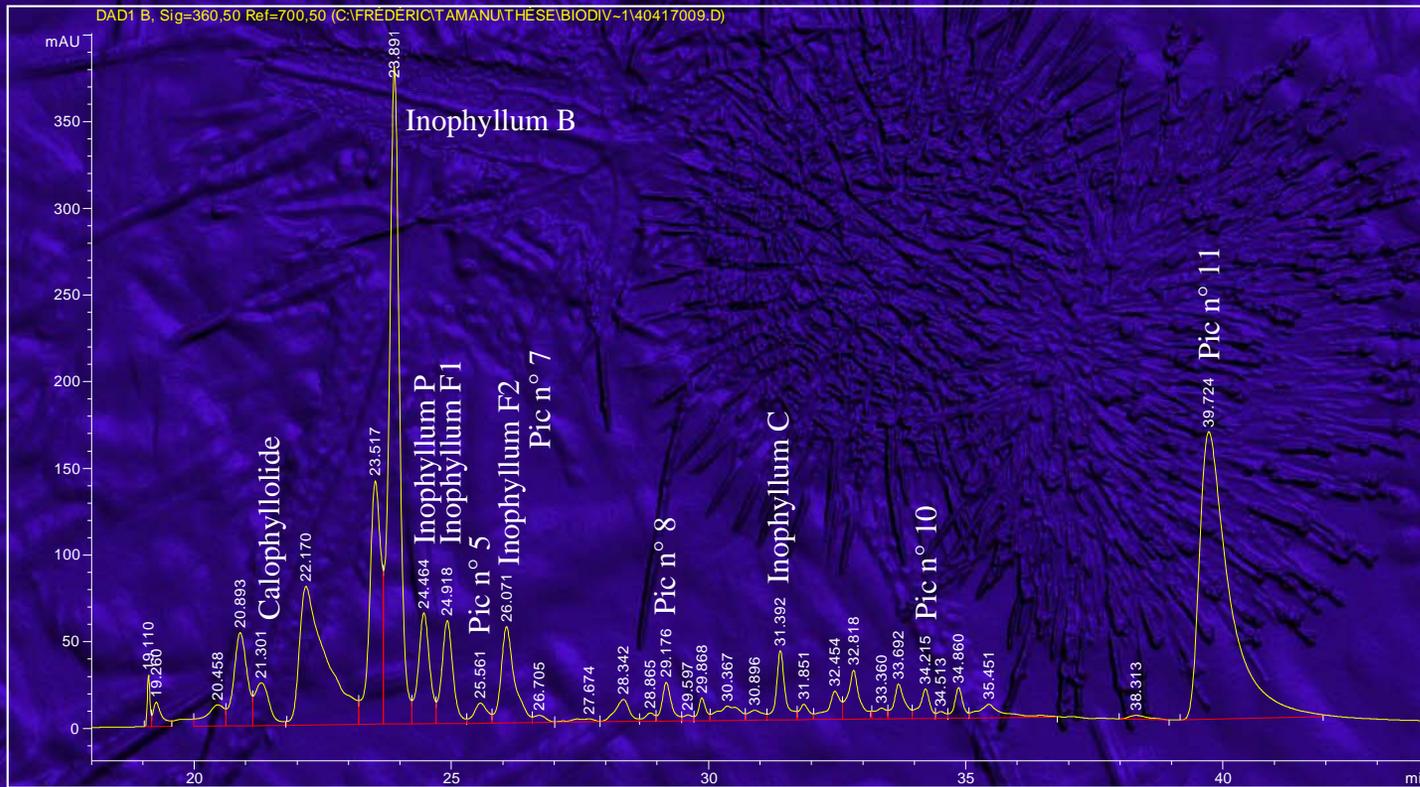
Gambier : (0)

Origine précise inconnue :
Polynésie(4, commerciales 6),
Indonésie (1), Vanuatu(2),
Madagascar(1)

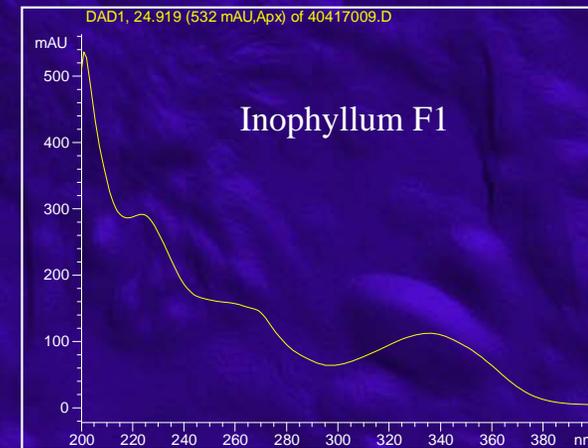
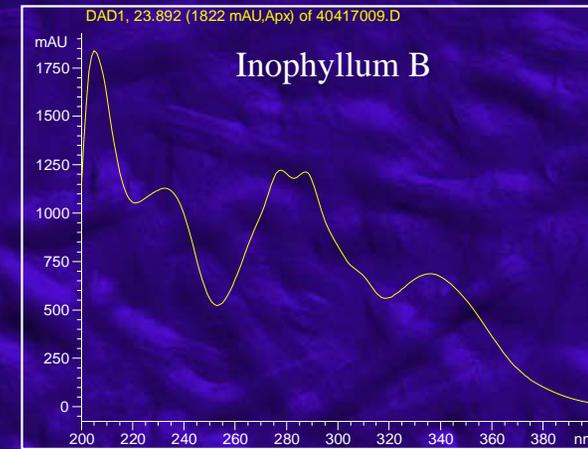
Total : 69 échantillons



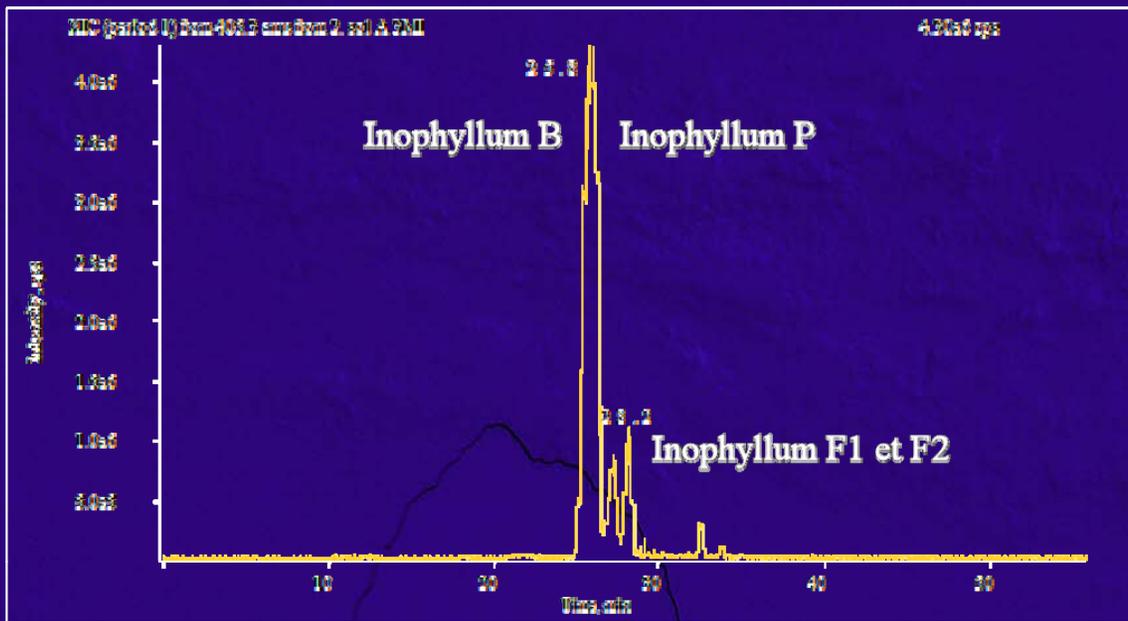
Biodiversité du *C. inophyllum* par l'étude des feuilles



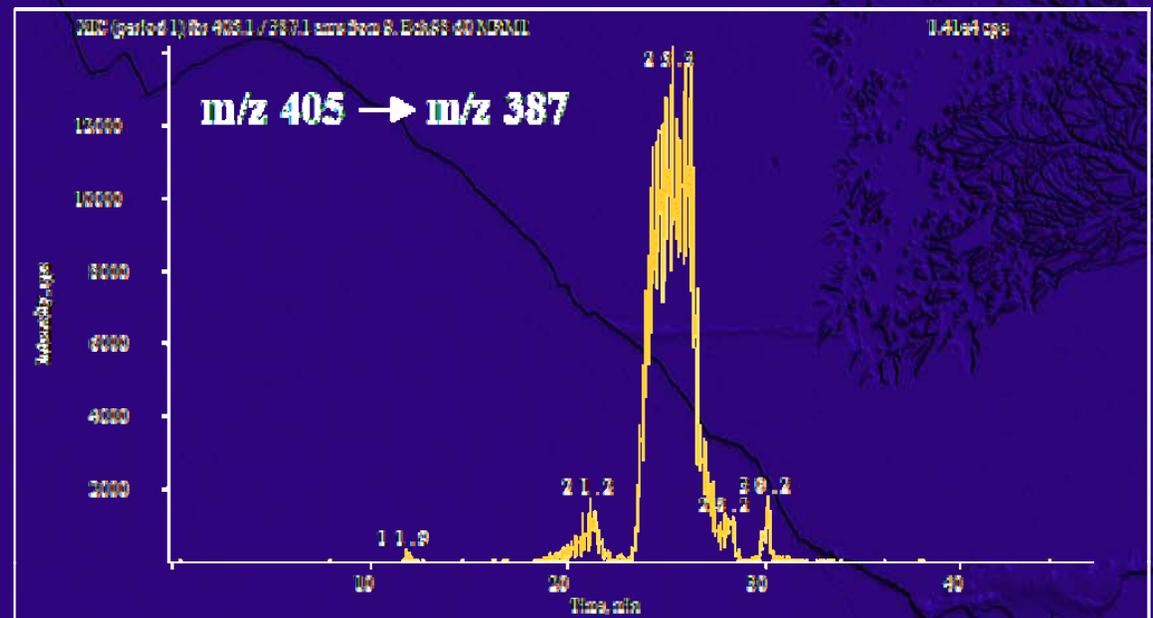
Chromatogramme CLHP-UV/DAD d'un échantillon brut de feuilles de Tamanu



Spectres UV de l'inophyllum B et de l'inophyllum F1

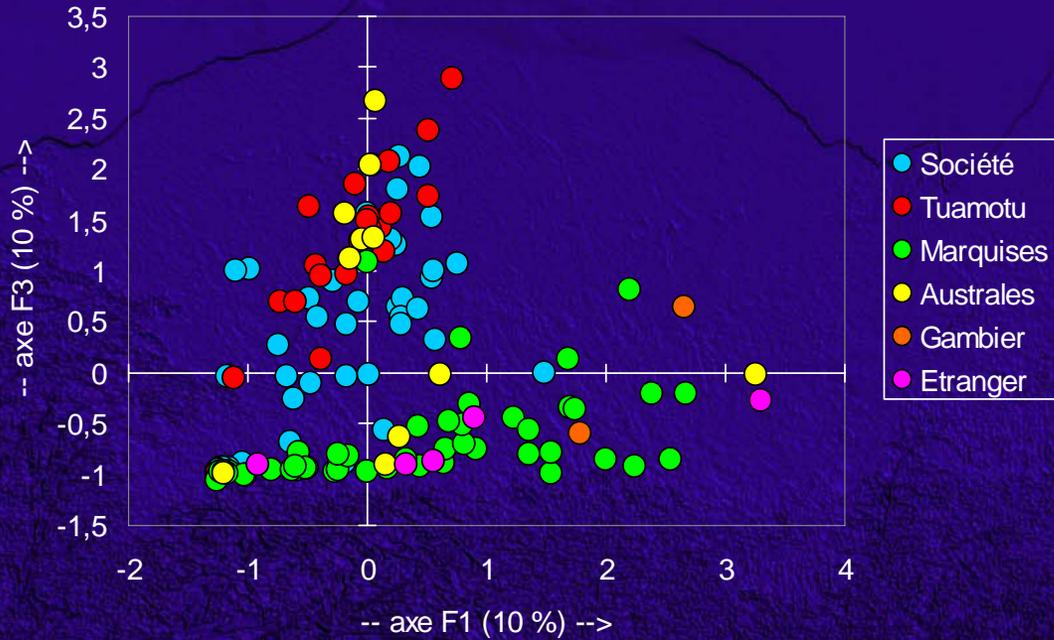


Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 405



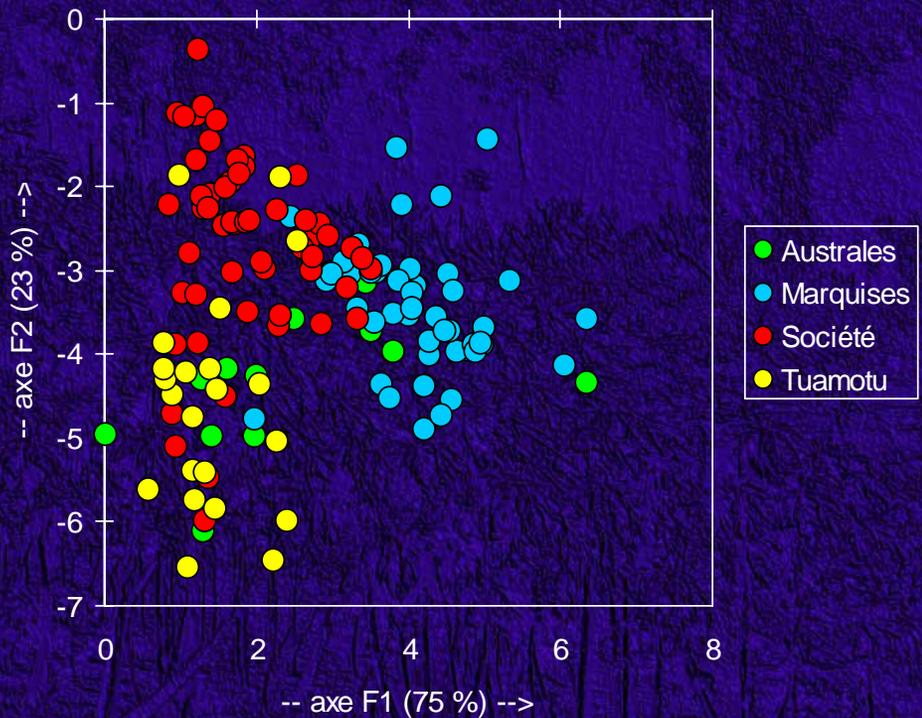
Chromatogramme CLHP-SM/SM d'un extrait brut ciblé sur m/z 405 \rightarrow m/z 387

Individus après rotation Varimax (axes F1 et F3 : 20 %)

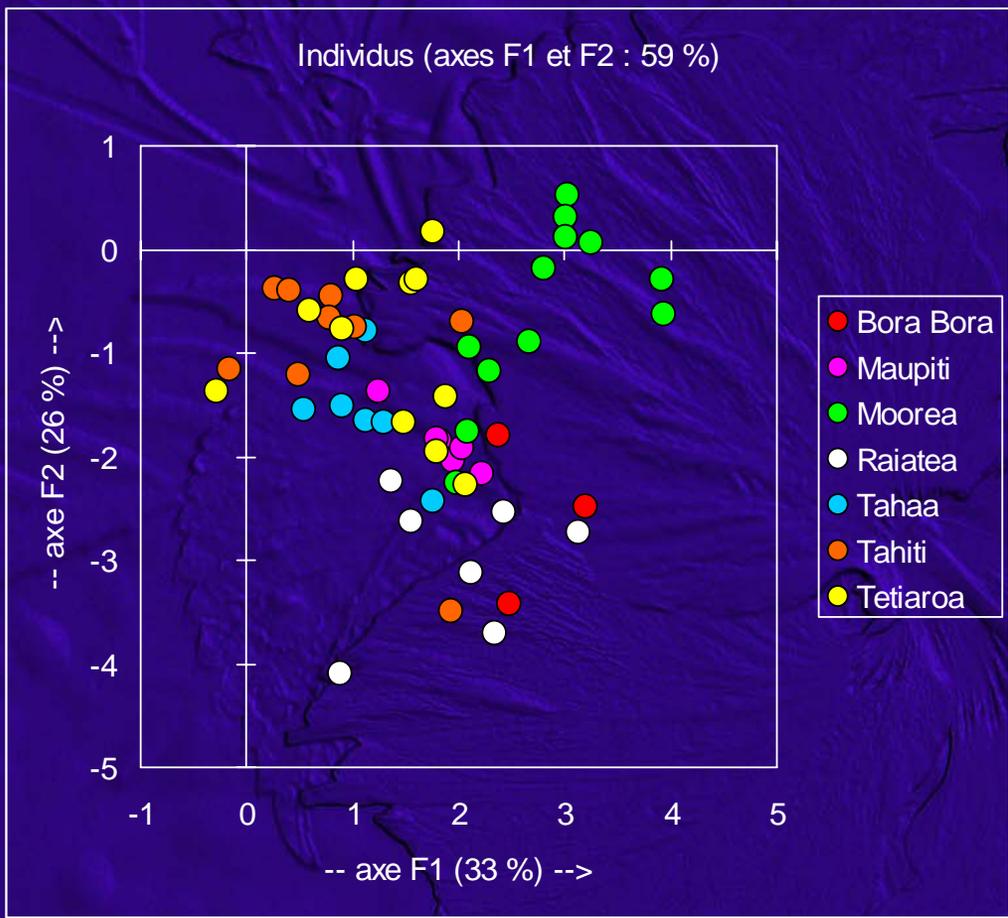


ACP sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel

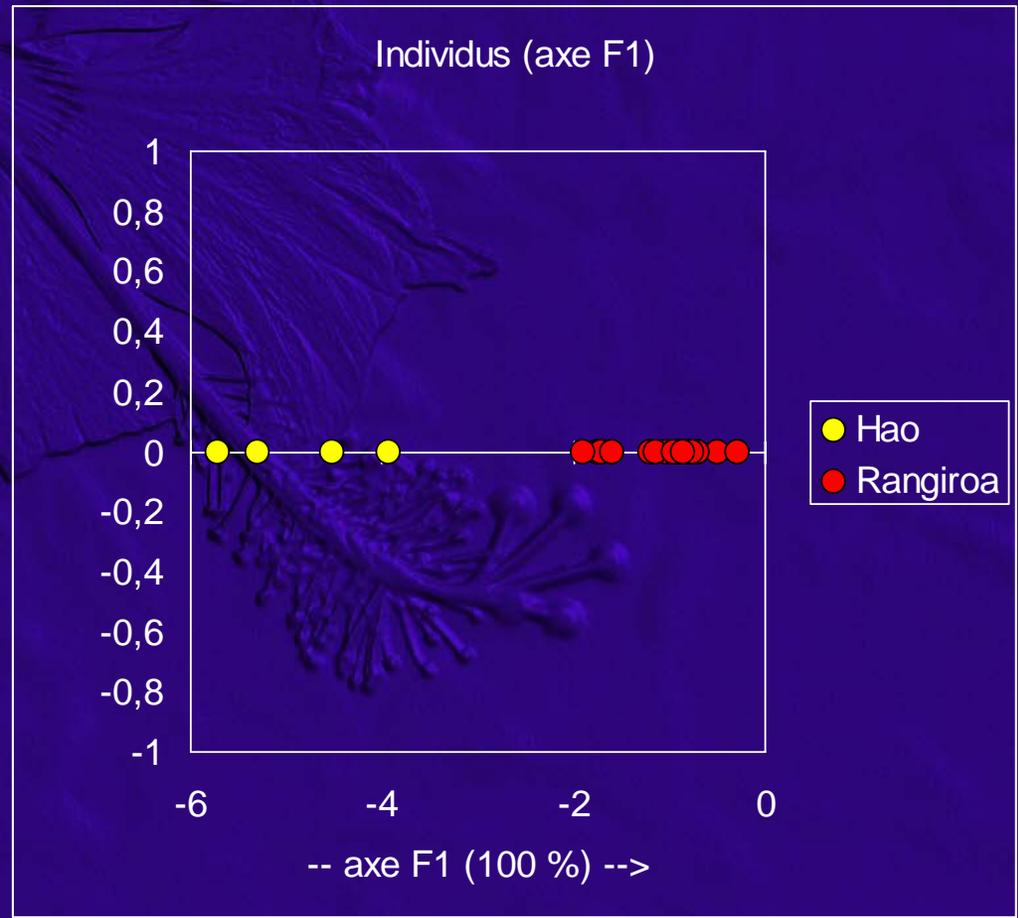
Individus (axes F1 et F2 : 98 %)



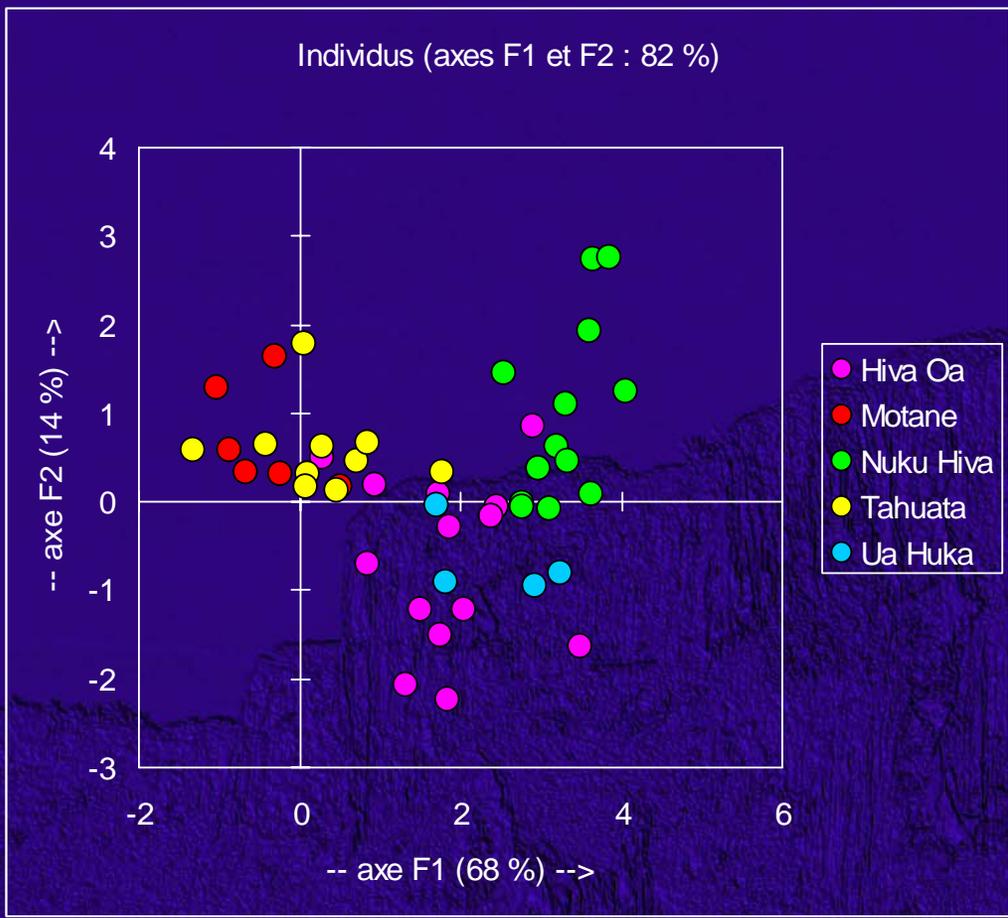
AFD sur les échs. de feuilles de Polynésie classés par archipel



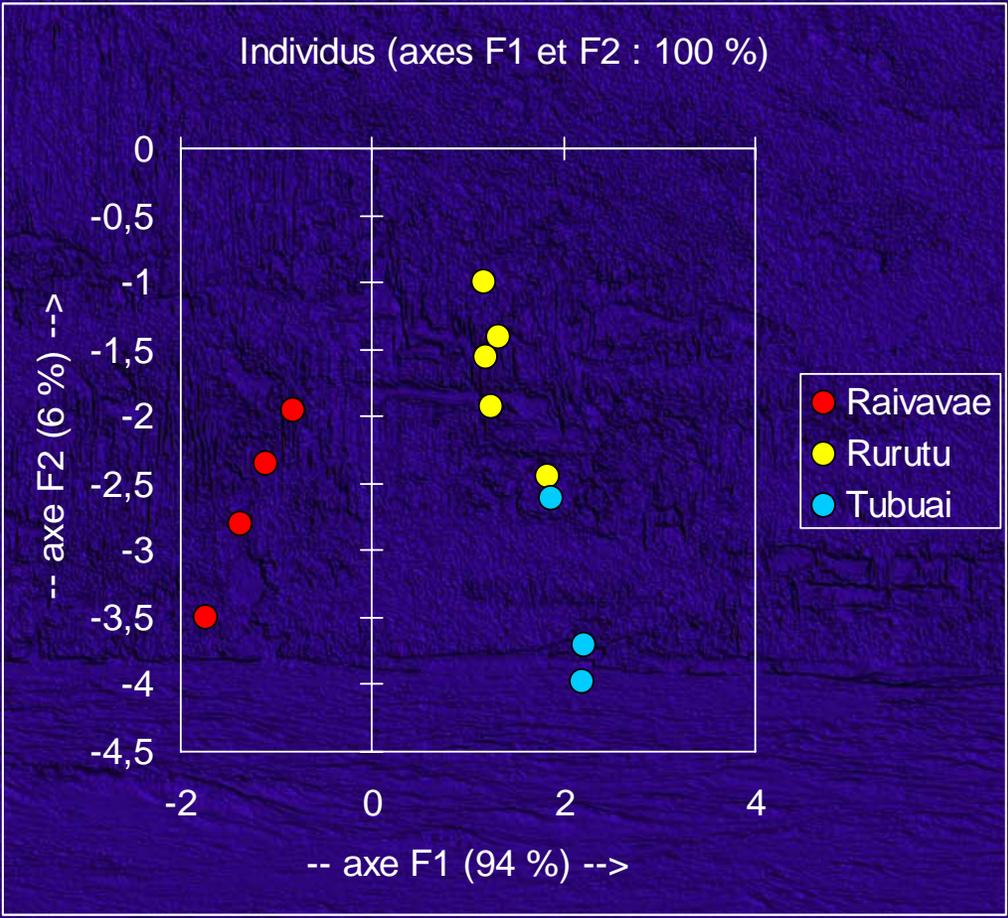
AFD sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île



AFD sur les échantillons de feuilles des Tuamotu classés par île

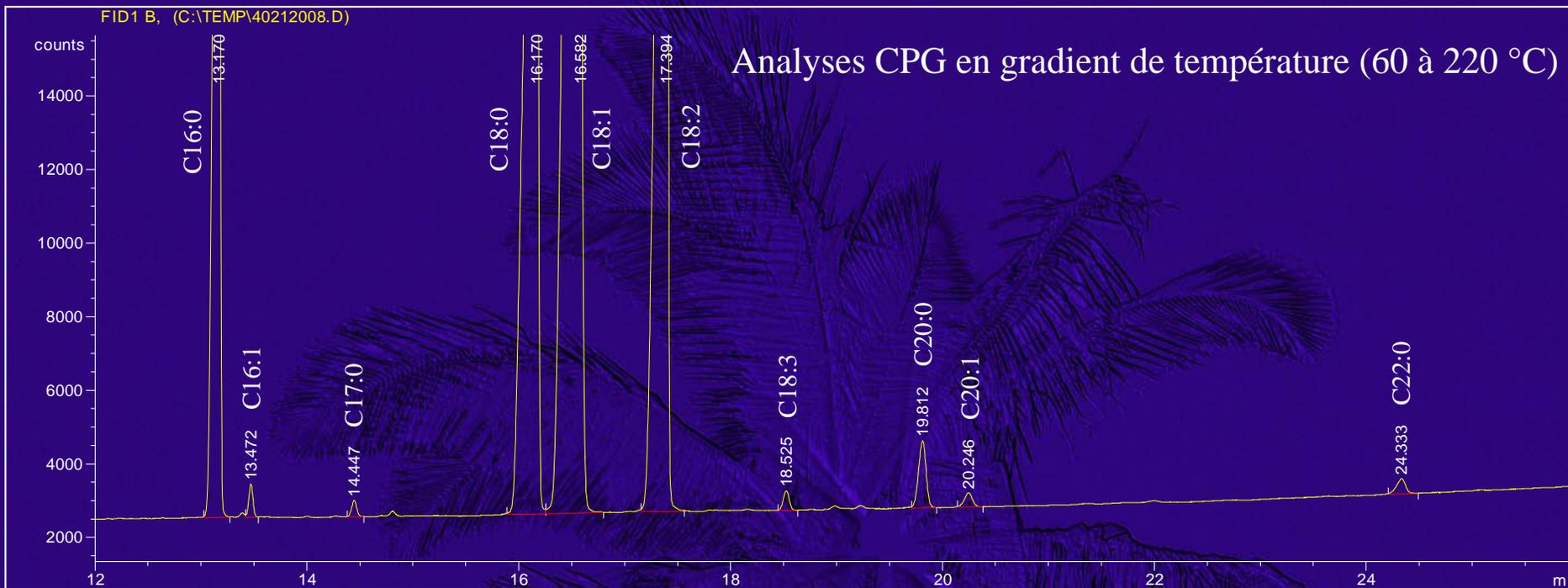


AFD sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île

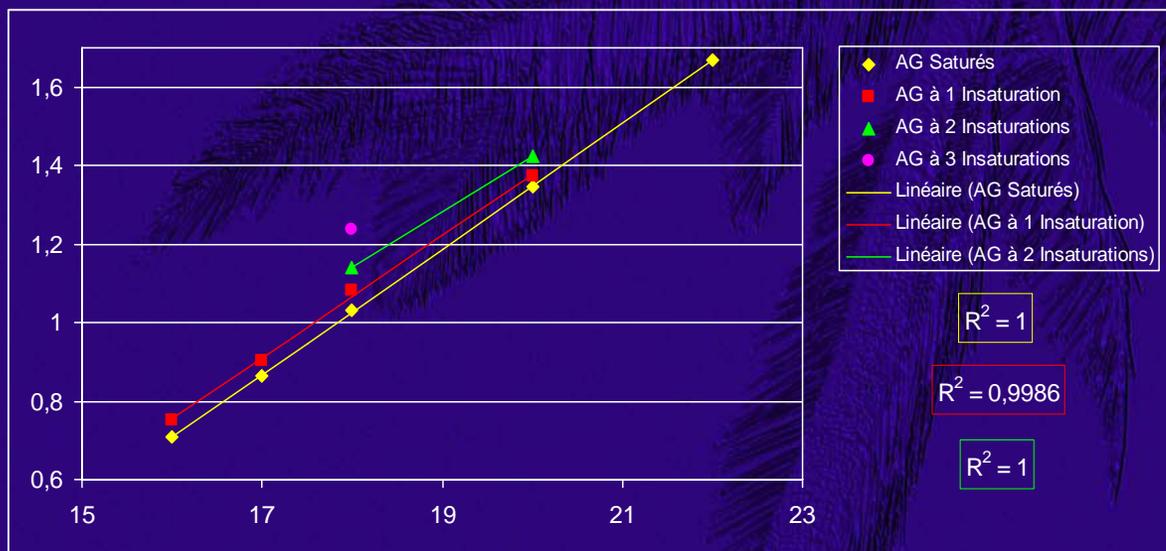


AFD sur les échantillons de feuilles des Australes classés par île

Biodiversité du *C. inophyllum* par l'étude des huiles

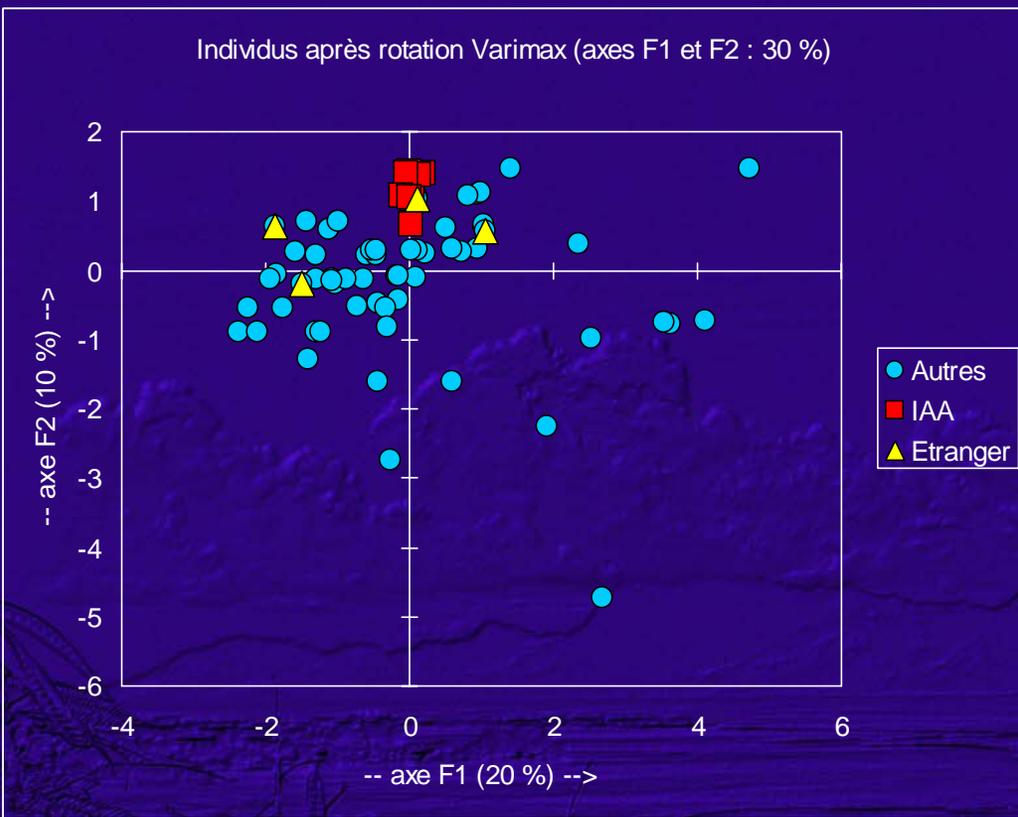


Chromatogramme CPG-FID des Esters Méthyliques d'Acides Gras d'un échantillon d'huile de Tamanu

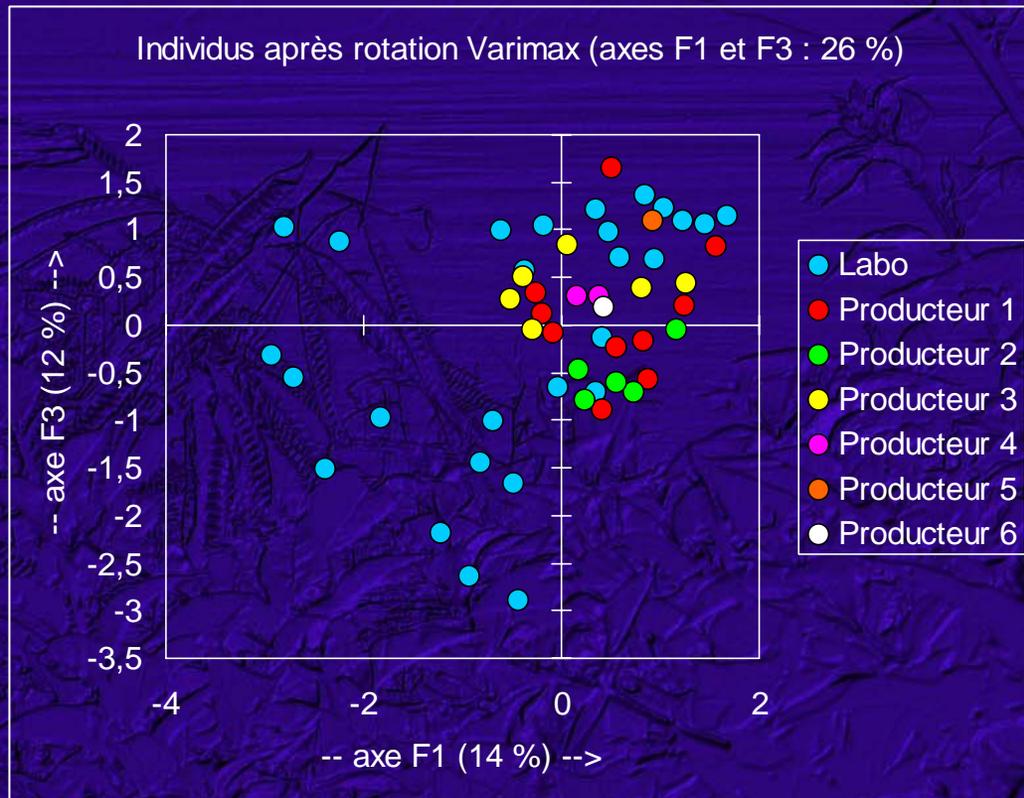


AG identifiés par la méthode LCE

Diagramme d'identification des Acides Gras pour l'huile d'olive (LCE)

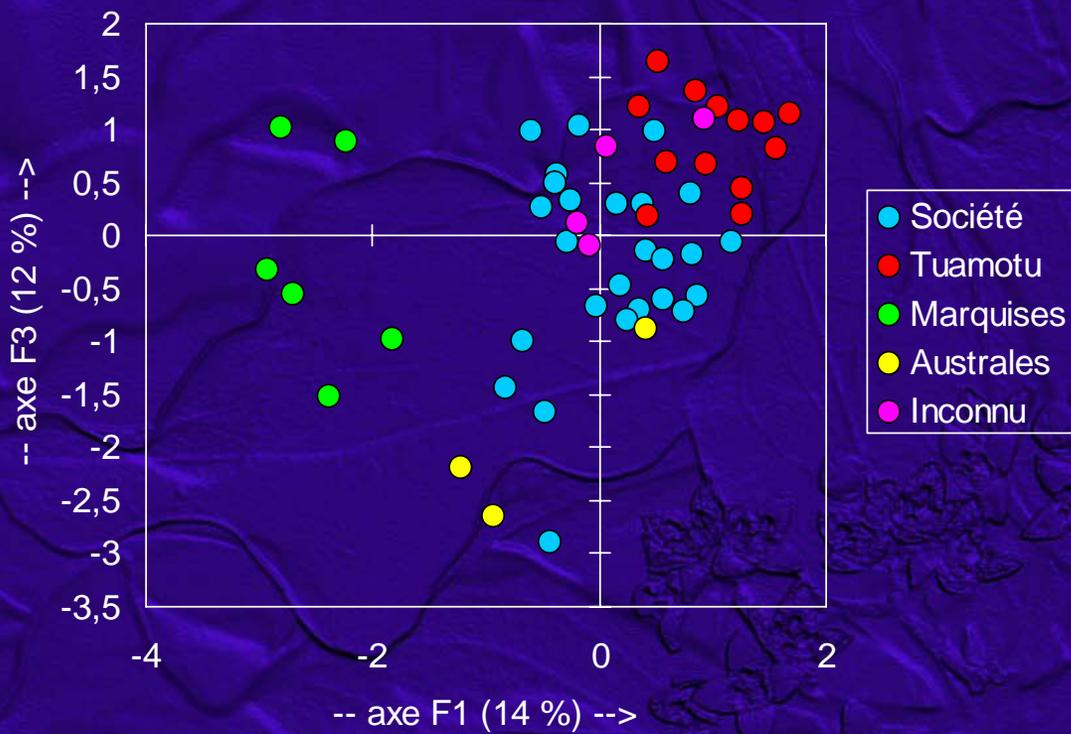


ACP sur tous les échantillons d'huile analysés



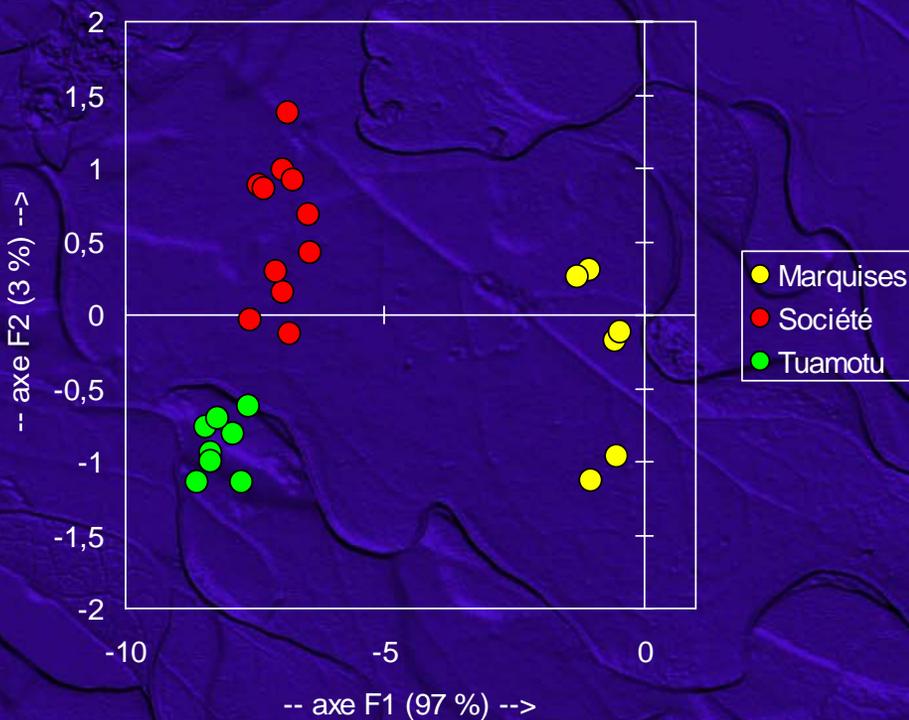
ACP sur les échs. d'huile des producteurs classés par producteur

Individus après rotation Varimax (axes F1 et F3 : 26 %)

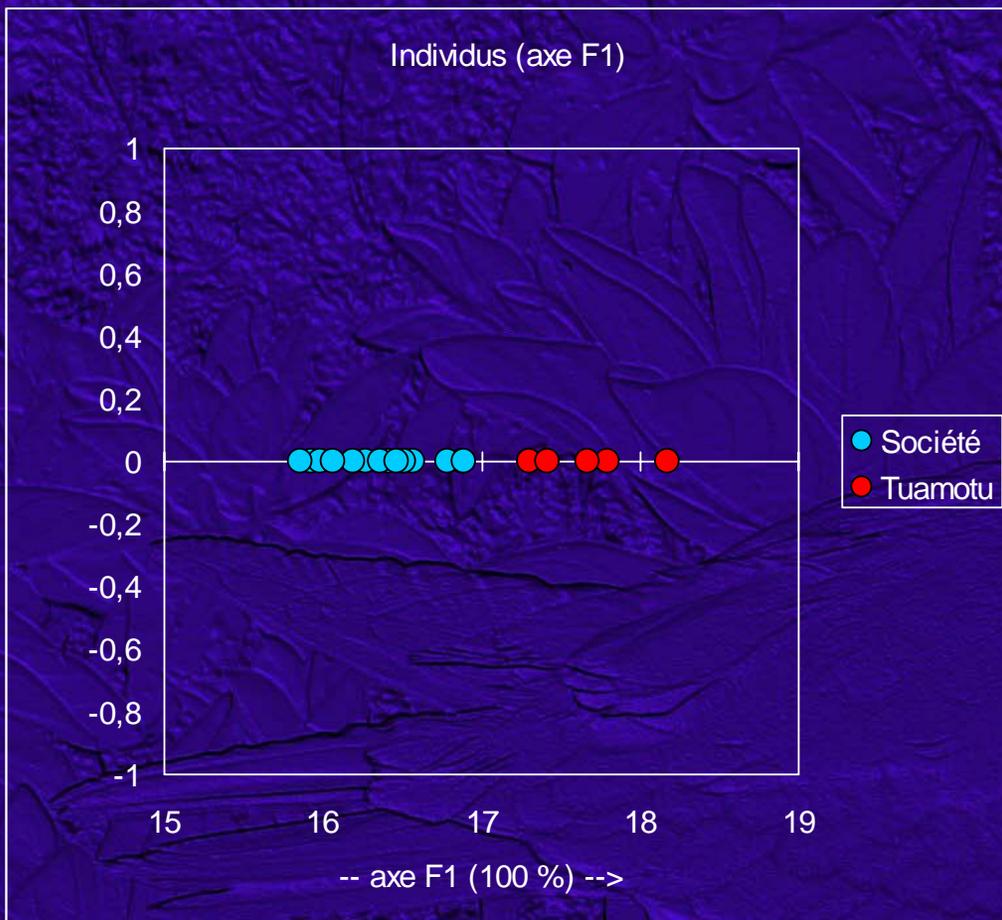


ACP sur les  chs. d'huile des producteurs classés par archipel

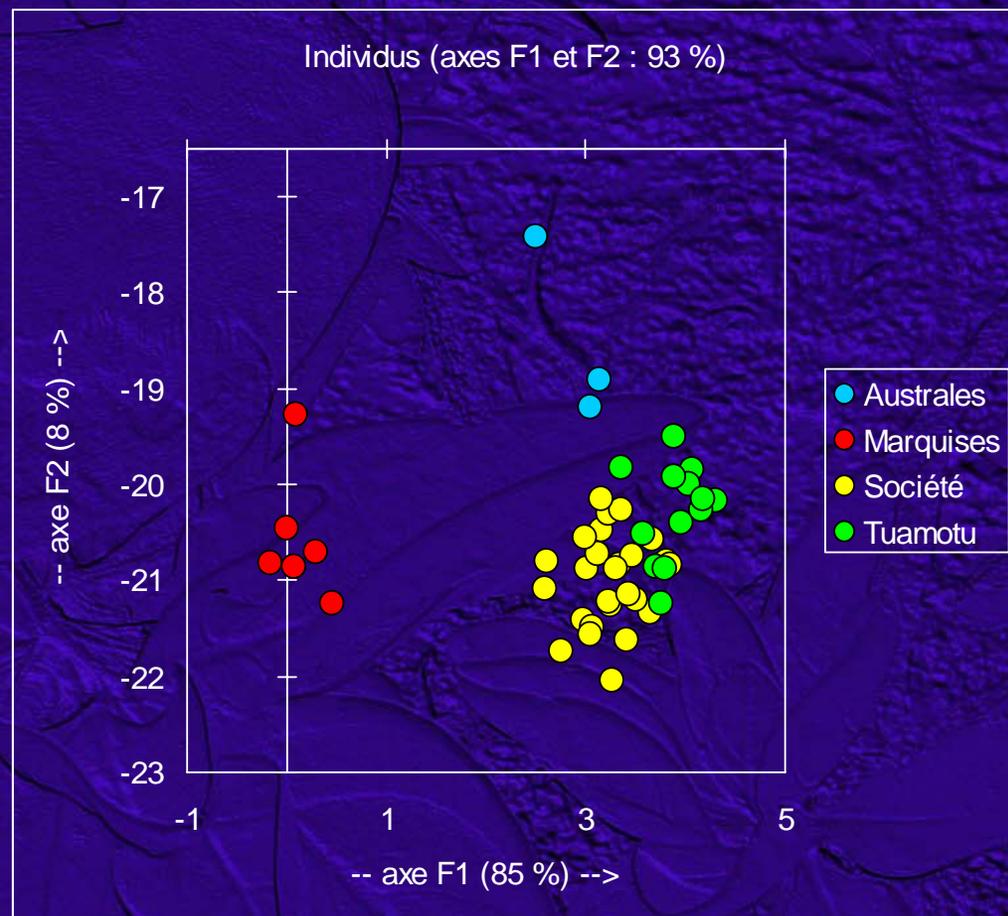
Individus (axes F1 et F2 : 100 %)



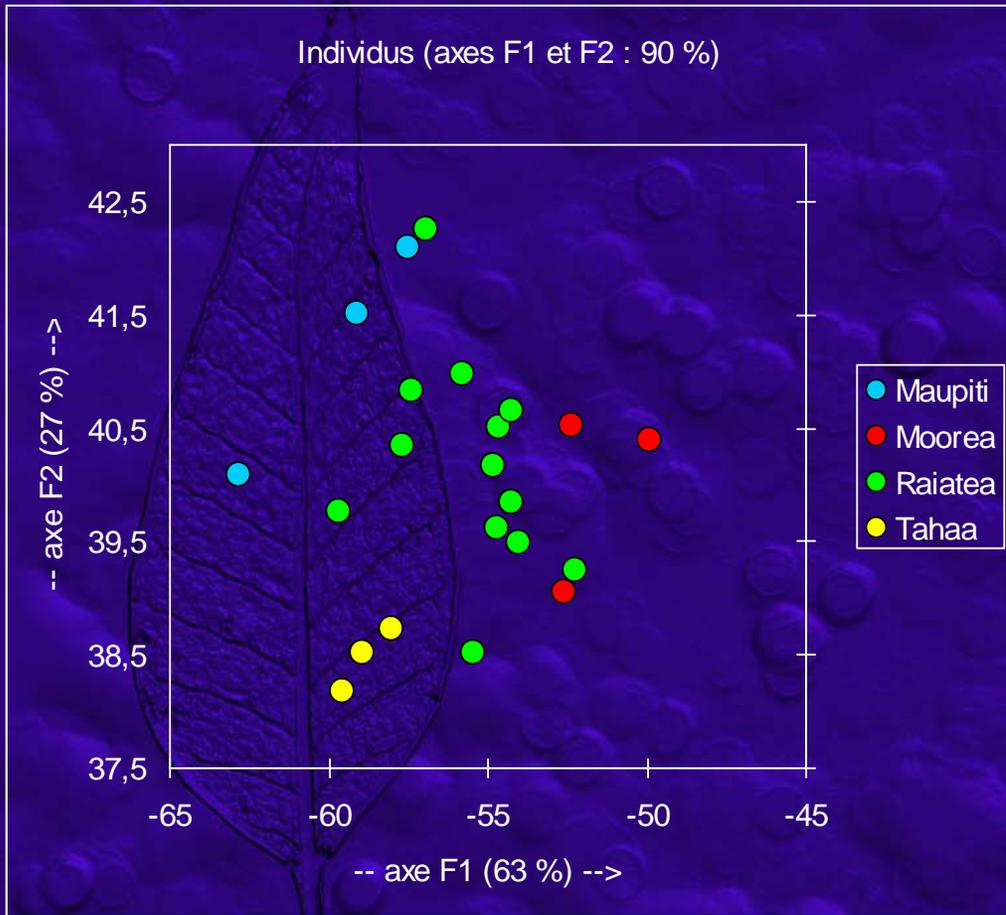
AFD sur les  chs. d'huile du laboratoire classés par archipel



AFD sur les échs. d'huile des producteurs classés par archipel



AFD sur tous les échs. d'huile de Polynésie classés par archipel



AFD sur les échantillons d'huile de la Société classés par île

Conclusions sur la biodiversité :

- ✓ Feuilles : Trois groupes d'individus chimiquement bien distincts (la Société, les Tuamotu et les Marquises)
- ✓ Huile : Importance de l'origine des graines

Etude de la Composition Chimique et de la Biodiversité du *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française

1. Botanique et Ethnobotanique - Utilisations Modernes
 2. Métabolites connus chez *C. inophyllum*
 3. Isolement des molécules par chromatographie
 4. Détermination structurale des molécules isolées
5. Echantillonnage et étude de la biodiversité de la plante
 6. Conclusion Générale

Conclusion Générale

- ✓ Trois nouveaux triterpènes isolés et décrits
- ✓ Deux nouvelles phényl-coumarines isolées et décrites
- ✓ Coumarines majoritaires du *C. inophyllum* de Polynésie française de stéréochimie 10,11-trans au niveau du cycle chromanol ou chromanone
- ✓ Mise au point d'une méthode analytique de 'screening' des coumarines dans des échantillons bruts de feuilles
- ✓ Biodiversité : trois groupes de Tamanu chimiquement bien distincts correspondant aux archipels de la Société, des Tuamotu et des Marquises mis en évidence statistiquement

Perspectives

- ✓ Configuration absolue des nouvelles coumarines isolées
- ✓ Détermination des constituants des résines de l'huile et des constituants minoritaires des feuilles ('screening' par Spectrométrie de Masse sur des quantités très faibles)
- ✓ Tests biologiques sur les molécules nouvelles, ciblés sur les maladies virales et le cancer
- ✓ Affiner l'étude sur la biodiversité : échantillonnage plus vaste, utilisation d'autres marqueurs chimiques, étude génétique
- ✓ Etude des xanthones présentes dans les écorces et le bois du tronc et des racines

Mauruuru roa i te ta'ato'ara'a

Merci à tous

