

UNIVERSITE DE LA POLYNESIE FRANCAISE
LABORATOIRE DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES



THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE LA POLYNESIE FRANCAISE
Spécialité Chimie Moléculaire

par

Frédéric LAURE

Ingénieur Chimiste ENSSPICAM, Etudiant-Chercheur de 3^{ème} cycle

ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE
ET DE LA BIODIVERSITE
DU *CALOPHYLLUM INOPHYLLUM*
DE POLYNESIE FRANCAISE

- Soutenue le 3 mars 2005 à Nice -

Membres du Jury :

Professeur Serge Gèribaldi, Université de Nice Sophia Antipolis, Rapporteur et Président du Jury
Professeur Emile Gaydou, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III), Rapporteur
Professeur Phila Raharivelomanana, Université de la Polynésie Française, Directrice de Thèse
Docteur Laurence Charles, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III), Invitée
Docteur Robert Faure, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III), Invité

*A Toutes Elles et Tous Ceux Avec Qui J'ai Partagé des Tranches de Vie Inoubliables.
Vous Avez Tous Beaucoup Compté.*

A Mes Regrettés Grands-Parents Qui Parcoureront Toujours Ma Mémoire.

A Ma Grand-Mère Pour Son Affection Depuis Toujours.

A Mes Parents à Qui Je Dois Tant.

« Alexandre créait des villes partout où il courait : j'ai laissé des songes partout où j'ai traîné ma vie. »

« Rompre avec les choses réelles, ce n'est rien ; mais avec les souvenirs ! Le coeur se brise à la séparation des songes, tant il y a peu de réalité dans l'homme. »

« Il faut avoir le coeur placé haut pour verser certaines larmes : la source des grands fleuves se trouve sur le sommet des monts qui avoisinent le ciel. »

François-René de Chateaubriand



II

DEUX ANNÉES DE DÉLIRE. – OCCUPATIONS ET CHIMÈRES.

CE délire dura deux années entières, pendant lesquelles les facultés de mon âme arrivèrent au plus haut point d'exaltation. Je parlais peu, je ne parlai plus ; j'étudiais encore, je jetai là les livres ; mon goût pour la solitude redoubla. J'avais tous les symptômes d'une passion violente ; mes yeux se creusaient ; je maigrissais ; je ne dormais plus ; j'étais distrait, triste, ardent, farouche. Mes jours s'écoulaient d'une manière sauvage, bizarre, insensée, et pourtant pleine de délices.

Au nord du château s'étendait une lande semée de pierres druidiques ; j'allais m'asseoir sur une de ces pierres au soleil couchant. La cime dorée des bois, la splendeur de la terre, l'étoile du soir scintillant à travers les nuages roses, me ramenaient à mes songes : j'aurais voulu jouir de ce spectacle avec l'idéal objet de mes désirs. Je suivais en pensée l'astre du jour ; je lui donnais ma beauté à conduire afin qu'il la présentât radieuse avec lui aux hommages de l'univers. Le vent du soir qui brisait les réseaux tendus par l'insecte sur la pointe des herbes, l'alouette de bruyère qui se posait sur un caillou, me rappelaient à la réalité : je reprenais le chemin du manoir, le cœur serré, le visage abattu.

Les jours d'orage en été, je montais au haut de la grosse tour de l'ouest. Le roulement du tonnerre sous les combles du château, les torrents de pluie qui tombaient en grondant sur le toit pyramidal des tours, l'éclair qui sillonnait la nue et marquait d'une flamme électrique les girouettes d'airain, excitaient mon enthousiasme : comme Ismen sur les remparts de Jérusalem, j'appelais la foudre ; j'espérais qu'elle m'apporterait Armide.

Le ciel était-il serein ? Je traversais le grand Mail, autour duquel étaient des prairies divisées par des haies plantées de saules. J'avais établi un siège, comme un nid, dans un de ces saules : là, isolé entre le ciel et la terre, je passais des heures avec des fauvettes ; ma nymphe était à mes côtés. J'associais également son image à la beauté de ces nuits de printemps toutes remplies de la fraîcheur de la rosée, des soupirs du rossignol et du murmure des brises.

D'autres fois, je suivais un chemin abandonné, une onde ornée de ses plantes rivulaires ; j'écoutais les bruits qui sortent des lieux infréquentés ; je prêtais l'oreille à chaque arbre ; je croyais entendre la clarté de la lune chanter dans les bois : je voulais redire ces plaisirs, et les paroles expiraient sur mes lèvres. Je ne sais comment je retrouvais encore ma déesse dans les accents d'une voix, dans les frémissements d'une harpe, dans les sons veloutés ou liquides d'un cor ou d'un harmonica. Il serait trop long de raconter les beaux voyages que je faisais avec ma fleur d'amour ; comment main en main nous visitions les ruines célèbres, Venise, Rome, Athènes, Jérusalem, Memphis, Carthage ; comment nous franchissions les mers ; comment nous demandions le bonheur aux palmiers d'Otaïti, aux bosquets embaumés d'Amboïme et de Tidor ; comment au sommet de l'Himalaya nous allions réveiller l'aurore ; comment nous descendions les *fleuves saints* dont les vagues épandues entourent les pagodes aux boules d'or ; comment nous dormions aux rives du Gange, tandis que le bengali, perché sur le mât d'une nacelle de bambou, chantait sa barcarolle indienne.

La terre et le ciel ne m'étaient plus rien ; j'oubliais surtout le dernier : mais si je ne lui adressais plus mes vœux, il écoutait la voix de ma secrète misère : car je souffrais, et les souffrances prient.

François-René de Chateaubriand
Mémoires d'Outre-Tombe, Livre Troisième
1848

Il me présenta au vieux jujubier de la Pondrane, au sorbier du Gour de Roubaud, aux quatre figuiers de Précatory, aux arbusiers de La Garette, puis, au sommet de la Tête-Rouge, il me montra la Chantepierre.

C'était, juste au bord de la barre, une petite chandelle de roche, percée de trous et de canaux. Toute seule, dans le silence ensoleillé, elle chantait selon les vents.

Etendus sur le ventre dans la baouco et le thym, chacun d'un côté de la pierre, nous la serrions dans nos bras ; et l'oreille collée à la roche polie, nous écoutions, les yeux fermés.

Un petit mistral la faisait rire; mais s'il se mettait en colère, elle miaulait comme un chat perdu. Elle n'aimait pas le vent de la pluie, qu'elle annonçait par des soupirs, puis des murmures d'inquiétude. Ensuite un vieux cor de chasse très triste sonnait longtemps au fond d'une forêt mouillée.

Lorsque soufflait le vent des Demoiselles, alors c'était vraiment de la musique. On entendait des chœurs de dames habillées comme des marquises, qui se faisaient des révérences. Ensuite une flûte de verre, une flûte fine et pointue accompagnait, là-haut, dans les nuages, la voix d'une petite fille qui chantait au bord d'un ruisseau.

Mon cher Lili ne voyait rien, et quand la petite fille chantait, il croyait que c'était une grive, ou quelquefois un ortolan. Mais ce n'était pas de sa faute si son oreille était aveugle, et je l'admirais toujours autant.

[...]

Nous étions presque sous le Taoumé, et je voyais nettement le contour de la barre qui surplombait le passage souterrain où j'allais vivre la grande aventure.

Lili s'arrêta soudain.

« Il y a une chose que nous avons oubliée ! »

Sa voix disait une grande inquiétude.

« Et laquelle ? »

Mais au lieu de me répondre, il secoua la tête, posa son sac dans les lavandes et commença un soliloque.

« D'avoir oublié ça, ça semble pas possible! Moi, j'aurais dû y penser. Mais toi aussi, tu l'as oublié... Et maintenant, qu'est-ce que nous allons faire ? »

Il s'assit sur une roche et, secouant toujours la tête, il croisa les bras et se tut.

Cette mimique un peu théâtrale m'irrita, et je dis sévèrement :

« Qu'est-ce qu'il te prend ? Tu deviens fou ? Qu'est-ce que c'est que nous avons oublié ? »

Il me montra du doigt la barre et prononça ce mot mystérieux :

« Libou.

- Qu'est-ce que tu veux dire ?

- Legrosibou.

- Quoi ? »

Il s'énerma et dit avec force :

« Celui qui a voulu nous crever les yeux ! Le grand-duc ! Il habite dans le plafond, il a sûrement sa femelle... Nous en avons vu qu'un, mais je te parie douze pièges qu'il y en a deux ! »

C'était une nouvelle terrifiante. On a beau être formidable, il y a des moments où le destin nous trahit.

Deux grosibous ! Je les vis voler autour de ma tête, leur bec jaune ouvert sur des langues noires, les yeux glauques, la serre crochue, et rendus mille fois plus dangereux par les descriptions que j'en avais faites, descriptions confirmées par mes cauchemars... Je fermai les yeux de toutes mes forces, et je respirai profondément.

Non, non ce n'était pas possible : il valait mieux la classe de M. Besson, avec les carrés, les losanges, et les devoirs du Citoyen.

[...]

Il allait sans doute continuer son homélie, lorsque le cocher souffla dans sa corne sur un ton impérieux, et fit claquer son fouet deux fois. Nous montâmes en hâte.

La dernière banquette, qui tourne le dos aux chevaux, était vide : comme ma mère et Paul avaient des nausées quand on les transportait à reculons, la famille s'installa au milieu des paysans, tandis que j'allais m'asseoir à l'arrière, tout seul.

Le frein fut desserré, et nous partîmes au petit trot.

Il pleuvait toujours.

Le cou rentré dans les épaules, comme ramassé sur moi-même, je mordillais un brin de menthe ; ma main, dans ma poche, serrait un piège qui n'avait plus sa valeur meurtrière, mais qui devenait un objet sacré, une relique, une promesse... Au loin se dressait, éternelle, la masse bleue du Taoumé bien-aimé, qui dominait le cercle des collines à travers le flou de la pluie. Je pensais au sorbier tordu sous la barre de Baume-Sourne, aux gouttes tintantes de Font Brégnette, aux trois petites mouches vibrantes dans le vallon de Précatory... Je pensais au tapis de thym de la Pondrane, aux térébinthes pleins d'oiseaux, à la pierre de la musique, à la douce lavande du gravier des garrigues...

De chaque côté de l'étroite route, deux murs de pierres nues, d'où pendaient des pariétaires trempées, fuyaient sans fin sous la pluie.

La haute guimbarde craquait, les jantes de fer écrasaient le gravier, le trot des chevaux tintait sur les pierres, la mèche du fouet claquait sourdement, comme un petit pétard mouillé...

On m'emportait de ma patrie, et de douces gouttes de pluie pleuraient pour moi sur mon visage... Je ne partais pas vers un but, avec ma poitrine et mon front : solitaire, dans un désespoir incommunicable, au son cadencé des sabots, je m'enfonçais dans l'avenir à reculons, comme la reine Brunehaut, traînée longuement sur les pierres, ses cheveux blonds tressés à la queue d'un cheval.

Marcel Pagnol

Le Château de ma Mère

1957

Résumé

Le Tamanu ou *Calophyllum inophyllum* est un arbre très répandu dans la zone Indo-Pacifique, où il pousse communément en bord de mer. A Tahiti, il abonde moins que jadis sur les rivages ou sur les plateaux à cause d'une exploitation intensive de son bois pour les sculptures ; malgré tout, il est encore bien implanté dans certaines îles de Polynésie française, où ses graines sont ramassées pour produire de l'huile, très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle. L'étude de la composition chimique des extraits de feuilles de Tamanu a permis d'identifier trois nouveaux triterpènes et deux nouvelles 4-phényl-coumarines en plus de molécules déjà connues. Les molécules ont été isolées par une succession de séparations chromatographiques préparatives, de type CLBP, CLHP et CCM. Les identifications ont pu être menées à bien grâce aux CLHP-UV/DAD et CCM analytiques, aux spectres IR et RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, et 2D (COSY, HMQC et HMBC), et enfin grâce aux analyses menées en CL-SM/SM, avec notamment une nouvelle méthode facilitant l'ionisation des coumarines. Une méthode CLHP-UV/DAD analytique a été utilisée pour déterminer les teneurs en coumarines des extraits bruts de feuilles de Tamanu provenant des cinq archipels polynésiens. Ces données ainsi que les teneurs en acides gras et en résines de divers échantillons d'huile de Tamanu ont permis d'étudier la biodiversité de l'arbre par l'application de méthodes d'analyses statistiques de données telles que l'ACP et l'AFD. L'existence de trois groupes caractéristiques de Tamanu a ainsi pu être mise en évidence selon leur provenance : l'archipel de la Société, l'archipel des Tuamotu, et l'archipel des Marquises.

Mots Clés : Tamanu – *Calophyllum inophyllum* – Extraits de feuilles – Huile – Triterpènes – Coumarines – Néoflavonoïdes – CLHP – UV-DAD – IR – RMN – CL/SM/SM – Acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque – Acide 27-acétoxy-canophyllique – Acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque – Inophyllums F1 et F2 – Biodiversité – ACP – AFD.

Abstract

Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) is a widely spread tree in the Indo-Pacific area, where it commonly grows on the seaside. In Tahiti, it is less abundant than it used to be on the shores or the plateaus because of the intensive exploitation of its wood for crafting^o; nevertheless it is still well established in some islands of French Polynesia, where its seeds are gathered to produce oil, which is very useful in the traditional pharmacopoeia. The study of the chemical composition of the leaves extracts of Tamanu enabled us to led to the identification of three new terpenoids and two new 4-phenyl-coumarins in addition to other known molecules. All the molecules were isolated by the use of chromatographic methods, such as LPLC, HPLC, and TLC. Identifications were performed with analytical HPLC-UV/DAD and TLC, with IR and NMR spectra (^1H , ^{13}C , DEPT, and 2D^o: COSY, HMQC et HMBC), and with LC-MS/MS analyses, using a new method improving ionisation of coumarins. An HPLC-UV/DAD analytical method was set up, to determine the coumarins contents of the crude leaves extracts of Tamanu from the five Polynesian archipelagos. These data and the fatty acids and resins contained in some Tamanu oil samples enabled us to study the biodiversity of the tree thanks to methods of statistical data analyses such as PCAF and DAF. Three distinctive groups were thus established, according to their archipelago origin : the Society, the Tuamotu, and the Marquesas.

Key Words : Tamanu – *Calophyllum inophyllum* – Leaves extracts – Oil – Terpenoids – Coumarins – Neoflavonoids – HPLC – UV-DAD – IR – NMR – LC/MS/MS – 3,4-secofriedelan-3,28-dioic acid – 27-hydroxyacetate canophyllic acid – 3-oxo-27-hydroxyacetate friedelan-28-oic acid – Inophyllums F1 and F2 – Biodiversity – PCAF – DAF.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes professeurs de lycée et de classe préparatoire aux grandes écoles à Caen qui ont su me transmettre leur passion des sciences, et en particulier de la chimie : Mme Larsonneur, M. Loret, M. Draï, M. Portier et M. Ménival.

J'adresse un grand merci à tous mes professeurs de l'ENSSPICAM, pour leurs compétences, leur disponibilité et leur soutien pendant ces trois années inoubliables passées dans la cité phocéenne ; je pense en particulier à M. Richard Laï, M. Didier Nuel, M. Roger Gallo, M. Christian Roussel, Mme Isabelle Cuomo, Mme Elisabeth Archelas, M. Philippe Moulin, M. Frédéric Fotiadu, M. Gérard Bueno, M. Jean-Pierre Aune et M. Roger Gassend. J'ai également une pensée pour tous mes amis marseillais (parfois d'adoption comme moi), chimistes ou non, qui m'ont fait aimer la Provence.

Concernant plus précisément ces trois années de thèse, je tiens dans un premier temps à exprimer toute ma gratitude à Mme le professeur Sylvie André, Présidente de l'Université de la Polynésie Française, qui m'a accueilli dans son université et m'a permis d'y effectuer ces travaux. Je tiens à remercier vivement Mme Phila Raharivelomanana, qui a dirigé mes travaux de thèse pendant ces trois années passées à l'Université de la Polynésie Française. Merci à toi Phila pour tes compétences, ta détermination, ta disponibilité, ton soutien sans failles, et ton amitié. Mes plus sincères remerciements vont à mes collègues du Laboratoire de Chimie de L'UPF pour leur amitié, leur soutien et leur aide précieuse durant ces trois ans de recherche à Tahiti : M. Taivini Teai, Mme Angéline Gicquel, M. Christophe Moreau et M. Laurent Weingarten. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. J'adresse bien sûr de profonds remerciements à M. Jean-Pierre Bianchini, qui m'a accordé sa confiance et m'a permis de mener à bien ce travail de thèse en mettant à ma disposition toutes ses compétences, son expérience, et tous les moyens matériels de son laboratoire de recherche. Sans lui, rien n'aurait été possible.

Revenons à Marseille pour remercier vivement tous mes collègues de l'Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III), avec qui j'ai toujours travaillé dans d'excellentes conditions : M. Robert Faure alias Félix, Mme Laurence Charles, M. André Thévand, Mme Roselyne Rosas, et M. Gaëtan Herbet. Merci pour votre détermination et vos compétences qui ont permis de mener à bien toutes les déterminations structurales des molécules présentées dans ce mémoire. Votre aide a été déterminante.

J'adresse un grand merci à Mme Priscille Frogier et à M. Jean-Yves Meyer, de la Délégation à la Recherche de la Polynésie française pour leur aide et leur soutien dans le cadre du contrat de développement Etat-Territoire pour l'étude et le développement de l'huile de Tamanu de Polynésie, contrat qui a contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Je me dois également d'adresser mes sincères remerciements à tous les agents du Service du Développement Rural du Territoire de Polynésie française qui m'ont aidé dans les collectes d'échantillons, ou dans le séchage et pressage des amandes récoltées, que ce soit à Tahiti ou dans les archipels ; je pense en particulier à M. Willy Tetuani du SDR de Pirae, M. Francis Vognien du SDR de Papara, et M. Hiro Pouira du SDR de Rangiroa.

Restons à Tahiti pour dire un grand merci aux producteurs d'huile de Tamanu, qui nous ont fourni gracieusement des échantillons divers et des échantillons commerciaux de leurs productions respectives d'huile ; en particulier merci à M. Olivier Touboul, M. Gérard Brigand, M. et Mme Touatini, M. Renvoyé, M. Vincenti et M. Temaru.

Merci également à M. Guillots, de Raiatea, qui approvisionne M. Touboul en amandes séchées par ses soins ; merci à lui pour son accueil, pour nous avoir fait visiter ses installations de séchage, et pour nous avoir fourni gracieusement des amandes séchées.

Je tiens bien sûr à remercier profondément les rapporteurs de ce manuscrit de thèse, ainsi que les autres membres du Jury devant lequel j'ai soutenu cette thèse, et qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger mon travail ; je n'oublie pas non plus les chercheurs invités à participer à mon jury, avec qui j'ai eu la chance de travailler à l'Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III) dans le cadre de ce sujet de recherche ; merci infiniment au Professeur Serge Gëribaldi, au Professeur Emile Gaydou, au Professeur Phila Raharivelomanana, au Docteur Laurence Charles et au Docteur Robert Faure.

Je tiens par ailleurs à saluer vivement mes amis doctorants et stagiaires du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'UPF : Jean-François Butaud – Merci à toi Brad pour ton aide en botanique et en statistiques, pour tout ton temps passé à collecter de précieux échantillons de Tamanu, un peu partout, mais merci surtout pour ton amitié, ton hospitalité et toutes ces fantastiques aventures sur les plus hautes crêtes des îles polynésiennes ou au bout d'une corde à flanc de falaise ; Raimana Ho – Déjà un an et demi de travail ensemble dans une ambiance sereine et amicale... Merci pour ta gentillesse et ton soutien. Je te passe le flambeau en te souhaitant courage et réussite ; Vincent Gaydou – Trois petits mois et puis s'en va... Mais un ami grimpeur que je retrouverai avec plaisir dans les Calanques de Marseille ; Marcia Lopes – Comment oublier ces six mois passés à tes côtés ? Merci pour ton amitié, ton affection, et cette grande complicité que nous avons toujours entretenue, de Tahiti jusqu'à Viti Levu, en passant par Moorea et Rarotonga.

Un grand merci aussi adressé à Frédéric Jacq, stagiaire et maintenant consultant auprès du Service du Développement Rural polynésien, pour son aide en botanique et sur le terrain pour la collecte d'échantillons de Tamanu, mais aussi et surtout pour ces franches parties de rigolade en montagne ou pendant de longues soirées entre amis. Et attention à tes yeux !

Pour conclure ces remerciements, j'adresse mes plus amicales salutations à tous les polynésiens, de naissance ou d'adoption, avec qui j'ai pu partager des moments inoubliables, que ce soit à Tahiti ou dans les nombreuses îles que j'ai eu la chance de visiter et qui font tout le charme de ce Pays où la vie s'écoule si paisiblement. Une pensée toute particulière pour Anne-Fanny, pour tout ce que nous avons partagé, à Tahiti, à Moorea, mais aussi à Rapa Nui, cette île si mystique qui ne nous a pas laissés indifférents ! A Tahiti, merci à Claudia, Elodie, Sylvie et Mattias ; merci à mes amis randonneurs de Te Fetia O Te Mau Mato, pour toutes ces expéditions au plus profond de cette île si belle et au relief si tourmenté ; je ne suis pas prêt d'oublier ces bivouacs et ces couchés de soleil extraordinaires admirés depuis les plus hauts cols et les plus hauts sommets ; je tiens à citer Joël, Didier, Sylvie et Jeanot, Françoise, Stéphanie et Eric, Jean-Marc, Christian, et Frédéric ; un salut amical par ailleurs à tous les membres du club de plongée Eleuthera avec qui j'ai partagé de nombreux moments si sereins et agréables à admirer les beautés du monde sous-marin entre la surface et -60M dans les eaux turquoises de la côte ouest du Fenua. Pour les autres îles, mes pensées s'évadent en particulier du côté de Moorea, avec François, du côté de Nuku Hiva, avec Jo, Fred et Christine, et du côté de Bora Bora, Maupiti, Raiatea, Huahine, Tetiaroa, Rurutu, Rangiroa et Manihi. Merci à tous, vous aurez contribué à rendre mon séjour plus extraordinaire encore. Une chose est sûre, je ne reviendrai pas de ce bout du monde indemne, et une partie de moi restera toujours à naviguer entre ces îlots perdus au milieu du Pacifique Sud. On garde Tahiti dans son cœur, et Tahiti nous fait tous un jour revenir à elle et à ses habitants si attachants.

Ce travail de recherche a fait l'objet de 2 publications et de 3 communications sous forme d'affiches :

Publications

- 1) F. Laure, G. Herbette, R. Faure, J.-P. Bianchini, P. Raharivelomanana et B. Fogliani, "Structures of new secofriedelane and friedelane acids from *Calophyllum inophyllum* of French Polynesia", *Magn. Reson. Chem.*, 2005, vol 43, n° 1, pp 65-68.
- 2) L. Charles, F. Laure, P. Raharivelomanana et J.-P. Bianchini, "Sheath liquid interface for the normal-phase liquid chromatography / electrospray mass spectrometry combination and its application to the analysis of neoflavonoids", *J. Mass Spectrom.*, 2005, vol 40, n° 1, pp 75-82.

Communications

- 1) F. Laure, M. Lopes, R. Rosas, R. Faure, J.-P. Bianchini, P. Raharivelomanana et B. Fogliani, "Composés triterpéniques isolés des feuilles du *Calophyllum inophyllum* Linn. de Polynésie française", Assises de la Recherche Française dans le Pacifique, 24 – 27 Août 2004, Nouméa, Nouvelle Calédonie.
- 2) F. Laure, P. Raharivelomanana, J.-P. Bianchini, G. Herbette et L. Charles, "An improved electrospray interface for coupling of normal-phase liquid chromatography to mass spectrometry^o: application to neoflavonoid screening in *Calophyllum inophyllum* from French Polynesia", 46th International Congress on Natural Products Research of the American Society of Pharmacognosy, 31 Juillet – 4 Août 2004, Phoenix, Arizona, USA.
- 3) L. Charles, F. Laure, P. Raharivelomana et J.-P. Bianchini, "Normal-phase liquid chromatography – electrospray mass spectrometry using a sheath liquid interface for the analysis of coumarin compounds", 52nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics of the American Society on Mass Spectrometry, 23 – 27 Mai 2004, Gaylord Opryland Hotel, Nashville, Tennessee, USA.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	8
<i>CHAPITRE I : PRESENTATION BOTANIQUE ET ETHNOBOTANIQUE.....</i>	<i>11</i>
I. LA FAMILLE DES CLUSIACEAE ET LE GENRE <i>CALOPHYLLUM</i>	14
II. LE <i>C. INOPHYLLUM</i> : BOTANIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	15
III. ETHNOBOTANIQUE - UTILISATIONS TRADITIONNELLES DE LA PLANTE	20
IV. UTILISATIONS MODERNES DE LA PLANTE.....	27
V. SYNTHESSES DE CERTAINS CONSTITUANTS DU <i>C. INOPHYLLUM</i>	29
VI. CONCLUSION	36
<i>CHAPITRE II : ETUDE DES METABOLITES DU CALOPHYLLUM.....</i>	<i>37</i>
I. LES COUMARINES ET LES NEO-FLAVONOIDES	38
I.1. Classification structurale	40
I.2. Distribution dans le genre	43
I.3. Chimie : stéréochimie et analyse conformationnelle	46
I.4. Stéréochimie absolue.....	46
I.5. Les coumarines et néo-flavonoïdes du <i>C. inophyllum</i> (Tamanu).....	48
I.6. Activités biologiques.....	53
I.6.1. Activité anti HIV-1 des coumarines issues du genre <i>Calophyllum</i>	53
I.6.2. Autres activités biologiques des coumarines issues du <i>C. inophyllum</i>	54
I.7. Conclusion.....	55
II. LES XANTHONES.....	60
II.1. Classification structurale des xanthones issues du <i>C. inophyllum</i>	61
II.2. Activités biologiques.....	65
III. LES TRITERPENES	68
IV. AUTRES FAMILLES CHIMIQUES.....	72
IV.1. Les benzopyranones	72
IV.2. Les flavonoïdes	72
IV.3. Divers acides	73
IV.4. Les acides gras constituant l'huile de Tamanu.....	73
V. CONCLUSION	75
<i>CHAPITRE III : METHODES PREPARATIVES ET ANALYTIQUES.....</i>	<i>76</i>
I. LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	77
I.1. Principes généraux	77
I.2. Evaluation des performances d'un système chromatographique	78
I.3. Réalisation matérielle des analyses chromatographiques	81
I.4. Méthodes utilisées	82
I.4.1. La Chromatographie sur Couches Minces (CCM).....	82
I.4.2. La Chromatographie Liquide à Basse Pression (CLBP).....	83
I.4.3. La Chromatographie Liquide à Hautes Performances (CLHP)	83
I.4.4. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	85
II. LES METHODES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROMETRIQUES.....	86
II.1. La spectroscopie Infra-Rouge (IR).....	86
II.2. La spectroscopie Ultra-Violet (UV).....	86

II.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	87
II.3.1. Principe de la RMN (impulsionnelle par Transformée de Fourier)	87
II.3.2. La RMN impulsionnelle 1D du proton (¹ H)	87
II.3.3. La RMN impulsionnelle 1D du carbone (¹³ C)	88
II.3.4. La RMN multi-impulsionnelle 1D du carbone (¹³ C) : la séquence DEPT	88
II.3.5. La RMN 2D	89
II.3.6. Spectromètre à 500 MHz équipé d'une cryosonde	90
II.4. La Spectrométrie de Masse (SM)	92
II.4.1. Principe de la SM	92
II.4.2. L'ionisation électrospray (ESI)	92
II.4.3. L'analyseur quadripolaire	96
II.4.4. Le couplage CLHP - SM	99
II.4.5. La SM en tandem (SM/SM)	99
III. CONCLUSION	101
CHAPITRE IV : TRAVAUX PERSONNELS	102
I. RAPPEL DES OBJECTIFS	103
II. COLLECTE ET TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL	104
II.1. Matériel végétal destiné à l'isolement des métabolites des feuilles	104
II.1.1. Echantillonnage	104
II.1.2. Extractions au Soxhlet	104
II.2. Matériel végétal destiné à l'étude de la biodiversité	105
II.2.1. Les échantillons de feuilles	105
a) Echantillonnage	105
b) Micro méthode d'extraction	106
II.2.2. Les échantillons d'amandes	107
a) Echantillonnage	107
b) Obtention des échantillons d'huile par pressage des amandes	107
II.3. Conclusion	108
III. ISOLEMENT ET DETERMINATION STRUCTURALE DES METABOLITES	109
III.1. Séparations chromatographiques préliminaires	109
III.2. Les triterpènes	114
III.2.1. CCM analytiques avec révélation à la vanilline sulfurique	114
III.2.2. CLHP préparatives avec détection réfractométrique et DDL	114
III.2.3. Etude structurale	116
a) Triterpènes connus	117
a)1. La friedeline (73)	117
a)2. Le canophyllol (74)	119
a)3. L'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	121
a)4. L'acétate de canophyllol (86)	136
a)5. L'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)	138
b) Nouveaux triterpènes	144
b)1. L'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (88)	144
b)2. L'acide 27-acétoxy-canophyllique (89)	156
b)3. L'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (85)	172
III.2.4. Conclusion	187
III.3. Les coumarines et les néo-flavonoïdes	188
III.3.1. CCM analytiques avec révélation à la vanilline sulfurique	188
III.3.2. CLHP analytiques avec détection UV-DAD	188
III.3.3. CLHP préparatives avec détection réfractométrique et UV	191

III.3.4. Etude structurale.....	195
a) Coumarines connues.....	196
a)1. L'acide calophyllique (21).....	196
a)2. Le calophyllolide (22).....	203
a)3. L'inophyllum B (1).....	208
a)4. L'inophyllum P (2).....	215
a)5. L'inophyllum C (3).....	220
b) Nouvelles coumarines : L'inophyllum F1 (90) et L'inophyllum F2(91).....	227
III.3.5. Conclusion.....	247
III.4. Conclusion.....	249
IV. ETUDE DE LA BIODIVERSITE DU <i>C. INOPHYLLUM</i> EN POLYNESIE.....	250
IV.1. Principes des outils statistiques utilisés.....	250
IV.2. Etude des échantillons de feuilles.....	251
IV.2.1. CLHP analytiques des extraits de feuilles obtenus.....	251
IV.2.2. Analyses statistiques des données obtenues.....	263
IV.3. Etude des échantillons d'amandes.....	282
IV.3.1. CPG des esters méthyliques des Acides Gras des échantillons d'huile obtenus.....	283
IV.3.2. Analyses statistiques des données obtenues.....	287
IV.4. Discussion – Conclusion.....	302
V. CONCLUSION.....	304
CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES.....	305
BIBLIOGRAPHIE.....	307
I. BOTANIQUE.....	308
II. CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROSCOPIES.....	308
II.1. Divers.....	308
II.2. La Résonance Magnétique Nucléaire.....	308
II.3. La Spectrométrie de Masse.....	309
III. STRUCTURES MOLECULAIRES.....	309
III.1. Les coumarines et néo-flavonoïdes.....	309
III.2. Les xanthones.....	314
III.3. Les triterpènes.....	317
III.4. Les flavonoïdes.....	318
III.5. Les benzopyranes.....	318
IV. DIVERS.....	319
PARTIE EXPERIMENTALE.....	321
I. APPAREILLAGE ET TECHNIQUES D'ANALYSES.....	322
II. MONOGRAPHIES.....	327
ANNEXES.....	342
TABLES.....	357
I. LISTE DES SPECTRES.....	358
II. LISTE DES TABLEAUX.....	361
III. LISTE DES FIGURES.....	363
IV. LISTE DES PHOTOS.....	367

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le *Calophyllum inophyllum*, communément appelé Tamanu, est un arbre assez répandu sur les côtes polynésiennes. On le reconnaît aisément à son port caractéristique (tronc massif et feuillage dense en boule assez régulière), à ses feuilles oblongues de couleur vert foncé, et à ses fruits sphériques d'environ 4 centimètres de diamètre qui jonchent le sable des plages coralliennes ou basaltiques. Le genre *Calophyllum* fait partie de la famille des Clusiaceae (anciennement Guttiferae), et comprend plus de 180 espèces répandues principalement dans les zones tropicales et équatoriales des océans Pacifique et Indien¹. Le *Calophyllum inophyllum* est à notre connaissance la seule espèce de *Calophyllum* représentée en Polynésie française.

Cet arbre avait dans l'ancienne religion polynésienne une place très importante, puisqu'il était sacré, considéré comme un véritable Dieu. Il occupait également une place importante dans la pharmacopée traditionnelle polynésienne, au même titre que le Metu'a Pua (Fougère du genre *Microssorum*), place importante qu'il occupe encore aujourd'hui malgré son relatif déclin dû à une trop grande exploitation de son bois pour les sculptures. C'est en particulier l'huile tirée des amandes du Tamanu qui est très utilisée par les polynésiens pour ses propriétés antiseptiques et cicatrisantes². Mais les décoctions de feuilles ou d'écorces sont également employées, notamment pour leurs effets analgésiques, ou pour traiter certaines maladies de peau. Aujourd'hui, la filière économique de l'huile de Tamanu est en pleine expansion, notamment avec la création d'un syndicat des producteurs d'huile. Un label tel que l'appellation d'origine contrôlée 'Huile de Tamanu de Tahiti' est même à l'étude pour promouvoir le produit à l'exportation. L'intérêt économique du Tamanu et en particulier de son huile n'a donc jamais été aussi fort en Polynésie française qu'actuellement.

Les premières études sur la composition chimique du *Calophyllum inophyllum* datent de 1951. Les propriétés piscicides des feuilles de cet arbre ont attiré l'attention d'un groupe de chercheurs français qui ont isolé et identifié des coumarines comme étant les principes actifs. L'huile a également fait l'objet à l'époque de recherches qui ont abouti à l'identification de certaines coumarines. L'intérêt scientifique du sujet a fortement augmenté au début des années 1990 quand on a mis en évidence des activités antivirales.

Il existe actuellement plus d'une centaine d'études chimiques sur les arbres du genre *Calophyllum*. Les études portent sur les diverses parties de la plante : graines, feuilles, tiges, bois et écorce de tronc et de racines, fleurs. Les molécules originales identifiées sont le plus souvent spécifiques du genre. Elles appartiennent aux familles chimiques des coumarines et des néo-flavonoïdes, des xanthones, et des triterpènes. La plupart de ces molécules ont des propriétés antivirales, anticancéreuses ou antimicrobiennes intéressantes. Les néoflavonoïdes et les coumarines constituent le groupe le plus important.

Certaines dihydrocoumarines isolées des arbres du genre *Calophyllum* ont montré une activité anti HIV-1, y compris contre les souches résistantes à l'AZT. Ces dérivés sont des inhibiteurs de la transcriptase inverse du virus. Leur mécanisme d'action original, impliquant deux sites différents, en fait les chefs de file d'une nouvelle classe d'inhibiteurs non-nucléosidiques de cette enzyme virale. Le (+)-Calanolide A et le (+)-Inophyllum B sont actuellement testés cliniquement pour évaluer leur toxicité et leurs propriétés pharmacocinétiques, à la fois sur des patients sains et sur des patients infectés par le HIV-1³. Des voies synthétiques permettant d'obtenir ces molécules en laboratoire ont été proposées récemment.

Cette étude a été rendue possible grâce notamment aux crédits du contrat de développement Etat-Territoire (1999-2003) affectés par la Délégation à la Recherche Territoriale à notre laboratoire (Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles LCSN) pour l'étude et le développement de l'huile de Tamanu. A notre connaissance, cette étude chimique est la première réalisée sur le Tamanu de Polynésie française.

Dans un premier temps, nous présenterons une synthèse bibliographique constituée de trois grandes parties. Tout d'abord, nous nous intéresserons à la botanique et à l'ethnobotanique du Tamanu. Nous proposerons ensuite une synthèse la plus exhaustive possible sur les études chimiques menées jusqu'à présent sur les arbres du genre *Calophyllum*, et plus particulièrement sur les recherches ayant abouti à l'identification des molécules contenues dans l'espèce *Calophyllum inophyllum* de Polynésie. Enfin, nous présenterons une synthèse théorique des différentes techniques que nous avons utilisées pour l'isolement et l'identification des diverses molécules.

Nous présenterons ensuite les résultats de nos travaux, classés en trois grandes parties. Nous décrirons tout d'abord les différents échantillonnages réalisés sur le matériel végétal qui ont permis de mener à bien les recherches envisagées suite à la synthèse bibliographique. Nous présenterons ensuite les molécules isolées et les méthodes mises en œuvre pour y parvenir. Ces résultats permettront de confirmer la présence dans le Tamanu de Polynésie française de molécules déjà connues chez des *Calophyllum inophyllum* 'étrangers', mais également de révéler la présence d'autres molécules inédites. Enfin, une méthode chromatographique de détection de certaines molécules entrant dans la composition du Tamanu (screening) sera décrite puis appliquée à de nombreux échantillons afin de procéder à l'étude statistique de la biodiversité chimique du Tamanu de Polynésie française.

Références

- 1) P.F. Stevens, "A revision of the old world species of the *Calophyllum* (Guttiferae)", J. Arnold Arbor. Harv. Univ., 1980, vol 61, pp 117-424.
- 2) P. Pétard, "Plantes utiles de la Polynésie française", édition Haere po no Tahiti, réédition 1986.
- 3) T. Ishikawa, "Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins : distribution, chemistry and activity", Heterocycles, 2000, vol 53, n° 2, pp 453-474.

Chapitre I :
***PRESENTATION BOTANIQUE
ET ETHNOBOTANIQUE***

CHAPITRE I : PRESENTATION BOTANIQUE ET ETHNOBOTANIQUE

Avant de présenter les recherches dont a été l'objet le *Calophyllum inophyllum* durant les cinquante dernières années, et de traiter l'ensemble des résultats de nos investigations d'ordre chimique sur cette plante, il nous semble important d'en faire une présentation botanique.

La première classification botanique est l'œuvre de Carl Linné au XVIII^e siècle, et elle est basée sur les différences des organes sexuels des plantes, critères qui sont facilement observables. Cette systématique permit à l'époque de classer de façon satisfaisante l'ensemble des espèces connues. Au XIX^e siècle, des classifications phylogénétiques (ou phylogéniques : qui tiennent compte de la formation et de l'évolution des espèces en vue d'établir leur parenté) voient le jour, à la suite des travaux de Darwin relatifs à sa fameuse théorie de l'évolution des espèces vivantes. Dans la continuité de ces travaux, les avancées scientifiques récentes sur la connaissance des caractéristiques moléculaires des espèces (le critère de ressemblance porte sur les séquences d'acides aminés des protéines) ont permis d'aboutir à la classification actuellement utilisée par la majorité des botanistes, classification due à l'Angiosperm Phylogenic Group. Parmi les eucaryotes (espèces vivantes dont la ou les cellules ont une membrane nucléaire séparant le noyau du cytoplasme, par opposition aux procaryotes) sont distingués deux groupes principaux : les Thallophytes (plantes à thalles, appareil végétatif des végétaux inférieurs où l'on ne distingue ni racines, ni tiges, ni feuilles) et les Cormophytes (plantes à tiges)^{6,7,8,9}.

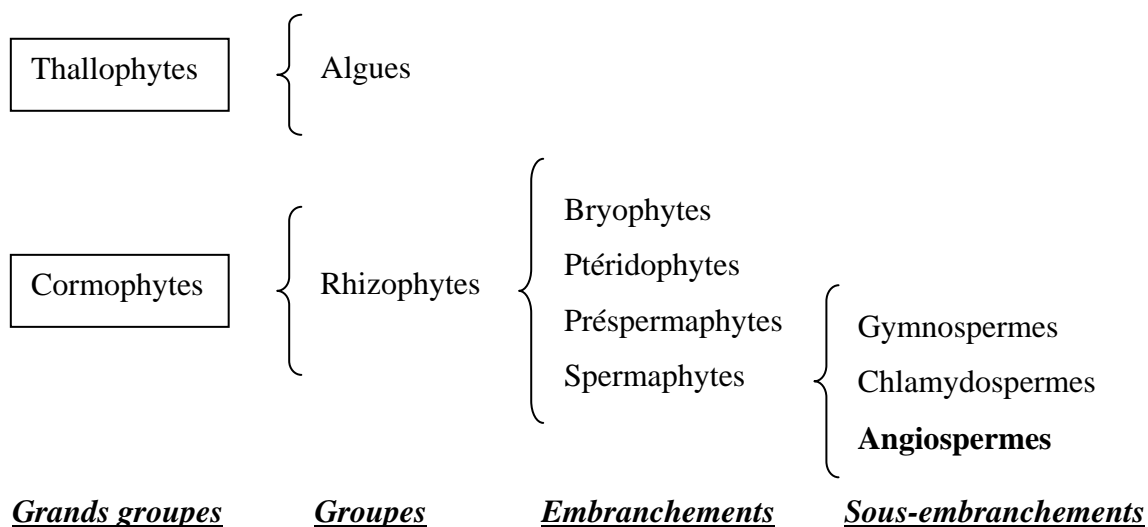


Figure 1 : Schéma de division chez les eucaryotes du règne végétal

Les derniers progrès dans l'étude de l'ADN des êtres vivants et dans le domaine des statistiques donnent de nouvelles perspectives à la cladistique (méthode de classification des êtres vivants selon leur parenté évolutive, fondée sur la recherche des caractères propres aux différents groupes) classique élaborée en 1950 par Hennig. Ces travaux sur l'ADN ont permis à l'Angiosperm Phylogeny Group de publier en 1998 une nouvelle classification ordinaire des plantes à fleurs. Cette nouvelle taxonomie (classement des individus par groupe ayant des caractéristiques communes ; en botanique, le taxon de base est l'espèce) est illustrée à la **Figure 2** par le Cladogramme des Angiospermes^{6,9}, qui traduit les différences génétiques entre les différents ordres appartenant à ce sous-embranchement.

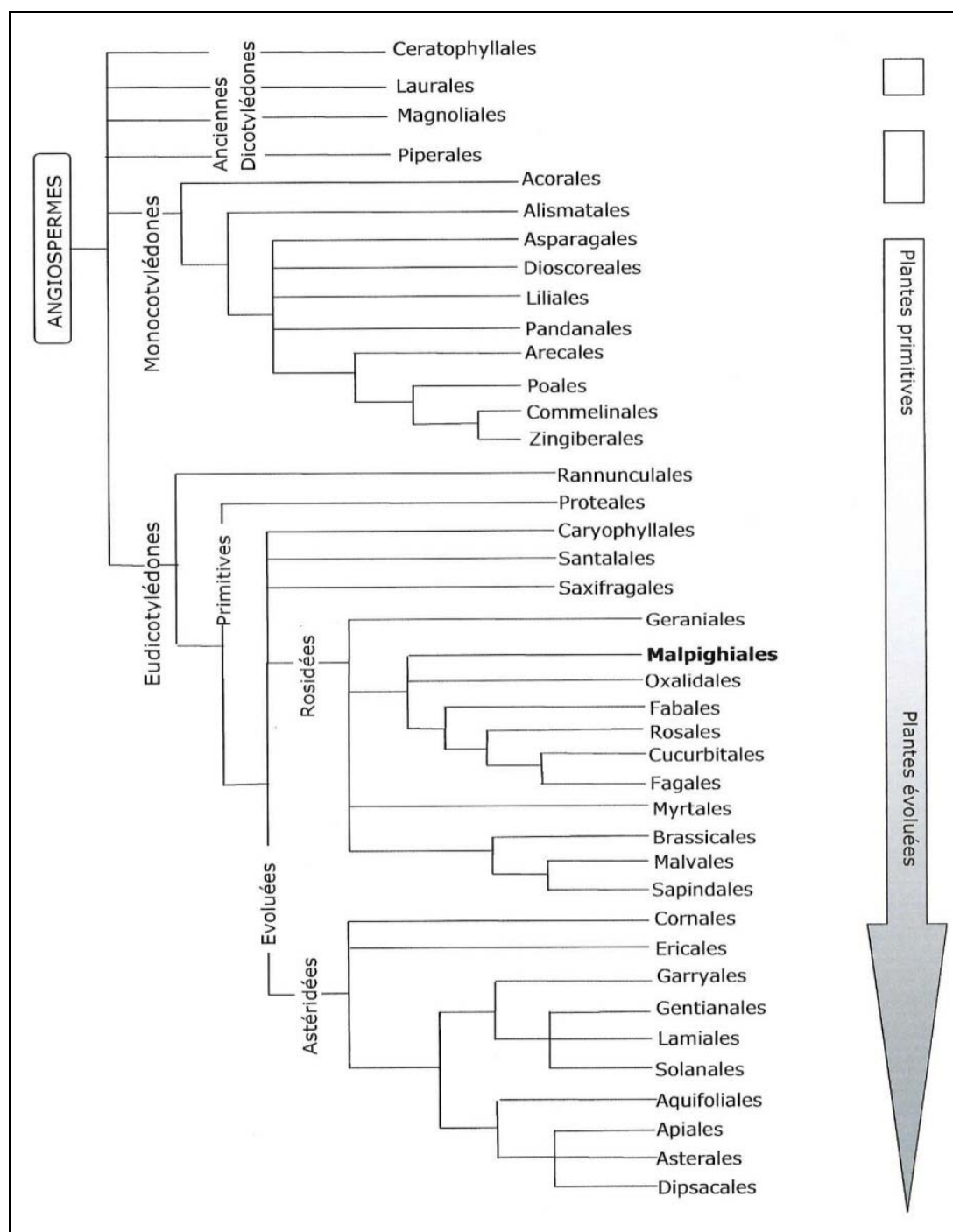


Figure 2 : Cladogramme des Angiospermes selon l'Angiosperm Phylogeny Group (APG)

Le genre *Calophyllum* appartient à l'ordre des Malpighiales et à la famille des Clusiaceae, anciennement appelée Guttiferae dans la précédente classification.

La description botanique de la famille des Clusiaceae, du genre *Calophyllum*, et de l'espèce *inophyllum*, nécessite quelques définitions en terme de vocabulaire afin d'être bien appréhendée par le non initié. Nous proposons donc en [Annexe 1](#) un lexique botanique¹² succinct qui permettra une meilleure compréhension des paragraphes qui suivent. Par ailleurs un glossaire des noms vernaculaires utilisés dans ce chapitre est consultable en [Annexe 2](#).

I. LA FAMILLE DES CLUSIACEAE ET LE GENRE *CALOPHYLLUM*

Les Clusiaceae sont des herbes annuelles ou pérennes, des arbustes, des arbres ou des lianes, à sève résineuse, souvent jaune pâle. Les *feuilles* sont simples, opposées ou verticillées, rarement alternes ; le limbe est souvent muni de glandes ou de canaux résinifères ; la marge est généralement entière et les stipules presque toujours absentes. Les *inflorescences* sont axillaires ou terminales, formées de cymes simples ou composées, de grappes ou fleurs solitaires ; les pédicelles sont souvent munis de bractéoles sépaloïdes. Les *fleurs* sont souvent voyantes, hermaphrodites ou unisexuées, actinomorphes ; le périanthe est généralement double ; le calice est à 2-10 sépales libres, imbriqués ou décussés ; la corolle est à 2-14 pétales, imbriqués ou décussés, rarement valvaires, parfois soudés à la base, parfois absents. Les étamines sont nombreuses, libres ou plus ou moins soudées en faisceaux opposés aux pétales ; l'anthère est biloculaire, basi- ou dorsifixe, déhiscente longitudinalement ; les fleurs femelles sont souvent munies de staminodes. L'ovaire est supère, sessile, 1-16-carpellé, les loges sont aussi nombreuses que les carpelles ; les ovules sont solitaires à nombreux par loge, à placentation axile ou basale, rarement pariétale ; les styles sont aussi nombreux que les carpelles, distincts ou soudés en un seul, rarements absents ; les stigmates sont lobés ou peltés, les fleurs mâles sont parfois munies d'un pistillode. Le *fruit* est une capsule, parfois une baie ou une drupe. La *graine* est souvent arillée ; l'embryon est dépourvu d'albumen¹².

La famille des Clusiaceae est pantropicale, s'étendant en régions tempérées de l'hémisphère nord. Elle comporte cinq sous-familles, identiques à celles qui composaient l'ancienne famille des Guttiferae : les Kielmeyeroideae, les Calophylloideae, les Clusioideae, les Moronobeoideae, et les Hypericoideae, et regroupe 1350 espèces réparties en 47 genres^{1,5,12}.

En tout, 4 genres et 6 espèces de cette famille sont présents en Polynésie française. Le genre *Calophyllum*, qui appartient à la sous-famille des Calophylloideae, est l'un des plus importants avec ses 187 espèces ; il est pantropical, et on le retrouve dans les océans Pacifique et Indien, et surtout en Indomalaisie ; il est représenté en Polynésie française par une seule espèce à statut douteux : le *C. inophyllum* (Un doute subsiste sur le fait que cette espèce soit naturalisée ou indigène en Polynésie française)^{1,5,12}.

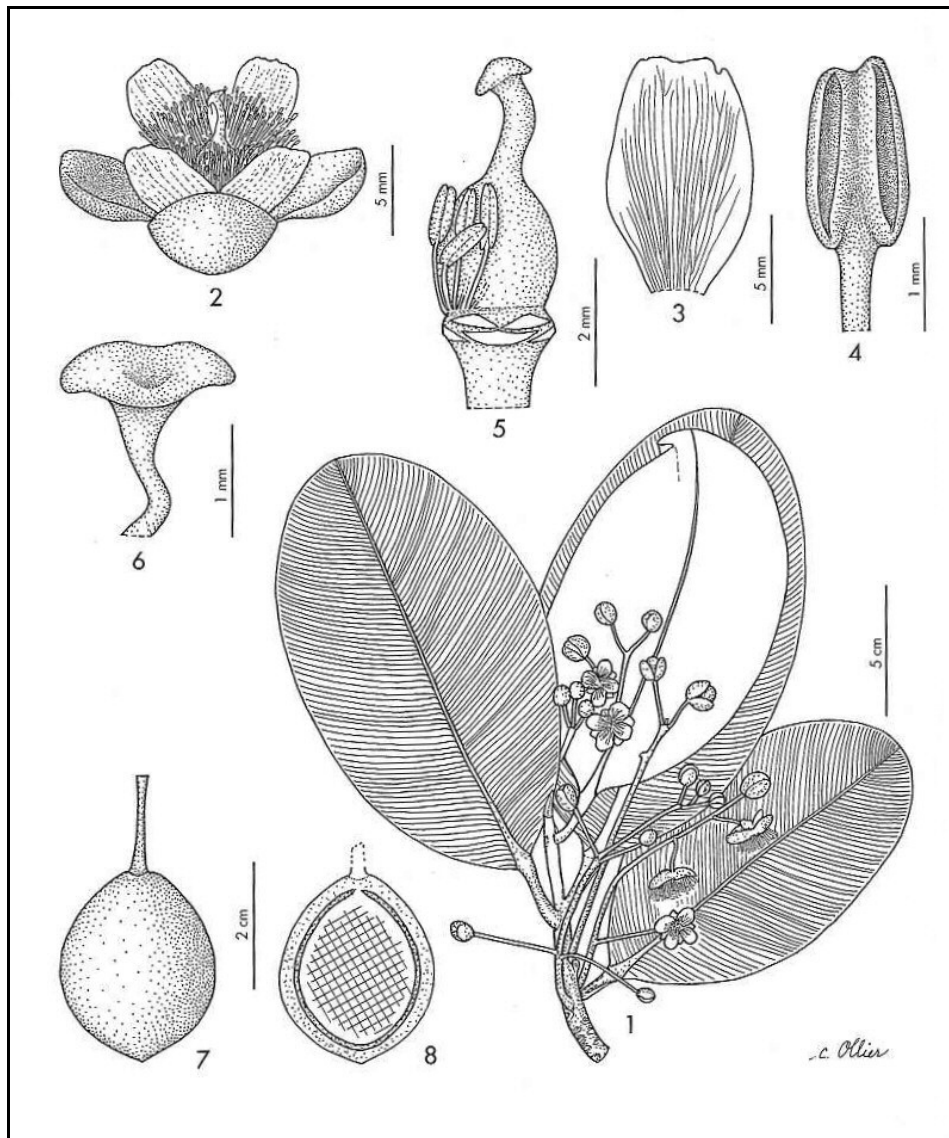
Le genre *Calophyllum* regroupe des arbres, souvent de grande taille, à bois dur, pourvus de jeunes rameaux ronds, anguleux ou comprimés, à sève résineuse, blanche ou jaune pâle, souvent abondante. Les *feuilles* sont simples, opposées-décussées ; le pétiole est élargi au sommet ; le limbe est à texture épaisse ; les nervures secondaires sont nombreuses, plus ou moins parallèles ; la marge est entière ; les stipules sont absentes. Les inflorescences sont axillaires ou sur des axes courts défeuillés, elles sont formées de cymes simples ou composées, pseudoracémeuses ou pseudopaniculées. Les fleurs sont hermaphrodites (rarement fonctionnellement unisexuées) ; le périanthe est généralement double ; le calice est à 4 sépales libres, décussés ; la corolle est à 0-10 pétales libres, imbriqués ou décussés, blancs, de texture plus mince que les sépales. Les étamines sont nombreuses, bi- ou plurisériées, libres ou soudées à la base ; l'anthère est biloculaire, basifixe. L'ovaire est subglobuleux à ovoïde, uniloculaire ; l'ovule est solitaire, à placentation basale ; le style unique est souvent filiforme ; le stigmate unique est pelté ou plus ou moins infundibuliforme. Le *fruit* est drupacé, l'endocarpe est crustacé ou osseux. La *graine* est non arillée¹².

II. LE C. INOPHYLLUM : BOTANIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Le *Calophyllum inophyllum* est un arbre de 1 à 20 m de hauteur et de 15 à 190 cm de diamètre, entièrement glabre, sauf les apex portant une pilosité fugace, microtomentelleuse à microvillose ; ses jeunes rameaux sont anguleux et orthotropes ; son écorce est brun-noir, crevassée longitudinalement, et contient un latex jaune pâle, jaune d'or ou jaune citron, plus ou moins abondant ; son bois est rouge, très dur. Les *feuilles* sont subérigées, à pétiole jaune pâle *in vivo*, robuste, de 0,8-1,5-2,8 cm, élargi au sommet, à section ronde à carrée, canaliculé dessus. Le limbe est elliptique, ovale, obovale ou oblong, rarement étroitement elliptique à oblong, de 4,5-16,4-25,2 x 2,5-7,7-10,8 cm (L/l = 1,1-4,3), parfois un peu falqué, chartacé à coriace ; la face supérieure est vernissée, vert jaunâtre, vert foncé à vert noirâtre *in vivo* ; la face inférieure est vert clair *in vivo* ; la base est cunéiforme à tronquée ; la marge est entière, parfois plissée transversalement, vert à jaune pâle *in vivo*, souvent révoluée ; le sommet est obtus à tronqué, parfois rétus ; la nervure médiane est jaune pâle *in vivo*, canaliculée dessus, fortement en relief dessous ; les nervures secondaires sont denses, de 8 à 18 par cm, bien marquées sur les deux faces ; le réseau tertiaire est indistinct. Les feuilles contiennent aussi du latex. Les *inflorescences* axillaires ou terminales, formées de cymes simples ou composées, pseudoracémeuses ou pseudopaniculées avec environ 10 à 25 fleurs, longues de 6,8 à 12,5 cm ; le pédoncule est robuste, de 2,2 à 2,5 cm, les bractées sont caduques, à cicatrice distincte. Les *fleurs* sont hermaphrodites, ont un parfum de miel ou de tilleul, sont généralement solitaires, plus rarement fasciculées par 2 ou 3 sur le rachis principal, et ont une pédicelle de 0,3 à 2,8 cm. Le calice est à 4 sépales décussés, les externes étant concaves, ovales à suborbiculaires, de 9 x 8,5 mm, à nervures distinctes, les internes étant un peu plus longs. La corolle est à 4-(8) pétales libres, obovalo-oblongs, mesurant 10 x 4 mm. Les étamines sont nombreuses, plus de 150, soudées à l'extrême base sur moins de 1 mm, disposées en 4 à 5 phalanges peu nettes ; le filet est linéaire, long de 3,5 à 5,5 mm ; l'anthère est ellipsoïde, de 1,2-1,8 x 0,4-7 mm. L'ovaire est subglobuleux à ovoïde, il mesure 3 x 2,5 mm ; le style est filiforme, long de 4 à 5 mm, plus ou moins plié à sigmoïde vers le sommet ; le stigmate est pelté. Le *fruit* est drupacé, globuleux à ellipsoïde, de 2,5 à 3,5 cm de diamètre, son mésocarpe peut atteindre jusqu'à 8 mm d'épaisseur, et son endocarpe est osseux. La *graine* atteint en moyenne 2,3 cm^{1,2,3,4,12}.

Phénologie : le *C. inophyllum* est en fleurs et en fruits toute l'année, avec toutefois deux pics de fructification. En conditions favorables, le Tamanu peut produire des fruits dès la cinquième année^{2,12}.

Ecologie : L'espèce est assez fréquente en végétation littorale et jusque vers 50 m d'altitude, rarement au-delà et alors toujours plantée et naturalisée (on le trouve jusqu'à 200 mètres d'altitude). Elle pousse sur les sables calcaires, *makatea* ou *mato*, en végétation de plage ou de *motu*, en forêt à *Hibiscus-Thespesia*, parmi *Casuarina*, *Terminalia*, *Guettarda* ou *Pandanus* ; plus rarement sur substrat basaltique, avec *Thespesia*, *Barringtonia* et *Pandanus*. On la retrouve parfois en plantation de bois précieux dans les îles hautes, en arbre de bordure ou en cocoteraie dans les atolls^{1,2,3,4,12}.



1. Extrémité de rameau fleuri ; 2. Fleur épanouie ; 3. Pétale, face externe ; 4. Etamnie ouverte ; 5. Jeune gynécée ; 6. Stigmate mûr ; 7. Fruit entier ; 8. Fruit, coupe longitudinale schématique.

Figure 3 : Planche botanique du *Calophyllum inophyllum*¹²



Photo 1 : Fleur de Tamanu *



Photo 2 : Tamanu poussant au bord du lagon à Raiatea *



Photo 3 : Jeune rameau et inflorescence de Tamanu *



Photo 4 : Fruits et amande de Tamanu de maturités différentes #

Répartition : Le *Calophyllum inophyllum* qui est la seule espèce représentée en Polynésie française, s'étend de l'Afrique orientale (Kenya, Tanzanie, Mozambique) à l'extrême est de la Polynésie, en passant par Madagascar, les Comores, l'Inde, le Sri Lanka, Myanmar, le sud du Japon, Taiwan, le sud de la Chine, les Philippines, le Vietnam, le Laos, la Thaïlande, la Malaisie, l'Indonésie, la Papouasie Nouvelle-Guinée, le nord de l'Australie, les Iles Salomon, les Iles Mariannes, la Micronésie, le Vanuatu, la Nouvelle Calédonie, Fidji, Tonga, Samoa, Niue, Hawaii, les Iles Cook, et enfin la Polynésie française. Son aire de répartition est donc toujours comprise entre le trentième parallèle nord et le trentième parallèle sud (espèce dite pantropicale), et la densité de population maximale est observée en Indonésie^{1,3}.

Il est indigène dans l'océan Indien et le sud-est asiatique, mais largement introduit ailleurs en particulier dans le Pacifique où son indigénat est problématique (une fois le fruit débarrassé de son mésocarpe, celui-ci flotte facilement et est disséminé par les courants marins, ce qui pourrait expliquer la présence de l'espèce dans de nombreuses îles du Pacifique ; toutefois la viabilité de la graine est mal connue)^{1,12}.

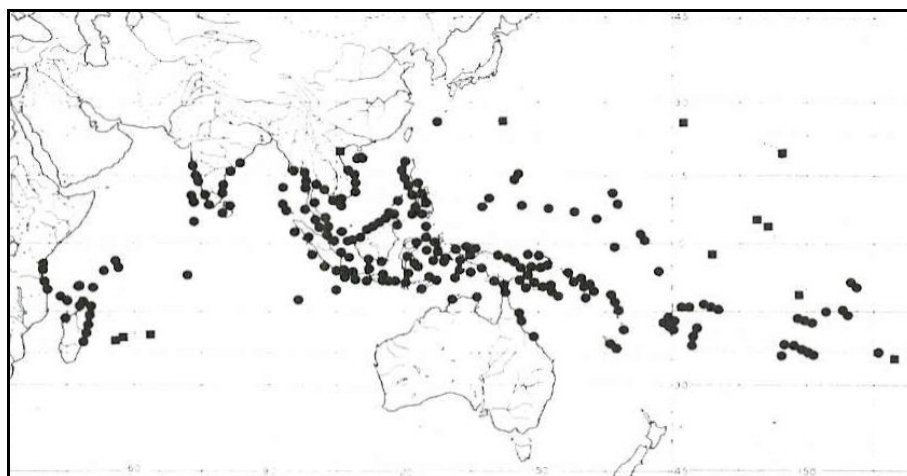


Figure 4 : Distribution du *Calophyllum inophyllum* en Asie du Sud-Est¹



Figure 5 : Carte de la zone Pacifique : le *C. inophyllum* se répartit entre les 2 tropiques^{1,3,12}

En Polynésie française, il se trouve dans tous les archipels avec des populations importantes dans les archipels de la Société et des Tuamotu. Il est peu commun aux Australes et aux Marquises où il subsiste sous la forme de petites populations reliques^{2,3,4}.

Les îles de Polynésie française où il est implanté : Australes : Maria, Raivavae, Rimatara, Rurutu, Tubuai ; Gambier : Agakaitai, Akamaru, Aukena, Mangareva, Taravai, Temoe ; Marquises : Fatu Hiva, Hiva Oa, Mohotani (Motane), Nuku Hiva, Tahuata ; Société : Bora Bora, Huahine, Maupiti, Mehetia, Moorea, Mopelia, Raiatea, Scilly, Tahaa, Tahiti, Tetiaroa, Tupai ; Tuamotu : Anaa, Fakahina, Hao, Makatea, Manihi, Niau, Rangiroa, Takapoto, Takume, Tikehau¹².

Noms vernaculaires utilisés^{1,2,3,4} :

France : Laurier d'Alexandrie ; **Angleterre** : Alexandrian laurel, Beach mahogany, Beach calophyllum, Indian laurel, Portia tree, Pannay tree, Sweet scented calophyllum ; **Polynésie française** : Tamanu ou Ati sauf aux Marquises : Temanu, Kamanu ou Tamakahaka ; **Îles Cook** : Tamanu ; **Samoa, Tonga et Niue** : Fetau ; **Hawaii** : Kamani, Kamanu ; **Îles Salomon** : Dalo ; **Fidji** : Dilo, Dolno ; **Vanuatu** : Nambagura ; **Nouvelle-Calédonie** : Bois à canots ou Bois Marie ; **Fédération de Micronésie** : Rekich ; **Îles Marshall** : Lukwej ; **Guam** : Daok ; **Kiribati** : Te itai ; **Tanzani** : M'tondoo ; **Madagascar** : Foraha ; **Seychelles, Ile Maurice** : Takamaka ; **Inde** : Kashumpa ; **Philippines** : Bangkalan ; **Indonésie** : Njampjong ; **Malaisie** : Penaga ou Pudek.

Nom pilote (commercial) pour les *Calophyllum* spp. : Bintangor.

III. ETHNOBOTANIQUE - UTILISATIONS TRADITIONNELLES DE LA PLANTE

Le Tamanu occupe encore aujourd'hui une place importante dans la culture et dans la pharmacopée traditionnelle polynésiennes. Mais ce n'est rien comparé à ce qu'il représentait autrefois, arbre sacré par excellence, qui était considéré comme un Dieu. Par ailleurs il était largement utilisé dans la pharmacopée locale pour ses propriétés biologiques spectaculaires.

III.1. Rôle symbolique du Tamanu dans la culture polynésienne

Avant la conversion des Polynésiens au christianisme, le Tamanu était considéré comme un arbre sacré ; il était planté dans l'enceinte des *marae* royaux et son bois servait à confectionner les idoles³. Quelques coups de hache pour abattre l'arbre, le dépouiller de ses branches et voilà ce grand dieu façonné. On l'ornait ensuite des *tapa* les plus beaux et des plumes les plus rares, puis on le dressait majestueusement au pied de l'autel lorsque le *tahua* devait accomplir un sacrifice¹⁵. Les vieillards prétendent que l'arbre était planté autour des *marae* parce que les Dieux affectionnaient son ombrage et que, pendant les sacrifices humains, ils venaient s'y reposer et assister à la cérémonie sans être vus. Les *marae* de second ordre, ou *marae* particuliers, ne comportaient pas de Tamanu : cet arbre était remplacé soit par le *miro*, soit par le *aito* ou encore par le *pua veoveo*^{3,15}. Le Tamanu qui était planté dans le *marae* portait le nom de *Nohaohu*. Le mot '*ati*' était aussi l'un des noms sacrés de l'arbre ; celui de Tamanu n'existait pas : il est d'une origine plus récente¹⁵.

Quand le *tahua* venait offrir un sacrifice au Dieu *Oro*, il prononçait quelques prières sur le cadavre, puis il cueillait une feuille de Tamanu, y déposait l'œil gauche de la victime et l'offrait respectueusement au *Arioi* qui le portait à la bouche et faisait le geste de l'avaler. Cette cérémonie, survivance de l'antique cannibalisme, a laissé sa trace dans le nom de *Aimata* (mangeur d'œil) que portaient encore, voilà cent ans, les princesses de la lignée des Pomare³.

Des légendes mettant en scène le Tamanu se sont transmises oralement de génération en génération, et ont été racontées aux premiers européens débarqués sur les îles de Polynésie par les grands prêtres de l'ancienne religion. Ces légendes sont donc parvenues jusqu'à nous et nous montrent bien la place qu'occupait le Tamanu dans la société polynésienne d'autrefois.

LEGENDE 1 : UNE PROPHECIE¹⁴

(En 1823, Auna-iti et Vai-au, deux prêtres de Porapora, firent ces déclarations confirmées par les indigènes lorsqu'arrivèrent les premiers missionnaires)

A Opoa, au cours d'une des dernières réunions du Hau-pahu-nui pour l'adoration des idoles et avant l'arrivée des navires européens, un étrange phénomène se produisit pendant le rite solennel. La cérémonie du *pa'i-atua* était à peine terminée qu'une bourrasque enleva le sommet d'un arbre Tamanu, appelé Paruru-Mata'i-i-'a'ana (Abrite du vent de la faute qui s'aggrave) ne laissant que le tronc dépouillé. Ceci était étonnant car le bois de Tamanu est très dur et d'un grain serré. Tous ceux qui étaient présents furent saisis d'angoisse. Les représentants de chaque tribu se regardèrent silencieusement entre eux, pendant quelque temps. C'est alors qu'un prêtre de Opoa nommé Vaita (Eau frappée) s'écria « *E homa eaha ta'outou e feruri nei ?* » (Amis, à quoi pensez-vous ?) « *Te feruri nei i te tapa'o o teie raau i motu nei, a'ita te ra'au nei i motu mai te po au'iu'i mai.* » (Nous nous demandons quel présage nous est indiqué par la destruction de cet arbre. Depuis les temps les plus reculés rien de semblable n'est arrivé à nos arbres).

C'est alors que Vaita se sentant inspiré leur expliqua le sens de cet évènement étrange :

Te ite nei au, tei mua ia'u nei te aura'a o teie nei peu maere rahi ! Tena mai te fanau'a 'una'una na te Tumu, e haere mai e hi'o i teie uru ra'au i Taputapuatea nei. E tino 'ê to ratou, e tino 'e to tatou ho'e ana'e ra huru no te tumu mai e e riro teie nei fenua ia ratou. E mou teie ha'apaora'a tahito nei, e e tae mai ho'i te manu mo'a o te moana, e te fenua nei. E haere mai e ta'iha'a i ta teie ra'au i motu e ha'api'i nei.

Je vois devant moi le sens de cet évènement étrange. Les glorieux enfants du tronc (Dieu) vont arriver et verront ces arbres ici à Taputapuatea. Ils seront d'aspect différent de nous et pourtant ce sont nos semblables, issus du Tronc et ils prendront nos terres. Ce sera la fin de nos coutumes actuelles et les oiseaux sacrés de la mer et de la terre viendront se lamenter sur ce que cet arbre décapité nous enseigne.

Cette déclaration inattendue stupéfia les prêtres qui demandèrent où se trouvaient ces hommes étranges. Et il répondit « *Te haere mai nei na ni'a i te ho'e pahi ama 'ore* » (Ils viennent sur une embarcation sans balancier). [...]

Il y avait aussi un prêtre de Ra'iatea qui déclara au Roi Tamatoa qu'un jour viendrait où il n'existerait plus de nourritures défendues aux femmes et qu'elles auraient toute liberté de manger de la tortue et autres aliments sacrés pour les Dieux et les hommes. Cette prédiction fut également reçue avec incrédulité mais se vérifia lorsque le christianisme fit son apparition...

LEGENDE 2 : TANE L'HOMME-DIEU¹⁴

(Récité en 1823 par Vara et Ara-mou'a, grand-prêtre de Ra'iatea et en 1840 par Mahine, chef de Mai'ao et fils du Roi Mato de Ra'iatea)

Ô sans formes, ô sans formes ! Pas de visage, pas de nez, pas d'oreilles, pas de bouche, pas de cou, pas de dos, pas de poitrine, pas de côtes, pas de ventre, pas de nombril, pas de hanches, pas de fesses, pas de genoux, pas de jambes, pas de plante des pieds. Ô, quelle est la croissance de ce petit enfant ? Ô néant sans formes, sans formes ! Qui aurait pu porter cet enfant ? Il est né d'Atea et de Papa-tu-'oi (Roc pointu debout) le beau descendant de Ta'aroa. [...]

Alors les messagers Ti'a-o-uri et Ti'a-o-Atea retournèrent chez Ta'aroa et Vai-tû-pô ; il leur souhaila la bienvenue et dit « Une autre mission ? »

« Oui ! nous avons une autre mission importante ! »

« Je vous écoute ! »

« Nous sommes venus chercher votre esprit pour l'apporter au fils de Atea-ta'o-nui (Vaste étendue de grand commandement) ».

« Votre mission est agréée, rentrez tous deux, voici mon esprit ».

Ensuite Ta'aroa fit pousser des épidermes pour l'enfant, pour lui donner des qualités pour en faire un grand Dieu, et un homme parfaitement beau, l'écorce du *hutu* pour rendre l'enfant robuste, l'écorce du *atae* pour que l'enfant ait un épiderme résistant, la croûte de la mer pour que l'enfant ait un épiderme salé, l'écorce du cocotier pour que l'enfant ait un épiderme poreux, l'écorce du *purau* pour que l'enfant ait un épiderme plein de fissures, l'écorce du *'ati* pour que l'enfant ait un épiderme nuancé, l'écorce du *mara* pour que l'enfant ait un épiderme mince, l'écorce du *apape* pour que l'enfant ait un épiderme épais, l'écorce du *to'i* pour que l'enfant ait un épiderme brillant, l'écorce du *aito* pour que l'enfant ait un épiderme rouge, l'écorce de l'arbre à pain pour que l'enfant ait un épiderme gluant, [...]. Toutes ces peaux furent placées sur l'enfant, la peau et sa qualité, la peau et sa qualité, la peau et sa qualité pour cet enfant...

LEGENDE 3 : L'ORDRE DEFINITIVEMENT ETABLI¹⁴

(Transmis en 1840 par les grand-prêtres Tamera et Mo'a)

Ô Tumu-nui quels sont les arbres qui se dresseront en présence d'Atea, quels sont les oiseaux de la vallée qui nicheront dans leurs branches et se nourriront de leurs fleurs, et quels sont les oiseaux de mer qui bâtiront leurs nids dans leurs branches ?

Ô Tane, l'arbre à pain se dressera en présence d'Atea, la grive foncée et la grive jaune clair sont les oiseaux de la vallée qui vivront dans ses branches et se nourriront de ses pousses, et la blanche hirondelle de mer ainsi que la noire sont les oiseaux qui bâtiront leurs nids dans ses branches.

Le cocotier dont le sommet domine tous les autres arbres, se dressera en présence d'Atea et le perroquet siffleur est l'oiseau de la vallée qui nichera dans ses branches et se nourrira de ses fleurs. Les oiseaux de mer nicheront aussi dans ses branches.

Le *mape* est l'arbre ; le pluvier siffleur et l'oiseau de paradis nicheront dans ses branches et se nourriront de ses fleurs, au bord de la rivière.

Le Tamanu est l'arbre, et nombreux sont les oiseaux au doux chant qui nicheront dans ses branches et se nourriront de ses fleurs.

Le *toa* est l'arbre et la frégate et l'albatros se poseront sur ses branches en présence d'Atea...

LEGENDE 4 : HOHOIO LA GRANDE PIROGUE DE HIRO¹⁴

[...]

Hiro continua ainsi, désignant les uns après les autres des arbres que l'on pouvait voir de la maison, tandis que Puna les dépréciait au fur et à mesure. Enfin Hiro désigna un grand *aha-tea* qui se dressait au Nord et abritait la maison de Puna du soleil et du vent et proposa de l'abattre, mais Puna s'écria : « Ô Hiro, mon prince, quel arbre ! Il est vieux et plein d'aspérités noueuses, c'est le refuge des rats et des chiens familiers. Va, choisis un arbre plus loin ô Hiro mon prince, qui convienne pour ta pirogue. »

Mais avec la permission de choisir un arbre, Hiro en fit exactement à sa guise. Pour contrarier le Roi Puna, il abattit le grand arbre qui abritait la maison, le dépouilla de ses branches et de son écorce et le laissa sur place à pourrir. Puis il se mit à abattre l'un après l'autre tous les arbres que Puna avait essayé de déprécier. Il coupa les branches, débarrassa les troncs de leur écorce et sans la moindre difficulté, les traîna par-dessus falaises et ravins, les ayant liés avec de fortes cordes de *fau*.

C'est ainsi que le Roi Puna perdit son bel *aha-tea*, son *mara-uri*, un *toi*, et un *hauou* et Hiro n'épargna pas les arbres sacrés autour du *marae*. Il abattit un grand Tamanu dépouilla le tronc de ses branches et de son écorce, le débita en planches, pour l'avant de sa pirogue et utilisa les branches pour en faire des balanciers et des traverses. Puis il abattit un *miro* des plus sacrés pour en faire des planches pour l'arrière de sa pirogue et il prit deux arbres à pain très hauts et droits pour les planchers des habitacles de pont. Puis il s'en fut dans les bois et abattit des *fau* bien droits pour faire des pagaies et des planchers et trois *hutu* pour faire des mâts...

III.2. Les utilisations traditionnelles du Tamanu : artisanat et pharmacopée

Comme matière première pour la confection des idoles, le bois de 'ati faisait l'objet d'un *tabu* rigoureux ; défense était faite de l'utiliser pour tout autre usage, en particulier pour construire les cases et les pirogues ; les arbres étaient donc extrêmement nombreux et formaient à Tahiti même de superbes forêts. Avec le christianisme vint la suppression des *tabu* religieux et les 'ati tombèrent par milliers sous la hache des indigènes, puis des trafiquants européens qui se rendirent très vite compte des qualités de ce bois. Aujourd'hui, il n'existe plus, dans toute l'île de Tahiti, une seule forêt de Tamanu ; on ne rencontre plus que des pieds isolés ayant échappé à la hache des bûcherons, grâce à la sollicitude d'un ami de la nature³.

Le bois de *Calophyllum inophyllum* présente une teinte rouge, une forte densité, il est imputrescible grâce à la résine qui l'imprègne. Les spécialistes distinguent deux variétés qui diffèrent par la couleur plus ou moins vive de leur bois et par la disposition des fibres. La première (*tamanu hiva*) est la plus dure et se travaille aisément. La seconde (*ati*) a un bois moins dur et plus blanc, qui éclate facilement : il faut le débiter longtemps à l'avance et le faire sécher à l'ombre avant de l'employer ; si on n'observe pas cette précaution, les meubles s'écaillent au bout de peu de temps³.

La corporation des sculpteurs indigènes utilise le bois de Tamanu pour la fabrication des vases sculptés à la main (*umete, kooka*), qui sont la spécialité des îles Marquises ; ils lui préfèrent cependant le *miro* moins dur et moins sujet à s'écailler. Lorsque les Tamanu étaient très nombreux, ils servaient à construire des pirogues. Aujourd'hui, les constructeurs de navires recherchent ce bois pour confectionner les pièces qui exigent une grande solidité (quille, carlingue et membrures) et ils en offrent un prix d'autant plus élevé que l'arbre devient plus rare³.



Photo 5 : Umete en Tamanu de Nuku Hiva (Benoît Tamarii)

On trouve dans les crevasses de l'écorce une résine verte qui reste longtemps fluide et poisseuse et qui, avec le temps, finit par devenir solide. Elle est alors d'un jaune-vert, friable, à cassure vitreuse et présente une odeur aromatique. Les tahitiens l'utilisent quelquefois pour calfater leurs pirogues³.

Autrefois, les fruits séchés de Tamanu enfilés sur une baguette de bois servaient de flambeaux aux tahitiens, de la même manière que les noix du Bancoulier, elles aussi riches en huile¹⁵.

Outre l'aspect sacré et les usages en artisanat et en construction navale, le Tamanu occupait également une place très importante dans la pharmacopée traditionnelle des polynésiens.

Les feuilles jeunes et fraîches sont utilisées pour faire un liquide adoucissant pour laver les yeux, elles sont aussi utilisées dans des bains de vapeur à l'usage de personnes fiévreuses¹⁴.

Les fleurs parfumaient le monoï. Les décoctions d'écorces servaient de teinture, mais étaient également très utilisées comme purgatif, et contre les ulcères. Le jus tiré des fruits et des feuilles était employé en médecine quotidienne pour ses effets analgésiques, contre les céphalées et les hémorroïdes. Ce jus était par ailleurs utilisé par les pêcheurs pour ses propriétés piscicides. Les décoctions de feuilles servaient de bains corporels pour soigner les maladies de peau, et de collyres pour apaiser les conjonctivites^{1,2,3,4}.



Photo 6 : Tronc écorcé d'un Tamanu de Raiatea : le latex suinte *

En dermatologie, les tahitiens remplissent une pirogue d'eau douce et font bouillir cette eau par immersion de pierres volcaniques rougies au feu. Quand l'eau bout, les pierres sont retirées et remplacées par des rameaux de Tamanu et de *ora* qu'on laisse infuser jusqu'à ce que la température se soit abaissée suffisamment. Le malade se plonge alors dans le bain et y séjourne une demi-heure. Dans la plupart des maladies de peau (herpès, eczémas, intertrigos, prurits d'origines diverses) il suffit de répéter trois fois le traitement pour obtenir une sédation complète et parfois la guérison définitive³.

En ophtalmologie, la macération aqueuse de feuilles de Tamanu est un très bon calmant ; il convient de choisir de jeunes feuilles et de les faire macérer dans l'eau pendant une nuit en évitant de briser les tiges car la sève viendrait modifier les propriétés du liquide. Cette macération est employée en bains d'yeux répétés jusqu'à guérison³.

Pour soigner les brûlures, on pile ensemble une poignée de jeunes pousses de *'ati* et une poignée de stipules de *purau*. La pulpe est enveloppée dans une étoffe, on exprime le suc, on fait boire une cuillerée à soupe et on baigne avec le reste la partie brûlée. Le traitement est poursuivi deux fois par 24 heures jusqu'à guérison³.

Les jeunes pousses entrent également dans la préparation d'une potion que l'on administre aux porteurs de hernies. On broie ensemble un citron entier (y compris le zeste) et deux jeunes pousses de *'ati*. On ajoute un peu d'eau douce (une hauteur de deux pouces dans un verre), on exprime et on administre ce liquide une fois par jour pendant trois jours³.

L'huile produite à partir des amandes du Tamanu est quant à elle utilisée pour soigner toutes sortes de plaies atones (escarres, ulcères variqueux, fistules, ulcères lépreux, brûlures). Une compresse trempée dans l'huile de Tamanu est appliquée sur la lésion. Cette huile possède des propriétés cicatrisantes. Le pansement est changé tous les deux ou trois jours. Pour obtenir cette huile, on doit presser à froid des amandes de Tamanu préalablement séchées au soleil pendant environ un mois ([Photos 7](#) et [8](#)). Dans les îles lointaines où il est impossible de se procurer l'huile, celle-ci peut être remplacée par un emplâtre confectionné avec les graines fraîches broyées et délayées dans de l'huile de coco stérilisé. Cette huile est également employée par application locale contre les rhumatismes et les sciatiques (effets analgésiques)³.

Les amandes de Tamanu entrent également dans la composition de divers remèdes élaborés par les Polynésiens. Un exemple avec cette recette d'une préparation abortive¹⁶ :

Prendre : 7 graines de *vavai* (cotonier)
3 graines sèches de *ti'a'iri* (bancoulier)
½ amande sèche de *'ati* (tamanu).

Ecraser le tout, mettre dans un linge. Râper ½ amande de *coco* au stade *opaa* ; en exprimer le lait. Ajouter au lait de coco le suc des végétaux écrasés et boire le mélange froid.

Toutes ces utilisations traditionnelles du Tamanu relatées en Polynésie française se retrouvent dans presque tous les pays où pousse cet arbre. Il est ainsi utilisé pour les propriétés empiriques décrites ci-dessus de l'Afrique orientale à l'extrême est de la Polynésie¹⁷.



Photo 7 : Séchoirs d'amandes de Tamanu sur l'île de Raiatea *



Photo 8 : Amandes de Tamanu séchant au soleil : la résine suinte *

IV. UTILISATIONS MODERNES DE LA PLANTE

Malgré toute l'importance du Tamanu dans la pharmacopée traditionnelle polynésienne, celui-ci aurait pu tomber dans l'oubli, si en 1934 les propriétés analgésiques des amandes n'avaient reçu une application nouvelle dans le traitement des névrites lépreuses contre lesquelles, en dehors des sédatifs du système nerveux central (morphine, héroïne, etc...), la thérapeutique est généralement impuissante. C'est aux îles Fidji que, pour la première fois, le médicament fut expérimenté sous le nom de Dolno (nom indigène du *Calophyllum inophyllum* à Vanua Levu). Auparavant, on avait remarqué que les malades arrivaient souvent à la léproserie avec un flacon d'une huile jaune qu'ils employaient en frictions ; cette huile fut identifiée comme étant tirée des graines de *dolno* ; on en entreprit la fabrication. On eut ensuite l'idée de préparer les esters éthyliques des acides gras de l'huile qui, injectés à fortes doses, ne causaient aucun mal aux animaux d'épreuve. Une femme indigène souffrant d'insomnies rebelles depuis des mois et dont le nerf cubital était enflé et très douloureux s'offrit pour recevoir la première injection. Trois heures après, elle était libérée de toute douleur et on avait palper son nerf sans éveiller la moindre réaction ; de plus, elle retrouvait le sommeil. Ces esters éthyliques ont été essayés un grand nombre de fois depuis sous le nom de Dolno non seulement dans les névrites lépreuses mais aussi dans les névrites d'origines diverses, les sciatiques, le zona, les douleurs des tabétiques et des cancéreux. D'après Jeanson, les doses optima sont les suivantes : injections intra-musculaires profondes : 5 à 10 mL, frictions et voie buccale : 5 à 20 mL. Les injections sous-cutanées sont à rejeter parce qu'elles sont trop douloureuses. Le traitement peut être continué un grand nombre de jours successifs, le Dolno étant peu toxique. Il a été mis à la disposition du docteur Rollin, médecin de la léproserie d'Orofara, des ampoules des ces esters éthyliques d'acides gras d'huile de Tamanu préparées à la pharmacie de l'hôpital colonial de Papeete. Les résultats ont été satisfaisants et le médicament a été utilisé d'une façon courante dans les formations hospitalières de Tahiti et des archipels voisins³.

En 1948, l'huile de Tamanu a fait son entrée dans la thérapeutique européenne grâce aux travaux de Jeanson. Celui-ci, dans son laboratoire de l'hôpital Saint Louis de Paris, a entrepris l'étude de l'action de cette huile sur les plaies les plus diverses. Parallèlement à ces travaux cliniques, des recherches chimiques, destinées à approfondir la connaissance de la composition de l'huile, étaient entreprises dans divers laboratoires parisiens par Lederer, O-Potier, Buzas et Polonsky. Enfin, de nombreux essais cliniques complétant ceux de Jeanson furent effectués dans d'autres hôpitaux parisiens par Sidi et Chevalier, tandis que Pocidalo et Chaslot étudiaient l'action de cette huile sur les brûlures expérimentales du cobaye. Peu de temps après la dernière guerre, les laboratoires Jeanson, devenus depuis Pro-médica, commercialisaient l'huile de Tamanu en ampoules scellées et stérilisées sous le nom d'Inocalo³.

Les essais cliniques étaient destinés à vérifier les résultats obtenus par les guérisseurs polynésiens, à trouver si possible des propriétés nouvelles et à préciser le mode d'action du médicament. On a traité avec l'huile fournie par Jeanson (Inocalo), préparée à partir de graines récoltées à Tahiti, des plaies atones, des brûlures physiques et chimiques, des radiodermites, des fissures anales, des greffes cutanées, des plaies post-opératoires et des ulcères. Dans la plupart des cas, les résultats ont été spectaculaires³.

Dans une escarre gangrénée de la cuisse droite, chez une femme de 57 ans, rebelle à tous les traitements et justifiant une amputation, la guérison a été obtenue au bout de sept mois. Chez une jeune fille de 13 ans et demi dont la jambe gauche avait été écrasée par un charriot à roues cerclées de fer quatre ans auparavant, et chez laquelle toutes les greffes avaient échoué, on tente de nouvelles greffes, après un traitement de dix jours avec l'huile de Tamanu. Les douze greffons posés prennent parfaitement, les plaies se combleront et s'épidermiseront et la malade quitte l'hôpital, complètement guérie, deux mois après son entrée³.

Des malades présentant les brûlures les plus variées, dans leurs causes comme dans leurs localisations, furent traités à l'Inocalo (brûlures au visage par du phosphore, brûlures à la tête par une bassine de lait bouillant, brûlures à la main provoquées par un bain de soude caustique, brûlures du cuir chevelu par l'eau bouillante et brûlures du creux poplité produites par de l'essence enflammée). Dans tous les cas les traitements classiques n'avaient pas réussi à provoquer la cicatrisation. Les pansements quotidiens à l'Inocalo amenèrent rapidement (au bout de quelques jours ou de quelques semaines) la guérison de toutes ces brûlures³.

L'huile de Tamanu trouve sa principale indication dans le traitement des radiodermes. Son action est d'autant plus rapide qu'elle est appliquée précocement. Chez une malade de 82 ans soignée depuis trente ans par des séances répétées de rayons pour une syringomyélie, il s'était formé une radioderme importante de la région dorsale, avec une ulcération s'étendant sur une largeur de 5 à 7 cm. Tous les traitements avaient échoué avant que les pansements quotidiens à l'Inocalo n'amènent la cicatrisation totale en trois mois³.

L'huile de Tamanu est également efficace dans le traitement des fissures anales. Très souvent, pour des fissures récentes, on obtient la guérison³.

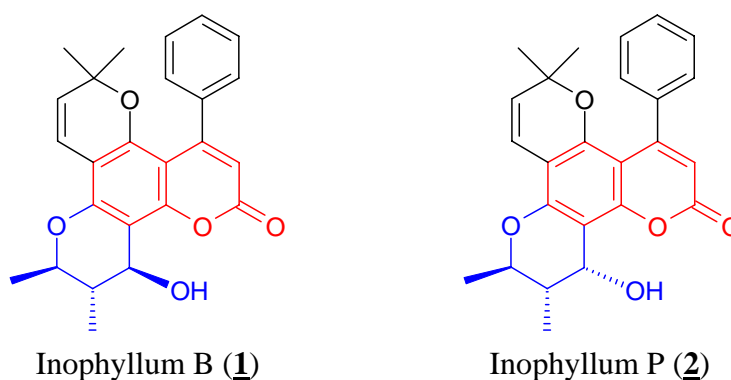
Le docteur Chevalier a publié plusieurs observations dans lesquelles l'huile de Tamanu a amené la cicatrisation de plaies post-opératoires avec sédation des douleurs. Chez un malade âgé de 67 ans, amputé des jambes à cause de lésions gangréneuses, les plaies étaient à la fois atones et suppurantes, les moignons s'étaient rétractés, laissant les fémurs à découvert sur une longueur de 4 cm. Le malade souffrait beaucoup, son état général interdisait une nouvelle intervention chirurgicale. Les pansements furent pratiqués alternativement avec le Tamanu à l'argent et le Tamanu à la morphine après nettoyage des plaies par un tampon imbibé d'éther. Au 33^e jour il fut possible de pratiquer une nouvelle résection et les surfaces étaient entièrement cicatrisées 18 jours après³.

Dans les plaies d'ulcères variqueux, d'ulcères lépreux (maux perforants plantaires), les résultats sont moins spectaculaires surtout lorsque la plaie est infectée ou eczématisée. Il faut d'abord traiter celle-ci par des compresses d'Hexomédine ou de Néomycine. La guérison est de règle au bout de plusieurs mois. L'huile de Tamanu, outre son action cicatrisante, a des propriétés antalgiques, anti-inflammatoire et anti-biotiques. On peut l'utiliser aussi bien sur les lésions des muqueuses que sur celles de l'épiderme. Elle guérit les crevasses des pieds et des mains, les engelures et gerçures, les vaginites, les érosions et ulcérations du col de la matrice, les crevasses du sein. Les laboratoires Pro-médica préparent, outre les ampoules d'huile stérilisée, une pommade et des ovules³.

De nos jours, l'huile de Tamanu entre dans la fabrication contemporaine de produits cosmétiques et est également achetée par certains groupes pharmaceutiques européens et américains, d'où la viabilité économique potentielle de la filière de production de cette huile en Polynésie française. D'autant plus que le Service du Développement Rural a mis en place depuis plusieurs années des plantations de Tamanu dans différentes îles, en vue de l'exploitation du bois mais aussi des graines.

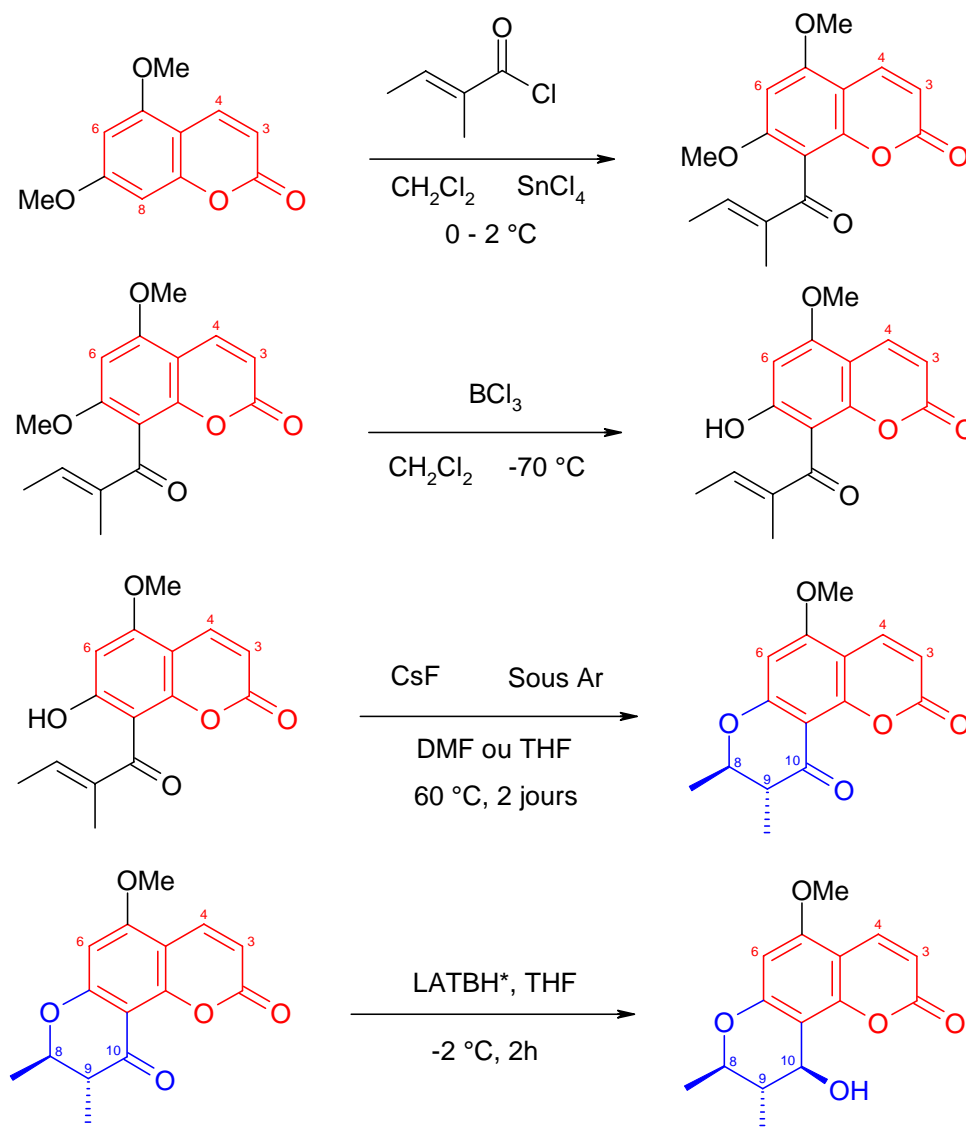
V. SYNTHÈSES DE CERTAINS CONSTITUANTS DU *C. INOPHYLLUM*

Les vertus thérapeutiques avérées de l'huile et des extraits de feuilles et d'écorces de Tamanu a bien entendu attiré l'attention des chimistes sur cette plante. Les premières publications d'ordre chimique sur le *Calophyllum inophyllum* datent de 1951, et depuis un grand nombre de molécules ont été découvertes, pouvant expliquer son activité biologique. Les molécules qui présentent des activités biologiques intéressantes font partie de la famille des xanthones, et surtout de celle des coumarines. Certaines coumarines présentes dans le *Calophyllum inophyllum* ont été caractérisées puis testées avec succès pour lutter contre le virus HIV-1. Il s'agit de l'inophyllum B (**1**) et de l'inophyllum P (**2**) :



Toutefois ces molécules sont présentes en quantités relativement faibles dans l'huile ou les extraits de Tamanu. Il paraît donc difficile d'envisager des extractions massives du matériel végétal pour obtenir ces molécules pures après différentes séparations chromatographiques, en vue de leur utilisation pharmaceutique. La recherche s'est donc naturellement orientée vers la synthèse énantiosélective de ces molécules, à partir de dérivés commerciaux de la **coumarine** (motif de base représenté en rouge).

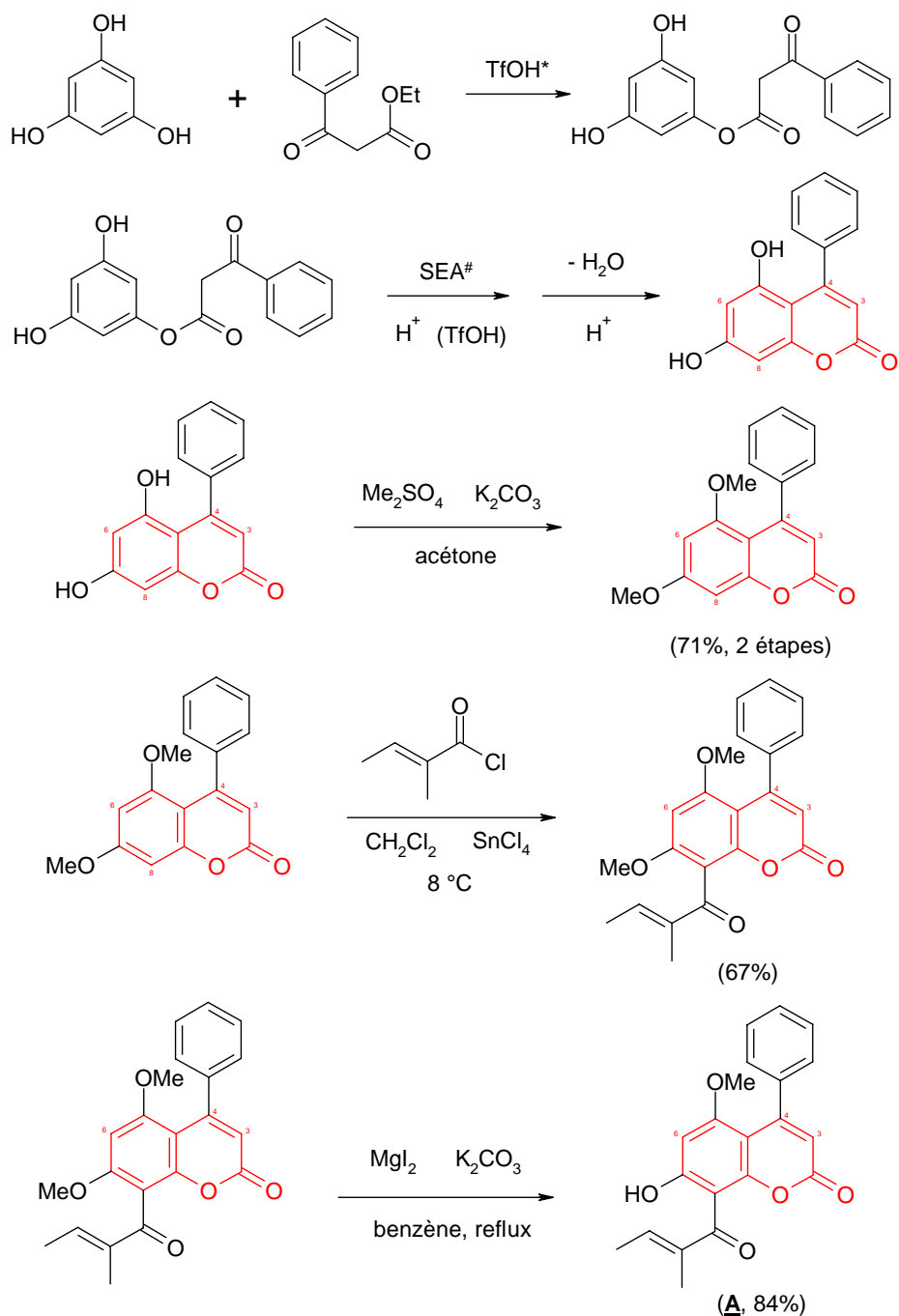
Une synthèse diastéréosélective d'une coumarine comportant la même configuration absolue du cycle **chromanol** que celle de l'inophyllum B (**1**) (**Figure 6**) a été proposée par Ishikawa en 1997¹⁰. Le précurseur est la limettine (ou citroptène : 5,7-diméthoxy-coumarine), qui est une molécule commercialisée aux alentours de 50 euros les 10 mg¹³.



(*) LATBH : Hydrure de tri-tertiobutoxy lithium aluminium ($\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$)

Figure 6 : Schéma d'une synthèse diastéréosélective d'une chromanol-coumarine

La même équipe de recherche (Sekino, 2004)¹¹ vient de publier une synthèse complète de l'inophyllum B (**1**) à partir du 1,3,5-trihydroxybenzène (ou phloroglucinol). Cette synthèse en huit étapes utilise les réactions de Pechmann, de Friedel-Craft, de Michael (addition intramoléculaire), et de Lau (cyclisation en présence d'acide phénylboronique). Le détail de ces huit étapes synthétiques est présenté ci-dessous (**Figures 7** et **78**) :



(*) TfOH : Acide triflique ou trifluorométhanesulfonique (CF₃SO₃H)

(#) SEA : Substitution Électrophile Aromatique

Figure 7 : Schéma de synthèse du précurseur (**A**) de l'inophyllum B (**1**)

La première étape est très importante, elle permet de former la structure de base de la molécule recherchée : la 5,7 dihydroxy-4-phénylcoumarine, grâce à une substitution électrophile aromatique (SEA) intramoléculaire en présence d'acide triflique (réaction de Pechmann). On protège ensuite les groupes hydroxy par méthylation, puis on procède à une deuxième SEA avec le chlorure de tigloyle en présence de chlorure d'étain (réaction de Friedel-Craft). On déprotège ensuite sélectivement l'un des deux groupes hydroxy pour obtenir le précurseur (**A**) dont le rendement global est de 40%.

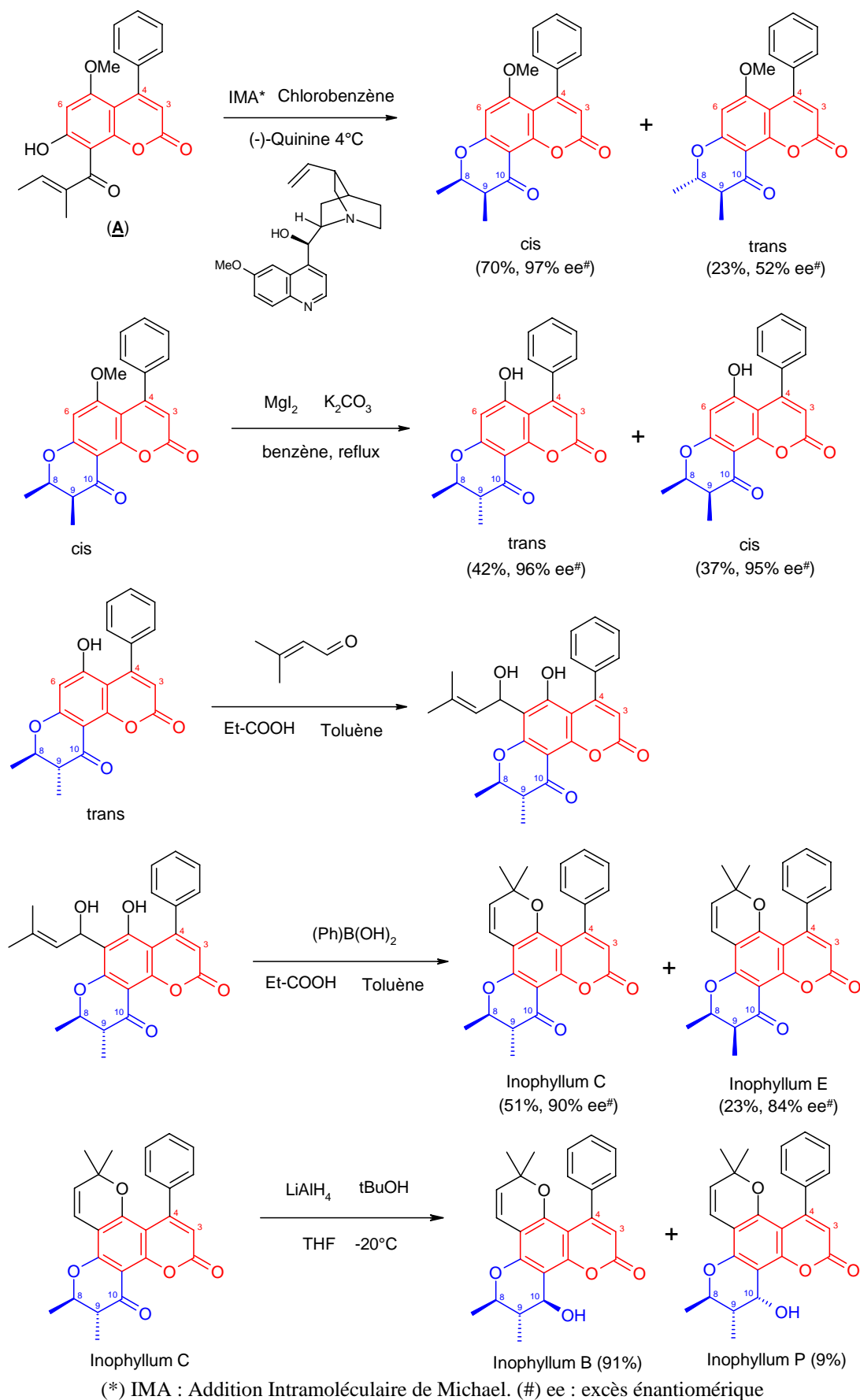


Figure 8 : Schéma de synthèse de l'inophyllum B (**1**) à partir du précurseur (A)

Ce précurseur (**A**) subit ensuite une addition intramoléculaire de type Michael, catalysée par la (-)-quinine, pour conduire majoritairement à la formation du cycle chromanone de configuration cis. La déprotection du deuxième groupe hydroxy par l'iodure de magnésium conduit à l'épimérisation de la molécule pour donner en majorité le composé trans. La réaction de Lau permet ensuite de former le dernier cycle diméthylchromène, tout en gardant majoritairement la configuration trans. On obtient ainsi l'inophyllum C (**3**), puis l'inophyllum B (**1**) par réduction avec l'hydrure de lithium aluminium. Le rendement de l'inophyllum B (**1**) par rapport au précurseur (**A**) est de 14%, le rendement global des huit étapes de synthèse étant alors d'environ 6%.

Ce nouveau protocole synthétique est inédit, il est pour le moment le seul permettant d'obtenir l'inophyllum B (**1**) par des réactions diastéréosélectives et énantiosélectives. Il a l'avantage de conduire à l'inophyllum B (**1**) à partir de molécules simples et commerciales, toutefois son rendement global est assez faible puisqu'il n'atteint pas les 10%. Des progrès restent donc encore à faire, mais il semble clair que la voie synthétique prenne définitivement l'avantage sur la voie 'extractive', afin d'obtenir de l'inophyllum B (**1**) en grandes quantités et de l'utiliser dans la lutte contre le HIV-1.

Par ailleurs on peut remarquer qu'un grand nombre de brevets ont été déposés sur les coumarines, dont plusieurs d'entre elles sont actives contre le HIV-1. Il s'agit en particulier du (+)-inophyllum B (**1**), mais aussi et surtout du (+)-calanolide A (**4**), qui n'est pas présent dans les extraits de *Calophyllum inophyllum*. Sont ainsi brevetés un grand nombre de procédés d'extraction, de purification, d'hémisynthèses et de synthèses totales permettant d'obtenir le (+)-calanolide A (**4**), le mélange racémique (+/-)-calanolide A, ou d'autres composés du type des calanolides, ainsi que leurs dosages et modes d'administration à l'homme. Concernant les inophyllums B (**1**) et P (**2**), Patil et son équipe ont breveté, cinq ans après avoir signé une publication de référence sur les coumarines isolées du *Calophyllum inophyllum*, des méthodes de préparation de phényl-coumarines ainsi que leurs applications thérapeutiques. (une liste de brevets américains est donnée ci-dessous)

En ce qui concerne le *Calophyllum inophyllum*, il reste donc encore beaucoup de chemin à parcourir pour le développement des applications biomédicales des molécules biologiquement actives qu'il renferme, et de ses dérivés biosynthétiques ou synthétiques potentiellement actifs.

Exemples de brevets

Boyd et associés., "Calanolide et autres composés anti-rétroviraux relatifs, compositions, et utilisations", Brevet américain **5 591 770**, 7 janvier 1997.

Résumé : La présente invention fournit de nouveaux composés antiviraux appartenant au groupe des calanolides, des composés relatifs à ce groupe, et leurs dérivés, qui peuvent être isolés à partir de matériel végétal, ou sont dérivés de ces composés isolés de plantes du genre *Calophyllum* en accord avec la présente méthode. Ces composés et leurs dérivés peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres agents antiviraux dans des compositions pharmaceutiques afin d'inhiber la propagation ou la réplication d'un virus, tel un rétro-virus, en particulier un virus d'immunodéficience humaine, comme les HIV-1 et HIV-2.

Flavin et associés., “Méthode pour la préparation du (+-)-calanolide A et d’intermédiaires de synthèse”, Brevet américain **6 043 271**, 28 mars 2000.

Résumé : Une méthode de préparation du (+-)-calanolide A, un inhibiteur potentiel de la transcriptase inverse du HIV, à partir d’un chromène, est présentée. Des intermédiaires utiles pour la préparation du (+-)-calanolide A et ses dérivés sont également présentés. Selon la méthode révélée, le chromène réagit avec le 1,1-diéthoxy-éthane ou avec le paraldéhyde (2,4,6-triméthyl-1,3,5-trioxane) en présence d’un catalyseur acide et sous chauffage ; une autre alternative est de passer par une réaction en deux étapes, incluant une réaction du chromène avec l’acétaldéhyde (réaction de type aldol) puis une cyclisation toujours en milieu acide (ou dans les conditions neutres de Mitsunobu) pour produire la chromanone. La réduction de la chromanone avec du borohydrure de sodium en présence de trichlorure de cérium, produit le (+-)-calanolide A. Une méthode pour résoudre le mélange racémique (+-)-calanolide A en ses formes optiquement actives par un système HPLC chiral ou par une acylation enzymatique suivie d’une hydrolyse est également révélée. Enfin, une méthode pour traiter ou prévenir les infections virales en utilisant le mélange (+-)-calanolide ou le (-)-calanolide est fournie.

[Références des brevets américains déposés depuis 1997](#)

- 1) Boyd et al., United States Patent **5 591 770**, 7 janvier 1997.
- 2) Baker et al., United States Patent **5 608 085**, 4 mars 1997.
- 3) Patil et al., United States Patent **5 723 631**, 3 mars 1998.
- 4) Flavin et al., United States Patent **5 840 921**, 24 novembre 1998.
- 5) Baker, United States Patent **5 843 990**, 1^{er} décembre 1998.
- 6) Flavin et al., United States Patent **5 847 164**, 8 décembre 1998.
- 7) Boyd et al., United States Patent **5 859 049**, 12 janvier 1999.
- 8) Flavin et al., United States Patent **5 859 050**, 12 janvier 1999.
- 9) Flavin et al., United States Patent **5 869 324**, 9 février 1999.
- 10) Flavin et al., United States Patent **5 872 264**, 16 février 1999.
- 11) Flavin et al., United States Patent **5 874 591**, 23 février 1999.
- 12) Flavin et al., United States Patent **5 892 060**, 6 avril 1999.
- 13) Flavin et al., United States Patent **5 977 385**, 2 novembre 1999.
- 14) Flavin et al., United States Patent **5 981 770**, 9 novembre 1999.
- 15) Flavin et al., United States Patent **6 043 271**, 28 mars 2000.
- 16) Lin et al., United States Patent **6 160 131**, 12 décembre 2000.
- 17) Xu et al., United States Patent **6 369 241**, 9 avril 2002.
- 18) Xu et al., United States Patent **6 420 571**, 16 juillet 2002.
- 19) Boyd et al., United States Patent **6 673 830**, 6 janvier 2004.
- 20) Boyd et al., United States Patent **6 774 141**, 10 août 2004.

Références

- 1) P.F. Stevens, “A revision of the old world species of the *Calophyllum* (Guttiferae)”, J. Arnold Arbor. Harv. Univ., 1980, vol 61, pp 117-424.
- 2) J.-F. Butaud, “Le *Calophyllum inophyllum* et la filière Tamanu en Polynésie française”, communication personnelle, Département FOGER du SDR, 2003.
- 3) P. Pétard, “Plantes utiles de la Polynésie française”, édition Haere po no Tahiti, réédition 1986.
- 4) W.A. Whistler, “Flowers of the Pacific Islands Seashore”, Ed. Isle Botanica, Honolulu, 1992.
- 5) D. Guilet, “Etude Phytochimique d’une Clusiaceae Malaise, le *Calophyllum dispar*”, Thèse de l’Université d’Angers, France, 2000.
- 6) A.-E. Hay, “Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique”, Thèse de l’Université d’Angers, France, 2003.
- 7) J.-L. Guignard, “Systématique moléculaire”, Ed. Masson, 12^e édition, Paris, 2001.
- 8) R.-E. Spichiger, V.V. Savolainen et M. Figeat, “Botanique systématique des plantes à fleurs”, Ed. des presses polytechniques et universitaires romandes, 2^e édition, Lausanne, 2000.
- 9) J. Mugnier, “De la graine à la fleur”, Pour la Science, Paris, 2000.
- 10) T. Ishikawa, Y. Oku, et K.I. Kotake, “Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton : a model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins”, Tetrahedron, 1997, vol 53, n° 44, pp 14915-14928.
- 11) E. Sekino, T. Kumamoto, T. Tanaka, T. Ikeda et T. Ishikawa, “Concise synthesis of anti-HIV-1 active (+)-inophyllum B and (+)-calanolide A by application of (-)-quinine-catalyzed intramolecular oxo-Michael addition”, J. Org. Chem., 2004, vol 69, n° 8, pp 2760-2767.
- 12) J. Florence, “Flore de la Polynésie française, Volume 2”, Collection Faune et Flore tropicales 41, IRD Editions, Publications Scientifiques du Muséum, 2004, pp 113-115.
- 13) Extrasynthèse : <http://www.extrasynthese.com/ProdUnique.asp?num=526>, page web consultée le 1^{er} mars 2005.
- 14) T. Henry, “Tahiti aux temps anciens”, Publications de la Société des Océanistes, n° I, Musée de l’Homme, Paris, 2000.
- 15) L. Chabouis et F. Chabouis, “Petite histoire naturelle de la Polynésie française”, Société Polynésienne d’Edition.
- 16) F. Grépin et M. Grépin, “La médecine Tahitienne traditionnelle, *raau tahiti*”, Société Nouvelle des Editions du Pacifique, 1984.
- 17) A.C. Dweck et T. Meadows, “Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – The African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea”, Int. J. Cosmet. Sci., 2002, vol 24, n° 6 pp 341-348.

Photos

* Frédéric Jacq, stagiaire au SDR.

Frédéric Laure.

VI. CONCLUSION

Le *Calophyllum inophyllum* est l'espèce de *Calophyllum* la plus répandue dans le monde. Elle est naturalisée en Polynésie française depuis son introduction par les premiers Polynésiens il y a plusieurs siècles. Cet arbre est porteur d'un symbole culturel et religieux très fort, mais il est aussi utilisé en artisanat et dans la pharmacopée traditionnelle en Polynésie, dans le Pacifique, et plus généralement dans tout le monde tropical. Les vertus empiriques de son huile, de ses feuilles ou encore de son écorce ont été vérifiées cliniquement, ce qui a conduit à leur large utilisation moderne dans les centres de soins. Par la suite, de nombreux chimistes ont étudié la composition de la plante et découvert des molécules aux activités biologiques intéressantes, notamment dans la lutte contre le cancer et contre le virus du sida. Les chimistes sont parvenus récemment à synthétiser ces molécules, ce qui ouvre des perspectives intéressantes quant à leur utilisation pharmaceutique. En Polynésie, le développement de la filière économique de l'huile de Tamanu est prometteuse grâce à son utilisation dans divers produits cosmétiques.

Chapitre II :
ETUDE DES METABOLITES
DU CALOPHYLLUM

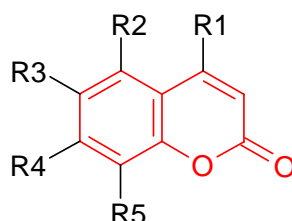
CHAPITRE II : ETUDE DES METABOLITES DU CALOPHYLLUM

Deux grandes catégories de molécules peuvent être isolées à partir de matériel végétal : les métabolites primaires, qui correspondent à des molécules vitales pour la plante, comme les protéines, les sucres ou les matières grasses, et les métabolites secondaires, qui comprennent toutes les autres molécules contenues dans les diverses parties de la plante. Cette seconde catégorie de métabolites, particulièrement intéressante, comporte des molécules importantes et variées du point de vue de leurs structures et de leurs activités biologiques.

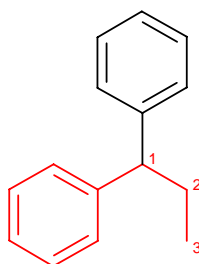
Toutes les parties de la plante ont fait l'objet d'études chimiques en ce qui concerne les nombreuses espèces du genre *Calophyllum*. Les chimistes ont ainsi isolé des molécules provenant des feuilles, des tiges, des écorces, du tronc, des racines, des fruits et des fleurs de plantes appartenant au genre *Calophyllum*. De ces diverses parties ont été isolées des molécules (métabolites secondaires) appartenant à trois familles principales : les coumarines et les néo-flavonoïdes, les xanthones, et enfin les triterpènes. D'autres familles de molécules sont représentées dans ce genre, mais de façon beaucoup moins abondante.

I. LES COUMARINES ET LES NEO-FLAVONOIDES

On entend par 'coumarines' des molécules dont la structure comporte un motif commun, qui est le suivant :



Ce motif commun comprend deux cycles à 6 atomes, dont l'un est un cycle benzénique aromatique, et l'autre un hétérocycle de type lactone. Lorsque le substituant R1 est un groupe phényle, ce qui est presque toujours le cas pour les molécules isolées de l'espèce *inophyllum*, la molécule appartient aussi à la famille des 'néo-flavonoïdes'. En effet, le motif de base des néo-flavonoïdes est le suivant :



Un schéma biosynthétique des néo-flavonoïdes (R1 = phényle) est envisagé, la synthèse du précurseur initial résultant de l'addition sur un noyau acylphloroglucinol d'une unité pyrophosphate de diméthylallyle et d'un dérivé acide α,β -insaturé^{1,2,3} ([Figure 9](#)).

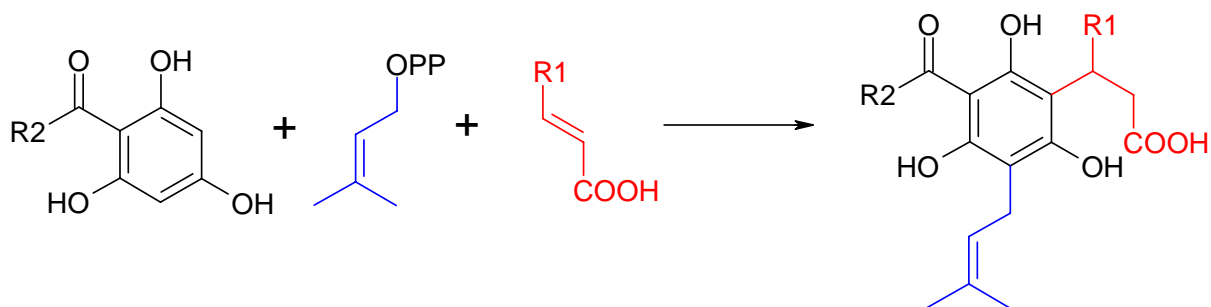


Figure 9 : Schéma de biosynthèse du précurseur des néo-flavonoïdes

Le groupe pyrophosphate (OPP) fait office de nucléophile qui arrache un proton du cycle aromatique pour réaliser la SEA (Substitution Electrophile Aromatique) de la chaîne diméthyl-allyle sur le cycle aromatique.

Le précurseur peut ensuite se cycliser pour donner la lactone caractéristique des coumarines :

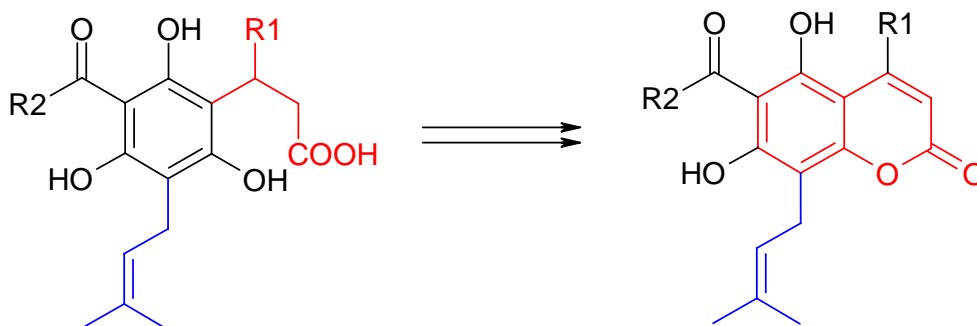
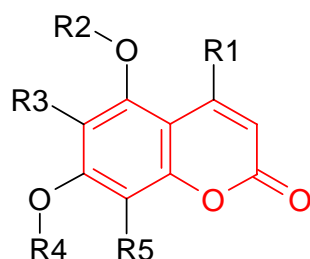


Figure 10 : Biosynthèse du précurseur des coumarines à partir de celui des néo-flavonoïdes

Toutes les coumarines isolées des plantes du genre *Calophyllum* sont issues de ce second précurseur (R1 = phényle, méthyle, ou n-propyle). La structure commune de toutes ces coumarines peut alors encore être précisée, elle est la suivante :



Les autres chaînes carbonées de ce second précurseur peuvent également se cycliser pour former différentes coumarines (et différents néo-flavonoïdes avec R1 = phényle), que nous retrouvons dans de nombreuses espèces du genre *Calophyllum*. Une mise au point donne une vision assez exhaustive des différentes coumarines du genre *Calophyllum*, de leurs sources naturelles, de leurs structures et de leurs activités (Ishikawa, 2000)⁴.

I.1. Classification structurale

Les coumarines issues du *Calophyllum* peuvent être classées en trois groupes bien distincts, selon que le substituant en position C₄ de la lactone est soit un groupement n-propyle (calanolides), soit un groupement phényle (inophyllums), soit un groupement méthyle (cordatolides).

Ces composés peuvent se classer en quatre groupes élémentaires :

- Groupe 1. Les dipyrano-coumarines tétracycliques, où le cycle C porte un groupe gem-diméthyle.
- Groupe 2. Les dipyrano-coumarines tétracycliques dont les cycles pyraniques C et D ont été inversés.
- Groupe 3. Les pyrano-coumarines tricycliques qui comportent un équivalent non cyclique des cycles C ou D de la structure tétracyclique des classes précédentes.
- Groupe 4. Les coumarines sans cycle additionnel.

Certaines coumarines du groupe 3 sont des dihydrocoumarines dont la liaison C₃-C₄ est saturée.

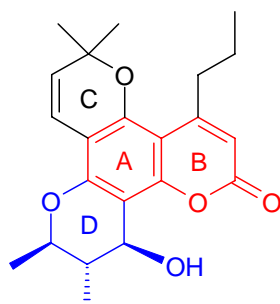
Les coumarines des groupes 1 et 2 peuvent également être divisées en deux sous-groupes, selon qu'elles comportent un **cycle chromanol** ou un **cycle chromanone**, dépendant de la nature de la fonction oxygénée portée par le carbone C₄ dans les cycles 2,3-diméthylpyranes.

Les pseudo-calanolides C et D avaient d'abord été identifiées comme faisant partie du groupe 1, avec un groupe *gem*-diméthyle sur le cycle C. Mais on s'est aperçu grâce aux déplacements chimiques en RMN ¹H qu'on avait affaire à des calanolides du groupe 2, où le groupe *gem*-diméthyle est porté par le **cycle D**^{14,15}.

Quelques exemples de coumarines classées par série

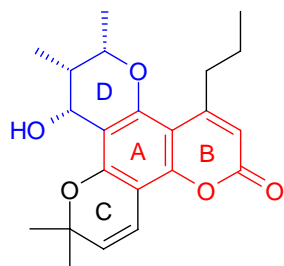
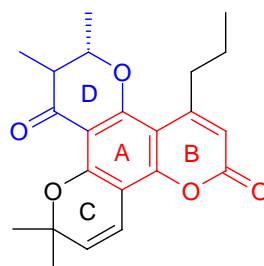
a) La Série des Calanolides

- Groupe 1 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques

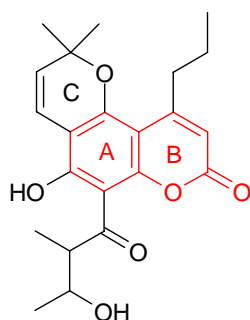


(4) (+)-Calanolide A

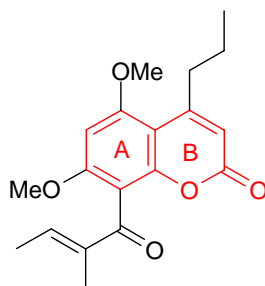
- Groupe 2 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques inversées

**(5)** (+)-Pseudo-calanolide C**(6)** (+)-Pseudo-calanolide D

- Groupe 3 : Les pyrano(dihydro)-coumarines tricycliques

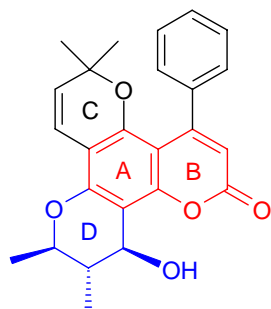
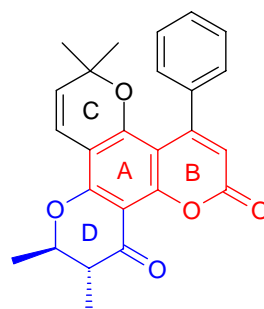
**(7)** (+)-Calanolide E

- Groupe 4 : Autres calanolides

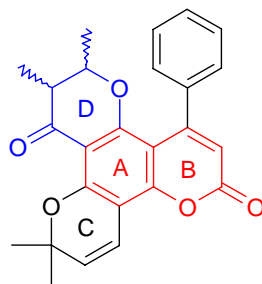
**(8)** Sans nom

b) La série des Inophyllums

- Groupe 1 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques

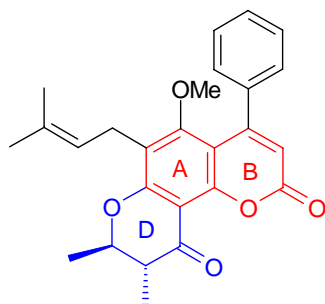
**(1)** (+)-Inophyllum B**(3)** (+)-Inophyllum C

- Groupe 2 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques inversées

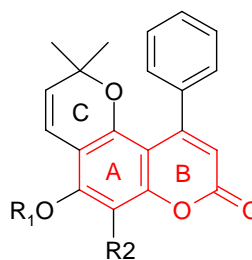


(9) 6,7-trans-Tomentolide A

- Groupe 3 : Les pyrano-coumarines tricycliques

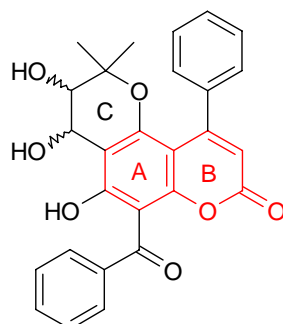


(10) (+)-Teysmanone B



(11) Sans nom

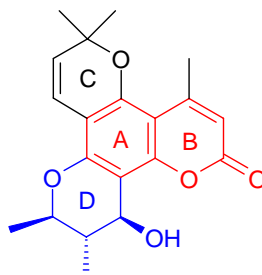
- Groupe 4 : Autres Inophyllums



(12) Sans nom (7,8-trans)

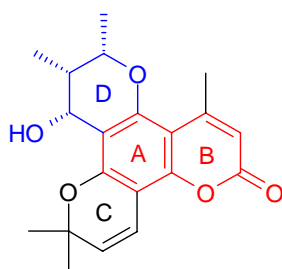
c) La série des Cordatolides

- Groupe 1 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques



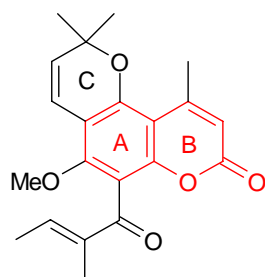
(13) (+)-Cordatolide A

- Groupe 2 : Les dipyrano-coumarines tétracycliques inversées

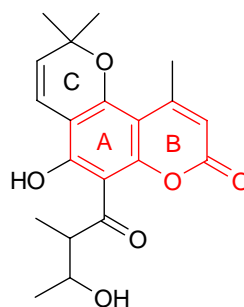


(14) (+)-Pseudo-cordatolide C

- Groupe 3 : Les pyrano(dihydro)-coumarines tricycliques



(15) Oblongulide



(16) (+)-Cordatolide E

I.2. Distribution dans le genre :

Le genre *Calophyllum* est un large groupe d'arbres tropicaux constitué d'environ 180 à 200 espèces différentes, couvrant principalement la zone Indo-Pacifique¹⁶. Les coumarines naturelles isolées à partir des différentes espèces du *Calophyllum* sont rassemblées dans le [Tableau 1](#).^{5,11,12,14,17 à 40,58,64,67 à 72}

a) Les Calanolides

La première coumarine de type calanolide a été isolée pour la première fois en 1964, à partir du *C. costatum*, qui pousse en Australie. Trois ans plus tard a été extraite du *C. tomentosum* une autre coumarine de type inophyllum, la tomentolide A (9)¹⁷.

En 1992, la séparation des différents constituants d'un extrait obtenu à partir du *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum* de Malaisie a permis d'isoler 8 nouvelles coumarines de type calanolide. Parmi ces coumarines, deux d'entre elles, le (+)-calanolide A (4) et le (+)-calanolide B étaient complètement protecteurs contre la réplication du HIV-1 et contre son activité cytopathogène⁵.

Les meilleurs rendements de (+)-calanolide A (4) obtenus étaient 1 mg pour 1 g d'échantillon de feuilles, ce qui est très peu... Les recherches se sont donc portées sur l'extraction du latex des mêmes arbres, mais ce latex ne contient pas des quantités décelables de (+)-calanolide A (4) ; il est cependant actif contre le HIV-1 par la présence de (+)-calanolide E1.

D'un autre côté, le latex provenant du *C. teysmanni* var. *inophylloïde* contient du (-)-calanolide B dont l'activité anti HIV-1 se situe entre le (+)-calanolide A (4) et le (+)-calanolide B, ce qui en fait un candidat à la substitution du (+)-calanolide A (4).

Espèces	Coumarines		
	Calanolides	Inophyllums	Cordatolides
<i>C. apetalum</i>		Apetalolide ¹⁷	
<i>C. australianum</i>		Calaustraline ¹⁸	
<i>C. blancoi</i>	Recedensolide ⁶⁷		
	Iso-recedensolide ⁶⁷		
<i>C. bracteatum</i>		Calophyllolide ¹⁹	
<i>C. brasiliense</i>	Brasimarine A ⁶⁸	Brasimarine B ⁶⁸	
	Mammea B/BA ⁶⁹	Brasimarine C ⁶⁸	
	Mammea B/BB ⁶⁹	Mammea A/AB ⁶⁹	
	Mammea B/BA cyclo F ⁶⁹	Mammea A/BB ⁶⁹	
	Mammea B/BB cyclo F ⁶⁹	Iso-mammeigine ⁶⁹	
<i>C. cerasiferum</i>	(-)-Costatolide ²⁰		
<i>C. cordato-oblongum</i>			(+)-Cordatolide A ^{21,22}
			(-)-Cordatolide B ^{21,22}
			12-Méthoxycordatolide B ²²
			Oblongolide ^{21,22}
<i>C. costatum</i>	(-)-Costatolide ²⁰		
<i>C. dispar</i>	Disparpropylinol B ⁷¹	Disparinol A ⁷²	
		Disparinol B ^{71,72}	
		Iso-disparinol A ⁷²	
		Iso-disparinol B ⁷²	
		Disparfurane B ⁷⁰	
		Disparacétylfurane A ⁷⁰	
		Mammea A/AA déshydrocyclo F ⁷⁰	
		Mammea A/AA méthoxycyclo F ⁷⁰	
		Mammea A/BA cyclo F ⁷⁰	
		Mammea A/BB cyclo F ⁷⁰	
		Mammea A/BC cyclo F ⁷⁰	
		Iso-disparfurane A ⁷⁰	
		Mammea A/AA cyclo F ⁷⁰	
		Mammea A/AB cyclo F ⁷⁰	
		Iso-dispar B ⁷¹	
		Disparinol D ⁷¹	
		Dispariol B ⁷¹	
		Mammea A/AB cyclo E ⁷¹	
	Mammea A/AB dioxalanocyclo F ⁷¹		
<i>C. inophyllum</i>	Sans nom I ²⁴	(+)-Inophyllum B ^{12,20,25}	
		(+)-Inophyllum P ^{12,20}	
		(+)-Inophyllum D ^{12,25}	
		12-Méthoxy-inophyllum D ⁵⁸	
		(+)-Inophyllum A ^{12,25}	
		(+)-Inophyllum G1 ¹²	
		(-)-Inophyllum G2 ¹²	
		Calocoumarine B ⁶⁴	
		Calocoumarine C ⁶⁴	
		(+)-Inophyllum C ^{12,20,25}	
		Inophyllolide ²⁶	
		(+)-Inophyllum E ^{12,20,25}	
		Calocoumarine A ⁶⁴	
		(-)-Calaustraline ²⁷	
		Calophyllolide ^{20,28,29,30}	
	Ponnalide E ^{24,31}		
	Apetalolide ³⁰		

Tableau 1 : Les sources de coumarines parmi les espèces de *Calophyllum*⁴

<i>C. lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i>	(+)-Calanolide A ⁵		(+)-Pseudocordatolide C ³²
	(+)-12-Méthoxycalanolide A ⁵		(+)-Cordatolide E ³²
	(+)-12-Acétoxycalanolide A ⁵		
	(+)-Calanolide B ⁵		
	(+)-12-Méthoxycalanolide B ⁵		
	(-)-Calanolide F ³²		
	(+)-Pseudocalanolide C ^{5,14,32}		
	(+)-Pseudocalanolide D ^{5,14,32}		
	(+)-Calanolide E1 ^{5,31,33}		
(+)-Calanolide E2 ^{5,32}			
<i>C. molle</i>	Calanolide E ³⁴		
<i>C. mooni</i>		(-)-Soulattrolide ³⁵	
		(+)-Inophyllum A ³⁵	
<i>C. aff. pervillei</i>		Calophyllolide ³⁴	
<i>C. soulattri</i>		(-)-Soulattrolide ³⁶	
<i>C. teysmannii</i> var. <i>inophylloide</i>	(-)-Costatolide ³³	(-)-Soulattrolide ^{33,37}	
	(-)-Calanolide F ³²	Inophyllolide ^{38,39}	
	No name 2 ³²	Soulattrolone ³⁷	
	Calanolide A ⁴⁰	Inophyllum E ³⁹	
		(+)-Teysmanone B ³⁹	
		(-)-O-méthylcalaustraline ³⁸	
		(-)-O-méthylisocalaustraline ³⁸	
		Calanone ^{37,38,39}	
		Isocalanone ³⁸	
		Teysmanone A ³⁹	
		No name 3 ³⁸	
	No name 4 ³⁸		
	No name 5 ³⁸		
	No name 6 ³⁸		
<i>C. tomentosum</i>	Tomentolide B ¹⁷	Tomentolide A ¹⁷	

Tableau 1 : Les sources de coumarines parmi les espèces de *Calophyllum*⁴ (suite)

b) Les Inophyllums

Les inophyllums ont une plus vieille histoire que les calanolides. En 1951, le calophyllolide (**22**) a été isolé à partir du *C. inophyllum*, et sert de référence à cette classe structurale de molécules^{14,28,29}. Sa structure fut déterminée six ans plus tard comme étant une pyranocoumarine tricyclique du groupe 3, et une autre molécule, l'inophyllolide (**19**), fut caractérisée comme étant une dipyrano-coumarine tétracyclique du groupe 1, comportant un cycle chromanone^{28,29,32}.

En 1968, 5 molécules de la série des inophyllums ont été isolées à partir du *C. inophyllum*, à savoir les inophyllums A (**30**), B (**1**), C (**3**), D (**31**) et E (**20**); des tests ont alors montré que ces molécules avaient une activité piscicide²⁵.

D'autres molécules du type inophyllum avaient également été découvertes à cette époque à partir d'autres espèces de la famille des *Calophyllum*.

En 1993, le fractionnement d'extraits à l'acétone de l'escargot d'Afrique, *Achatina fulica*, vivant aux Seychelles, a permis d'isoler 5 molécules de la série des inophyllums, l'inophyllum A (**30**), B (**1**), C (**3**) et E (**20**), et le calophyllolide (**22**), dont l'activité d'inhibition du HIV était importante. On s'est aussi aperçu que cet escargot mangeait les feuilles et les tiges du *C. inophyllum*, on les a donc extraites, et on y a retrouvé les 5 molécules précédentes, plus trois nouveaux composés : le (+)-inophyllum P (**2**), le (+)-inophyllum G1 (**33**) et le (-)-inophyllum G2 (**34**)¹².

c) Les Cordatolides

Ils représentent un petit groupe de coumarines issues du *Calophyllum* avec seulement 6 molécules différentes recensées. Il est à noter qu'aucune de ces molécules ne comporte de cycle chromanone.

I.3. Chimie : stéréochimie et analyse conformationnelle

Les structures des coumarines issues du *Calophyllum* sont généralement déterminées par des moyens spectroscopiques conventionnels. La stéréochimie relative et l'analyse conformationnelle des cycles 2,3-diméthyl-4-chromanol et 2,3-diméthyl-4-chromanone sont déduites des constantes de couplage entre les protons cycliques en RMN ^1H et par des expériences de couplage dans l'espace (RMN NOESY).

La stéréochimie peut aussi être déterminée par corrélation chimique, par exemple en utilisant des réactions d'oxydo-réduction pour oxyder les dérivés du cycle chromanol, et pour réduire les dérivés du cycle chromanone.

a) Les chromanol-coumarines

Sur les huit diastéréoisomères possibles pour le cycle chromanol, on n'en retrouve que quatre dans les différentes espèces de *Calophyllum*, répartis dans les 3 premiers groupes structuraux qui sont la série calanolide, la série inophyllum, et la série cordatolide. (Cf. [Tableau 2](#))

b) Les chromanone-coumarines

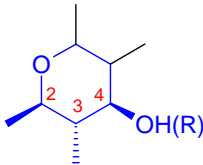
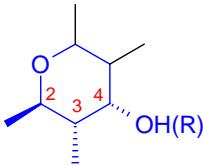
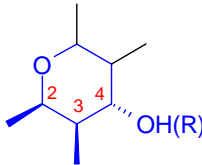
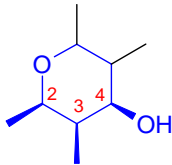
Parmi les quatre diastéréoisomères possibles pour le cycle chromanone, on n'en retrouve que deux dans les différentes espèces de *Calophyllum*, répartis dans les trois groupes structuraux qui sont la série calanolide, la série inophyllum, et la série cordatolide. (Cf. [Tableau 3](#))

I.4. Stéréochimie absolue :

La stéréochimie absolue des chromanol-coumarines a été déterminée de deux manières différentes. Une première méthode dérivée de celle de Mosher consiste en l'analyse des déplacements chimiques en RMN ^1H des esters α -méthoxy- α -(trifluorométhyl)-phénylacétiques (MTPA) d'alcools secondaires. Une autre consiste en une analyse par rayons X donnant la structure tridimensionnelle des molécules cristallisées. (Cf. [Tableau 2](#)) La corrélation chimique des chromanone-coumarines en chromanol-coumarines dont la stéréochimie est connue peut aussi être utilisée. (Cf. [Tableau 3](#))

La configuration absolue du carbone C_4 du cycle chromanol des calanolides est (4S) pour le (+)-calanolide A (**4**) et (4R) pour le (+)-calanolide B. D'autre part, la configuration absolue du (+)-pseudo-calanolide C (**5**) est (2S, 3S, 4R)^{5,14}.

En ce qui concerne les inophyllums, la première configuration absolue établie est celle du (+)-inophyllum A (**30**), qui est (2R, 3R, 4S) pour le cycle chromanol, et qui a été déterminée par l'analyse de la diffraction des rayons X sur des cristaux de son dérivé 4-bromobenzoate. Les configurations absolues des autres inophyllums ont été déduites de comparaisons entre le spectre RMN NOESY du (+)-inophyllum A (**30**) dont la configuration est connue, et de ceux des autres inophyllums.

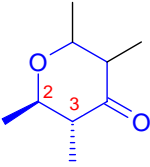
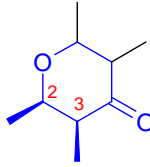
Coumarines	Type de cycle chromanol			
				
Calanolides	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>) (+)-Calanolide A Actif HIV	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>) (+)-Calanolide B Inactif HIV	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) Pas de coumarine
	(+)-12-Méthoxy-calanolide A (R=méthyle) (+)-12-Acétoxy-calanolide A (R=acyle)	(+)-12-Méthoxy-calanolide B (R=méthyle)		
	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) (-)-Calanolide A Inactif HIV	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) (-)-Calanolide B (Costatolide) Actif HIV	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>) (-)-Calanolide F	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>) (+)-Pseudo-calanolide C
	(+)-Inophyllum B Actif HIV Actif piscicide	(+)-Inophyllum P Actif HIV ? ⁴³	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) (+)-Inophyllum D Inactif HIV Actif cancer Actif piscicide	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) (+)-Inophyllum A Inactif HIV Actif cancer Actif piscicide
	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) (-)-Inophyllum P (Soulattrolide)	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>) Pas de coumarine	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>) (+)-12-Méthoxy-inophyllum D (R=méthyle) (+)-Inophyllum G1 Inactif HIV (-)-Inophyllum G2 Inactif HIV
Cordatolides	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>) (+)-Cordatolide A Actif HIV	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) Pas de coumarine
	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>) (-)-Cordatolide B	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>) Pas de coumarine	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>) Pas de coumarine
		<i>Indéterminée</i> 12-Méthoxy-cordatolide B (R=méthyle)		<i>Indéterminée</i> (+)-Pseudo-cordatolide C

“Pas de coumarine” signifie qu’aucune coumarine possédant cette configuration n’a encore été trouvée à l’état naturel.

“*Indéterminée*” signifie que la configuration absolue de la molécule est toujours non élucidée à ce jour.

“**Actif**” / “**Inactif**” signifie que la molécule possède ou non une certaine bioactivité.

Tableau 2 : Stéréochimie des cycles chromanol dans les chromanol-coumarines⁴

Coumarines	Type de cycle chromanone	
		
Calanolides	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)
	Pas de coumarine	Pas de coumarine
	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)
Inophyllums	Tomentolide B	(+)-Pseudocalanolide D
	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)
	(+)-Inophyllum C Inactif cancer Actif piscicide	(+)-Inophyllum E Actif cancer Actif piscicide
	(+)-Teysmanone B	
	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)
	Soulatrolone	Pas de coumarine
	<i>Indéterminée</i>	<i>Indéterminée</i>
	Tomentolide A	(-)-O-Méthylisocalaustraline
Cordatolides	(-)-Calaustraline	Calocoumarine A Actif cancer
	(-)-O-Méthylcalaustraline	Calocoumarine C Inactif cancer
	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)	(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)
	Pas de coumarine	Pas de coumarine
Cordatolides	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)
	Pas de coumarine	Pas de coumarine
	Pas de coumarine	Pas de coumarine

“Pas de coumarine” signifie qu’aucune coumarine possédant cette configuration n’a encore été trouvée à l’état naturel.

“*Indéterminée*” signifie que la configuration absolue de la molécule est toujours non élucidée à ce jour.

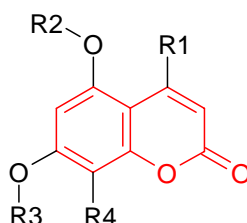
“**Actif**” / “**Inactif**” signifie que la molécule possède ou non une certaine bioactivité.

Tableau 3 : Stéréochimie des cycles chromanone dans les chromanone-coumarines⁴

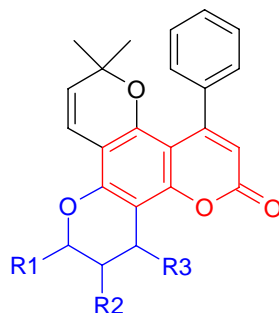
I.5. Les coumarines et néo-flavonoïdes du *Calophyllum inophyllum* (Tamanu)

Après avoir parcouru une vue d’ensemble sur les coumarines du genre *Calophyllum*, intéressons nous maintenant plus précisément aux coumarines, aux néo-flavonoïdes et à leurs dérivés présents dans les amandes et dans les feuilles du *Calophyllum inophyllum*.

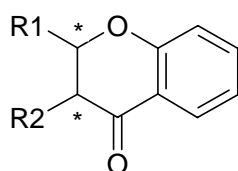
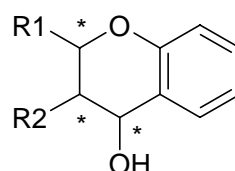
En ce qui concerne les coumarines connues pour être présentes dans les amandes de Tamanu, leur motif commun est le suivant : (structure α)



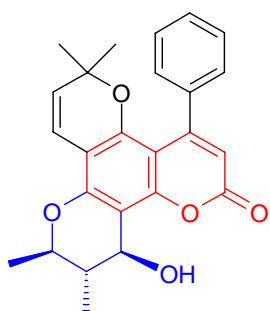
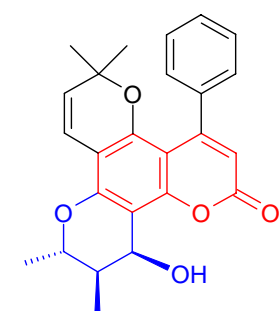
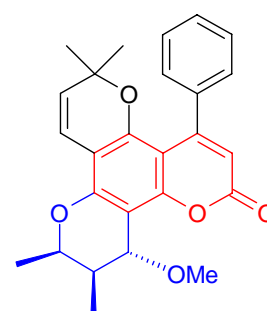
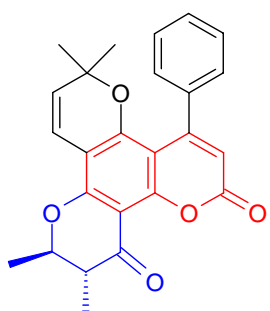
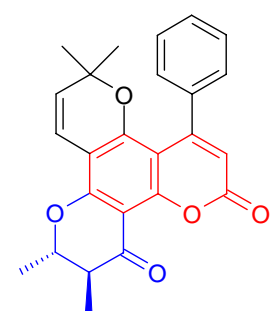
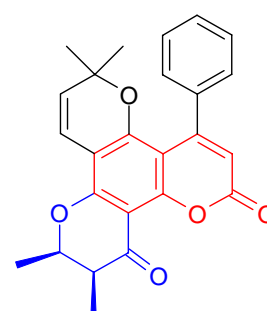
A noter que le groupe fonctionnel R1 est toujours un phényle (et donc la molécule est aussi un néo-flavonoïde), à l'exception de la molécule **12**, pour laquelle le motif R1 est un groupement n-propyle. La structure la plus souvent rencontrée est alors pentacyclique : (structure β)

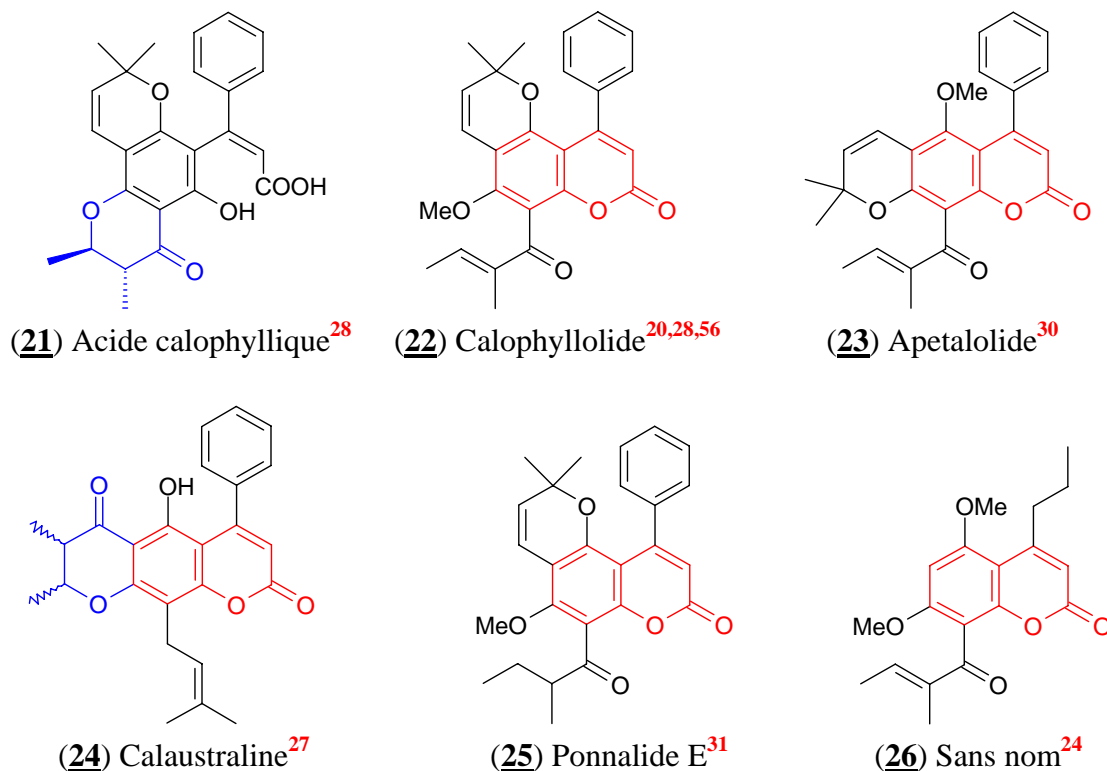


Le cycle **chromanone** ou **chromanol** (suivant que le substituant R3 est un groupe fonctionnel de type cétone ou de type alcool) caractéristique de ce type de molécules comporte deux ou trois centres asymétriques successifs (*), dont la configuration absolue joue un rôle important dans l'activité biologique de ces molécules.

Structure de la **chromanone**Structure du **chromanol**

En tout, onze coumarines ayant ce motif commun (α) et un néo-flavonoïde dont le cycle lactonique des coumarines est ouvert (**21**) ont été découverts dans les amandes de *Tamanu* durant les cinquante dernières années. Six de ces coumarines ont la structure (β) la plus courante et la plus intéressante du point de vue de l'activité biologique :

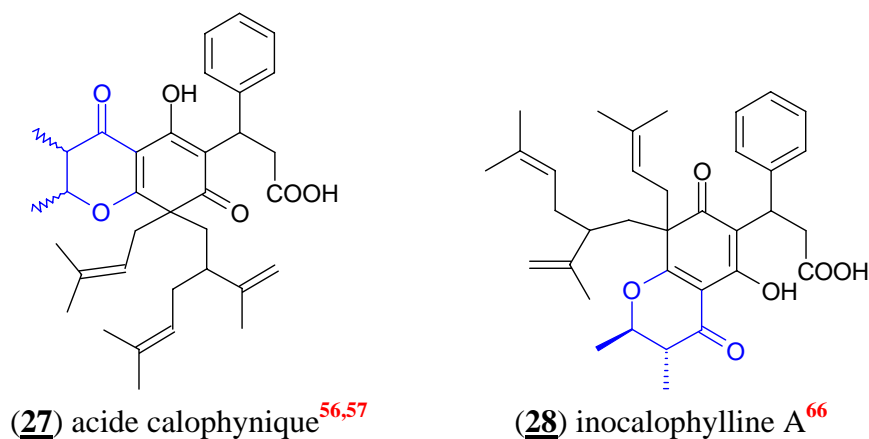
**(1)** Inophyllum B^{20,56}**(17)** Soulattrolide^{20,56}**(18)** 12-méthoxyinophyllum D⁵⁸**(3)** Inophyllum C^{20,56}**(19)** Inophyllolide²⁶**(20)** Inophyllum E^{20,56}



Remarques : - La structure de l'apetalolide (23) a été révisée depuis sa publication par D.E. Games en 1972³⁰.

- L'hétérocycle lactonique caractéristique des coumarines peut s'ouvrir pour former un acide : c'est le cas pour l'inophyllum C (3) qui conduit à un dérivé de type néo-flavonoïde, l'acide calophyllique (21), qui est aussi intéressant que les coumarines du point de vue structural, grâce à son cycle chromanone.

On peut également remarquer la présence dans les amandes de Tamanu d'autres molécules structurellement proche de la famille des néo-flavonoïdes et de celle des coumarines : l'acide calophynique (27) et l'inocalophylline A (28) :



La présence de telles molécules dans les amandes du Tamanu a conduit les chercheurs à s'intéresser aux autres parties du *Calophyllum inophyllum*, où ils espéraient découvrir d'autres molécules ayant une structure voisine, de type coumarine ou néo-flavonoïde.

Ainsi, ce sont les feuilles du Tamanu qui se sont révélées être la partie de la plante où les néo-flavonoïdes et les coumarines sont les plus nombreux, abondants, et divers. Certains de ces néo-flavonoïdes et de ces coumarines se trouvent même spécifiquement dans les feuilles.

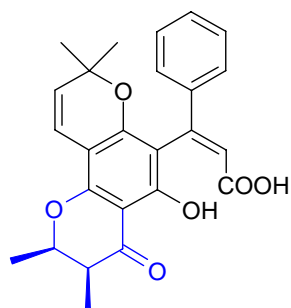
Pour les coumarines issues des feuilles, l'article de référence est sans aucun doute celui de A.D. Patil datant de 1993. Cet article présente trois nouvelles coumarines, l'inophyllum P (**2**), l'inophyllum G1 (**33**) et l'inophyllum G2 (**34**), et confirme la présence d'autres coumarines et néo-flavonoïdes déjà connus. Il met l'accent sur la détermination structurale des nouvelles coumarines, et sur leur activité anti HIV-1¹².

En complément de cet article de Patil¹², la mise au point d'Ishikawa⁴, ainsi que des publications plus récentes, nous permettent de dresser la liste connue des coumarines et des néo-flavonoïdes présents dans les feuilles de Tamanu.

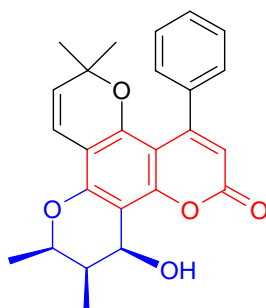
Les coumarines et néo-flavonoïdes présents dans les amandes que l'on retrouve dans les feuilles sont les suivants :

- Acide calophyllique¹² (**21**)
- Apetalolide³⁰ (**23**)
- Calophyllolide⁵⁶ (**22**)
- Inophyllum B⁵⁶ (**1**)
- Inophyllum C⁵⁶ (**3**)
- Inophyllum E⁵⁶ (**20**)

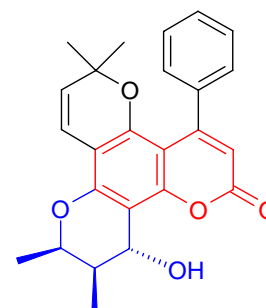
Mais les feuilles de Tamanu contiennent d'autres coumarines et néo-flavonoïdes, que personne n'a encore mis en évidence dans les amandes :



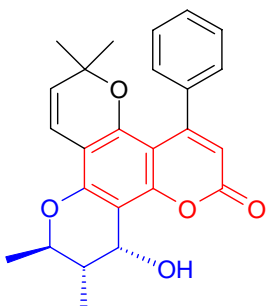
(**29**) Acide iso-calophyllique¹²



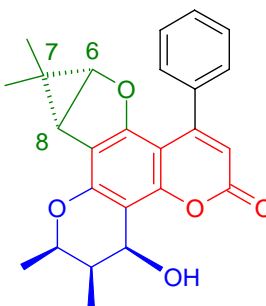
(**30**) Inophyllum A¹²



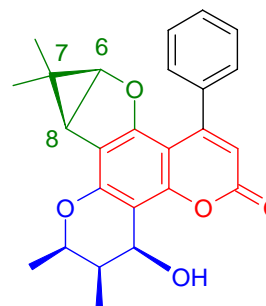
(**31**) Inophyllum D¹²



(**32**) Inophyllum P¹²



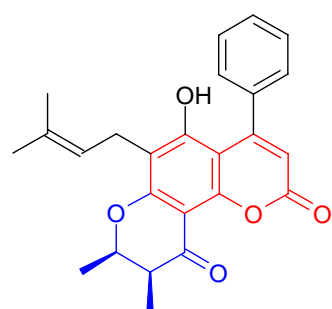
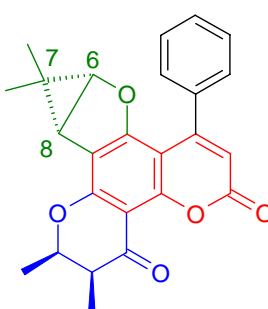
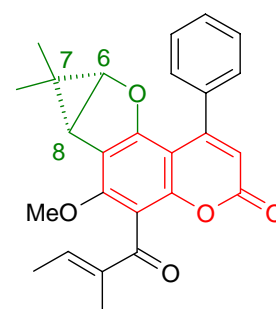
(**33**) Inophyllum G1¹²



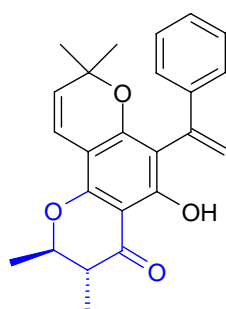
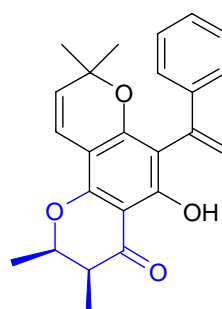
(**34**) Inophyllum G2¹²

Remarque : Les configurations absolues des deux carbones asymétriques du groupe fonctionnel 7,7-diméthyl-6,8-cyclopropano-furanne de l'inophyllum G1 (**33**) et de l'inophyllum G2 (**34**) n'ont pas encore pu être déterminées, elles sont ici attribuées de manière aléatoire, tout en sachant que la configuration absolue de l'inophyllum G1 (**33**) est l'inverse de celle de l'inophyllum G2 (**34**), en ce qui concerne ces deux centres asymétriques.

Récemment, trois nouvelles coumarines ont été isolées du *Calophyllum inophyllum* et testées pour leur action anti-cancéreuse (Ito 1999)^{60,64}. On retrouve dans leurs structures les motifs chromanone et/ou 7,7-diméthyl-6,8-cyclopropano-furanne :

(35) Calocoumarine A^{60,64}(36) Calocoumarine C^{60,64}(37) Calocoumarine B^{60,64}

A noter également la présence dans les feuilles de Tamanu de deux épimères dérivés des acides calophyllique (**21**) et iso-calophyllique (**29**) par décarboxylation⁵⁷. Ces molécules qui ne sont ni des coumarines ni des néo-flavonoïdes mais des benzo-dipyranoles sont malgré tout intéressantes car elles comportent le cycle chromanone qui semble jouer un grand rôle dans la bio-activité de ce type de structure moléculaire :

(38) Inophynone⁶¹(39) Iso-Inophynone⁶¹

Type du Cycle D	N°	Références	Nom	Parties de la plante
Chromanol	<u>1</u>	20,56	Inophyllum B	Huile, Feuilles
	<u>17</u>	20,56	Soulatrolide	Huile
	<u>30</u>	12	Inophyllum A	Feuilles
	<u>31</u>	12	Inophyllum D	Feuilles
	<u>2</u>	12	Inophyllum P	Feuilles
	<u>33</u>	12	Inophyllum G1	Feuilles
	<u>34</u>	12	Inophyllum G2	Feuilles
Méthoxy-chromanol	<u>18</u>	58	12-Méthoxy-inophyllum D	Huile
Chromanone	<u>3</u>	20,56	Inophyllum C	Huile, Feuilles
	<u>19</u>	26	Inophyllolide	Huile
	<u>20</u>	20,56	Inophyllum E	Huile, Feuilles
	<u>21</u>	28	Acide calophyllique	Huile, Feuilles
	<u>29</u>	12	Acide iso-calophyllique	Feuilles
	<u>35</u>	60,64	Calocoumarine A	Feuilles
	<u>36</u>	60,64	Calocoumarine C	Feuilles
Ouvert	<u>22</u>	20,28,56	Calophyllolide	Huile, Feuilles
	<u>23</u>	30	Apetalolide	Huile, Feuilles
	<u>24</u>	27	Calaustraline	Huile
	<u>25</u>	31	Ponnalide E	Huile
	<u>26</u>	24	Sans nom	Huile
	<u>37</u>	60,64	Calocoumarine B	Feuilles

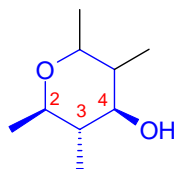
Tableau 4 : Liste des coumarines et néoflavonoïdes connus dans le *C. inophyllum*

I.6. Activités biologiques

Une majorité des coumarines ou des néo-flavonoïdes isolés à partir d'extraits végétaux du genre *Calophyllum* ont des activités biologiques intéressantes. Parmi toutes ces activités biologiques, la plus intéressante est sans doute l'activité anti HIV-1 de certaines coumarines, qui a été révélée par Kashman en 1992⁵ puis par Patil en 1993¹².

I.6.1. Activité anti HIV-1 des coumarines issues du genre *Calophyllum* :

Les coumarines issues du *Calophyllum* qui sont actives contre le HIV, comme le (+)-calanolide A (**4**) et le (+)-inophyllum B (**1**), possèdent un cycle D de structure (2*R*, 3*S*, 4*S*)-2,3-diméthyl-4-chromanol qui semble essentiel pour leur activité, puisque des coumarines très proches mais qui ne comportent pas cette structure caractéristique sont moins actives, ou totalement inactives. C'est pourquoi la stéréochimie du chromanol dans les coumarines issues du *Calophyllum* semble être responsable de l'activité anti HIV-1.



Trois types de coumarines issues des différentes espèces de *Calophyllum*, les calanolides, les inophyllums et les cordatolides, isolées ou préparées avec une pureté importante, ont été testées pour leur action anti HIV-1. Les plus étudiées sont le (+)-calanolide A (**4**) et ses dérivés, qui sont très prometteurs dans la lutte anti HIV⁴.

a) Les Calanolides

Il a été démontré que les calanolides énantiomériquement purs (+)-calanolide A (**4**) et (-)-calanolide B étaient des inhibiteurs potentiels du HIV-1, alors que leurs énantiomères (-)-calanolide A et (+)-calanolide B étaient complètement inactifs. Ainsi l'activité observée du (+)-calanolide B était due à la présence de son énantiomère (-) dans le mélange racémique. Le (+)-Calanolide A (**4**) est actuellement testé cliniquement⁴.

b) Les Inophyllums

Six d'entre eux, appartenant au groupe 1, c'est à dire de structures dipyrano-coumarines tétracycliques, ont été évalués pour connaître leur activité anti HIV-1. Parmi eux, les (+)-inophyllum B (**1**) et (+)-inophyllum P (**2**)⁴³ comportant un cycle *trans*-2,3-diméthylchromanol inhibaient la transcriptase inverse du HIV et étaient actifs dans des cultures de cellules. D'un autre côté, les inophyllums comportant un cycle *cis*-2,3-diméthylchromanol étaient moins ou pas du tout actifs, indiquant une structure spécifique requise au niveau du cycle chromanol¹². A noter que le composé le plus actif, le (+)-inophyllum B (**1**), a la même stéréochimie que le plus actif des calanolides, le (+)-calanolide A (**4**)⁴.

c) Les Cordatolides

Le (+)-cordatolide A (**13**) est un inhibiteur de la transcriptase inverse du HIV-1, et possède la même stéréochimie que les plus actifs inhibiteurs issus de la famille *Calophyllum*, à savoir le (+)-calanolide A (**4**) et le (+)-inophyllum B (**1**). Cependant, son activité est moins importante, ce qui laisse penser que le substituant placé sur le carbone C₄ du cycle lactonique a une certaine influence sur l'activité de la molécule⁴.

I.6.2. Autres activités biologiques des coumarines issues du *C. inophyllum*

Outre leur activité anti HIV-1 prometteuse, les coumarines présentent d'autres activités biologiques intéressantes. Nous nous contenterons ici de présenter les activités biologiques attribuées aux coumarines du *Calophyllum inophyllum*.

a) Activité anti HIV

Deux coumarines ont des activités importantes contre la transcriptase inverse du HIV : il s'agit du (+)-inophyllum B (**1**) et du (+)-inophyllum P (**2**). Ces molécules se trouvent aussi bien dans les amandes que dans les extraits de feuilles de *Calophyllum inophyllum*¹².

b) Activité anticancéreuse

Des tests ont été effectués par Itoigawa sur 10 coumarines et néo-flavonoïdes, pour déterminer leur activité antitumorale (tests d'activation EBV-EA [Epstein-Barr Virus Early Antigen]). Sur les 10 molécules testées, seulement deux coumarines sont totalement inactives, il s'agit de l'inophyllum C (**3**) et de la calocoumarine C (**36**). Les autres molécules, l'inophyllum A (**30**), l'inophyllum D (**31**), l'inophyllum E (**20**), la calocoumarine A (**35**), la calocoumarine B (**37**), le calophyllolide (**22**), l'apetalolide (**23**), et l'acide iso-calophyllique (**29**), ont toutes montré une activité significative, la molécule la plus active étant la calocoumarine A (**35**)⁶⁴.

c) Activité anti-inflammatoire

Le calophyllolide (**22**) extrait de la poudre d'amandes de *Calophyllum inophyllum* a été testé pour ses propriétés anti-inflammatoires. Dosé à 140 mg / kg chez le rat, ses effets sont du même ordre que l'hydrocortisone dosée elle à 10 mg / kg, à savoir qu'il conduit à la guérison de la moitié des rats affectés par l'œdème induit par la carrageenine (ED₅₀). Ce qui est très intéressant puisque la dose létale du calophyllolide pour la moitié d'une population de rats est de 2,5 g / kg (LD₅₀). La marge de sécurité entre la dose ED₅₀ et la dose LD₅₀ est ainsi importante comparée à celle de l'hydrocortisone, ce qui est très prometteur⁵⁹.

d) Activité antibactérienne

L'inophynone (**38**) contenue dans les feuilles de Tamanu a montré une bonne activité antibactérienne contre la souche *Staphylococcus aureus*. La démonstration de cette activité explique les propriétés antiseptiques avérées du jus ou des décoctions de feuilles de Tamanu utilisés pour soigner les plaies^{62,63}.

e) Activité piscicide

Cinq coumarines issues des feuilles du *Calophyllum inophyllum* ont été testées pour leur toxicité sur le 'killie-fish' (*Oryzias latipes*). Toutes les cinq se sont révélées actives, mais ce sont les inophyllum C (**3**) et inophyllum E (**20**), qui sont tous deux des cétones, qui ont l'activité piscicide la plus importante. Les inophyllum A (**30**), inophyllum B (**1**), et inophyllum D (**31**), trois alcools, ont une activité piscicide plus modérée. Parmi ces trois alcools, l'inophyllum B (**1**), qui possède une configuration *trans* au niveau de son cycle chromanol, est le plus actif^{25,65}.

I.7. Conclusion :

Le (+)-calanolide A (**4**) et le (+)-inophyllum B (**1**) sont les molécules les plus prometteuses parmi les coumarines issues des différentes espèces de *Calophyllum*, en vue d'obtenir un médicament anti HIV-1, bien que les rendements obtenus lors de l'extraction de la plante soient très faibles. Il sera alors peut-être nécessaire de réaliser leur synthèse asymétrique totale. Des essais en ce sens ont déjà été effectués^{6,15,42,48 à 52}. La synthèse énantiosélective des coumarines issues des *Calophyllums* fondée sur la réaction d'addition de type oxo-Michael intramoléculaire des dérivés *o*-acryloylphénols est également en développement^{53 à 55}. Nous espérons qu'un médicament anti HIV-1 dérivé des (+)-calanolide A (**4**) et (+)-inophyllum B (**1**) pourra être mis au point dans un proche avenir.

Références et notes

- 1) D. Guilet, "Etude Phytochimique d'une Clusiaceae Malaise, le *Calophyllum dispar*", Thèse de l'Université d'Angers, France, 2000.
- 2) A.-E. Hay, "Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique", Thèse de l'Université d'Angers, France, 2003.
- 3) F. Ramiandrasoa, N. Kunesch et J. Poisson, "Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogénèse des néo-flavonoïdes", Tetrahedron, 1983, vol 33, n° 23, pp 3923-3928.

- 4) T. Ishikawa, "Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins : distribution, chemistry, and activity", *Heterocycles*, 2000, vol. 53, n° 2, pp 453-474.
- 5) Y. Kashman, K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.H. Cardellina II, J.B. McMahon, et al., "The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*", *J. Med. Chem.*, 1992, vol 35, n° 15, pp 2735-2743.
Y. Kashman, K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.H. Cardellina II, J.B. McMahon, et al., "Additions and corrections", *J. Med. Chem.*, 1993, vol 36, p 1110.
- 6) M.T. Flavin, J.D. Rizzo, A. Khilevich, A. Kucherenko, A.K. Sheinkman, et al., "Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (+/-)-calanolide A and its enantiomers", *J. Med. Chem.*, 1996, vol 39, n° 6, pp 1303-1313.
- 7) M.J. Currens, R.J. Gulakowski, J.M. Mariner, R.A. Moran, R.W. Buckheit, et al., "Antiviral activity and mechanism of action of calanolide A against the human immunodeficiency virus type-1", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, vol 279, n° 2, pp 645-651.
- 8) P.L. Boyer, M.J. Currens, J.B. McMahon, M.R. Boyd et S.H. Huges, *J. Virol.*, 1993, vol 67, p 2412.
- 9) A. Hizi, R. Tal, M. Shaharabany, M.J. Currens, M.R. Boyd, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, vol 37, p 1037.
- 10) M.J. Currens, J.M. Mariner, J.B. McMahon et M.R. Boyd, "Kinetic analysis of inhibition of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase by calanolide A", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, vol 279, n° 2, pp 652-661.
- 11) Z.Q. Xu, M.G. Hollingshead, S. Borgel, C. Elder, A. Khilevich et al., "In vivo anti-HIV activity of (+)-calanolide A in the hollow fiber mouse model", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, vol 9, pp 133-138.
- 12) A.D. Patil, A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C. Haltiwanger, M.F. Bean, et al., "The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn.", *J. Med. Chem.*, 1993, vol 36, n° 26, pp 4131-4138.
- 13) T. Ishikawa, "Chemistry of anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins", *J. Synth. Org. Chem.*, 1998, vol 56, n° 2, pp 116-124.
- 14) T.C. McKee, J.H. Cardellina II, G.B. Dreyer et M.R. Boyd, "The pseudocalanolides : structure revision of calanolides C and D", *J. Nat. Prod.*, 1995, vol 58, n° 6, pp 916-920.
- 15) C.J. Palmer et J.L. Josephs, "Synthesis of the *Calophyllum* Coumarins. Part 2", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 1995, n° 24, pp 3135-3152.
- 16) P.F. Stevens, "A revision of the old world species of the *Calophyllum* (Guttiferae)", *J. Arnold. Arbor.*, Harv. Univ., 1980, vol 61, pp 117-424.
- 17) S.K. Nigam et C.R. Mitra, "Constituents of *Calophyllum tomentosum* and *Calophyllum apetalum* nuts : structure of a new 4-alkyl- and of two new 4-phenyl-coumarins", *Tetrahedron Lett.*, 1967, n° 28, pp 2633-2636.
- 18) G.D. Breck et G.H. Stout, "Calophyllum products. V. A new 4-phenylcoumarin from *Calophyllum australianum* FvM Vesq.", *J. Org. Chem.*, 1969, vol 34, n° 12, pp 4203-4204.
- 19) R. Somanathan et M.U.S. Sultanbawa, "Chemical investigation of Ceylonese plants. Part 1. Extractives of *Calophyllum calaba* L. and *Calophyllum bracteatum* Thw. (Guttiferae)", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 1972, pp 1935-1943.
- 20) C. Spino, M. Dodier et S. Sotheeswaran, "Anti HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, vol 8, n° 24, pp 3475-3478.

- 21) H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et E.S. Waight, "Triterpenoids and coumarins from the leaves of *Calophyllum cordato-oblongum*", *Phytochemistry*, 1985, vol 24, n° 7, pp 1553-1556.
- 22) H.R.W. Dharmaratne, J.R.D.M. Sajeevani, G.P.K. Marasinghe et E.M.H.G.S. Ekanayake, "Distribution of pyranocoumarins in *Calophyllum cordato-oblongum*", *Phytochemistry*, 1998, vol 49, n° 4, pp 995-998.
- 23) G.H. Stout et K.L. Stevens, "The structure of costatolide", *J. Org. Chem.*, 1964, vol 29, pp 3604-3609.
- 24) A. Cavé, M. Debray, G. Henry, G. Kunesch et J. Polonsky, "Sur la structure d'une nouvelle alkyl-4 coumarine isolée de *Calophyllum inophyllum*", *J. Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, 1972, vol 275, pp 1105-1107.
- 25) K. Kawazu, H. Ohigashi et T. Mitsui, "The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Tetrahedron Lett.*, 1968, n° 19, pp 2383-2385.
- 26) J. Polonsky et R. Toubiana, "Sur les constituants des noix de *Calophyllum inophyllum* : isolement d'une nouvelle lactone, l'inophyllolide", *Compt. Rend. Ac. Sci.*, 1956, vol 242, pp 2877-2880.
- 27) B. Bhushan, S. Rangaswami et T.R. Seshadri, "Calaustralin, a new 4-phenylcoumarin from the seed oil of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Indian J. Chem.*, 1975, vol 13, pp 746-747.
- 28) A. Potier-O., A. Buzas et E. Lederer, "Sur le calophyllolide et l'acide calophyllique isolés des graines de *Calophyllum inophyllum*", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1951, n° 146, pp 577-580.
- 29) J. Polonsky, "Structure chimique du calophyllolide, de l'inophyllolide et de l'acide calophyllique, constituants des noix de *Calophyllum inophyllum*", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957, pp 1079-1087.
- 30) D.E. Games, "Identification of 4-phenyl and 4-alkylcoumarins in *Mammea americana* L., *Mammea africana* G. Don and *Calophyllum inophyllum* by gas chromatography - mass spectrometry", *Tetrahedron Lett.*, 1972, n° 31, pp 3187-3190.
- 31) V.V.S. Murti, P.S.S. Kumar et T.R. Seshadri, "Structure of ponnalide", *Indian J. Chem.*, 1972, vol 10, pp 255-257.
- 32) T.C. McKee, R.W. Fuller, C.D. Covington, J.H. Cardellina II, I.R.J. Gulakowsky, et al., "New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*", *J. Nat. Prod.*, 1996, vol 59, n° 8, pp 754-758.
- 33) Fuller R.W., Bokesch H.R., Gustafson K.R., McKee T.C., Cardellina J.H. II, et al., "HIV inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*", *Bioorg.Med. Chem. Lett.*, 1994, vol 4, n° 16, pp 1961-1964.
- 34) T.C. McKee, C.D. Covington, R.W. Fuller, H.R. Bokesch, S. Young, et al., "Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum* : a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection", *J. Nat. Prod.*, 1998, vol 61, n° 10, pp 1252-1256.
- 35) B.M.R. Bandara, H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran et S. Balasubramaniam, "Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka", *Phytochemistry*, 1986, vol 25, n° 2, pp 425-428.
- 36) P. Gunasekera, G.S. Jayatilake, S.S. Selliah et M.U.S. Sultanbawa, "Chemical investigation of Ceylonese plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae)", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 1977, pp 1505-1511.
- 37) K.R. Gustafson, H.R. Bokesch, R.W. Fuller, J.H. Cardellina II, M.R. Kadushin, et al., "Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*", *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol 35, n° 32, pp 5821-5824.

- 38) S.G. Cao, X.H. Wu, K.Y. Sim, B.H.K. Tan, J.J. Vittal, et al., "Minor coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* and synthesis of cytotoxic calanone derivatives", *Helv. Chim. Acta*, 1998, vol 81, n° 8, pp 1404-1416.
- 39) S.G. Cao, K.Y. Sim, J. Pereira et S.H. Goh, "Coumarins from *Calophyllum teysmannii*", *Phytochemistry*, 1998, vol 47, n° 5, pp 773-777.
- 40) J.H. Cardellina II, H.R. Bokesch, T.C. McKee et M.R. Boyd, "Resolution and comparative anti-HIV evaluation of the enantiomers of calanolides A and B", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, vol 5, n° 9, pp 1011-1014.
- 41) X. Shi, A.B. Attygalle, A. Liwo, M.H. Hao, J. Meinwald, et al., "Absolute stereochemistry of soulattrolide and its analogues", *J. Org. Chem.*, 1998, vol 63, pp 1233-1238.
- 42) A. Kucherenko, M.T. Flavin, W.A. Boulanger, A. Khilevich, R.L. Shone, et al., "Novel approach for synthesis of (+/-)-calanolide A and its anti-HIV activity", *Tetrahedron Lett.*, 1995, vol 36, n° 31, pp 5475-5478.
- 43) Les deux énantiomères de l'inophyllum P ont une activité prouvée contre le HIV^{12,33}. Cependant, les auteurs suggèrent une racémisation partielle (67 % ee) du (-)-isomère, tout comme avec le (+)-calanolide B⁴⁰, en s'appuyant sur le fait que la rotation spécifique pour le (+)-isomère (+19,8°) était plus faible que pour le (-)-isomère (-29,6°)³⁶.
- 44) D.E. Zembower, S. Liao, M.T. Flavin, Z.Q. Xu, T.L. Stup, et al., "Structural analogues of the calanolide anti-HIV agents. Modification of the trans-10,11-dimethyldihydropyran-12-ol ring (ring C)", *J. Med. Chem.*, 1997, vol 40, n° 6, pp 1005-1017.
- 45) H.R.W. Dharmaratne, W.M.A.P. Wanigasekera, E. Mata-Greenwood et J.M. Pezzuto, "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*", *Planta Med.*, 1998, vol 64, n° 5, pp 460-461.
- 46) P.B. Taylor, J.S. Culp, C. Debouck, R.K. Johnson, A.D. Patil, et al., "Kinetic and mutational analysis of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase inhibition by inophyllums, a novel class of non-nucleoside inhibitors", *J. Biol. Chem.*, 1994, vol 269, n° 9, pp 6325-6331.
- 47) D.L. Galinis, R.W. Fuller, T.C. McKee, J.H. Cardellina II, R.J. Gulakowsky, et al., "Structure-activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-calanolide A and (-)-calanolide B", *J. Med. Chem.*, 1996, vol 39, n° 22, pp 4507-4510.
- 48) B. Chenera, M.L. West, J.A. Finkelstein et G.B. Dreyer, "Total synthesis of (+/-)-calanolide A, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase", *J. Org. Chem.*, 1993, vol 58, n° 21, pp 5605-5606.
- 49) C.J. Palmer et J.L. Josephs, "Synthesis of the *Calophyllum* coumarins", *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol 35, n° 30, pp 5363-5366.
- 50) A.V.R. Rao, A.S. Gaitonde, K.R.C Prakash et S.P. Rao, "A concise synthesis of chiral 2-methyl chroman-4-ones : stereo selective build-up of the chromanol moiety of anti-HIV agent, calanolide A", *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol 35, n° 34, pp 6347-6350.
- 51) P.P. Deshpande, F. Tagliaferri, S.F. Victory, S. Yan et D.C. Baker, "Synthesis of optically active calanolides A and B", *J. Org. Chem.*, 1995, vol 60, n° 10, pp 2964-2965.
- 52) P.P. Deshpande et D.C. Baker, "A simple approach to the synthesis of the chiral substituted chroman ring of *Calophyllum* coumarins", *Synthesis*, 1995, n° 6, pp 630-632.
- 53) T. Ishikawa, Y. Oku, K.I. Kotake et H. Ishii, "Cesium fluoride-induced intramolecular Michael addition : highly diastereoselective ring construction of a trans-2,3-dimethylchroman-4-one", *J. Org. Chem.*, 1996, vol 61, n° 19, pp 6484-6485.
- 54) T. Ishikawa, Y. Oku et K.I. Kotake, "Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton : a model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins", *Tetrahedron*, 1997, vol 53, n° 44, pp 14915-14928.

- 55) T. Ishikawa, Y. Oku, T. Tanaka et T. Kumamoto, "An approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarin synthesis : an enantioselective construction of 2,3-dimethyl-4-chromanone ring by quinine-assisted intramolecular Michael-type addition", *Tetrahedron Lett.*, 1999, vol 40, n° 19, pp 3777-3780.
- 56) D.E. Games, J.L. Gower, N.J. Haskins, M. Rossiter et P. Scourides, "Newer mass spectral methods in structural studies of natural compounds", *Biochem. Appl.*, 1978; vol 7B, pp 1561-1566.
- 57) J. Gautier, G. Kunesch et J. Polonsky, "Structure of calophynic acid, a novel constituent of *Calophyllum inophyllum*", *Tetrahedron Lett.*, 1972, n° 27, pp 2715-2718.
- 58) S.P. Joshi, V.B. Deodhar et U.D. Phalgurie, "A new coumarin from the seeds of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Indian J. Chem. Sect. B*, 2000, vol 39, n° 7, pp 560-561.
- 59) T.N. Bhalla, R.C. Saxena, S.K. Nigam, G. Misra et K.P. Bhargava, "Calophyllolide - A new non-steroidal anti-inflammatory agent", *Indian J. Med. Res. (1913-1988)*, 1980, vol 72, Nov, pp 762-765.
- 60) C. Ito, Y. Mishina, M. Ohta, H. Furukawa, H. Tan, et al., "Studies on anti-tumor promoter from tropical medicinal plants (8). Isolation and structure elucidation of new coumarins from *Calophyllum* species (Guttiferae)", The 119th Annual Meetings of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokushima, March 1999, Abstract II, p 156.
- 61) M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, V.U. Ahmad et G.H. Rizwani, "Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1999, vol 50, n° 8, pp 1385-1389.
- 62) M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, G.H. Rizwani et V.U. Ahmad, "Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae", *J. Chem. Soc. Pak.*, 1999, vol 21, n° 2, pp 174-178.
- 63) S. Mahmud, G.H. Rizwani, M. Ahmad, S. Ali, S. Perveen, et al., "Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Pak. J. Pharmacol.*, 1998, vol 15, n° 2, pp 13-25.
- 64) M. Itoigawa, C. Ito, H.T.W. Tan, M. Kuchide, H. Tokuda, et al., "Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*", *Cancer Lett.*, 2001, vol 169, n° 1, pp 15-19.
- 65) K. Kawazu, H. Ohigashi, N. Takahashi et T. Mitsui, "Piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum*", *Bull. Inst. Chem. Res. , Kyoto Univ.*, 1972, vol 50, n° 3, pp 160-167.
- 66) Y.-C. Shen, M.-C. Hung, L.-T. Wang et C.-Y. Chen, "Inocalophyllins A, B and their methyl esters from the seeds of *Calophyllum inophyllum*", *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, vol 51, n° 7, pp 802-806.
- 67) Y.-C. Shen, L.-T. Wang, A.T. Khalil et Y.-H. Kuo, "Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*", *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, vol 52, n° 4, pp 402-405.
- 68) C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V.C. Filho, F. Enjo, et al., "Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins", *J. Nat. Prod.*, 2003, vol 66, n° 3, pp 368-371.
- 69) R. Reyes-Chilpa, E. Estrada-Muñiz, T. Ramírez Apan, B. Amekraz, A. Aumelas, et al., "Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*", *Life Sciences*, 2004, vol 75, n° 13, pp 1635-1647.
- 70) D. Guilet, J.-J. Hélesbeux, D. Séraphin, T. Sévenet, P. Richomme, et al., "Novel cytotoxic 4-phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*", *J. Nat. Prod.*, 2001, vol 64, n° 5, pp 563-568.
- 71) D. Guilet, D. Séraphin, D. Rondeau, P. Richomme et J. Bruneton, "Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*", *Phytochemistry*, 2001, vol 58, n° 4, pp 571-575.
- 72) D. Guilet, C. Morel, N. Noyer, M. Cornec, D. Séraphin, et al., "Four new 4-phenylcoumarins from *Calophyllum dispar*. Isolation and hemisynthesis", *Heterocycles*, 1999, vol 51, n° 1, pp 67-76.

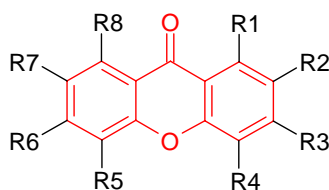
II. LES XANTHONES

Nous venons de le voir, les arbres du genre *Calophyllum* sont une source très intéressante pour certaines coumarines, et l'*inophyllum* est l'une des espèces où l'on trouve la plus grande diversité de ces coumarines.

Toutefois, les coumarines ne sont pas les seules molécules à être synthétisées par le Tamanu. Ainsi, on trouve des xanthonés dans beaucoup d'espèces de *Calophyllum*, et en particulier dans les racines et le tronc de l'*inophyllum*, qui sont des parties de la plante pauvres en coumarines. Ces xanthonés sont au même titre que les coumarines des molécules biologiquement actives dignes d'intérêt.

Contrairement aux coumarines, pour lesquelles nous avons commencé par une bibliographie générale, nous nous contenterons ici de donner une bibliographie ciblée sur l'*inophyllum*, du fait de la diversité conséquente des molécules rencontrées dans les différentes espèces de *Calophyllum*. Cependant, nous ne perdons pas de vue la littérature relative à toutes les xanthonés ayant pour origine le genre *Calophyllum*, afin de ne pas occulter des molécules qui pourraient également entrer dans la composition de l'espèce *inophyllum*.

La structure de base caractéristique des xanthonés est tricyclique : elle comprend deux cycles benzéniques aromatiques qui entourent un hétérocycle oxygéné :



Les substituants R1 à R8 peuvent être soit des groupements **hydroxy** ou **méthoxy**, soit des chaînes carbonées.

Les xanthonés qui sont produites par les végétaux supérieurs sont formées par cyclisation des benzophénones résultant de l'addition d'unités dicarbonées (malonyl - CoEnzyme A) sur l'acide benzoïque, précurseur issu d'un acide cinnamique. La cyclisation intramoléculaire de Dieckmann permet la formation du cycle A. Par couplage oxydatif, la 2,4,6,3'-tétrahydroxybenzophénone conduit aux xanthonés primitives telles que les 1,3,5-trihydroxyxanthoné (**48**) et 1,3,7-trihydroxyxanthonés^{15,16} : (**Figure 11**)

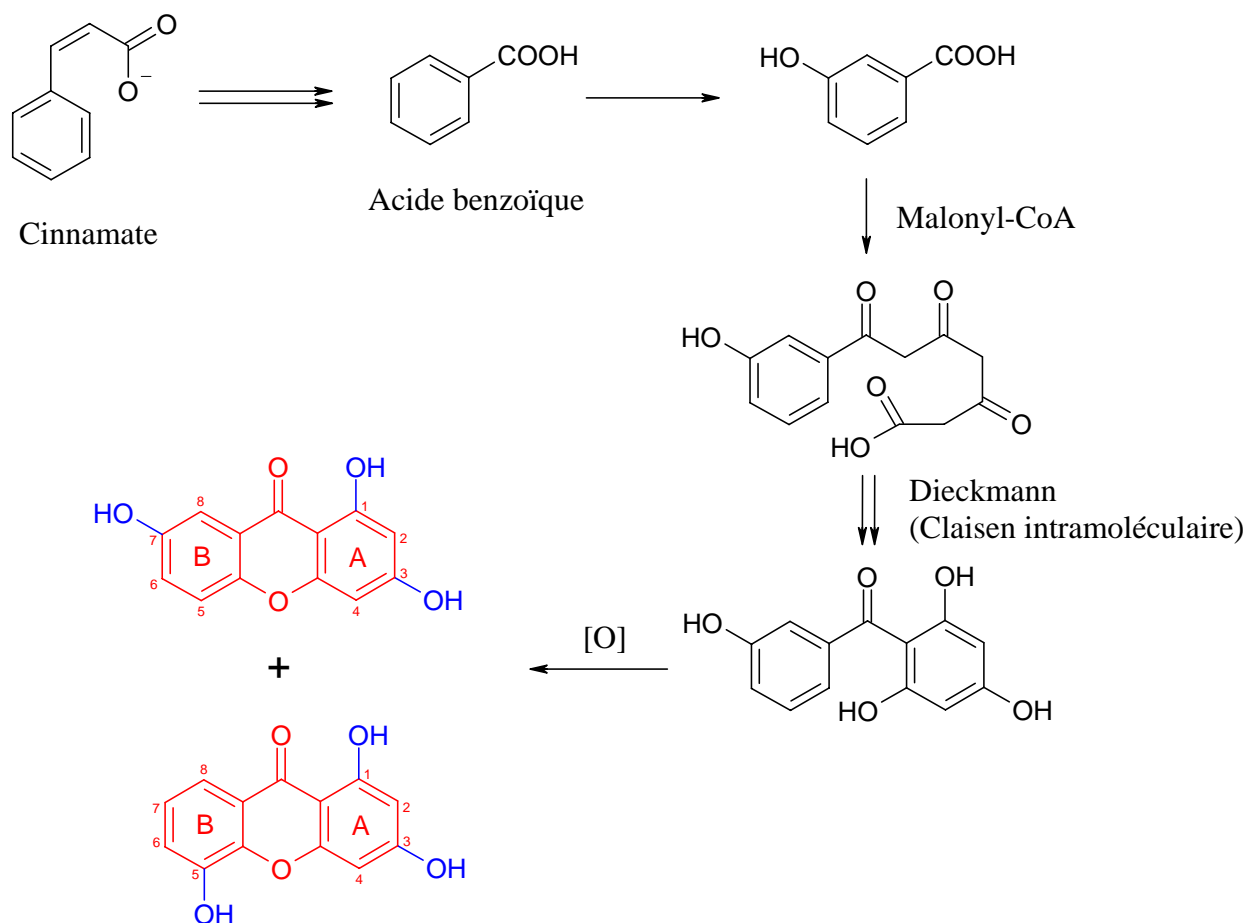
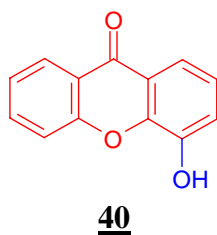


Figure 11 : Schéma de biosynthèse des xanthonés^{15,16}

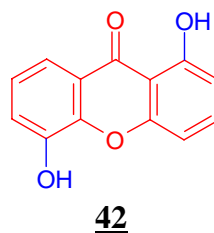
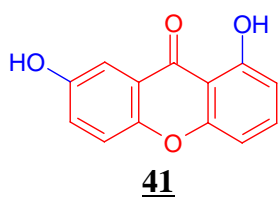
II.1. Classification structurale des xanthonés issues du *C. inophyllum*

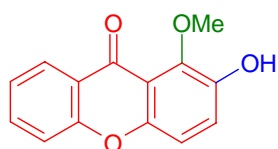
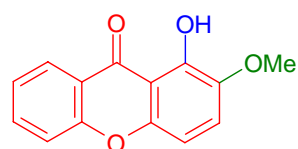
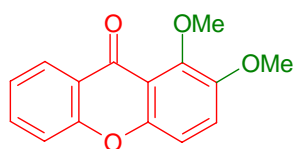
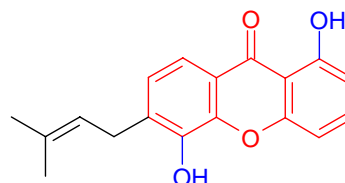
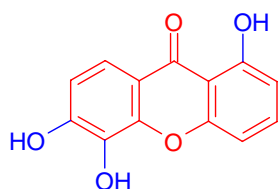
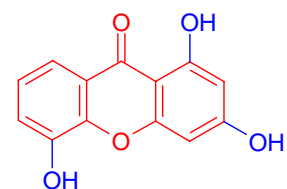
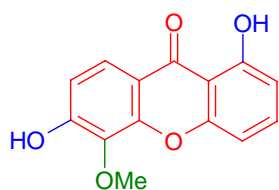
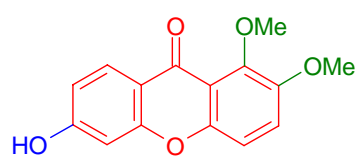
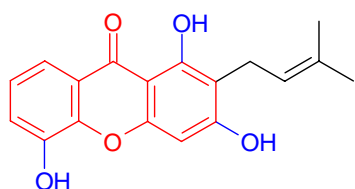
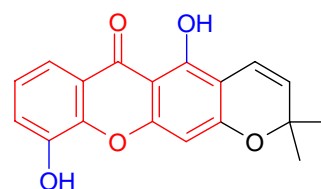
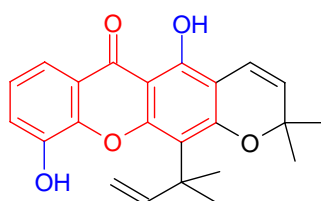
On peut proposer une classification structurale des xanthonés isolées à partir du *Calophyllum inophyllum*, dépendant du nombre de substituants oxygénés portés par le motif de base :

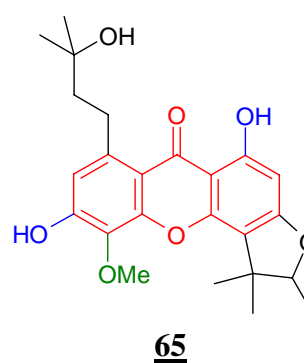
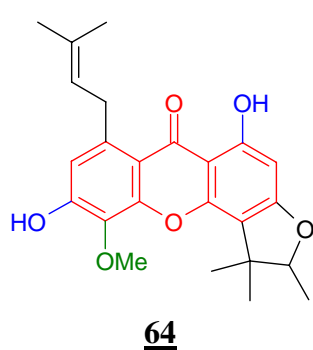
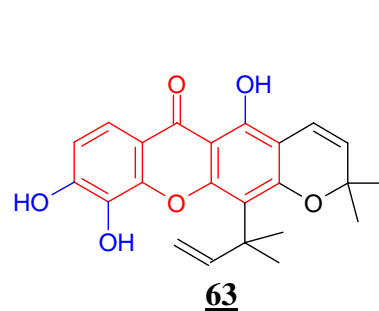
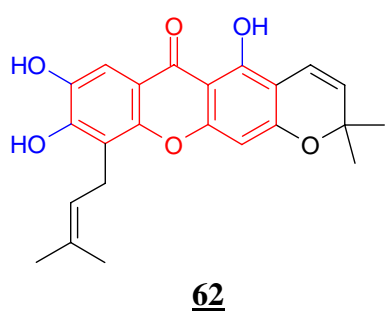
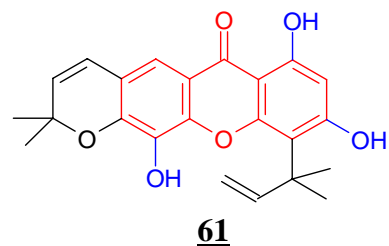
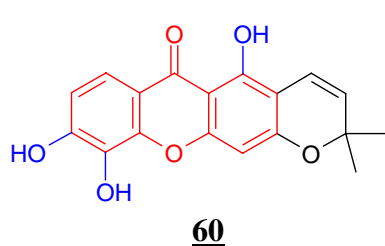
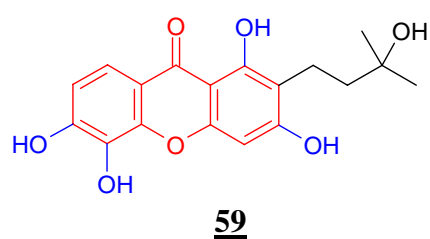
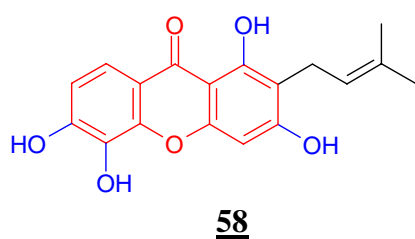
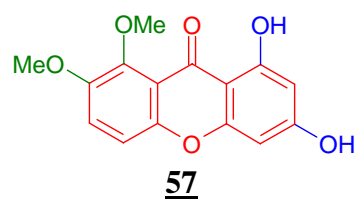
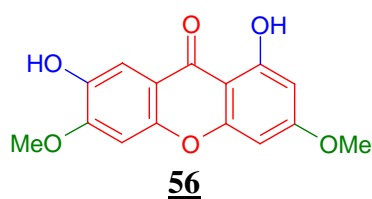
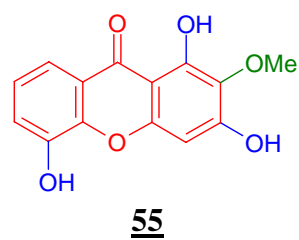
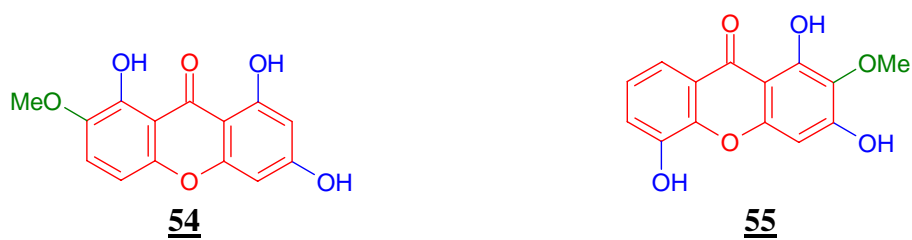
a) Les xanthonés mono-oxygénées

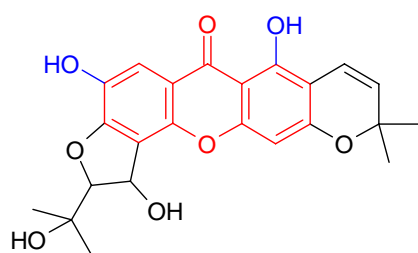
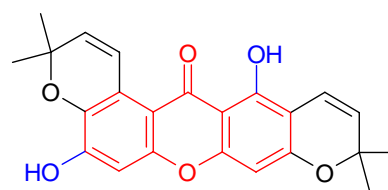
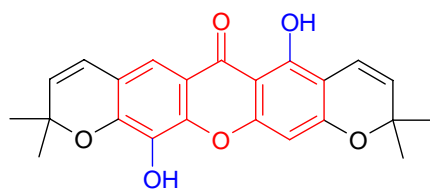
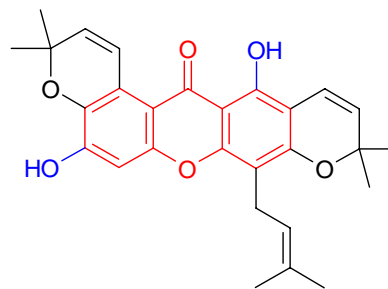
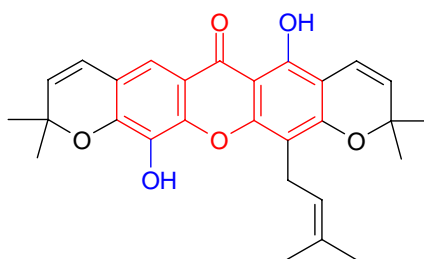
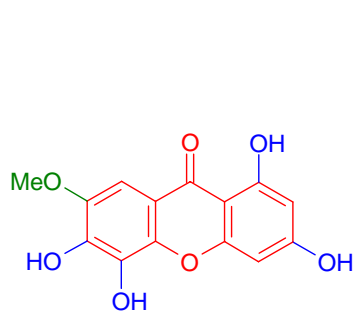
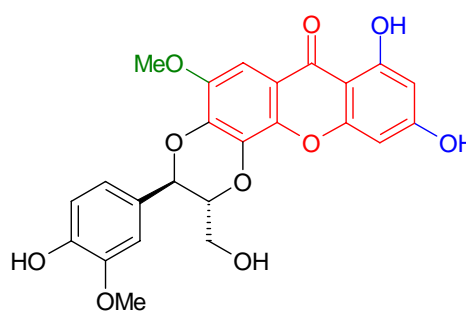


b) Les xanthonés di-oxygénées



**43****44****45****46**c) Les xanthones tri-oxygénées**47****48****49****50****51****52****53**

d) Les xanthones tétra-oxygénées

**66****67****68****69****70**e) Les xanthones penta-oxygénées**71****72**

Type de Xanthone	N°	Référence	Nom
Mono-oxygénée	<u>40</u>	4,17	4-Hydroxyxanthone
Di-oxygénée	<u>41</u>	6,9	1,7-Dihydroxyxanthone (ou Euxanthone)
	<u>42</u>	3,17	1,5-Dihydroxyxanthone
	<u>43</u>	4	2-Hydroxy-1-méthoxyxanthone
	<u>44</u>	4	1-Hydroxy-2-méthoxyxanthone
	<u>45</u>	4	1,2-Diméthoxyxanthone
	<u>46</u>	6,9,10	6-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,5-dihydroxy-xanthone (ou Calophylline B)
Tri-oxygénée	<u>47</u>	6,9	1,5,6-Trihydroxyxanthone (ou Mesuaxanthone B)
	<u>48</u>	17	1,3,5-trihydroxyxanthone
	<u>49</u>	6,17	1,6-Dihydroxy-5-méthoxyxanthone
	<u>50</u>	2	6-Hydroxy-1,2-diméthoxyxanthone
	<u>51</u>	1,5,6,11	2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5-trihydroxyxanthone
	<u>52</u>	1,4,5,6,17,18	6-Déoxyjacareubine
Tétra-oxygénée	<u>53</u>	4	Caloxanthone C
	<u>54</u>	2	1,3,8-Trihydroxy-7-méthoxyxanthone
	<u>55</u>	2,17	1,3,5-Trihydroxy-2-méthoxyxanthone
	<u>56</u>	6	1,7-Dihydroxy-3,6-diméthoxyxanthone
	<u>57</u>	2	1,3-Dihydroxy-7,8-diméthoxyxanthone
	<u>58</u>	1,5,6,11,17	2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5,6-tétrahydroxyxanthone
	<u>59</u>	5	2-(3-Hydroxy-3-méthylbutyl)-1,3,5,6-tétrahydroxyxanthone
	<u>60</u>	5,6,9,10,11,17	Jacareubine
	<u>61</u>	1	1,3,5-Trihydroxy-6,6'-diméthylpyrano-(2',3':6,7)-4-(1,1-diméthylprop-2-ényl)-xanthone
	<u>62</u>	3	Caloxanthone A
	<u>63</u>	1,3,17	Macluraxanthone
	<u>64</u>	3	Caloxanthone B
	<u>65</u>	17	Caloxanthone M
	<u>66</u>	2	Caloxanthone D
	<u>67</u>	18	Brasilixanthone B
<u>68</u>	18	Pyrano-jacareubine	
<u>69</u>	18	Calophnone	
<u>70</u>	18	Caloxanthone I	
Penta-oxygénée	<u>71</u>	2	Caloxanthone E
	<u>72</u>	17	Calophyllumine C

Tableau 5 : Liste des xanthones connues dans le *Calophyllum inophyllum*

II.2. Activités biologiques

La majorité des xanthones isolées à partir du *C. inophyllum* présentent des activités biologiques importantes et très variées. Nous présentons ici les activités les plus intéressantes.

a) Activité antagoniste vis à vis de certains médiateurs de l'organisme

Certaines xanthones extraites du *Calophyllum inophyllum* ont un pouvoir inhibiteur de certains récepteurs membranaires des cellules de l'organisme. Ainsi, la 6-déoxyjacareubine (52), la 2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5-trihydroxyxanthone (51), la 2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5,6-tétrahydroxyxanthone (58), la macluraxanthone (63), et la 1,3,5-Trihydroxy-6,6'-diméthylpyrano-(2',3':6,7)-4-(1,1-diméthylprop-2-ényl)-xanthone (61) ont un effet antagoniste important (de 63 à 87 %) sur la 1-alkyl-2-acétyl-glycéro-3-phosphocholine (ou facteur d'activation des plaquettes) qui est un médiateur chimique de l'organisme impliqué dans certaines réponses physiologiques et dans certaines pathologies comme l'inflammation, l'allergie, l'asthme, les rejets lors de transplantations d'organes, etc...¹ C'est à dire que ces molécules empêchent le médiateur de se fixer au récepteur, et donc modèrent son effet, mais qu'elles n'ont aucun autre effet. Ces xanthones sont donc susceptibles de contrôler efficacement certaines réactions de l'organisme, listées ci-dessus.

b) Activité antibactérienne

Trois xanthones isolées du *Calophyllum inophyllum* ont montré une activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes différentes, dont *Staphylococcus aureus*. Il s'agit, dans l'ordre décroissant d'efficacité, de la 6-déoxyjacareubine (**52**), de la jacareubine (**60**), et de la calophylline B (**46**)¹⁰.

Notons également que certaines espèces de *Calophyllum* autres que l'*inophyllum* renferment aussi des xanthones qui ont montré des activités antibactériennes intéressantes. C'est notamment le cas de la calozeyloxanthone extraite du *Calophyllum moonii* et du *Calophyllum lankaensis*, qui est active contre des souches d'*enterococci*⁷ et de *Staphylococcus aureus*⁸.

c) Activité antifongique

Trois xanthones isolées du *Calophyllum brasiliense* et également présentes dans le *Calophyllum inophyllum*, la 2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5,6-tétrahydroxyxanthone (**58**), la 2-(3-Méthylbut-2-ényl)-1,3,5-trihydroxyxanthone (**51**), et la Jacareubine (**60**), ont montré une activité antifongique contre le champignon *Postia placenta*¹¹.

Par ailleurs, une nouvelle xanthone isolée du *Calophyllum caledonicum*, la caledonixanthone E, présente une activité antifongique importante contre le champignon *Aspergillus fumigatus*¹².

d) Activité anti-inflammatoire

Cinq xanthones isolées du *Calophyllum inophyllum* ont montré une activité anti-inflammatoire, ainsi que des effets divers sur le système nerveux central. Il s'agit de la jacareubine (**60**), de la calophylline B (**46**), de la 6-déoxyjacareubine (**52**), de la mesuaxanthone B (**47**), et de l'euxanthone (**41**)⁹.

e) Activité anticancéreuse

Quatre xanthones isolées à partir des écorces de *Calophyllum brasiliense*, les brasixanthonnes B, C, D, et la 8-déoxygartanine, présentent une activité anticancéreuse significative¹³.

f) Activité immunomodulatrice

La 2-Hydroxy-1-méthoxyxanthone (**43**) (connue aussi dans le *Calophyllum inophyllum*) et la 3-(4-Hydroxy-3-méthylbutyl)-4,8-dihydroxyxanthone, toutes deux isolées du *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*, ont montré une activité inhibitrice de certains mécanismes immunitaires de l'organisme¹⁴. Les xanthones pourraient donc, comme les coumarines, se révéler efficaces dans le traitement de virus tel le HIV.

Références

- 1) I. Bin Jantan, J. Jalil et N.A. Warif, "Platelet activating factor (PAF) antagonistic activities of compounds isolated from Guttiferae species", *Pharm. Biol.*, 2001, vol 39, n° 4, pp 243-246.
- 2) M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two xanthenes from roots of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1995, vol 38, n° 3, pp 725-728.
- 3) M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two xanthenes from roots of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1994, vol 35, n° 2, pp 527-532.
- 4) M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two new xanthenes in the underground part of *Calophyllum inophyllum*", *Heterocycles*, 1994, vol 37, n° 2, pp 833-838.
- 5) S.H. Goh et I. Bin Jantan, "A xanthone from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1991, vol 30, n° 1, pp 366-367.
- 6) V. Kumar, S. Ramachandran et M.U.S. Sultanbawa, "Xanthenes and triterpenoids from timber of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1976, vol 15, pp 2016-2017.
- 7) Y. Sakagami, K. Kajimura, W.M.N.M. Wijesinghe et H.R.W. Dharmaratne, "Antibacterial activity of calozeoyloxanthone isolated from *Calophyllum* species against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics", *Planta Med.*, 2002, vol 68, n° 6, pp 541-543.
- 8) H.R.W. Dharmaratne, W.M.N.M. Wijesinghe et V. Thevanasem, "Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)", *J. Ethnopharmacol.*, 1999, vol 66, n° 3, pp 339-342.
- 9) C. Gopalakrishnan, D. Shankaranarayanan, S.K. Nazimudeen, S. Viswanathan et L. Kameswaran, "Antiinflammatory and CNS depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrea*", *Indian J. Pharmacol.*, 1980, vol 12, n° 3, pp 181-191.
- 10) B.M. Sundaram, C. Gopalkrishnan et S. Subramanian, "Antibacterial activity of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* L.", *Arogya (Manipal, India)*, 1986, vol 12, n° 1, pp 48-49.
- 11) R. Reyes-Chilpa, M. Jimenez-Estrada et E. Estrada-Muniz, "Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood", *J. Chem. Ecol.*, 1997, vol 23, n° 7, pp 1901-1911.
- 12) C. Morel, D. Séraphin, A. Teyrouz, G. Larcher, J.P. Bouchara, et al., "New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*", *Planta Med.*, 2002, vol 68, n° 1, pp 41-44.
- 13) C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V.C. Filho, T. Mukainaka, et al., "Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis* : structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity", *J. Nat. Prod.*, 2002, vol 65, n° 3, pp 267-272.
- 14) M.J. Gonzalez, M.S.J. Nascimento, H.M. Cidade, M.M.M. Pinto, A. Kijjoa, et al., "Immunomodulatory activity of xanthenes from *Calophyllum teysmannii* var. *Inophyllolide*", *Planta Med.*, 1999, vol 65, n° 4, pp 368-371.
- 15) A.-E. Hay, "Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique", Thèse de l'Université d'Angers, France, 2003.
- 16) G.J. Bennett et H.H. Lee, "Xanthenes from Guttiferae", *Phytochemistry*, 1989, vol 28, n°4, pp 967-998.
- 17) Y. Wu, P.-C. Zang, R.-Y. Chen, D.-Q. Yu et X.-T. Liang, "Two new xanthenes from *Calophyllum inophyllum*", *Acta Chimica Sinica (Huaxue xuebao)*, 2003, vol 61, n° 7, pp 1047-1051. (chinois)
- 18) H.-C. Cheng, L.-T. Wang, A.T. Khalil, Y.-T. Chang, Y.-C. Lin, et al., "Pyranoxanthenes from *Calophyllum inophyllum*", *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)*, 2004, vol 51, n° 2, pp 431-435.

III. LES TRITERPENES

En ce qui concerne les triterpènes, des études montrent que ces dérivés au squelette carboné saturé composé de 30 atomes de carbones (un terpène est une chaîne carbonée à 10 atomes de carbone), souvent de structure pentacyclique, entrent dans la composition des feuilles et des écorces du *Calophyllum inophyllum*^{1,2,7}.

La biosynthèse des triterpènes a pour précurseur initial l'acide mévalonique, qui subit des phosphorylations et des décarboxylations pour conduire au pyrophosphate de farnésyle (PPF). Deux molécules de PPF peuvent se condenser pour former le squalène, qui donne ensuite le 2,3-Epoxysqualène (Figure 12)^{11,12,13}.

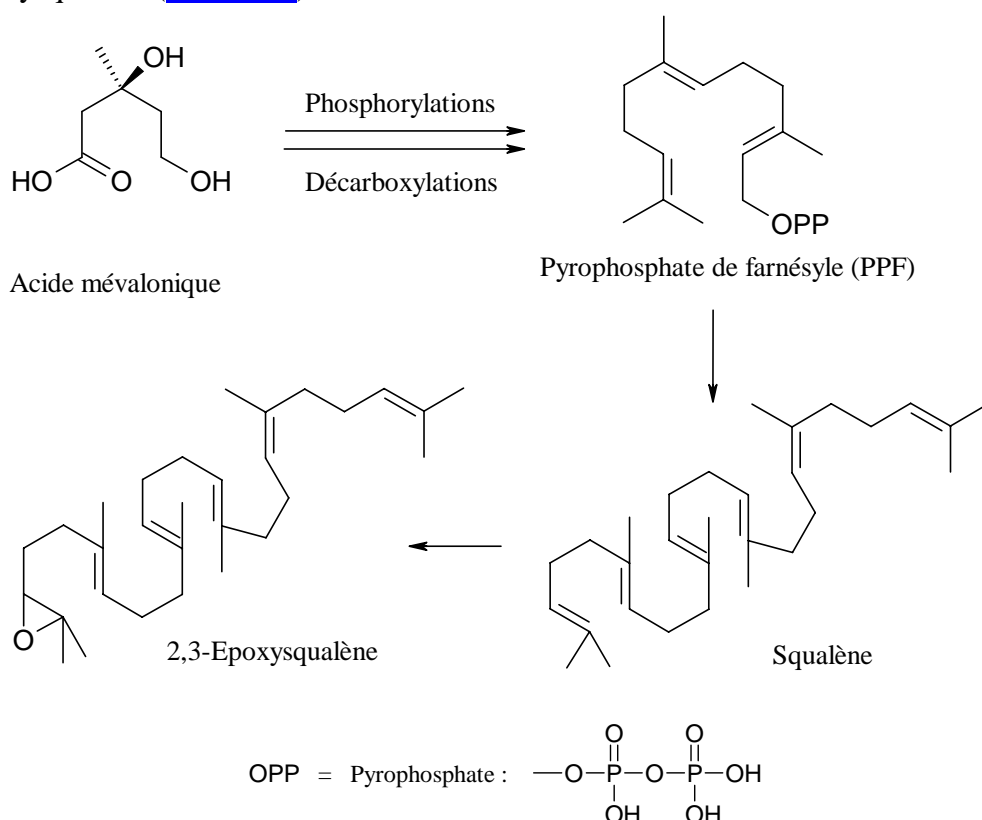


Figure 12 : Biosynthèse du 2,3-Epoxysqualène à partir de l'acide mévalonique

Les triterpènes sont issus de la cyclisation du 2,3-Epoxysqualène (Figure 13), ou plus rarement, du squalène lui-même. Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1,2 de protons et de méthyles pour aboutir aux squelettes tétra et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de molécules^{8,9}.

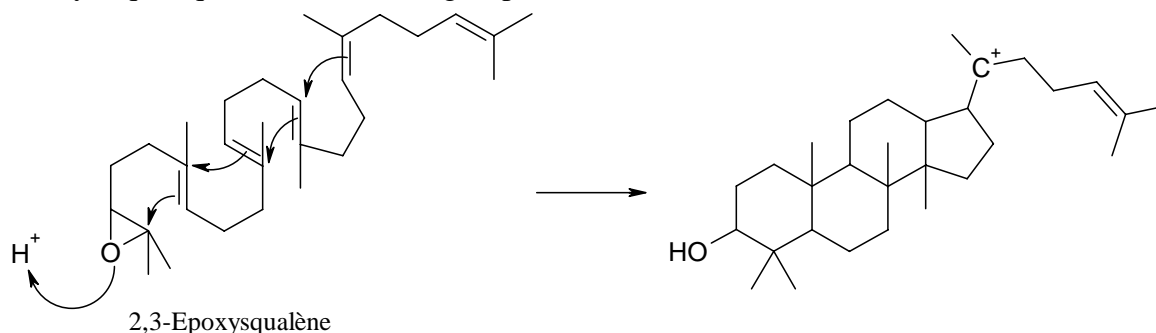
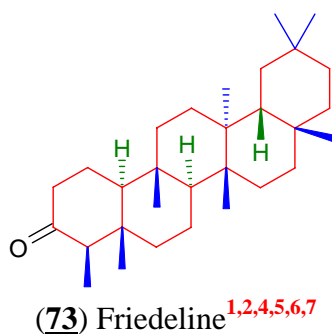


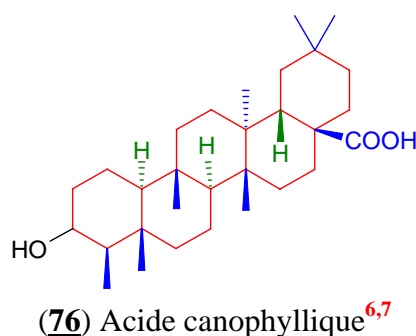
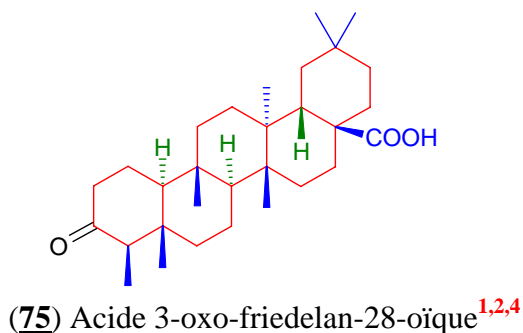
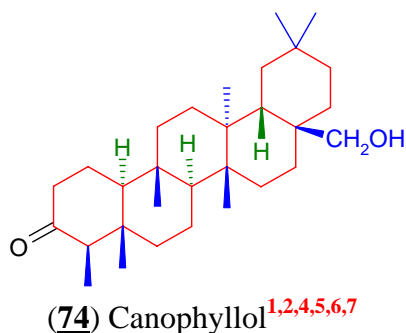
Figure 13 : Biosynthèse des triterpènes à partir du 2,3-Epoxysqualène

Selon la conformation initiale de l'époxy-squalène, différents types de triterpènes seront obtenus. Le plus couramment, une conformation chaise-chaise-chaise-bateau conduit au cation dammarane qui se réarrange ensuite par formation d'un cycle supplémentaire pour conduire aux friedelanes et à divers oléananes^{8,10}.

La molécule de base des triterpènes, qu'on retrouve dans un grand nombre d'espèces végétales, et en particulier dans le Tamanu, est la friedeline (**73**), dont la structure est la suivante :

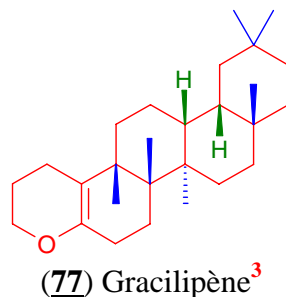


Par ailleurs la présence de trois autres triterpènes a été mise en évidence dans les feuilles et les écorces de Tamanu : il s'agit du de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**), du canophyllol (**74**), et de l'acide canophyllique (**76**) :



Remarque : Dans la littérature certains auteurs font une confusion entre les triterpènes (**75**) et (**76**) ; il est ainsi désormais courant de rencontrer la structure (**75**) avec la dénomination d'acide canophyllique. Néanmoins, nous avons décidé de conserver la nomenclature historique, qui est aussi la nomenclature officielle de la CAS (Chemical Abstracts Society).

Par ailleurs, une nouvelle molécule dont la structure est voisine de celle des triterpènes (mais qui possède non plus 30 mais 27 atomes de carbone), le gracilipène (**77**), a été isolé à partir du *Calophyllum gracilipes*³ :



Tous ces triterpènes ont montré des activités biologiques intéressantes, et notamment antibactérienne et antifongique, sur un certain nombre de souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, etc...) et fongiques (*Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus niger*, etc...) ^{1,2}.

Cette famille de molécules est très répandue dans de nombreuses espèces végétales, c'est pourquoi nous nourrissons l'espoir d'en découvrir de nouveaux dans le *Calophyllum inophyllum*. Cependant, il faut rester très prudent, car la littérature traitant des triterpènes provenant du genre *Calophyllum* est très succincte.

Références

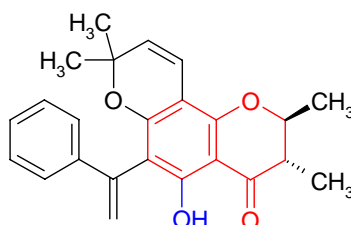
- 1) S. Mahmud, G.H. Rizwani, M. Ahmad, S. Ali, S. Perveen, et al., “Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn.”, Pak. J. Pharmacol., 1998, vol 15, n° 2, pp 13-25.
- 2) M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, G.H. Rizwani et V.U. Ahmad, “Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae”, J. Chem. Soc. Pak., 1999, vol 21, n° 2, pp 174-178.
- 3) S.G. Cao, K.Y. Sim, S.H. Goh, F. Xue et T.C.W. Mak, “Gracilipene : a heterocyclic seco-trisnor-oleanane from *Calophyllum gracilipes* (Guttiferae)”, Tetrahedron Lett., 1997, vol 38, n° 27, pp 4783-4786.
- 4) S.B. Mahato et A.P. Kundu, “Review article number 98 : ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features”, Phytochemistry, 1994, vol 37, n° 6, pp 1517-1575.
- 5) H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran et S. Balasubramaniam, “Triterpenes and neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*”, Phytochemistry, 1984, vol 23, n° 11, pp 2601-2603.
- 6) A.A.L. Gunatilaka, A.M.Y.J. De Silva, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et M.I.M. Wazeer, “Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum calaba* and *Garcinia spicata* from Sri Lanka”, Phytochemistry, 1984, vol 23, n° 2, pp 323-328.
- 7) T.R. Govindachari et N. Viswanathan, “Triterpenes of *Calophyllum ionophyllum* Linn.”, Tetrahedron, 1967, vol 23, n° 4, pp 1901-1910.
- 8) A.-E. Hay, “Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique”, Thèse de l’Université d’Angers, France, 2003.
- 9) J. Bruneton, “Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales”, Ed. TEC et DOC, 3^e édition, Paris, France, 1999.
- 10) M.U.S. Sultanbawa, “Chemistry of the Guttiferae of Ceylon”, J. Natl. Sci. Council of Sri Lanka, 1973, vol 1, pp 123-165.
- 11) D.E. Wolf, C.H. Hoffman, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1956, vol 78, p 4499.
- 12) W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning et F. Lynen, J. Biol. Chem., 1960, n° 235, p 326.
- 13) D.E. Cane, Acc. Chem. Res., 1985, vol 18, p 220.

IV. AUTRES FAMILLES CHIMIQUES

Nous avons vu que le *Calophyllum inophyllum* est très riche en métabolites secondaires appartenant à trois grandes familles de molécules : les coumarines et les néoflavonoïdes, les xanthones, et les triterpènes. Toutefois, le Tamanu est également constitué de molécules plus minoritaires, qui n'appartiennent à aucune de ces trois familles. Ont ainsi été isolés quelques benzopyranones, flavonoïdes, et autres acides organiques.

IV.1. Les benzopyranones

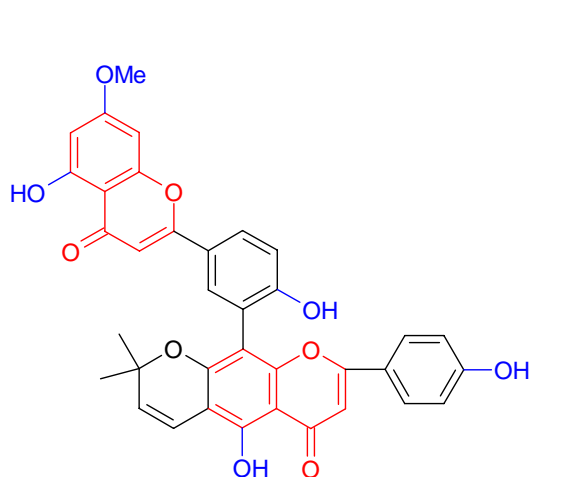
Le *Calophyllum* est un genre qui contient une grande diversité de molécules. Ainsi, outre les trois familles principales que sont les néo-flavonoïdes, les xanthones, et les triterpènes, certaines espèces de *Calophyllum* telles l'*inophyllum* et le *tomentosum* contiennent des benzopyranones, dont un exemple est donné ci-dessous :



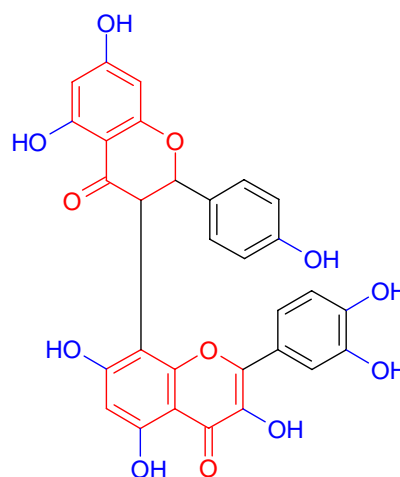
(78) 9-hydroxy-2,2,6,7-tétraméthyl-2H-[1]-benzopyran-(1-phényléthylèn-10-yl)-(3,2-b)-dihydropyran-4-one^{1,2}

IV.2. Les flavonoïdes

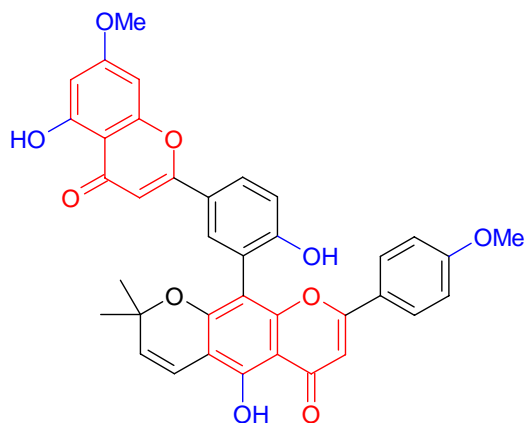
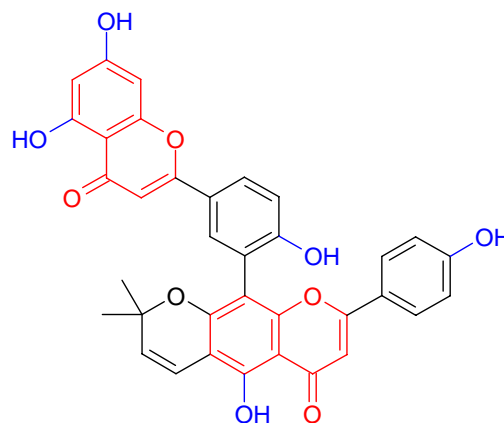
Des biflavonoïdes ont été découverts dans le genre *Calophyllum*. Quelques exemples :



(79) Pyranoamentoflavonoate de 7-méthyle³

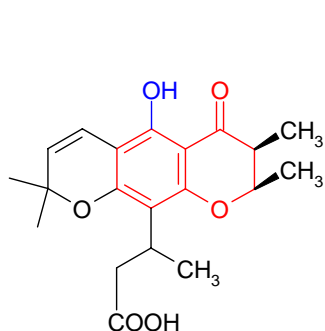
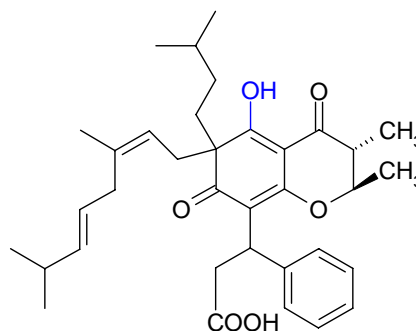


(80) Pancibiflavonol⁴

(81) Pyranoamentoflavonoate de 7,4''-diméthyle⁵(82) Pyranoamentoflavone⁶

IV.3. Divers acides

Citons ici deux exemples d'acides carboxyliques dont la structure a été déterminée par RMN de fractions chromatographiques provenant d'extraits de *Calophyllum* :

(83) Acide Isocordato-oblongique⁷(84) Acide Calozeylanique^{8,9}

IV.4. Les acides gras constituant l'huile de Tamanu (métabolites primaires)

Une huile végétale est en général composée à 99 % de triglycérides d'acides gras. L'huile de Tamanu est également composée en grande majorité de ces triglycérides, mais elle a ceci de particulier qu'outre ces triglycérides, elle contient aussi des résines. Nous avons déjà vu que ces résines contiennent des métabolites secondaires tels les coumarines et les néoflavonoïdes. Mais les métabolites primaires contenus dans l'huile ont également été étudiés. Il existe ainsi quelques articles traitant de la composition de l'huile en acides gras et en minéraux.

Composition en acides gras^{10,11} :

Deux huiles décrites dans la littérature nous servent de référence :

- une huile provenant du Nigéria¹⁰, sa composition est la suivante :
 - acide palmitique (C16 :0) : 16 %
 - acide stéarique (C18 :0) : 16 %
 - acide oléique (C18 :1) : 30 %
 - acide linoléique (C18 :2) : 38 %

- une huile provenant d'Inde¹¹, sa composition est la suivante :
 - acide palmitique (C16 :0) : 18 %
 - acide stéarique (C18 :0) : 8 %
 - acide oléique (C18 :1) : 47 %
 - acide linoléique (C18 :2) : 27 %

Ainsi, la composition en acides gras de l'huile de Tamanu est classique, très voisine de bon nombre d'huiles végétales.

Références

- 1) N.U.D. Khan, N. Parveen, M. Singh, R. Singh, B. Achari, et al., "Two isomeric benzodipyrone derivatives from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, 1996, vol 42, n° 4, pp 1181-1184.
- 2) V. Babu, R. Arya, M. Ilyas et K.T. Nasim, "9-hydroxy-2,2,6,7-tetramethyl-2H-[1]-benzopyran-(1-phenylethylene-10-yl)-(3,2-b)-dihydropyran-4-one from *Calophyllum tomentosum*", *Phytochemistry*, 1994, vol 35, n° 2, pp 507-510.
- 3) S.G. Cao, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Minor methylated pyranoamentoflavones from *Calophyllum venulosum*", *Nat. Prod. Lett.*, 2001, vol 15, n° 5, pp 291-297.
- 4) C. Ito, M. Itoigawa, Y. Miyamoto, K.S. Rao, J. Takayasu, et al., "A new biflavonoid from *Calophyllum paniculatum* with antitumor-promoting activity", *J. Nat. Prod.*, 1999, vol 62, n° 12, pp 1668-1671.
- 5) S.G. Cao, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Biflavonoids of *Calophyllum venulosum*", *J. Nat. Prod.*, 1997, vol 60, n° 12, pp 1245-1250.
- 6) S.H. Goh, I. Jantan et P.G. Waterman, "Neoflavonoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum inophylloide*", *J. Nat. Prod.*, 1992, vol 55, n° 10, pp 1415-1420.
- 7) H.R.W. Dharmaratne, D.S.C. Perera, G.P.K. Marasinghe et J. Jamie, "A chromene acid from *Calophyllum cordato-oblongum*" *Phytochemistry*, 1999, vol 51, n° 1, pp 111-113.
- 8) U. Samaraweera, S. Sotheeswaran, M.U.S. Sultanbawa et S. Balasubramaniam, "Bark acids of seven *Calophyllum* species (Guttiferae)", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1983, n° 4, pp 703-706.
- 9) U. Samaraweera, S. Sotheeswaran et M.U.S. Sultanbawa, "Calozeylanic acid, a new bark acid from three *Calophyllum* species (Guttiferae)", *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol 22, n° 50, pp 5083-5086.
- 10) A. Adeyeye, "Studies on seed oils of *Garcinia kola* and *Calophyllum inophyllum*", *J. Sci. Food Agric.*, 1991, vol 57, pp 441-442.
- 11) J. Hemavathy et J.V. Prabhakar, "Lipid composition of *Calophyllum inophyllum* kernel", *JAOCS*, 1990, vol 67, n° 12, pp 955-957.

V. CONCLUSION

Cette synthèse bibliographique montre bien le potentiel du *Calophyllum inophyllum* en ce qui concerne la découverte de molécules nouvelles biologiquement actives de type coumarine, néo-flavonoïde, xanthone, et triterpène.

Ces molécules sont distribuées dans toute la plante, mais certaines sont plus abondantes dans certaines parties : on retrouve en effet plutôt les coumarines et les triterpènes dans les feuilles, et les xanthonnes dans les écorces de tronc et de racines. En ce qui concerne les amandes, il a été établi qu'elles contiennent certaines coumarines et certains néo-flavonoïdes. Cette ressource pourrait être une bonne source renouvelable de ces molécules qui sont pour la plupart biologiquement actives. Cependant les amandes semblent moins riches en coumarines et en néo-flavonoïdes que les feuilles, en tout cas en ce qui concerne la diversité de ces molécules. Nous préférons donc pour ce travail utiliser comme matière première des extraits de feuilles (à l'hexane et à l'acétate d'éthyle pour les coumarines, les néo-flavonoïdes et les triterpènes).

Chapitre III :
METHODES PREPARATIVES
ET ANALYTIQUES

CHAPITRE III : METHODES PREPARATIVES ET ANALYTIQUES

I. LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

La chromatographie en général est une méthode d'analyse qui permet de séparer les constituants d'un mélange en utilisant les différences entre les constantes d'équilibre de ces corps lors de leur partage entre une phase mobile (liquide ou gazeuse) qui les entraîne et une phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. Sous l'influence de ces deux effets antagonistes, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont ainsi séparés.

I.1. Principes généraux^{1,2}

Les principes généraux présentés ici s'appliquent principalement à la chromatographie liquide sur colonne. Cependant, nous aborderons également par la suite la chromatographie liquide sur couche mince et la chromatographie en phase gazeuse, que nous avons utilisées. Il existe différents types d'interactions entre un soluté, une phase mobile et une phase stationnaire, qui sont utilisées pour séparer les molécules constituant le soluté. On distingue ainsi :

- la chromatographie d'adsorption, lorsque la phase stationnaire est un solide adsorbant et que la séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange par la phase fixe.
- la chromatographie de partage lorsque la séparation est fondée sur des différences de solubilité des molécules à séparer dans la phase liquide qui imprègne un solide, ou plus généralement, des différences d'interaction avec les molécules greffées sur le solide.
- la chromatographie d'échange d'ions, pour laquelle la phase stationnaire est un solide, ayant des propriétés particulières que l'on appelle un 'échangeur d'ions'. Ce solide est généralement poreux et comporte des groupements fonctionnels fixes ionisés ou ionisables ; les ions qui assurent l'électroneutralité de la structure sont mobiles et échangeables avec ceux de la phase mobile en contact avec l'échangeur.
- la chromatographie de paires d'ions : on forme des paires d'ions entre les constituants (ionisés) du mélange à séparer et un contre-ion convenable ; ces paires d'ions se distribuent entre la phase mobile et la phase stationnaire, qui est le plus souvent une phase greffée.
- la chromatographie d'échange de ligands, où la phase stationnaire contient une espèce fixée irréversiblement capable de former des complexes avec les solutés à séparer, par exemple un cation métallique tel que Ag^+ avec lequel de nombreuses molécules organiques forment des complexes de coordination, ou encore un anion tel que l'ion borate BO_2^- , qui forme des complexes avec certains polyols.
- la chromatographie d'exclusion, où la phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine des dimensions de certaines molécules à séparer ; celles qui sont trop grosses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées d'abord, celles qui peuvent pénétrer dans les pores sont éluées ensuite.
- la chromatographie d'affinité, qui est la plus sélective car elle utilise des interactions spécifiques entre les molécules du soluté et une molécule fixée sur la phase stationnaire. Par exemple, la molécule fixée peut être un anticorps d'une protéine particulière. Quand un mélange aqueux constitué de milliers de protéines est chromatographié, seule la protéine qui réagit avec l'anticorps est retenue sur la colonne. Après lavage de la colonne, la protéine ciblée est récupérée par changement du pH ou de la force ionique.

Une chromatographie liquide s'effectue en trois étapes :

- l'étape d'injection ou de dépôt : l'échantillon à analyser (mélange à séparer) est déposé en tête de colonne, soit sous forme dissoute dans le solvant d'éluion, soit sous forme solide (le soluté ayant alors été préalablement adsorbé sur de la silice) ;
- l'étape d'éluion, pendant laquelle les molécules à séparer sont éluées sur la colonne par le flux imposé par la phase mobile ;
- l'étape de détection, qui permet de fournir un signal électrique interprétable par un ordinateur ou un enregistreur chaque fois qu'un constituant du mélange initial sort de la colonne ; il existe des détecteurs spécifiques (principalement UV) et des détecteurs universels (réfractomètre, diffusion de lumière) ;

I.2. Evaluation des performances d'un système chromatographique¹

I.2.1. Grandeurs de rétention

On appelle temps de rétention t_R d'un composé le temps d'éluion au maximum du pic lui correspondant, mesuré à partir de l'injection. D étant le débit de la phase mobile, on peut facilement calculer le volume de rétention :

$$V_R = t_R \cdot D = t_R \cdot u \cdot S \cdot \varepsilon_C = \frac{\pi \cdot d_C^2 \cdot u \cdot \varepsilon_C}{4} \cdot t_R$$

où u est la vitesse linéaire de la phase éluante, S la section de la colonne chromatographique, d_C le diamètre de celle-ci, et ε_C la porosité totale de la colonne, qui peut être définie comme suit :

$$\varepsilon_C = \frac{V_M}{V_C} = \frac{V_i + V_p}{V_C}$$

où V_M est le volume de phase éluante contenu dans la colonne, V_C le volume de la colonne, V_i le volume interstitiel, et V_p le volume poreux de la phase stationnaire.

Le volume de rétention représente, à l'étalement du pic près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque soluté. Le temps de rétention ou le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques d'un composé, pour une colonne donnée et dans des conditions expérimentales fixées.

Les espèces non retenues par la phase stationnaire apparaissent dans l'effluent après un temps t_0 (temps de rétention nulle) correspondant à l'écoulement du volume de phase mobile V_M contenu dans la colonne :

$$V_M = t_0 \cdot D$$

En désignant par L la longueur de la colonne, u et t_0 sont liés par la relation :

$$t_0 = \frac{L}{u}$$

On tire alors la relation :

$$\varepsilon_C = \frac{V_M}{V_C} = \frac{4 \cdot t_0 \cdot D}{\pi \cdot d_C^2 \cdot L}$$

(ε_C est compris entre 0 et 1)

Pour un système chromatographique donné, on peut définir le coefficient de distribution ou de partage de chaque soluté par la relation suivante :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

où C_S et C_M sont respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

Le volume de rétention V_R est relié directement au coefficient de distribution K par la relation :

$$V_R = V_M + K \cdot V_S$$

V_S étant le volume de la phase stationnaire.

Pour s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé, le facteur de capacité k' , défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile :

$$k' = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

Le rapport V_S/V_M est constant pour une colonne donnée ; Les variations du facteur de capacité ne dépendent alors que du seul coefficient K , et donc des interactions mises en jeu :

$$\ln(K) = \frac{-\Delta G^0}{R \cdot T}$$

ΔG^0 étant l'enthalpie libre de distribution du soluté entre les deux phases.

Le facteur de capacité k' peut être déterminé expérimentalement au moyen des relations suivantes :

$$k' = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

On peut donc écrire le temps de rétention en fonction de k' :

$$t_R = t_0 \cdot (1 + k') = \frac{L}{u} \cdot (1 + k')$$

Ainsi plus k' est petit, et moins les composés sont retenus, ils sortent donc peu de temps après le volume de la phase mobile contenu dans la colonne, lequel correspond à $k'=0$. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, qui sortiront après un temps d'analyse assez long. (chaque implémentation d'une unité du facteur de capacité nécessite le passage sur la colonne d'un volume supplémentaire de phase éluante égal à V_M pour éluer le composé correspondant)

Dès lors, on comprend que les conditions opératoires d'une analyse résulteront d'un compromis entre une rétention suffisamment élevée pour permettre la séparation, mais pas trop importante pour éviter que le temps d'analyse ne devienne prohibitif.

I.2.2. La Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise la sélectivité (ou rétention relative) définie par la relation :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

La sélectivité α mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés :

$$\ln(\alpha) = \ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = -\frac{\Delta(\Delta G^0)}{RT}$$

I.2.3. L'efficacité d'une colonne : nombre de plateaux théoriques

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N contenus dans la colonne. Au lieu de considérer le déplacement réel, continu, de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par transferts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones où les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques. La théorie des plateaux établit que, après un certain parcours dans la colonne, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss, dont l'écart-type σ (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théoriques parcourus par la relation :

$$\sigma = \frac{t_R}{\sqrt{N}}$$

Utilisant les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss, on peut calculer le nombre de plateaux théoriques contenus dans une colonne, pour un soluté donné, directement à partir du chromatogramme obtenu :

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$

où ω est la largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base ($\omega=4\sigma$), et où δ est la largeur du pic à mi-hauteur ($\delta=\sigma \cdot \sqrt{5,54}$).

En rapportant la largeur du pic ω à la distance de rétention mesurée sur le chromatogramme, N constitue bien une mesure de l'élargissement relatif du pic dans la colonne, ce qui permet, pour un soluté donné, de comparer entre elles les performances de colonnes variées. Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : $H=L/N$, L étant la longueur de la colonne.

I.2.4. La résolution

La résolution R_S entre deux pics est définie par la relation :

$$R_S = 2 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\omega_2 + \omega_1}$$

ω_1 et ω_2 étant les largeurs à la base, déterminées comme précédemment par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

Il découle de cette définition que la séparation entre deux pics est d'autant meilleure que R_S est plus grand. Ainsi, pour deux composés conduisant à des pics de surface voisine, la séparation est pratiquement complète pour $R_S=1$, puisqu'il n'y a alors que 2% de recouvrement des deux pics. Pour $R_S < 0,8$, la séparation est généralement insuffisante. Pour une valeur donnée de R_S , la séparation est d'autant plus médiocre que le rapport des surfaces des deux pics est plus grand.

En supposant que les largeurs des pics à la base soient égales, on peut démontrer que la résolution R_S peut être exprimée par la relation :

(l'indice 2 se rapportant au composé le plus retenu)

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \sqrt{N_2}$$

Cette expression établit la relation fondamentale liant la résolution aux trois paramètres chromatographiques principaux, qui sont la sélectivité α , le facteur de capacité k' , et l'efficacité N de la colonne.

I.3. Réalisation matérielle des analyses chromatographiques

I.3.1. Choix du solvant d'élution

Concernant la chromatographie liquide, le soluté doit tout d'abord être soluble dans le solvant ou le gradient de solvants d'élution. On choisit ensuite l'éluant en fonction de ses propriétés élitives vis à vis du soluté sur la colonne chromatographique sélectionnée. Il s'agit en général de la polarité de l'éluant, qui peut être variable au cours de l'analyse (gradient de solvants). On peut ainsi faire varier les paramètres k' (facteur de capacité) et α (sélectivité) en modifiant le solvant ou le gradient de solvants, car ces paramètres sont fonction de la polarité de l'éluant.

I.3.2. Choix du type de phase stationnaire

Nous l'avons vu plus haut, il existe différentes phases stationnaires chromatographiques, et ces différentes phases sont caractérisées par le type d'interaction qu'elles créent avec le soluté. Chaque soluté pourra donc être chromatographié sur plusieurs phases stationnaires, avec des résultats différents quant à la séparation des molécules qui le composent. Nous nous restreindrons ici à l'utilisation de phases de silice polaire (adsorption) et de phases greffées apolaires dites inversées (partage) qui produisent les meilleures séparations en ce qui concerne les molécules étudiées.

Par ailleurs, une autre caractéristique des phases employées est leur granulométrie, qui varie en général entre 40 et 200 μm pour la CLBP et entre 3 et 10 μm pour la CLHP. Ce paramètre influence directement l'efficacité de la colonne, le nombre de plateaux théoriques étant d'autant plus important que la granulométrie est faible. Nous utiliserons des colonnes CLBP dont la granulométrie est comprise entre 40 et 63 μm , et des colonnes CLHP dont la granulométrie est de 5 μm , ce qui est dans les deux cas un bon compromis entre efficacité et perte de charge, qui reste encore acceptable (plus la granulométrie est faible, et plus la perte de charge est importante).

I.3.3. Quantité de soluté chromatographié

Plusieurs tailles de colonnes chromatographiques existent. Ces différentes tailles de colonnes permettent de chromatographier des quantités plus ou moins importantes d'un soluté. On parle ainsi de chromatographie analytique (diamètre de 5 mm), de chromatographie semi-préparative (diamètre de 10 mm), et de chromatographie préparative (diamètre de 20 mm et plus). La chromatographie analytique permet de connaître la pureté d'un produit ou la composition d'un mélange avec une quantité très faible de ceux-ci (quelques μg), alors que la chromatographie préparative permet de séparer et d'isoler des quantités beaucoup plus importantes de molécules présentes dans un mélange (jusqu'à plusieurs grammes).

Remarque : Une chromatographie préparative analogue (même phase, même longueur) à une chromatographie analytique réalisée avec un débit de 1 mL / min nécessitera un débit de 16 mL / min si la section de la colonne préparative est 4 fois plus grande que celle de la colonne analytique. Ce qui nécessite des pompes très performantes.

I.4. Méthodes utilisées

I.4.1. La Chromatographie sur Couches Minces (CCM)

La chromatographie sur couches minces est la plus simple des chromatographies liquides. Les séparations s'effectuent sur des plaques de verre, d'aluminium, ou de polyester qui sont recouvertes d'une couche mince et adhérente qui constitue la phase stationnaire. La phase stationnaire et la phase mobile liquide sont choisies en fonction du mélange de molécules à séparer. Les deux types principaux de phase stationnaire sont la phase normale (silice, polaire) et la phase inverse (C8 ou C18, apolaire). La phase mobile est choisie en fonction de sa polarité. La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité, entraînant les différentes molécules à des vitesses différentes. La CCM est une méthode principalement analytique.

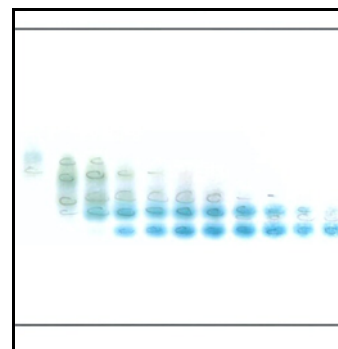
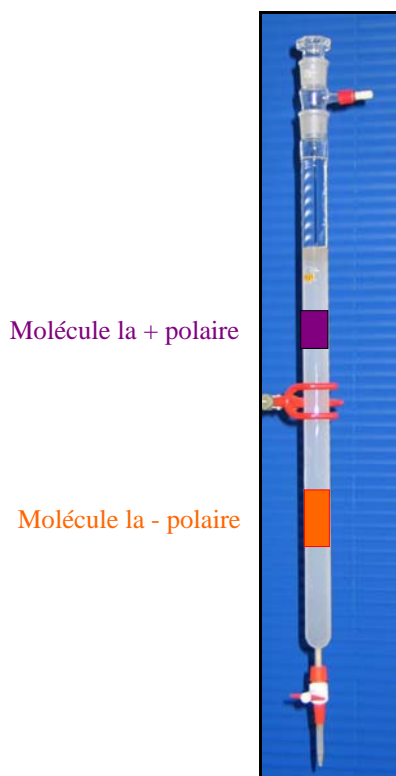


Photo 9 : Plaques CCM : coumarines révélées à la vanilline sulfurique

I.4.2. La Chromatographie Liquide à Basse Pression (CLBP)



La CLBP est une méthode de chromatographie liquide préparative permettant de séparer des mélanges en quantités importantes. La phase stationnaire est disposée dans une colonne en verre, et celle-ci forme un gel en présence de la phase mobile liquide. Le mélange à séparer est élué par gravité par la phase mobile (un compresseur ou une pompe basse pression peuvent éventuellement être utilisés). De même que pour la CCM, la phase stationnaire est choisie selon les mélanges à séparer, parmi des phases normales ou des phases inverses. La phase mobile est une nouvelle fois choisie en fonction de sa polarité ; toutefois, elle n'est plus obligatoirement isocratique, mais au contraire souvent constituée d'un mélange de solvants qui évolue au cours du temps : le gradient du solvant le plus polaire permet une augmentation de la polarité de la phase mobile dans le temps. Ceci a pour but d'améliorer les séparations.

Photo 10 : Colonne de CLBP avec gel de silice

I.4.3. La Chromatographie Liquide à Hautes Performances (CLHP)

La CLHP reprend le principe de la CLBP, en améliorant ses performances. En effet, la phase stationnaire utilisée a une granulométrie plus faible, ce qui augmente beaucoup la surface de contact, et donc l'efficacité de la colonne. Mais ceci rend aussi plus difficile la migration de la phase mobile, et nécessite de ce fait l'utilisation d'une pompe à haute pression pour assurer le débit de celle-ci.

a) CLHP préparative avec détection UV, réfractométrique, et DDL

La CLHP préparative permet comme la CLBP de séparer et d'isoler des molécules issues de mélanges plus ou moins complexes. Les quantités que l'on peut traiter sont plus faibles, mais les séparations effectuées sont plus efficaces, et les pics mieux résolus. Trois types de détection sont à notre disposition :

- la détection par absorption des rayons ultra-violet (UV-VWD à λ fixe) ;
- la détection réfractométrique (RI) ;
- et enfin la détection à diffusion de lumière (DDL).

Le détecteur UV à longueur d'onde fixe (VWD) est spécifique aux molécules qui absorbent dans l'ultra violet à la longueur d'onde λ fixée, les autres n'étant pas détectées. L'intérêt de ce détecteur qui n'est pas 'universel' est qu'il est très sensible (la sensibilité dépend des molécules détectées). Ce type de détection pourra être utilisé aussi bien en isocratique qu'en gradient de solvants.

Les deux autres détecteurs sont des détecteurs dits ‘universels’ car ils détectent un très grand nombre de molécules, appartenant à des familles chimiques très variées. Par contre, ils sont en général moins sensibles qu’un détecteur UV. D’un point de vue pratique, la principale différence entre un RI et un DDL, est que le détecteur réfractométrique ne peut être utilisé qu’avec un éluant isocratique, de composition constante, car les variations de composition de l’éluant font varier de manière très importante son indice de réfraction. Avec le DDL, ce problème n’existe pas puisque le solvant est évaporé avant que les molécules non volatiles soient détectées. Ces molécules sont nébulisées puis passent dans une chambre de détection où elles diffusent un rayon lumineux. Le signal obtenu est proportionnel à la variation d’intensité de ce rayon lumineux, qui est d’autant plus importante que le brouillard constitué par les molécules nébulisées est dense.

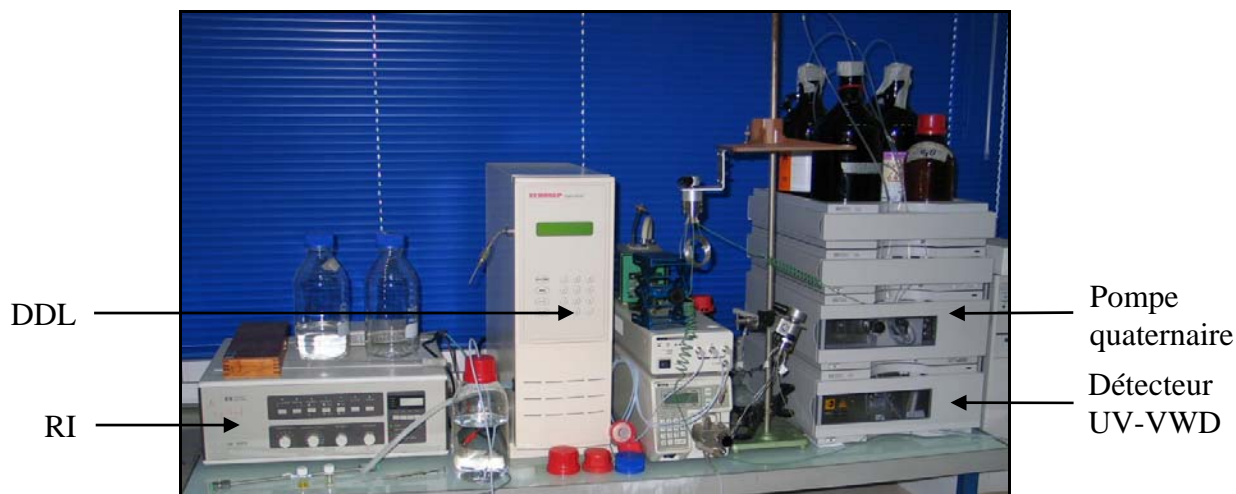


Photo 11 : CLHP préparative avec détecteurs RI, DDL et UV-VWD

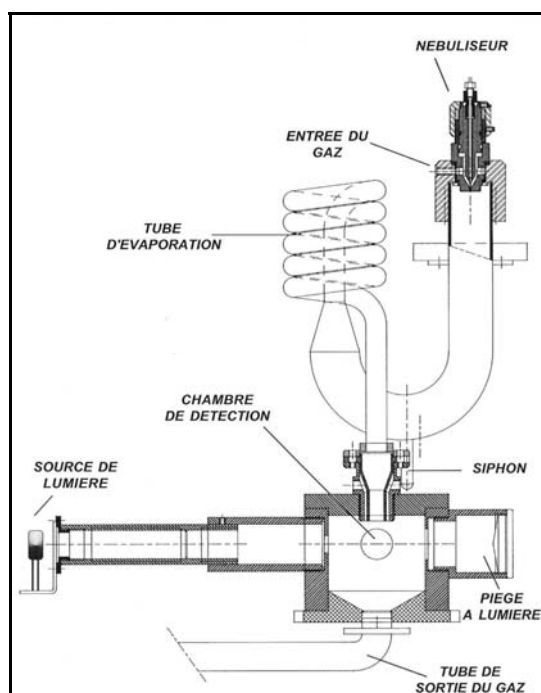


Figure 14 : Schéma général du DDL

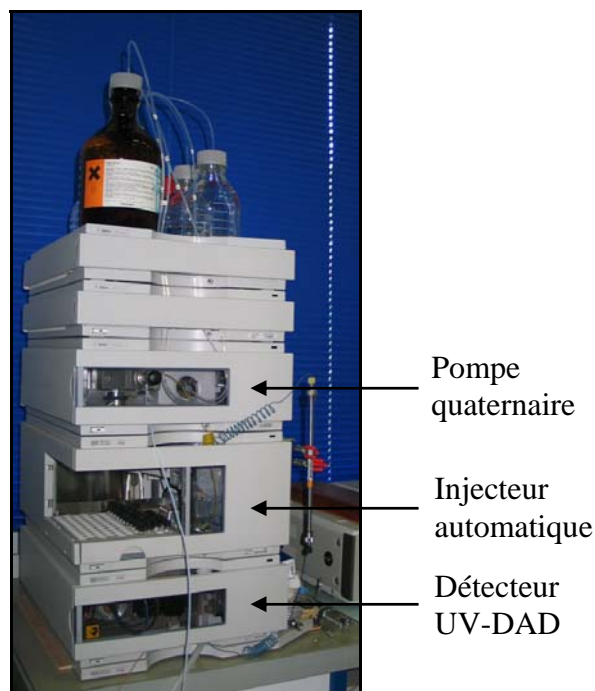


Photo 12 : CLHP analytique avec injecteur automatique et UV-DAD

b) CLHP analytique avec détection UV-DAD

Les colonnes CLHP analytiques sont du même type que les colonnes préparatives, mais leur diamètre est quatre à cinq fois plus petit (5 mm). Cette fois il ne s'agit plus d'isoler des molécules d'un mélange, mais d'analyser un échantillon. On utilise la plupart du temps un détecteur UV à barrettes de diodes (UV-DAD), qui permet d'enregistrer le spectre UV de l'éluant chromatographie à intervalles de temps réguliers de l'ordre de la seconde. On peut ainsi associer un spectre UV à chaque pic chromatographique obtenu, et avoir ainsi une première information sur la molécule considérée. Lorsque les molécules analysées n'absorbent pas en UV, on fait appel au DDL, qui permet d'utiliser des méthodes à gradient de solvants qui sont les plus couramment utilisées.

I.4.4. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode chromatographique principalement analytique, même s'il est possible de mettre en œuvre des CPG préparatives. Elle est basée sur les interactions qui interviennent entre le soluté à analyser et une phase stationnaire supportée par une colonne capillaire. L'éluion est assurée par un flux de gaz inerte (hélium, azote...) qui sert de phase mobile. Contrairement aux méthodes chromatographiques présentées précédemment, il n'existe pas d'interactions entre les molécules du soluté et la phase mobile, dont la seule fonction est de transporter ce soluté dans la colonne. Ainsi c'est la température du système chromatographique qui modulera sa force d'éluion, et non plus la polarité de l'éluant.

Le principal inconvénient de cette méthode est son domaine d'application. En effet, on estime à seulement 20% des substances organiques connues les molécules qui sont susceptibles d'être analysées en CPG. Ceci pour deux raisons principales : la substance doit être relativement volatile et ne doit pas se dégrader à des températures élevées.



Photo 13 : Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG) avec injecteur automatique

II. LES METHODES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROMETRIQUES

II.1. La spectroscopie Infra-Rouge (IR)³

La spectroscopie IR est une méthode spectrale d'analyse qui permet de déterminer les fonctions chimiques qui sont présentes dans la structure d'une molécule. Cette technique repose sur la déformation et la rotation des liaisons chimiques lorsque celles-ci sont soumises à des radiations dont le nombre d'onde est compris entre 400 et 4000 cm^{-1} (longueurs d'ondes correspondantes : 25 et 2,5 μm). Ces liaisons se mettent alors à vibrer et à tourner quand elles sont soumises à une radiation continue.

Concrètement, les liaisons absorbent certaines énergies propagées par les radiations, énergies qui diffèrent suivant le type de liaison (C-C, C=C, C-O, C=O, etc...). Chaque énergie particulière est associée à une radiation de longueur d'onde bien précise (l'énergie propagée dépend de la longueur d'onde), le spectre IR montre donc des pics d'absorbance de certaines longueurs d'onde. Chaque énergie absorbée fait vibrer et tourner une liaisons donnée. L'absorption de la radiation est donc quantifiée.

La relation entre énergie et longueur d'onde est la suivante :

$\Delta E = (h.C) / \lambda$ avec h : constante de Planck, et C : vitesse de la lumière.

Il y a deux types de vibrations des liaisons : l'élongation, symétrique ou asymétrique (stretching) et la déformation, dans le plan ou hors du plan (bending). Chaque type de liaison chimique peut subir plusieurs types de vibrations, qui peuvent être des vibrations d'élongation ou de déformation, ainsi que des rotations.

II.2. La spectroscopie Ultra-Violet (UV)³

La spectroscopie UV est une méthode d'analyse qui permet d'obtenir un spectre plus ou moins caractéristique d'une molécule ; mais le spectre obtenu ne permet pas, contrairement à un spectre IR, de déduire aisément les fonctions chimiques présentes dans la molécule. Les radiations UV ont des longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm (lumière visible : entre 400 et 800 nm). Ainsi, les énergies qui sont propagées par les ondes UV sont beaucoup plus élevées que celles propagées par les ondes IR ($\Delta E = (h.C) / \lambda$). Cette fois, ces énergies sont absorbées non plus par les liaisons chimiques, alors mises en mouvement, mais par le système électronique de la molécule, et plus particulièrement par les électrons de sa couche de valence, qui sont alors excités. Les radiations UV absorbées font donc subir des transitions électroniques aux électrons (par exemple transition d'une orbitale moléculaire liante π à une orbitale moléculaire non liante π^* de plus haute énergie). Les bandes d'absorption obtenues en UV sont donc caractérisées par leur longueur d'onde λ , mais aussi par leur intensité ε : la longueur d'onde correspond à l'énergie requise pour effectuer une transition, et l'intensité mesure le degré d'interaction entre le système électronique et la radiation UV, ainsi que la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité de l'électron. ($\varepsilon = (A.M) / (C.l)$ où A est l'absorbance, M la masse molaire, C la concentration de la solution, et l la longueur de la cuve du spectrophotomètre).

II.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)^{3,4}

II.3.1. Principe de la RMN (impulsionnelle par Transformée de Fourier)³

La Résonance Magnétique Nucléaire est une spectroscopie d'absorption d'ondes de radiofréquences. Dans un champ magnétique approprié, un noyau atomique possédant un spin non nul peut absorber une radiation électromagnétique dans la zone des radio-fréquences, à des fréquences dépendant de ses caractéristiques. Un spectre RMN est un graphe représentant les intensités des pics d'absorption en fonction de leurs fréquences. Plusieurs noyaux comme ^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P ont tous un nombre de spin égal à $\frac{1}{2}$ et une distribution de charge sphérique uniforme qui permet d'obtenir des spectres riches en informations sur la structure de la molécule étudiée. Parmi ceux-ci, les plus utilisés en RMN sont de loin les noyaux ^1H et ^{13}C .

On considère l'ensemble des noyaux constituant le léger excès de peuplement sur le niveau de plus basse énergie qui sont alignés dans le sens du champ magnétique \vec{B}_0 et qui subissent donc tous un mouvement de précession de phase aléatoire autour de l'axe \vec{z} de ce champ magnétique. La résultante des moments magnétiques \vec{M} de tous ces noyaux est alors dirigée selon l'axe \vec{z} , et dans le sens du champ. Appliquons à \vec{M} un champ \vec{B}_1 oscillant de radiofréquence pendant un temps très court appelé impulsion. \vec{M} va basculer de l'axe \vec{z} suivant un angle α proportionnel à l'intensité du champ \vec{B}_1 et à la durée de l'impulsion :

$$\alpha = B_1 \cdot t \cdot \gamma \quad (\text{avec } \gamma : \text{constante gyromagnétique du noyau étudié})$$

Après l'impulsion une magnétisation transverse apparaît. La précession sous l'effet conjugué du champ \vec{B}_0 et de la relaxation est représentée en fonction du temps par une oscillation amortie appelée FID (Free Induction Decay) ou signal de précession libre. Après une Transformée de Fourier FT, ce signal donne le spectre RMN qui est fonction de la fréquence. Une séquence de base est constituée d'une impulsion, d'un temps d'acquisition du signal et d'un délai pour permettre à la magnétisation macroscopique de retourner à son état d'équilibre. Cette séquence est répétée n fois lors de l'expérience de RMN impulsionnelle.

II.3.2. La RMN impulsionnelle 1D du proton (^1H)^{3,4}

La séquence impulsionnelle utilisée pour obtenir un spectre 1D du proton consiste en un temps d'équilibrage du système, une impulsion de radiofréquences d'angle $\pi/2$ selon l'axe x, un délai, et un temps d'acquisition de l'ordre de la seconde :

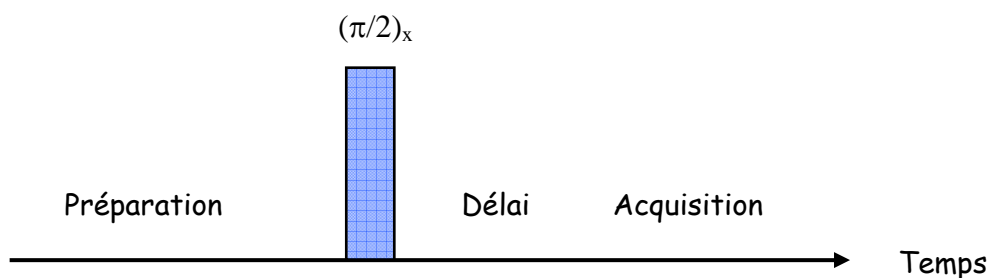


Figure 15 : Schéma de la séquence impulsionnelle 1D du proton ^1H

II.3.3. La RMN impulsionnelle 1D du carbone (^{13}C)^{3,4}

La séquence impulsionnelle utilisée pour obtenir un spectre 1D du carbone consiste pour le noyau ^{13}C en un temps d'équilibrage du système, une impulsion de radiofréquences d'angle $\pi/2$ selon l'axe x, un délai, et un temps d'acquisition de l'ordre de la seconde. Pendant toute la durée de la séquence, les noyaux ^1H devront être spécifiquement irradiés afin d'être découplés :

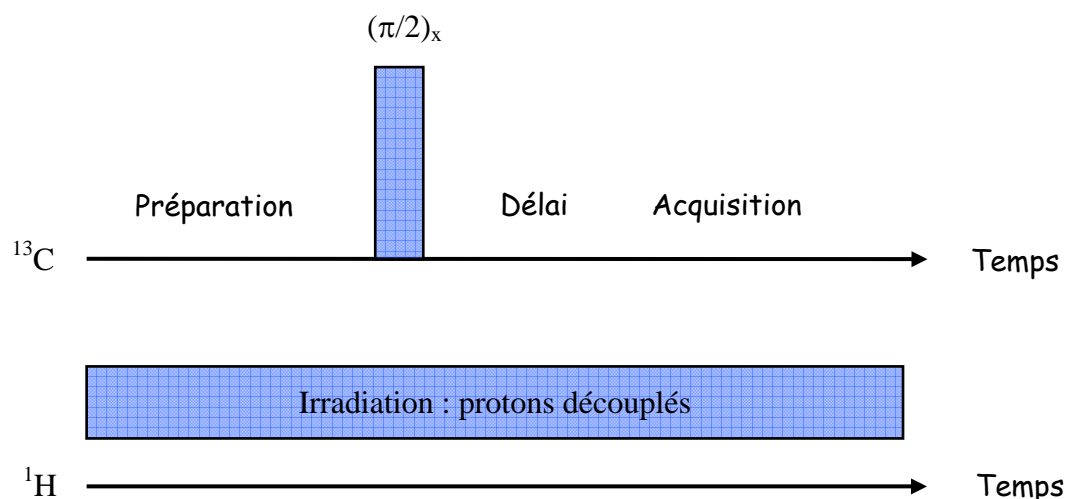


Figure 16 : Schéma de la séquence impulsionnelle 1D du carbone ^{13}C

II.3.4. La RMN multi-impulsionnelle 1D du carbone (^{13}C) : la séquence DEPT^{4,5,6}

La séquence DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) est une technique permettant de faire la distinction entre les groupes CH_3 , CH_2 , CH et les carbones quaternaires. La technique utilise un transfert de magnétisation entre les noyaux ^1H et ^{13}C . Cette séquence multi-impulsionnelle pour le couple ^1H - ^{13}C est représentée ci-dessous :

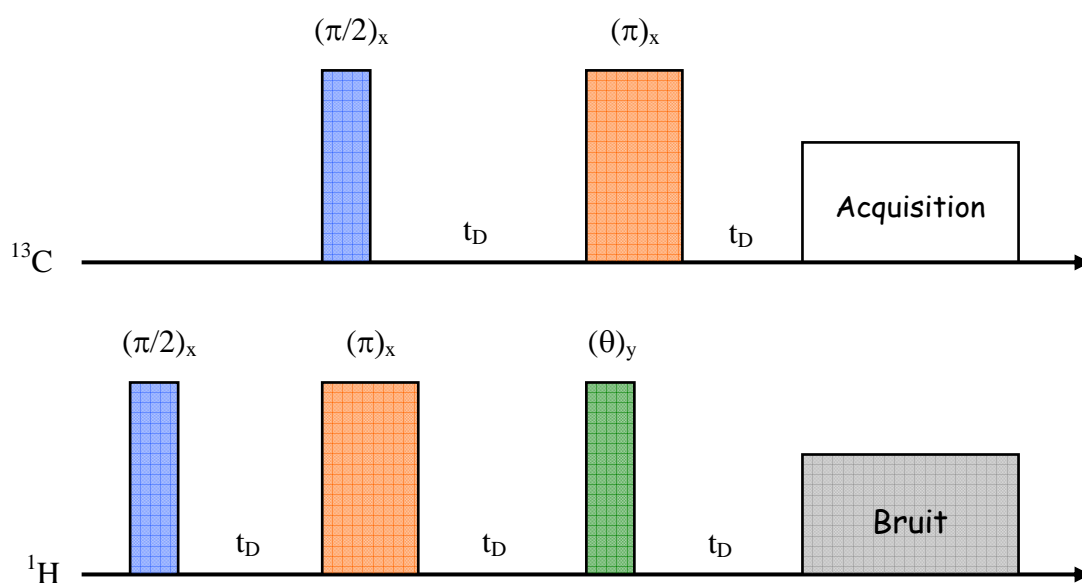


Figure 17 : Schéma de la séquence multi-impulsionnelle DEPT du ^{13}C

Remarque :

Le délai noté t_D est fixé au temps correspondant à deux fois la constante de couplage C-H : $t_D = (2 \cdot J_{CH})^{-1}$.

Cette séquence est caractérisée par la dernière impulsion $(\theta)_y$ appliquée aux noyaux 1H . Selon la valeur de l'angle θ , l'intensité des signaux correspondant aux carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2) et tertiaires (CH) est différente :

- les carbones quaternaires ne sont pas visibles avec la séquence DEPT ;
- pour $(\theta)_y = 135^\circ$ ($3\pi/4$), les groupements CH et CH_3 sont inversés par rapport aux méthylènes CH_2
- pour $(\theta)_y = 90^\circ$ ($\pi/2$), seuls les atomes de carbone tertiaires CH sont observés (on peut alors distinguer les groupes CH des groupes CH_3)

Les spectres RMN ^{13}C totalement découplés et ceux obtenus avec la séquence DEPT permettent de déterminer chaque type de carbone de la molécule étudiée. La formule brute et le nombre d'insaturations du composé pourront en être directement déduits.

II.3.5. La RMN 2D^{3,4,7 à 15}

a) Principe

Une séquence de RMN impulsionnelle est composée de trois (ou parfois quatre) parties :

- la période de préparation qui fixe les conditions de départ correspondant au retour du système à l'état d'équilibre et également la création de la magnétisation transverse
- la période d'évolution t_1 qui permet aux spins des noyaux étudiés de subir des interactions (couplage de spin, ...)
- la période de détection t_2 correspondant à la durée d'enregistrement du signal FID
- la période de mélange qui, pour certaines techniques, est un intervalle de temps entre les périodes d'évolution et de détection.

Par rapport à la RMN monodimensionnelle où elle était fixe, la période d'évolution t_1 devient variable en RMN bidimensionnelle. La valeur t_1 est incrémentée d'un intervalle de temps Δt entre deux expériences. A l'enregistrement, le signal FID dépend des deux variables t_1 et t_2 . Le spectre RMN 2D est obtenu par application d'une Transformée de Fourier FT sur les deux axes de fréquence de la matrice du signal. La représentation en perspective des spectres 2D n'est pas évidente à analyser. Les spectres 2D sont donc couramment présentés avec les tracés en courbes de niveaux. La visualisation en perspective est coupée horizontalement et les pics sont ainsi représentés par des lignes concentriques.

b) Corrélation homonucléaire COSY 1H - 1H

Le couplage de spin homonucléaire COSY 1H - 1H (CORrelated SpectroscopY) est utilisé pour corrélérer un spectre du proton avec lui-même. Cette séquence multi-impulsionnelle comporte deux impulsions successives :

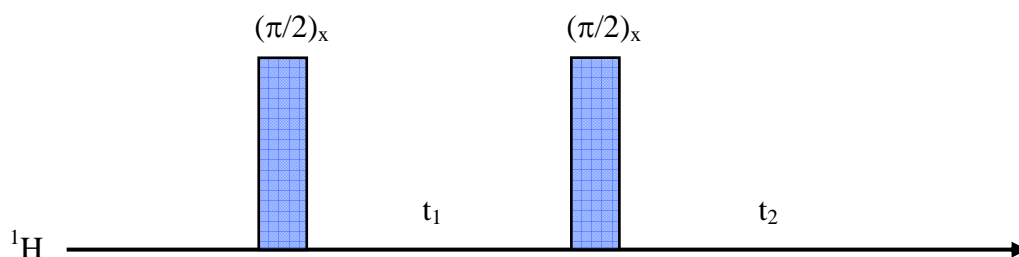


Figure 18 : Schéma de la séquence multi-impulsionnelle COSY ^1H - ^1H

La première impulsion engendre une magnétisation transverse. La seconde impulsion, dite de mélange, produit un échange de magnétisation entre les différentes transitions des noyaux ayant des niveaux d'énergie communs. La période d'évolution t_1 module l'intensité des signaux enregistrés.

Les pics non diagonaux observés sur les spectres 2D COSY correspondent aux transferts de magnétisation entre les transitions des divers protons couplés. En pratique, ces spectres apportent des informations sur les connexions entre protons portés par des atomes de carbones voisins.

c) Corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C

La séquence classique pour obtenir des couplages hétéronucléaires entre protons ^1H et carbones ^{13}C est nommée HETCOR (HÉTéronuclear chemical shift CORrelation). Cette séquence utilise un transfert de magnétisation entre les noyaux ^1H et ^{13}C . L'acquisition se fait alors sur les noyaux ^{13}C . Cette méthode peut être améliorée en faisant l'acquisition sur les noyaux ^1H , car la sensibilité est meilleure, et le temps d'acquisition moins long. C'est le cas pour les séquences nommées HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) qui sont présentées à la [Figure 19](#). Ces séquences permettent chacune d'obtenir un type de couplage différent entre protons et carbones. En effet la séquence HMQC permet d'obtenir un couplage direct entre des protons et le carbone qui les porte, alors que la séquence HMBC permet d'obtenir un couplage à longue distance (2 à 3 liaisons) entre protons et carbones.

Remarque : le délai t_D correspond à deux fois la constante de couplage : $t_D = (2 \cdot J_{\text{CH}})^{-1}$; pour un couplage C-H direct, J_{CH} est comprise entre 100 et 200 Hz, alors que pour un couplage à longue distance, J_{CH} est comprise entre 5 et 10 Hz.

II.3.6. Spectromètre RMN à 500 MHz équipé d'une cryosonde

Les structures moléculaires de toutes les molécules nouvelles décrites par la suite ont été déterminées grâce à des analyses en RMN sur un spectromètre d'une fréquence de 500 MHz, équipé d'une cryosonde permettant d'enregistrer les signaux des noyaux ^1H , ^{13}C et ^{15}N . Ce matériel de pointe nous a permis d'obtenir les spectres RMN d'échantillons en très faibles quantités avec une très bonne résolution. (Cf. [Photo 14](#))

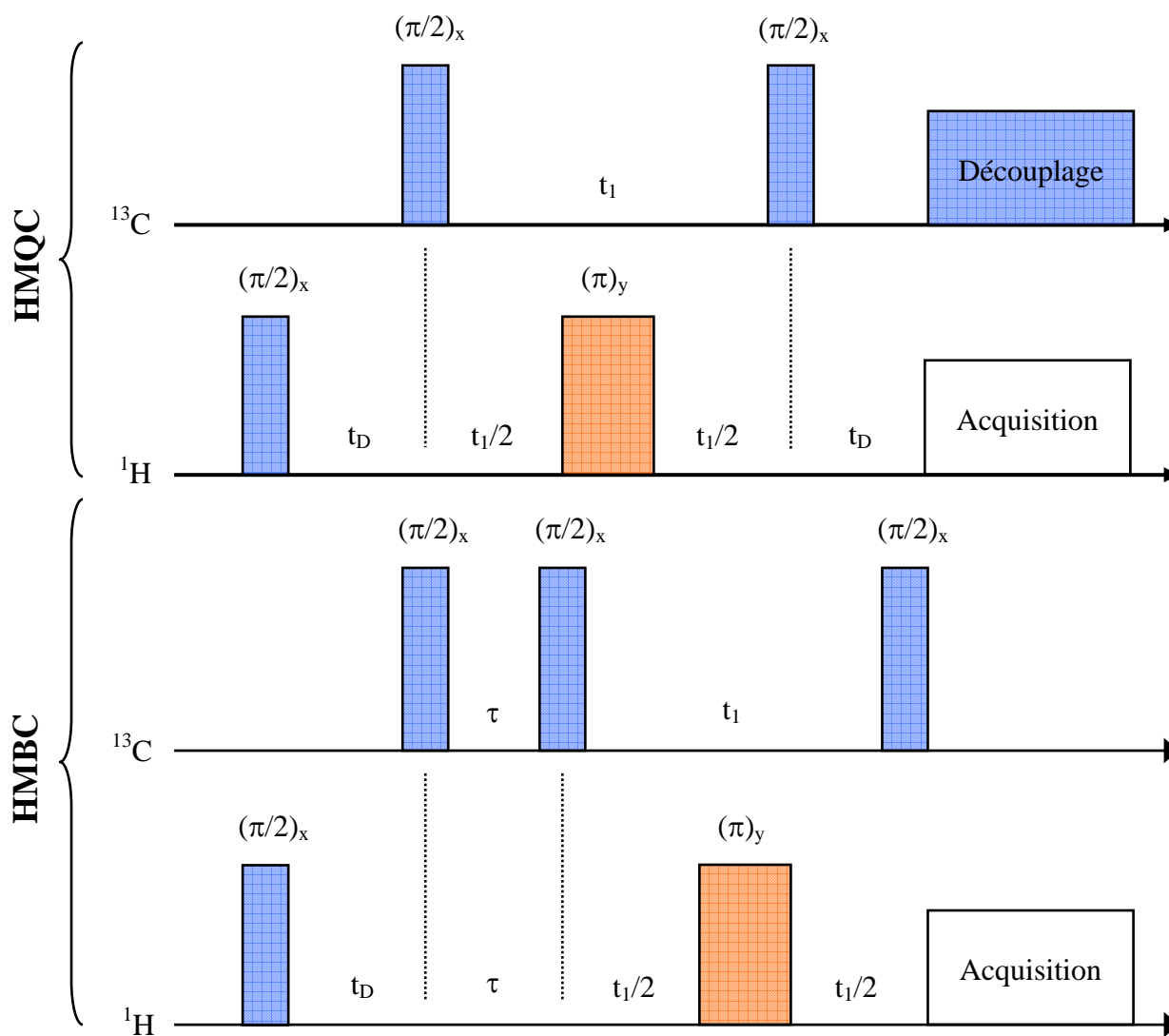


Figure 19 : Schéma des séquences multi-impulsionnelles ^1H - ^{13}C HMQC et HMBC



Photo 14 : Spectromètre RMN Bruker Avance DRX-500 et sa cryosonde ^1H , ^{13}C et ^{15}N

II.4. La Spectrométrie de Masse (SM)^{16,17}

II.4.1. Principe de la SM^{16,17}

La spectrométrie de masse pour l'analyse d'une substance organique consiste dans une première étape à produire en phase gazeuse des ions à partir de cette substance, par exemple par impact électronique. L'ion moléculaire formé va se fragmenter pour donner toute une série d'ions 'fils'. Tous ces ions sont ensuite séparés suivant leur masse, et détectés en proportion de leur nombre. On obtient ainsi le spectre de masse de la molécule, où les ions sont classés selon leur rapport masse sur charge m/z .

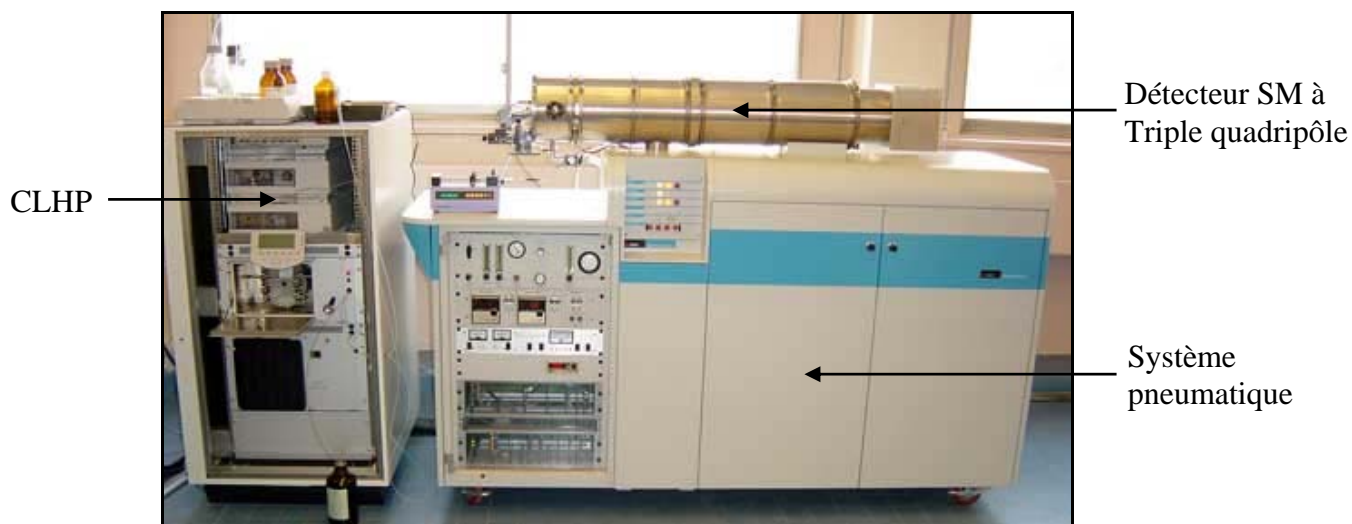


Photo 15 : Couplage d'un système CLHP à un spectromètre de masse ESI/SM/SM (Sciex)

II.4.2. L'ionisation électrospray (ESI) ou ionspray (ISP)^{16 à 27}

Le principe de cette source d'ionisation est de produire un électrospray par application d'un fort champ électrique à pression atmosphérique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre électrode, séparés de 0,3 à 2 cm. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, située à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au moment où celles-ci vont subir une succession d'explosions pour donner des gouttes de plus en plus petites. Le champ électrique en leur surface va alors devenir suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule. Cette méthode est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium ou autre. La nature du solvant, le débit de la phase liquide et la différence de potentiel sont des paramètres qui influencent les caractéristiques du spray comme la grandeur moyenne des gouttelettes et leur état de charge. A des débits supérieurs à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, l'électrospray produit un courant de larges gouttelettes en plus du spray désiré, rendant celui-ci instable.

L'ionspray, une version améliorée de l'électrospray, utilise pour créer des gouttelettes chargées une différence de potentiel et un nébuliseur pneumatique de manière à accepter des débits plus importants et produire un spray plus stable car moins dépendant de la nature de la phase liquide. L'ionspray consiste à pomper la solution contenant l'échantillon au travers d'un nébuliseur pneumatique maintenu à un haut voltage de manière à former un brouillard de gouttelettes chargées même si le débit utilisé est important. Les ions sont alors éjectés des gouttelettes s'évaporant par un processus de faible énergie qui ne produit pas de fragments. Cette technique est compatible avec des débits de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, bien que la meilleure sensibilité soit obtenue avec des débits plus faibles de l'ordre de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pour utiliser des débits de l'ordre du ml/min , une interface ionspray améliorée existe. Elle utilise une lentille écran, placée entre le nébuliseur et l'orifice d'entrée du spectromètre, qui inhibe la condensation des gouttelettes responsable de l'instabilité du spray à haut débit.

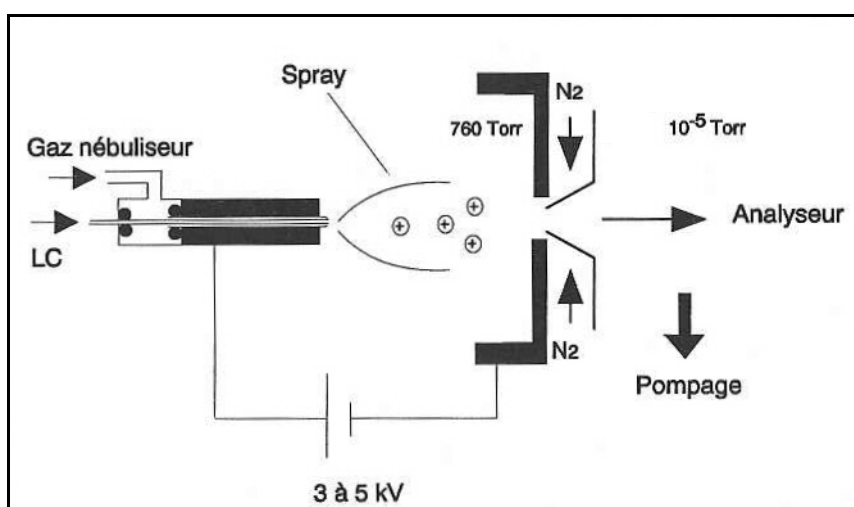


Figure 20 : Schéma de la méthode d'ionisation électrospray ou spray d'ions



Photo 16 : Source électrospray améliorée connectée à un triple quadripôle

Nous avons bénéficié d'une nouvelle amélioration de cette méthode électrospray pour l'utiliser en couplage CLHP-ESI/SM/SM avec des solvants peu polaires (phase normale) pour l'analyse des coumarines.

Le mécanisme de l'ionisation électrospray n'est pas compatible avec des solvants non polaires. Pour remédier à ce problème, on ajoute classiquement à une phase liquide peu polaire provenant d'une CLHP en phase normale un solvant polaire via une dérivation avant l'introduction dans la source d'ionisation. Cependant, la configuration de cette jonction liquide engendre des perturbations dues par exemple à des effets de dilution. L'équipe de Laurence Charles a développé une méthode qui utilise un interface dit à gaine liquide (sheath liquid interface) qui permet à la solution polaire d'être introduite directement à l'extrémité de la sonde électrospray. Les résultats obtenus après optimisation du système dans le cas de l'ionisation des coumarines suggèrent que le processus d'ionisation est sous le contrôle de la gaine liquide, qui formerait l'enveloppe externe des gouttelettes chargées²⁸.

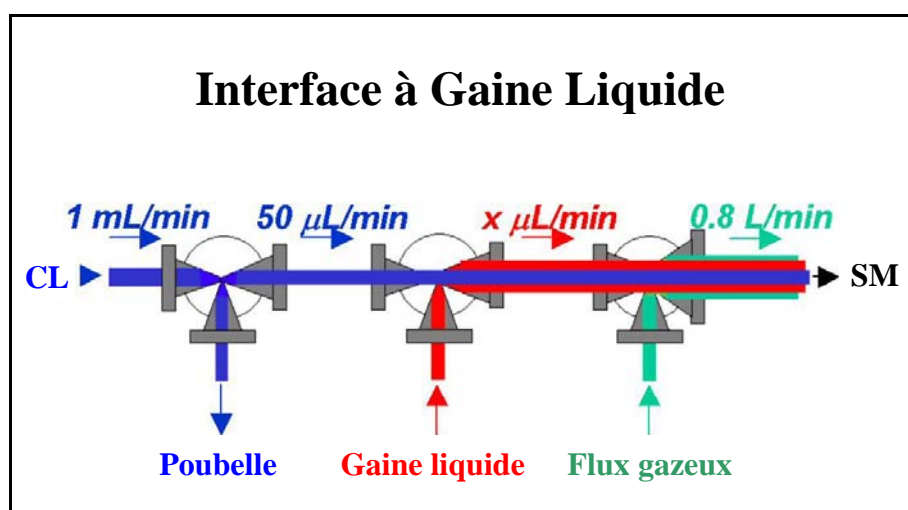


Figure 21 : Schéma de l'interface à gaine liquide de la source électrospray²⁸

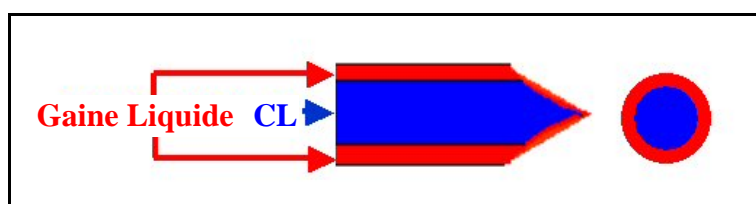


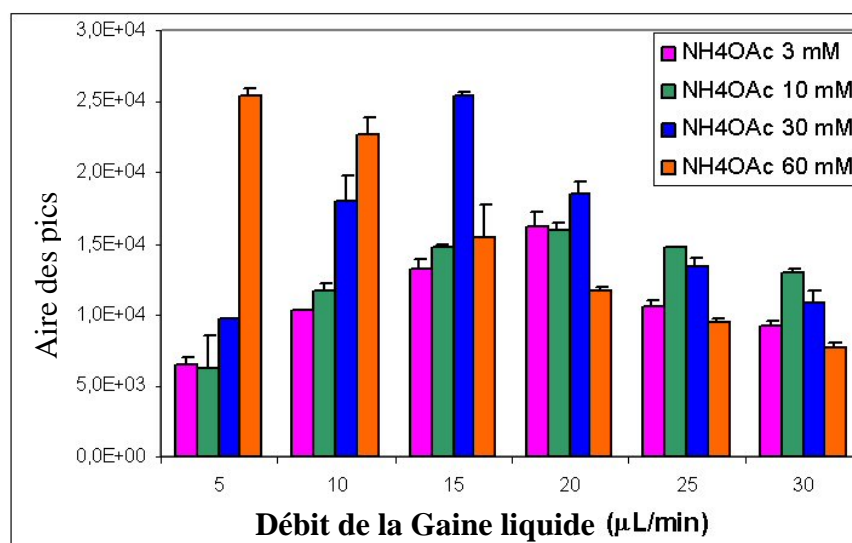
Figure 22 : Formation de gouttelettes enveloppées par la gaine liquide²⁸

Techniquement, l'interface utilise un arrangement à flux triaxial où l'effluent chromatographique, dont le débit est réduit grâce à une dérivation de volume mort nul, est introduit dans la région atmosphérique de la source électrospray via un capillaire de silice inséré dans un tube métallique étroit qui délivre la gaine liquide à l'extrémité du capillaire ; un troisième tube concentrique délivre un flux de gaz pour assister la formation du spray.

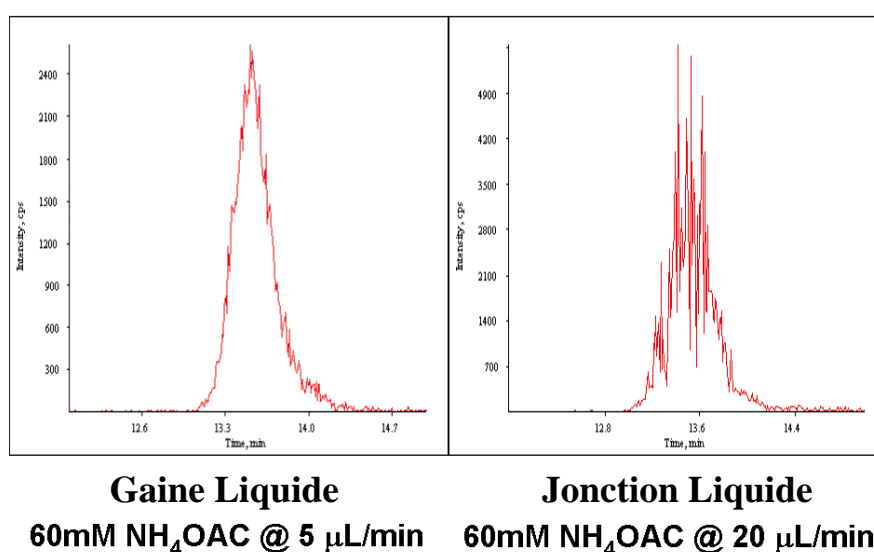
A l'échelle de temps du processus de l'électrospray, les deux phases liquides ne se mélangent pas complètement mais forment un système où les charges de la gaine liquide enveloppent la phase mobile neutre provenant de la chromatographie. Cet effet est favorisé par la limite de solubilité entre les deux phases²⁸.

Dans le cas de l'ionisation des coumarines, la gaine liquide utilisée est une solution d'acétate d'ammonium dans le méthanol. Le transfert de charges de la gaine liquide ionisée vers l'effluent chromatographique contenant les coumarines est ainsi facilité et engendre des ions constitués chacun de l'ion pseudo-moléculaire et d'une molécule d'ammoniac ; on parle alors d'adduit ammonium. Dans ce cas, les paramètres optimaux retenus afin d'obtenir le meilleur signal sont les suivants : (Cf. [Figure 23](#))

- le débit de l'effluent chromatographique contenant les coumarines est fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$; concernant la gaine liquide, il s'agit d'une solution méthanolique à 60 mM d'acétate d'ammonium, dont le débit est fixé à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$; le débit de gaz assistant la formation du spray est fixé à 0,8 L/min. Le signal correspondant à l'adduit ammonium obtenu avec l'interface à gaine liquide ainsi configuré est alors bien meilleur que le signal obtenu avec une jonction liquide classique. C'est ce que l'on constate à la [Figure 24](#).



[Figure 23](#) : Effet de la concentration et du débit de la gaine liquide sur l'aire des pics²⁸



[Figure 24](#) : Amélioration de la résolution des pics avec l'interface à gaine liquide²⁸

II.4.3. L'analyseur quadripolaire ^{16,17,29 à 33}

Le quadripôle est un analyseur qui utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport m/z . Il est constitué de quatre barres de section hyperbolique auxquelles sont appliquées des tensions électriques variables. Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction.

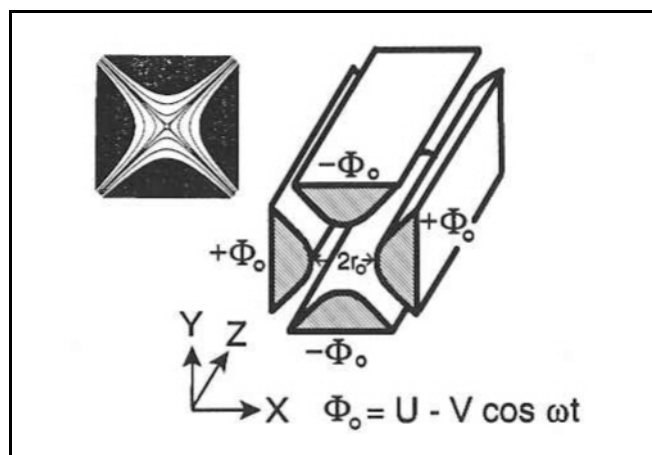


Figure 25 : Schéma d'un analyseur quadripolaire - Lignes d'équipotentiel

Les ions cheminant selon l'axe z sont soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres respectivement des potentiels Φ_0 et $-\Phi_0$:

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \text{ et } -\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t)$$

Dans cette équation, Φ_0 représente la tension appliquée aux barres, ω la fréquence angulaire, U la tension continue et V l'amplitude du voltage alternatif. Typiquement, U variera de 500 à 2000 V et V de 0 à 3000 V.

Les ions pénètrent entre les barres du quadripôle selon l'axe z et conservent leur vitesse suivant cet axe. Mais ils sont soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques :

$$F_u = m \cdot a = m \cdot \frac{d^2 u}{dt^2} = -z \cdot e \cdot \frac{\partial \Phi}{\partial u}$$

Où m est la masse de l'ion, a est son accélération, et $-q = z \cdot e$ est sa charge.

En posant :

$$\xi = \frac{\omega \cdot t}{2} \quad a_u = \frac{8 \cdot z \cdot e \cdot U}{m \cdot r_0^2 \cdot \omega^2} \quad q_u = \frac{4 \cdot z \cdot e \cdot V}{m \cdot r_0^2 \cdot \omega^2}$$

On obtient :

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos(2\xi)) \cdot u = 0$$

Ces équations qui ont été établies par Mathieu en 1866 établissent une relation entre les coordonnées d'un ion et le temps. Tant que x et y , qui mesurent la distance par rapport au centre des barres, restent simultanément inférieurs à r_0 , l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Sinon, il s'y déchargera et ne sera pas détecté.

Pour un quadripôle donné, r_0 est constant. ω est maintenu constant. Ce sont donc U et V qui sont les variables du système. Pour un ion de masse m donnée, on peut déterminer x et y à un instant t en fonction de U et V . Ainsi les zones de stabilité peuvent être représentées dans un diagramme a_u en fonction de q_u .

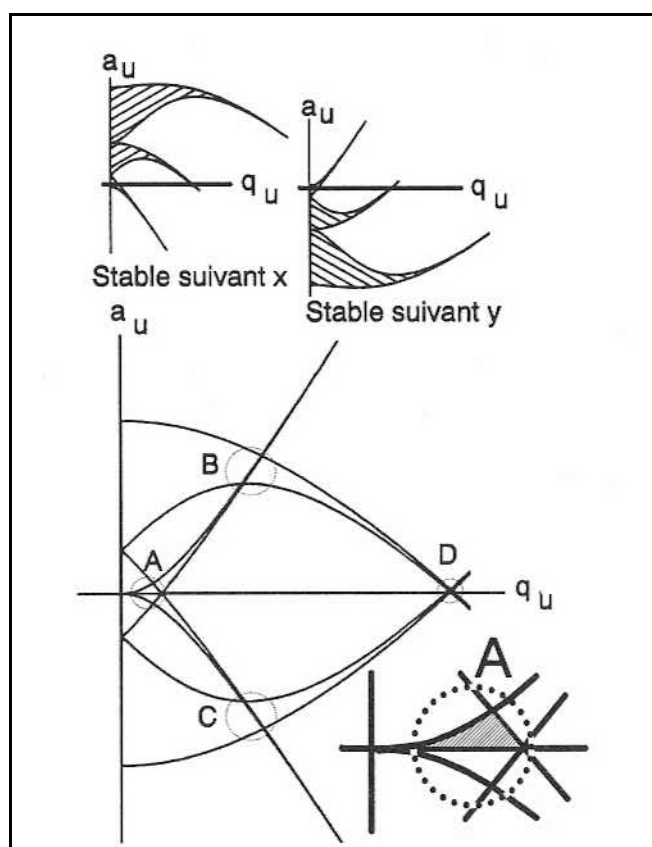
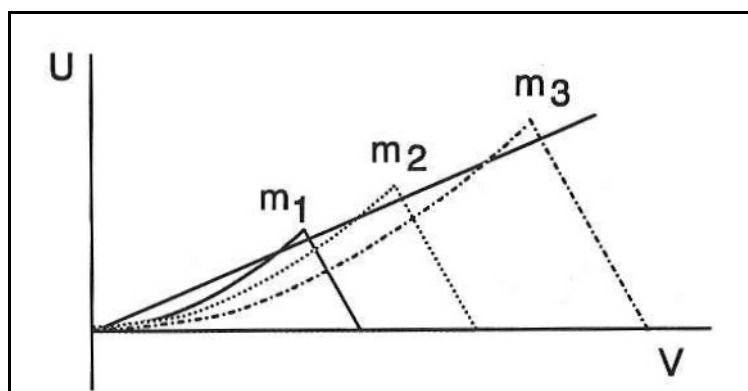


Figure 26 : Zones de stabilité pour un ion de masse m donnée suivant x et y

La zone de stabilité la plus couramment utilisée est la zone A, la partie hachurée correspondant à la zone de stabilité pour un potentiel continu U positif. C'est cette zone de stabilité que nous considérerons par la suite.

En examinant les équations, on voit que passer d'une masse m_1 à une masse m_2 supérieure revient à diviser proportionnellement a_u et q_u tout en maintenant z constant. La zone A positive, qui est une sorte de triangle, évoluera donc d'une masse à l'autre comme des triangles semblables, comme montré à la [Figure 27](#) ($m_1 < m_2 < m_3$) :



[Figure 27](#) : Zones de stabilité en fonction de U et V pour des ions de masses m_i

On voit sur ce diagramme qu'un balayage suivant une droite de rapport U/V constant permet de détecter successivement les différentes masses. La résolution sera d'autant meilleure que la pente est élevée, tant que la droite continue à passer dans les zones de stabilité.

En l'absence de tension continue ($U = 0$) la résolution devient nulle. Mais la valeur de V impose un minimum aux masses stables. Ainsi, si de 0 on augmente V de manière à dépasser tout juste la zone de stabilité pour m_1 , tous les ions de masse inférieure ou égale à m_1 auront une trajectoire instable, et tous ceux de masse supérieure à m_1 une trajectoire stable.

La résolution qu'on peut atteindre en pratique ne permet pas de déduire l'analyse élémentaire, on travaille donc habituellement avec ce type d'analyseur 'à résolution unitaire', en séparant les ions qui diffèrent d'une unité de masse. L'analyseur quadripolaire est un appareil à basse résolution.

La vitesse de balayage pouvant facilement être très élevée, ce type d'analyseur est bien adapté aux couplages chromatographiques.

II.4.4. Le Couplage CLHP – SM^{16,17} (Cf. [Photo 15](#))

Pour analyser un mélange, comme par exemple des produits naturels, une méthode consiste à faire précéder le spectromètre de masse par un système chromatographique de type CLHP. L'intérêt de ce type de système d'analyse est d'obtenir directement le spectre de masse correspondant à un pic chromatographique.

Le problème principal à résoudre est de se débarrasser du solvant de la chromatographie liquide, et de produire des ions en phase gazeuse à partir de molécules préalablement dissoutes.

Pour ce faire, diverses méthodes de couplage existent. On peut notamment citer l'interface à Faisceau de Particules (Particle Beam, PB), l'Introduction Directe Liquide (DLI), la méthode du Bombardement Atomique Véloce à Flux Continu (CF-FAB). Ces méthodes ont le désavantage de nécessiter des débits liquides très faibles en sortie du système chromatographique (5 µl/min). Ces débits sont obtenus en utilisant des colonnes CLHP capillaires, ou en utilisant des colonnes classiques dont le débit de sortie est divisé (split).

D'autres méthodes de couplage acceptant des débits de l'ordre du ml/min existent. Il s'agit de la méthode Thermospray (TSP), de la méthode d'Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI), et de la méthode Electrospray (ESI) ou Ionspray (ISP, électrospray amélioré).

L'introduction de la totalité du débit chromatographique dans le spectromètre de masse améliore la sensibilité de la détection.

II.4.5. La SM en tandem (SM / SM)^{16,17,34 à 37}

La spectrométrie de masse en tandem est une méthode où un premier analyseur sert à isoler un ion 'parent' qui subit ensuite une fragmentation donnant des ions 'fils' et des fragments neutres. Un second spectromètre analyse les ions 'fils'. Un appareil fréquemment utilisé emploie des quadripôles montés en série comme analyseurs. La configuration QQQ indique un appareil à trois quadripôles dans lequel le second constitue la région de réaction (fragmentation).

L'analyse SM/SM peut se faire de trois façons principales :

- Balayage des ions fragments qui consiste à choisir un ion parent et à en déterminer tous les ions fils.
- Balayage des ions précurseurs qui consiste à choisir un ion fils et à en déterminer tous les ions précurseurs.
- Balayage en perte de neutre qui consiste à choisir un fragment neutre et à détecter toutes les fragmentations provoquant la perte de ce neutre.

La spectrométrie de masse en tandem nécessite la fragmentation des ions précurseurs sélectionnés par le premier analyseur pour permettre au second d'analyser les ions fils formés. Le quadripôle central est ainsi configuré en radiofréquences uniquement, et un gaz y est introduit à une pression telle qu'il constitue une cellule de collision des ions (le gaz est la cible fixe). Si le gaz est inerte, on lui transfère de l'énergie en convertissant une fraction de l'énergie de collision en énergie interne. L'ion se fragmentera et les fragments seront analysés par le quadripôle Q3. Si le gaz est réactif, on pourra provoquer des réactions ions-molécules dont les produits de réaction seront analysés par le quadripôle Q3. Dans des cellules de collisions de ce type, les collisions se font à basse énergie (énergie cinétique comprise entre 1 et 100 eV), et le gaz utilisé est en général l'argon, le xénon, ou le krypton, car les gaz plus légers ne permettent pas d'obtenir une énergie transférée aussi importante. Cette méthode de fragmentation des ions est appelée Décomposition des Ions par Collisions (CID).

Références

- 1) R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, "Manuel pratique de chromatographie en phase liquide", Ed. Masson, 2^e édition, Paris, 1982.
- 2) D.C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", Sixième Edition, Editions W.H. Freeman and Company, New York, 2003.
- 3) R.M. Silverstein et F.X. Webster, "Spectrometric identification of organic compounds", Ed. J. Wiley & Sons Inc., 6^e édition, New York, 1998.

Résonance Magnétique Nucléaire

- 4) J.K.M. Sanders et B.K. Hunter, "Modern NMR spectroscopy, a guide for chemists", Ed. Oxford University Press, 2nd Ed., Oxford, 1993.
- 5) G.A. Morris, "Topics in ¹³C NMR spectroscopy", vol 4, ed G.C. Levy, pp 179-196, Ed. J. Wiley & Sons, New York, 1984.
- 6) M.R. Bendall, D.M. Doddrell, D.T. Pegg, et W.E. Hull, "DEPT", Bruker Analytische Messtechnik, Karlsruhe, 1982.
- 7) A. Bax, "Topics in ¹³C NMR spectroscopy", vol 4, ed G.C. Levy, pp 197-238, Ed. J. Wiley & Sons, New York, 1984.
- 8) G.A. Morris, Magn. reson. chem., 1986, vol 24, pp 371-403.
- 9) J. Keeler, Chem. Soc. rev., 1990, vol 19, pp 381-406.
- 10) H. Kessler, M. Gehrke et C. Griesinger, Angew. chem. intl. edn. engl., 1988, vol 27, pp 490-536.
- 11) R.R. Ernst, G. Bodenhausen et A. Wokaun, "Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions", Clarendon Press, Oxford, 1986.
- 12) N. Chandrakumar et S. Subramanian, "Modern techniques in high resolution FT NMR", Springer, New York, 1987.
- 13) J. Cavanagh, C.A. Hunter, D.N.M. Jones, J. Keeler et J.K.M. Sanders, Magn. reson. chem., 1988, vol 26, pp 867-875.
- 14) J. Keeler et D. Neuhaus, J. magn. reson., 1985, vol 63, pp 454-472.
- 15) <http://web.chem.queensu.ca/FACILITIES/NMR/nmr/webcourse/>, site web consulté le 1^{er} mars 2005.

Spectrométrie de Masse

- 16) E. De Hoffmann, J. Charrette et V. Stroobant, "Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés", Ed. Dunod, 2^e édition, Paris, 1999.
- 17) E. De Hoffmann, J. Charrette et V. Stroobant, "Spectrométrie de masse", Ed. Masson, Paris, 1994.
- 18) B.A. Thomsom, J.V. Iribane et P.J. Dziedzic, Anal. Chem., 1982, vol 54, p 2219.
- 19) M. Yamashita et J.B. Fenn, Phys. Chem., 1988, vol 88, p 4451.
- 20) M. Yamashita et J.B. Fenn, Phys. Chem., 1988, vol 88, p 4671.
- 21) R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, C.J. Barinaga et H.R. Udseth, Anal. Chem., 1990, vol 62, p 882.
- 22) J.A. Loo, H.R. Udseth et R.D. Smith, Anal. Biochem., 1989, vol 179, p 404.
- 23) M.G. Ikonomu, A.T. Blades et P. Kebarle, Anal. Chem., 1990, vol 62, p 957.
- 24) M. Mann, Org. Mass Spectrom., 1990, vol 25, p 575.
- 25) P. Kebarle et L. Tang, Anal. Chem., 1993, vol 65, pp 972A-986A.
- 26) A.P. Bruins, T.R. Covery et J.D. Henion, Anal. Chem., 1987, vol 59, p 2647.
- 27) J.D. Henion, Proceeding of the 40th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC, mai 1992, p. 465.
- 28) L. Charles, F. Laure, P. Raharivelomanana et J.-P. Bianchini, "Sheath liquid interface for the normal-phase liquid chromatography / electrospray mass spectrometry combination and its application to the analysis of neoflavonoids", J. Mass Spectrom., 2005, vol 40, n° 1, pp 75-82.
- 29) R.E. Ferguson, K.E. McKulloch et H.M. Rosenstock, J. Chem. Phys., 1965, vol 42, p 100.
- 30) H. Kienitz, "Massenspektrometrie", Verlag Chemie, Weinheim, 1968.
- 31) W. Paul et H.S. Steinwedel, Z. Naturforsch., 1953, vol 8a, p 448.
- 32) R.E. Finnigan, Anal. Chem., 1994, vol 66, p 969A.
- 33) R.E. March et R.I. Hughes, "Quadrupole Storage Mass Spectrometry", Wiley, New York, 1989.
- 34) R. Libert, D. Hermans, J.P. Draye, F. Van Hoof, E. Sokal, et al., Clin. Chem., 1991, vol 37, p 2102.
- 35) R.N. Schwartz, Z.I. Slawsky et K.F. Herzfeld, J. Chem. Phys., 1952, vol 20, p 1591.
- 36) Md.A. Mabud, M.J. DeKrey et R.G. Cooks, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1985, vol 75, p 285.
- 37) R.B. Cody et B.S. Freiser, Anal. Chem., 1979, vol 51, p 547.

III. CONCLUSION

Le *Calophyllum inophyllum* est un arbre riche en métabolites secondaires, les extraits obtenus à partir des diverses parties de la plante sont donc des mélanges complexes de molécules, qui sont difficiles à séparer. Il est donc nécessaire d'utiliser un arsenal de méthodes chromatographiques de séparations (CLBP, CLHP) pour aboutir à l'isolement de molécules pures. Par la suite, les différentes méthodes de spectroscopie moderne (IR, UV, RMN, SM/SM) sont nécessaires pour déterminer les structures moléculaires des molécules isolées.

Les méthodes présentées dans ce chapitre seront ainsi mises en œuvre afin d'arriver aux objectifs que nous nous sommes fixés.

Chapitre IV :
TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV : TRAVAUX PERSONNELS

I. RAPPEL DES OBJECTIFS

Les objectifs que nous nous sommes fixés pour ce travail de thèse peuvent être répartis en trois étapes bien distinctes, dans un ordre bien précis :

- Tout d'abord, identifier les molécules de types triterpène, coumarine et néo-flavonoïde contenues dans les feuilles de Tamanu, qu'elles soient majoritaires et donc probablement déjà connues, ou nouvelles, pour l'espèce *C. inophyllum* ou dans l'absolu. Il semble a priori plus ouvert de découvrir des molécules nouvelles appartenant à la famille des triterpènes, car celle-ci a fait l'objet de moins d'attention de la part des chercheurs que la famille des coumarines, en tout cas en ce qui concerne le Tamanu (Cf. synthèse bibliographique au **Chap. II**). Il est en effet toujours intéressant de décrire de nouvelles structures moléculaires, mais la composition globale des extraits de feuilles de Tamanu de Polynésie française est également digne d'être établie, ce qui n'a encore jamais été fait.
- Ensuite, mettre au point une méthode analytique rapide et efficace permettant d'identifier les molécules isolées lors de l'étape précédente. A ce sujet, nous nous orienterons vers la famille des coumarines, qui sont plus faciles à détecter en CLHP que les triterpènes, puisque les coumarines absorbent dans le domaine de l'Ultra-Violet, ce qui n'est pas le cas des triterpènes. De plus, les coumarines sont plus intéressantes du point de vue de leur utilisation éventuelle en pharmaceutique, puisque certaines d'entre elles ont une bioactivité reconnue, notamment dans la lutte contre le HIV (Cf. **Chap II**).
- Enfin, utiliser la méthode analytique mise au point dans deux optiques : Tout d'abord identifier les individus les plus riches en molécules intéressantes dans le domaine médical ; une exploitation de ces arbres pourraient être une bonne alternative aux voies de synthèses difficiles et coûteuses à mettre en œuvre, si les rendements d'extraction de la matière végétale sont satisfaisants. Ensuite recueillir les données chimiques nécessaires à une étude de la biodiversité du Tamanu en Polynésie française, afin de connaître l'étendue de celle-ci, et de la préserver le cas échéant.

II. COLLECTE ET TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL

II.1. Matériel végétal destiné à l'isolement des métabolites des feuilles

II.1.1. Echantillonnage

Pour cette première étape qui consiste à isoler les molécules pures présentes dans les feuilles de Tamanu, nous travaillons sur des quantités assez importantes de matériel végétal, afin de pouvoir atteindre les molécules les moins abondantes. Par ailleurs, cet échantillon important de feuilles est issu d'arbres poussant sur différents sites des îles de la Société, ce qui permet d'avoir une représentativité globale de la composition des Tamanu dans cet archipel, et d'écarter une éventuelle composition spéciale d'un individu particulier.

Les feuilles ramassées sont d'abord séchées afin d'améliorer leur extraction (rendements meilleurs sur feuilles sèches, et eau difficile à éliminer des extraits par la suite).

Notre échantillon est alors constitué de la manière suivante : (masses de feuilles sèches)

- 520 grammes de feuilles d'un individu de la côte ouest de Moorea,
- 360 grammes de feuilles d'un premier individu de Pueu, à Tahiti,
- 500 grammes de feuilles d'un second individu de Pueu, à Tahiti,
- 580 grammes de feuilles d'un individu de l'hôtel Bali Hai, à Huahine,
- 140 grammes de feuilles d'un individu de la pointe Miri Miri, à Raiatea,

soit en tout 2100 grammes de matériel végétal.

Ces cinq sous-échantillons ont été récoltés entre novembre 2001 et février 2002, et séchés puis extraits au fur et à mesure de leur arrivée au laboratoire.

II.1.2. Extractions au Soxhlet

Les cinq sous-échantillons de feuilles ont tous été extraits trois fois, avec trois solvants différents : d'abord l'hexane, puis l'acétate d'éthyle, et enfin le méthanol. On a ainsi commencé par le solvant le moins polaire (hexane) pour finir par le solvant le plus polaire (méthanol).

Par la suite, on travaillera sur les extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle, qui sont supposés contenir les molécules intéressantes que sont les triterpènes, les coumarines, et les néo-flavonoïdes (Cf. **Chap. II**).

On obtient les extraits suivants après évaporation à sec du solvant :

Masses / Extraits	Moorea	Pueu 1	Pueu 2	Huahine	Raiatea	Total
Feuilles (g)	520	360	500	580	140	2100
Extrait Hexane (g)	9,5	3,5	3	7	1,5	24,5
Extrait Acétate (g)	12	32	37	37	22	140

Tableau 6 : Résultats des extractions des échantillons importants de feuilles de Tamanu

Remarque : Les rendements d'extraction varient de manière significative en fonction des échantillons.

Tous les extraits à l'hexane sont regroupés, ainsi que tous les extraits à l'acétate d'éthyle. Les différentes CLHP préparatives seront effectuées à la fois sur l'extrait à l'hexane et sur l'extrait à l'acétate d'éthyle.

II.2. Matériel végétal destiné à l'étude de la biodiversité

II.2.1. Les échantillons de feuilles

a) Echantillonnage

Contrairement à l'échantillonnage effectué pour la partie 'isolement des molécules', l'échantillonnage destiné à l'étude de la biodiversité sera très diversifié, mais chaque échantillon sera en faible quantité, juste nécessaire pour effectuer une CLHP analytique représentative de la composition moyenne des feuilles de l'arbre. (dix feuilles par arbre environ)

L'ambition de cette étude est d'étudier la biodiversité du Tamanu sur les cinq archipels de Polynésie française, c'est à dire de mettre en évidence des différences ou des similitudes entre des arbres d'un même peuplement, d'une même île, d'un même archipel, ou finalement sur l'ensemble des îles de Polynésie française. C'est pourquoi nous avons, dans la mesure du possible, collecté une dizaine d'échantillons de feuilles par île, sur plusieurs îles de chaque archipel. (Société, Tuamotu, Marquises, Australes, Gambier)

Îles échantillonnées par archipel : (nombre d'échantillons)

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).

Par ailleurs, à titre de comparaison, des échantillons étrangers à la Polynésie française ont été récoltés : (nombre d'échantillons)

Hawaii(4), Fidji(1).

Au total, 143 échantillons de feuilles de Tamanu ont été collectés pour réaliser cette étude statistique sur la biodiversité de la plante en Polynésie française.

Un tableau récapitulatif de tous les échantillons et de leur description précise peut être consulté en [Annexe 3](#).

b) Micro méthode d'extraction

Ces 143 échantillons de feuilles sont tous séchés et extraits de la même façon, de manière à obtenir des résultats d'analyses qui seront indépendants de ces deux étapes de traitement des échantillons. Les feuilles sèches sont extraites à l'acétate d'éthyle.

Les rendements des différents extraits sont donnés dans le tableau suivant :

Echantillon	Rendement(%)	Echantillon	Rendement(%)	Echantillon	Rendement(%)	Echantillon	Rendement(%)
Bora Bora 1	5,3	Moorea 1	6,9	Raiatea 8	5,5	Tahiti 3	4,5
Bora Bora 2	5,7	Moorea 2	5,1	Raiatea 9	5,0	Tahiti 4	5,2
Bora Bora 3	6,3	Moorea 3	5,6	Raivavae 1	2,7	Tahiti 5	6,8
Fiji Viti Levu	6,5	Moorea 4	6,1	Raivavae 2	5,2	Tahiti 6	5,4
Hao 1	5,9	Moorea 5	6,2	Raivavae 3	6,4	Tahiti 7	6,4
Hao 2	5,2	Moorea 6	4,6	Raivavae 4	3,4	Tahiti 8	5,4
Hao 3	6,3	Moorea 7	6,0	Rangiroa 1	5,2	Tahiti 9	5,5
Hao 4	6,9	Moorea 8	6,2	Rangiroa 2	4,9	Tahuata 1	5,7
Hawaii Big Island 1	5,2	Moorea 9	5,6	Rangiroa 3	4,5	Tahuata 2	6,5
Hawaii Maui 1	4,0	Moorea 10	7,0	Rangiroa 4	5,8	Tahuata 3	5,5
Hawaii Oahu 1	5,3	Moorea 11	8,6	Rangiroa 5	5,2	Tahuata 4	5,3
Hawaii Oahu 2	8,0	Moorea 12	7,6	Rangiroa 6	3,9	Tahuata 5	8,1
Hiva Oa 1	5,8	Motane 1	7,2	Rangiroa 1 b	5,1	Tahuata 6	7,0
Hiva Oa 2	9,1	Motane 2	5,3	Rangiroa 2 b	6,6	Tahuata 7	6,4
Hiva Oa 3	11,1	Motane 3	6,3	Rangiroa 3 b	6,7	Tahuata 8	6,5
Hiva Oa 4	10,7	Motane 4	5,1	Rangiroa 4 b	5,8	Tahuata 9	5,9
Hiva Oa 5	7,9	Motane 5	5,5	Rangiroa 5 b	7,2	Tahuata 10	7,7
Hiva Oa 6	10,3	Motane 6	5,2	Rangiroa 6 b	5,1	Tetiaroa 1	4,7
Hiva Oa 7	9,8	Nuku Hiva 1	2,8	Rangiroa 7	6,2	Tetiaroa 2	3,7
Hiva Oa 8	8,8	Nuku Hiva 2	6,6	Rangiroa 8	5,9	Tetiaroa 3	5,9
Hiva Oa 9	7,7	Nuku Hiva 3	5,9	Rangiroa 9	5,5	Tetiaroa 4	5,0
Hiva Oa 10	6,9	Nuku Hiva 4	4,8	Rangiroa 10	6,2	Tetiaroa 5	4,5
Hiva Oa 11	6,3	Nuku Hiva 5	6,1	Rurutu 1	7,5	Tetiaroa 6	5,0
Hiva Oa 12	6,9	Nuku Hiva 6	6,1	Rurutu 2	6,1	Tetiaroa 7	4,9
Hiva Oa 13	6,7	Nuku Hiva 7	6,5	Rurutu 3	10,1	Tetiaroa 8	4,7
Hiva Oa 14	8,0	Nuku Hiva 8	6,8	Rurutu 4	5,4	Tetiaroa 9	4,5
Mangareva 1	5,6	Nuku Hiva 9	6,6	Rurutu 5	4,4	Tetiaroa 10	4,8
Mangareva 2	5,8	Nuku Hiva 10	6,3	Tahaa 1	5,9	Tetiaroa 11	5,4
Manihi 1	4,6	Nuku Hiva 11	5,7	Tahaa 2	5,4	Tubuai 1	3,3
Manihi 2	4,7	Nuku Hiva 12	4,6	Tahaa 3	5,3	Tubuai 2	6,8
Maupiti 1	5,7	Nuku Hiva 13	5,0	Tahaa 4	5,3	Tubuai 3	5,1
Maupiti 2	6,6	Raiatea 1	5,3	Tahaa 5	4,6	Ua Huka 1	4,5
Maupiti 3	5,2	Raiatea 2	4,6	Tahaa 6	5,7	Ua Huka 2	4,7
Maupiti 4	5,4	Raiatea 3	4,7	Tahaa 7	6,7	Ua Huka 3	5,8
Maupiti 5	6,5	Raiatea 4	5,2	Tahiti 1	4,9	Ua Huka 4	5,8
Maupiti 6	6,2	Raiatea 5	4,0	Tahiti 2	5,7		

Tableau 7 : Rendements d'extraction des échantillons de feuilles de Tamanu

Ces données pourront être utilisées dans l'étude de la biodiversité du Tamanu (Cf. § IV.2.2.). Les extraits ainsi obtenus ne peuvent pas être injectés tels quels dans le système chromatographique analytique CLHP qui est utilisé (Cf. § IV.2.1.). En effet, ces échantillons bruts contiennent beaucoup de molécules, de polarités très différentes, dont on ne sait pas si elles seront toutes éluées par le système chromatographique. Certaines pourraient ainsi rester sur la colonne de silice à cause de leur trop grande polarité, s'accumuler, et finir par boucher la colonne. Par ailleurs, d'autres impuretés végétales résiduelles pourraient elles aussi boucher le fritté situé en entrée de colonne. C'est pourquoi tous les extraits bruts obtenus subissent une étape de purification sur sep-pak silice.

II.2.2. Les échantillons d'amandes

a) Echantillonnage

Le nombre d'échantillons d'amandes de Tamanu recueillis s'élève à 26. Ce plus faible nombre d'échantillons d'amandes par rapport au nombre d'échantillons de feuilles (143) peut s'expliquer de la façon suivante :

- tous les arbres ne sont pas en période de fructification exactement en même temps, ce qui explique que certains arbres ne portaient pas de fruits au moment de la récolte (il y a en général deux fructifications par an, Cf. **Chap. I**) ;
- certains arbres portaient trop peu de fruits, alors qu'il est nécessaire d'avoir un minimum de 100 g d'amandes sèches pour pouvoir obtenir de l'huile à l'aide de la presse utilisée ;
- enfin certains arbres voisins d'un même peuplement voient leurs graines se mélanger au sol, ce qui ne permet pas de récolter les graines d'un seul individu, alors que ceci est plus intéressant pour l'étude statistique. (les graines sont toujours ramassées au sol et non cueillies sur l'arbre, afin d'avoir une certaine homogénéité au niveau de leur maturité) Toutefois, certains échantillons constitués des graines de plusieurs arbres voisins sont conservés pour l'étude de la biodiversité, faute de mieux.

Ces 26 échantillons ont été récoltés dans 4 archipels de Polynésie française par nos soins et parfois avec l'aide ou par des agents du SDR. (Service du Développement Rural polynésien)

b) Obtention des échantillons d'huile par pressage des amandes

Les endocarpes des fruits collectés par nos soins et avec l'aide du SDR ont été cassés au marteau afin de récupérer les amandes, qui ont ensuite été séchées au soleil pendant trois semaines puis pressées afin d'obtenir l'huile. La comparaison des résultats obtenus au sein de ce groupe d'échantillons (qu'on appellera 'laboratoire') permettra ainsi de déterminer s'il existe des différences notables entre les huiles provenant d'arbres différents, et donc de déterminer s'il existe des individus particuliers, des peuplements particuliers, ou encore des îles particulières quant aux caractéristiques de l'huile de Tamanu qu'ils fournissent. Ces différences seront alors uniquement dues à la provenance des graines, puisque le protocole d'obtention de l'huile est contrôlé et identique pour tous les échantillons traités (Cf. [Annexe 4](#) pour les caractéristiques précises de chaque échantillon).

Les huiles fournies par le laboratoire IAA du SDR proviennent toutes du même échantillon de graines qui ont pour origine l'île de Maupiti. Ces graines ont été séparées en huit lots, et les amandes de chacun des lots ont été séchées et pressées selon des conditions différentes de séchage (au soleil pendant des durées différentes ou au four à différentes températures) et de pressage (à des températures différentes) ; ceci afin de pouvoir mettre en évidence l'influence éventuelle de ces deux étapes de fabrication sur la qualité de l'huile, sans qu'il y ait d'interférences avec d'autres paramètres comme la provenance des graines (Cf. [Annexe 5](#) pour les caractéristiques précises de séchage et de pressage de chaque échantillon).

A la suite de ces étapes de traitement du matériel végétal, nous avons obtenu 26 huiles de Tamanu provenant de diverses îles de Polynésie française, ainsi que 8 huiles provenant toutes du même échantillon de graines ayant pour origine l'île de Maupiti, dans l'archipel de la Société.

Les producteurs d'huile de Tamanu nous ont quant à eux fourni tout une série d'échantillons d'huile dont on connaît la provenance (en général une île) et la personne qui les a produits. Ces échantillons nous permettront, d'une part, de compléter les résultats obtenus avec les échantillons scientifiques du laboratoire quant à la particularité potentielle d'une huile de provenance précise (par île, et non plus par individu ou peuplement), et d'autre part de mettre en évidence une relation entre le procédé de fabrication de l'huile (spécifique à chaque producteur) et certaines de ses caractéristiques chimiques.

Par ailleurs, quelques échantillons commerciaux d'huile de Tamanu produits en Polynésie française ont été collectés, mais leur intérêt est bien moindre puisqu'ils résultent souvent de mélanges de graines de différentes provenances, qui sont de plus inconnues.

Enfin, des échantillons d'huiles produites hors de Polynésie française ont pu être trouvées, ils pourront nous servir à montrer si oui ou non l'huile de Tamanu produite en Polynésie française a des particularités spécifiques que l'on ne retrouve pas ailleurs (mais ils sont eux aussi le fruit de mélanges indéterminés, donc l'étendue des conclusions éventuelles sera assez faible).

Une liste de tous les échantillons recueillis (69 en tout), classés par groupe, est donnée en [Annexe 4](#). Le tableau présenté indique également brièvement la provenance et le type d'échantillonnage de chaque échantillon d'huile.

II.3. Conclusion

Une collecte massive de feuilles de Tamanu (plusieurs kg) a été effectuée dans le but d'isoler des molécules pures (triterpènes et coumarines) en quantités suffisantes pour pouvoir déterminer leur structure moléculaire.

Par ailleurs, un échantillonnage très important de feuilles de Tamanu a été mis en œuvre afin d'étudier la biodiversité de la plante en Polynésie française. Le maximum d'échantillons (10 g de feuilles par arbre) ont ainsi été récoltés dans un maximum d'îles de tous les archipels de Polynésie. On obtient ainsi environ 1 g d'extrait par échantillon, ce qui sera largement suffisant pour son analyse en CLHP.

Pour compléter cette étude sur la biodiversité, un échantillonnage d'amandes ou directement d'huiles de Tamanu a également été effectué. Les huiles obtenues par pressage des graines sèches seront analysées en CPG afin de connaître leurs teneurs en acides gras.

Des analyses statistiques des données CLHP-UV et CPG recueillies permettront d'étudier la biodiversité du Tamanu en Polynésie française.

III. ISOLEMENT ET DETERMINATION STRUCTURALE DES METABOLITES

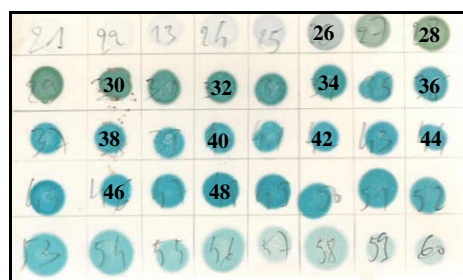
III.1. Séparations chromatographiques préliminaires

On commence par s'occuper des extraits de feuilles de Tamanu obtenus au soxhlet avec l'hexane. On effectue deux colonnes chromatographiques liquides à basse pression (CLBP n°1 et 2), sur lesquelles on dépose en tout 11 g d'extrait. Les fractions recueillies avec chacune des deux colonnes sont analysées en CCM afin de regrouper les fractions similaires. On obtient finalement 18 fractions pour la première colonne et 17 fractions pour la seconde (Cf. [Figure 31](#) et [Annexe 6](#) pour le détail des fractions).

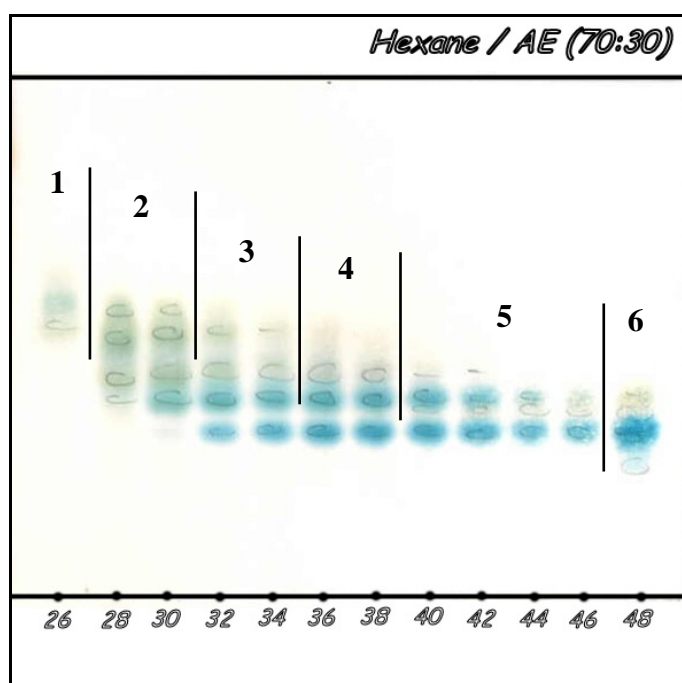
On traite ensuite les extraits de feuilles de Tamanu obtenus au soxhlet avec l'acétate d'éthyle. On va cette fois traiter de plus grandes quantités de matière, afin d'obtenir au final le plus possible de molécules pures. On dispose de 140 g d'extraits à l'acétate d'éthyle de différents échantillons. Ces extraits sont mis en commun et chromatographiés sur deux précolonnes de silice et on recueille uniquement 3 fractions par colonne : une fraction obtenue avec un mélange hexane / acétate d'éthyle 85:15, une fraction obtenue avec 100 % d'acétate d'éthyle, et une fraction obtenue avec 100 % de méthanol. Ce sont les fractions à l'acétate d'éthyle 100 % qui nous intéressent, car elles contiennent les molécules de polarité moyenne que nous recherchons, et elles sont les plus abondantes (m = 14,9 et 13,5 g).

Les fractions à l'acétate d'éthyle sont ensuite chromatographiées sur deux nouvelles colonnes de silice identiques aux colonnes n°1 et 2 précédentes.

La colonne n°3 fournit 154 tubes, et on réalise des CCM analytiques sur un tube sur deux (éluant : hexane / acétate d'éthyle [70:30]). Une partie de ces CCM analytiques sont présentées ci-dessous :



[Figure 28](#) : CCM sans migration



[Figure 29](#) : CCM avec migration (Hex/AE [70:30])

Les plaques CCM sont révélées à la vanilline sulfurique : les spots bleus et verts correspondent à des alcools ou à des cétones. Les tubes dont les spots sont bleus ou verts sont donc très intéressants car ils sont susceptibles de contenir des coumarines, ou des triterpènes fonctionnalisés. Les tubes qui sont les plus semblables sont mélangés pour former 11 groupes. Il en va de même pour la colonne n°4, qui est réalisée dans les mêmes conditions. A l'aide des CCM, on peut donc mélanger les groupes identiques provenant de chacune des colonnes. On obtient donc finalement 11 groupes à la suite des colonnes n°3 et 4, dont les masses sont obtenues par aliquotes ([Tableau 8](#) et [Figure 31](#)). Le rendement global est de 67 % avant lavage des colonnes au méthanol.

Colonnes de silice n°3 et 4				
Dépôt solide : 14,9 et 13,5 g d'extrait à l'acétate d'éthyle et 2 x 30 g de SiO ₂				
Groupe n°	Tubes colonne n°3	Tubes colonne n°4	Masse (g)	Révélation
1	1 à 26	1 à 21	1,76	Vert très pâle
2	27 à 30	22 à 32	1,41	Vert
3	31 à 35	33 à 37	1,37	Bleu-vert
4	36 à 39	38 à 41	0,77	Bleu
5	40 à 46	42 à 46	1,20	Bleu
6	47 à 51	47 à 56	1,64	Bleu
7	52 à 64	57 à 67	2,47	Bleu pâle
8	65 à 76	68 à 78	2,24	Vert pâle
9	77 à 84	79 à 87	1,06	Vert très pâle
10	85 à 130	88 à 106	3,25	Incolore
11	131 à 154	107 à 136	1,81	Incolore

Tableau 8 : Détails de formation des groupes des colonnes n°3 et 4

Une CCM analytique de contrôle réalisée dans les mêmes conditions (hexane / acétate d'éthyle [70:30]) montre bien que chaque groupe est différent, mais aussi que certains d'entre eux sont très proches de leurs voisins ([Figure 30](#)). Les groupes les plus ressemblant en CCM sont les groupes 3 et 4, ainsi que les groupes 5 et 6. Le groupe 3 et le groupe 5 seront ainsi mis de côté pour les chromatographies préparatives ultérieures, puisque les molécules qu'ils contiennent sont déjà présentes dans d'autres groupes (respectivement 4 et 6).

Remarque : les groupes 1, 10 et 11 ne sont pas ou très peu révélés par la vanilline sulfurique, on en déduit donc qu'ils ne contiennent pas de molécules portant des fonctions alcool ou cétone ; ces groupes sont donc a priori moins intéressants que les 8 autres, et seront traités dans un deuxième temps.

Finalement, on s'intéressera donc en premier aux groupes 2, 4, 6, et 7 (les groupes 8 et 9 sont bien révélés, mais donnent des spots qui ne sont ni bleus ni verts).

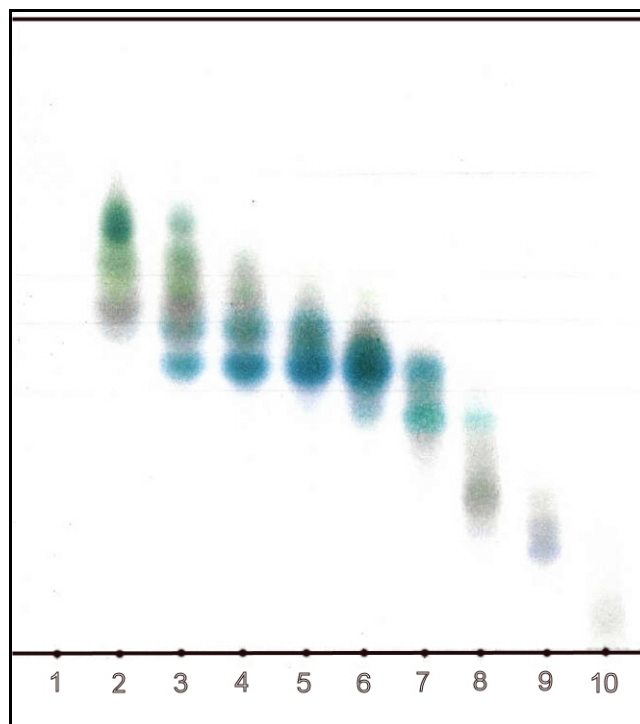


Figure 30 : CCM analytique des 10 premiers groupes issus des colonnes n°3 et 4

Un schéma récapitulatif présenté ci-après à la **Figure 31** donne une vision générale de toutes les chromatographies, analytiques ou préparatives, qui nous ont permis d'obtenir des molécules pures dans des quantités suffisantes pour les identifier par RMN. Par ailleurs, le **Tableau 9** permet de retrouver le chemin d'obtention des différentes molécules pures isolées.

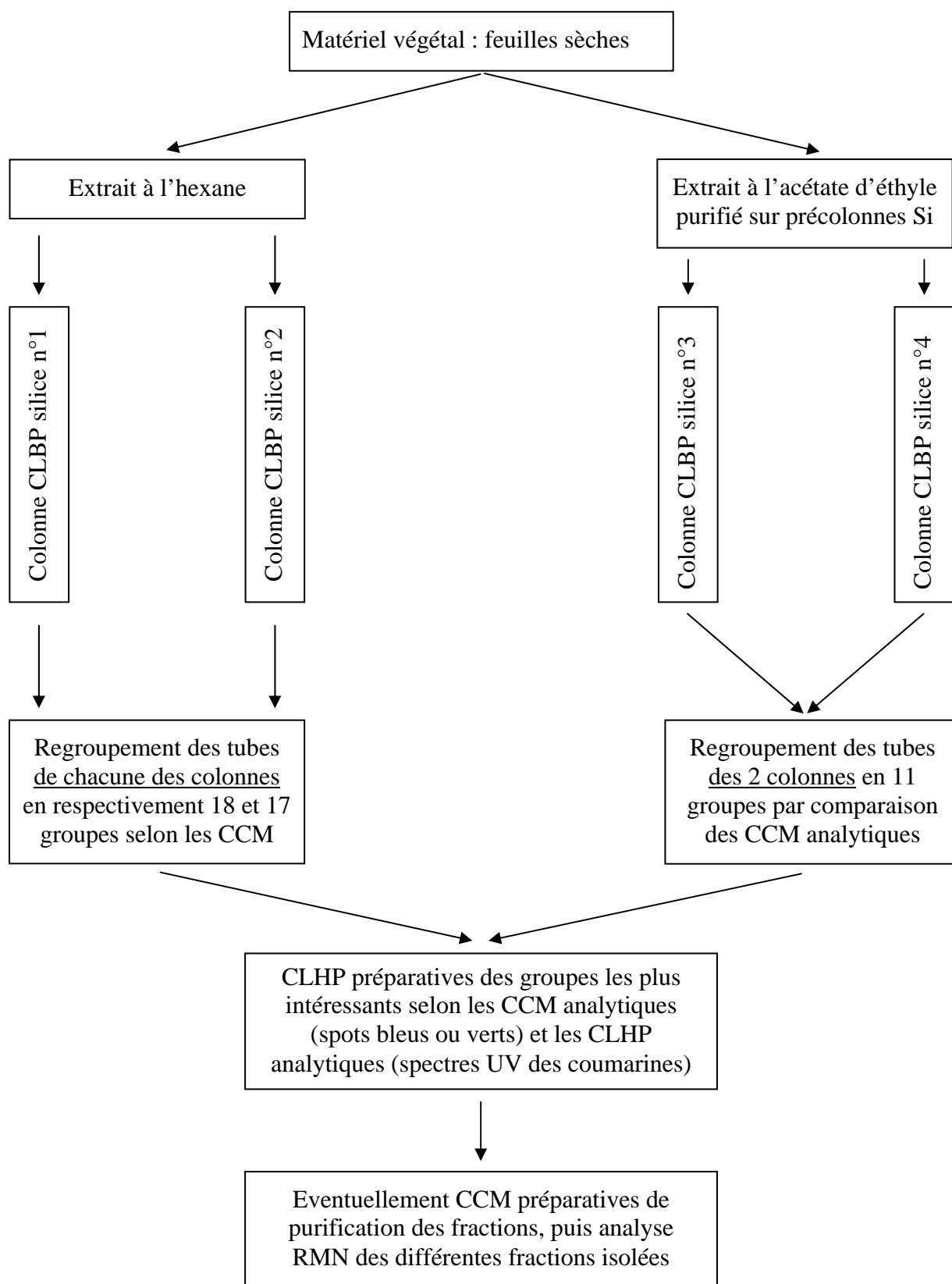


Figure 31 : Schéma des différentes étapes permettant d'isoler des molécules pures

Colonne CLBP	Groupe CLBP	Fraction CLHP	Produits
1	8	cristaux	Canophyllol
	9	1 + 2	Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque
		4 + 5	Calophyllolide
	12	2	Acide 3-oxo-27-hydroxyacétate friedelan-28-oïque
		3	Acide 27-hydroxyacétate canophyllique
		4	Inophyllum P
		5	Inophyllum B
	13	3	Acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque
		4 + 5	Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque
		7	Acide 27-hydroxyacétate canophyllique
		7 + 9	Inophyllum P
		8	Inophyllum B
		9 + 10	Inophyllum C
	14	10 + 11	Inophyllum F1 + F2
		2 + 3	Inophyllum C
	2	6	2
6			Calophyllolide
7		1	Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque
		7	Inophyllum P
3 + 4	1	1 + 6	Friedeline
		2	Inophyllum C
		5 + 6	Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque
	2	3	Friedeline
		2 + 4	Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque
		3 + 4	Canophyllol
		5 + 7	Calophyllolide
	4	3 + 4	Calophyllolide
		8 + 9	Inophyllum P
	6	5 + 7	Inophyllum F1 + F2
		7 + 8	Acide calophyllique
		8	Inophyllum C
	7	3 + 6	Inophyllum C

Tableau 9 : Chemin d'obtention des molécules pures isolées

III.2. Les triterpènes

Les triterpènes sont des molécules qui sont très abondantes dans de nombreuses familles végétales, et notamment la famille des Clusiaceae. On retrouve ainsi la friedeline dans beaucoup d'espèces du genre *Calophyllum*, comme par exemple *gracilipes*, *lankaensis*, *thwaitesii*, *calaba*, et *inophyllum*. En ce qui concerne le Tamanu, qui est l'espèce *inophyllum*, d'autres triterpènes entrent dans sa composition ; on peut citer, outre la friedeline, le canophyllol et l'acide canophyllique (Cf. **Chap. II**). On peut ainsi penser que cet arbre est susceptible de contenir d'autres molécules de la même famille n'ayant pas encore été découvertes.

Nombre de ces molécules à structure triterpénique ont montré des activités biologiques antibactérienne et antifongique, sur un certain nombre de souches (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, etc... pour les bactéries, et *Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus niger*, etc... pour les champignons, Cf. **Chap. II**). Ceci rend les recherches sur ces molécules d'autant plus intéressantes.

III.2.1. CCM analytiques avec révélation à la vanilline sulfurique

La principale caractéristique qui différencie les triterpènes des coumarines en ce qui concerne la CLHP, est que les triterpènes n'absorbent pas dans le domaine de l'UV. On ne peut donc pas faire de CLHP analytiques qui utilisent un détecteur UV-DAD. Les seuls contrôles analytiques qu'il est possible de réaliser sur des fractions contenant des triterpènes, sont donc des CCM, avec non pas une détection à la lampe UV, mais avec une détection à la vanilline sulfurique, qui détecte les alcools et les cétones (ou au permanganate de potassium, qui est un révélateur universel). Cette technique analytique est bien sûr moins précise et moins reproductible, mais c'est la seule qui soit à notre disposition, mis à part évidemment la RMN qui nous indiquera au final la pureté et la composition de chaque fraction. (Cf. § III.1. pour des exemples de CCM analytiques)

III.2.2. CLHP préparatives avec détection réfractométrique et DDL

De la même façon que pour les CLHP analytiques, on ne peut pas faire non plus de CLHP préparative à détection UV. Restent disponibles les détecteurs réfractométrique et à diffusion de lumière (DDL). Ce sont tous les deux des détecteurs universels, qui détectent a priori toutes les molécules qui sortent de la colonne autres que le solvant. (Cf. § I.4.)

Le détecteur réfractométrique a cependant un inconvénient majeur, c'est qu'il ne peut être utilisé qu'avec une méthode chromatographique isocratique, c'est à dire avec un éluant de composition fixée (le changement de composition de l'éluant fait varier de manière importante l'indice de réfraction).

Ce problème n'existe pas avec le DDL puisque le solvant est évaporé ; les molécules non volatiles sont ensuite vaporisées, elles diffusent un rayon lumineux, dont la variation d'intensité produit un signal électrique.

Malgré tout, les premières CLHP préparatives sont réalisées avec le détecteur réfractométrique, puisque nous ne disposons pas encore du DDL ; ce qui veut dire que la méthode utilisée est isocratique, la polarité du solvant étant choisie en fonction de la polarité de la fraction à chromatographier. Pour le groupe 12 issu de la colonne CLBP n°1 que nous prendrons comme exemple, le solvant utilisé est un mélange iso-octane / acétate d'éthyle (85:15).

Dans ces conditions, on sépare facilement 5 pics. Cette chromatographie est répétée une dizaine de fois, et les pics identiques de chaque chromatographie sont mélangés. Les 5 fractions obtenues sont purifiées sur CCM préparatives [hexane / dioxane (60:40)] avant d'être envoyées à la RMN pour déterminer la structure des molécules ainsi isolées. La fraction FL35 issue du pic n°2 est alors identifiée comme étant un nouveau triterpène, l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**66**) :

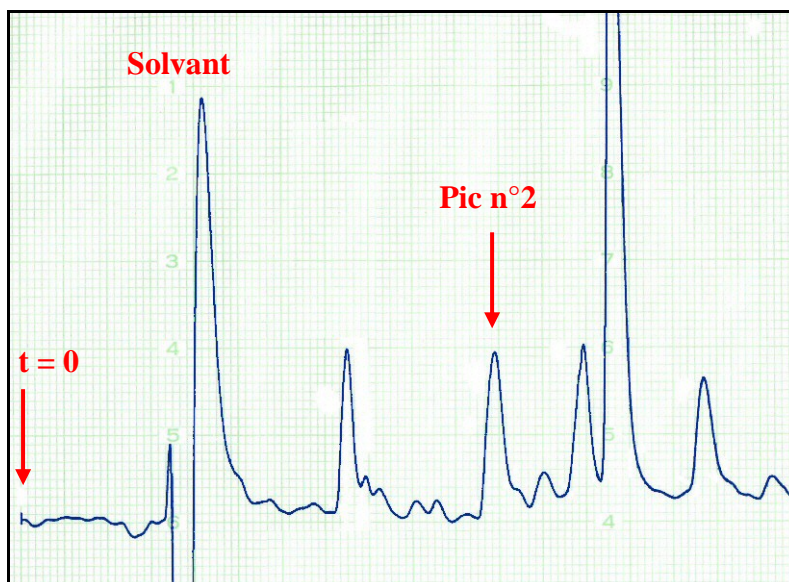
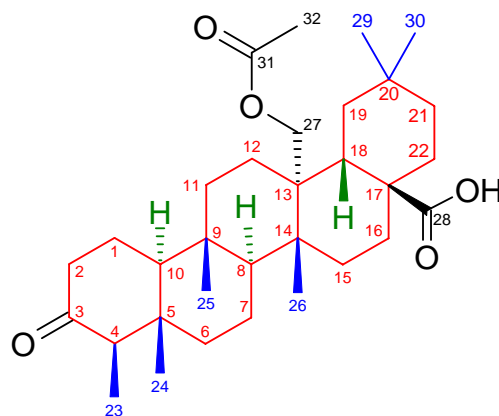


Figure 32 : Chromatogramme réfractométrique du groupe n°12 issu de la CLBP n°1



(85) Acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque

Tous les autres triterpènes sont obtenus dans des conditions similaires, à l'exception des derniers isolés, dont les signaux en CLHP préparative sont détectés avec le DDL. Dans ce cas, une méthode d'éluion en gradient de solvants est préférée (on utilise toujours l'iso-octane et l'acétate d'éthyle), car la séparation des différents pics est meilleure.

III.2.3. Etude structurale

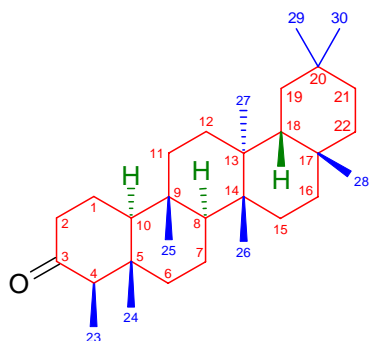
Toutes les molécules de cette famille ont une structure commune qui est dite triterpénique, c'est à dire à 30 atomes de carbone. Tout comme la friedeline, la majorité de ces molécules ont une structure pentacyclique, qui comporte en outre des groupements méthyles au nombre de 8, oxydés ou non en alcool, en acide carboxylique, ou en acétate. Cependant, il existe des triterpènes qui ont une structure tétracyclique, comportant également 8 groupements méthyles oxydés ou non. On peut donc tirer des caractéristiques générales que l'on retrouvera pour chacun des triterpènes rencontrés.

En ce qui concerne le spectre Ultra-Violet, ces molécules sont peu ou pas absorbantes, car elles ne possèdent pas de système π conjugué. Le spectre Infra-Rouge permet de repérer les fonctions chimiques présentes comme les groupements cétone, alcool, acide carboxylique, acétate, etc...

En RMN, on remarque facilement la présence des groupements méthyles non oxydés, par la réalisation d'un spectre du proton ^1H , sur lequel les groupes méthyles sortent sous forme de singulets entre 0,7 et 1,2 ppm, et d'un doublet ou d'un triplet entre 0,8 et 0,9 ppm, avec une multiplicité de trois protons. Par ailleurs, la RMN du carbone ^{13}C nous permet de bien mettre en évidence les 30 atomes de carbone qui constituent le squelette de la molécule, et en particulier les groupements carbonyles, acide carboxylique et alcool, par leurs déplacements chimiques spécifiques (environ 210 ppm pour un carbonyle, 170 ppm pour un acide carboxylique, et 70 ppm pour un alcool).

a) Triterpènes connus

Les triterpènes sont des molécules qui entrent dans la composition de nombreuses espèces du règne végétal. Cependant, le *Calophyllum inophyllum* n'a pas fait l'objet de beaucoup d'investigations en ce qui concerne cette famille de molécules. Nous présentons ici les triterpènes déjà décrits que nous avons isolés des extraits de feuilles de Tamanu.

a)1. La friedeline (73)

(73) Friedeline

Nous avons obtenu la friedeline par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où la friedeline a été identifiée : FL104, FL429, FL435)

Cette molécule cristallise sous forme d'aiguilles blanches, son point de fusion est de 263°C, et son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -28^\circ$ dans le chloroforme. Sa formule brute est $C_{30}H_{50}O$, et sa masse molaire est de $426 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C réalisés sur les différentes fractions disponibles ont révélé la présence de friedeline (73) dans les extraits de feuilles de Tamanu de Polynésie française. En effet, le spectre du carbone nous permet de détecter un squelette à 30 atomes de carbone. On remarque en particulier un signal à $\delta = 213,43$ ppm caractéristique d'un groupement $\text{C}=\text{O}$. De plus la comparaison de tous les déplacements chimiques du spectre du carbone obtenu à ceux indiqués dans la littérature nous permet de conclure que nous sommes bien en présence de friedeline (Cf [Tableau 10](#)). Par ailleurs, le spectre du proton vient confirmer cette conclusion, en mettant en évidence la présence de 8 groupements méthyle, dont 1 sous forme d'un doublet à $\delta = 0,87$ ppm de constante de couplage égale à 6,6 Hz, correspondant aux trois protons portés par le carbone C-23. (Cf. [Tableau 10](#) et [Spectre 1](#))

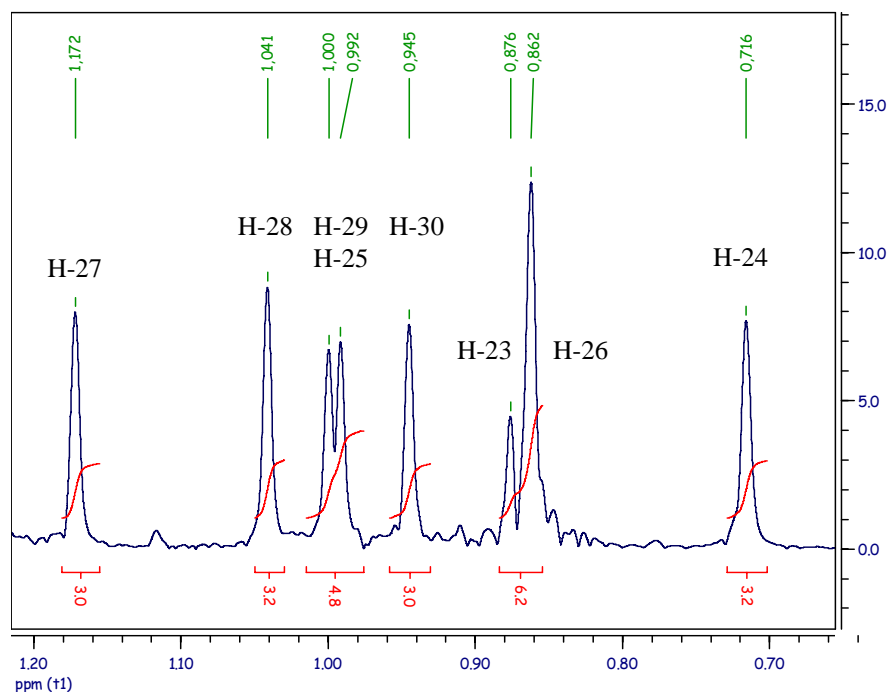
Remarque : Les signaux correspondant aux protons éthyléniques $-\text{CH}_2-$ n'ont pas été attribués à cause de la complexité et de la superposition des différents signaux, qui sortent entre 1,5 et 2,5 ppm.

La friedeline est une molécule très commune dans le règne végétal. Elle a été isolée pour la première fois en 1899 des écorces du chêne liège¹¹, et ses structure et stéréochimie ont été déterminées à partir de 1955¹². Depuis, elle a été isolée dans beaucoup d'autres plantes, et notamment dans les feuilles du *Calophyllum inophyllum*⁷.

Nos travaux confirment bien la présence de friedeline (73) dans le *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française.

Position n°	Friedeline (73)		
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹³ C littérature (δ, ppm)
1		22.37	22.3
2		41.61	41.5
3		213.43	213.2
4		58.31	58.2
5		42.24	42.1
6		41.36	41.3
7		18.32	18.2
8		53.18	53.1
9		37.52	37.4
10		59.55	59.4
11		35.70	35.6
12		30.59	30.5
13		39.78	39.7
14		38.38	38.3
15		32.50	32.4
16		36.09	36.0
17		30.08	30.0
18		42.86	42.8
19		35.42	35.3
20		28.26	28.1
21		32.85	32.7
22		39.33	39.2
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.91	6.8
24	0.72, s	14.74	14.6
25	0.99, s	18.03	17.9
26	0.86, s	20.35	20.2
27	1.17, s	18.75	18.6
28	1.04, s	32.17	32.1
29	1.00, s	35.11	35.0
30	0.94, s	31.86	31.8

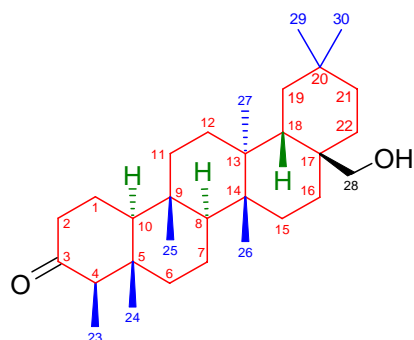
Tableau 10 : Attribution des signaux ¹H et ¹³C de **73** et comparaison à la littérature⁴.



Spectre 1 : RMN ¹H de la friedeline (**73**) entre 0,7 et 1,2 ppm

a)2. Le canophyllol (74)

Le canophyllol (**74**) est une molécule ayant une structure très proche de celle de la friedeline ; la seule différence est l'oxydation en alcool du groupement méthyle situé en position 28 de la friedeline (**73**).



(**74**) Canophyllol

Nous l'avons obtenu par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où le canophyllol a été identifié : FL31, FL134(mélange), FL140)

Le canophyllol cristallise sous forme d'aiguilles, son point de fusion est de 281°C, et son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -21^\circ$.

Sa formule brute est $C_{30}H_{50}O_2$, et sa masse molaire est de 442 $g \cdot mol^{-1}$.

De la même façon que pour la friedeline, les spectres RMN 1H et ^{13}C suffisent pour déterminer la structure du composé contenu dans les fractions FL31 et FL140, à savoir le canophyllol (**74**), par comparaison à la littérature.

Le spectre du carbone met en évidence un squelette à 30 atomes de carbone dont un donne un signal à $\delta = 213,29$ ppm caractéristique d'un groupement C=O. Ce spectre est très voisin de celui de la friedeline, ce qui montre que nous sommes bien en présence d'un triterpène du même type. Seul le signal à $\delta = 68,12$ ppm est nouveau, et remplace le signal du carbone C-28 de la friedeline, dont le déplacement vaut $\delta = 32,1$ ppm. L'hypothèse est alors que le groupement méthyle porté par le carbone C-28 de la friedeline soit oxydé en groupement alcool C-OH. La comparaison du spectre du carbone obtenu avec celui du canophyllol décrit dans la littérature confirme par ailleurs que nous sommes bien en présence de canophyllol (Cf. [Tableau 11](#)).

De plus, le spectre du proton vient confirmer les conclusions tirées du spectre du carbone, en mettant en évidence la présence de 7 groupements méthyles, dont 1 sous forme d'un doublet à $\delta = 0,87$ ppm de constante de couplage égale à 6,6 Hz, correspondant aux trois protons portés par le carbone C-23. Le spectre du proton révèle également la présence du groupement CH_2-OH (C-28), sous forme d'un signal très large à $\delta = 2,87$ ppm (OH) et de deux doublets à $\delta = 3,61$ ppm et $\delta = 3,64$ ppm de constantes de couplage égales à 10,5 Hz (CH_2) (Cf. [Tableau 11](#) et [Spectre 2](#)).

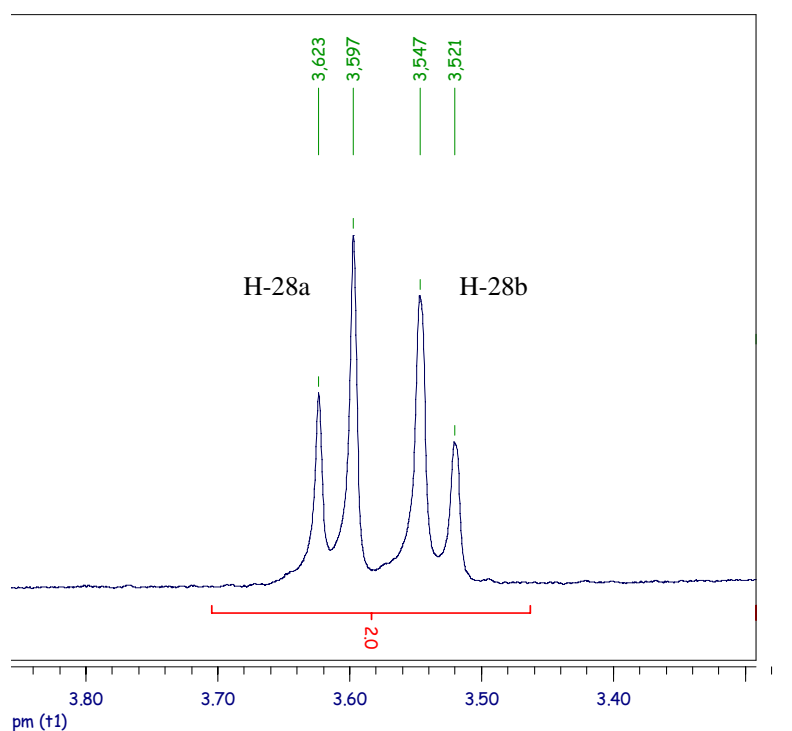
Remarque : De la même façon que précédemment, les signaux correspondant aux protons éthyléniques $-CH_2-$ n'ont pas été attribués.

Le canophyllol a été isolé pour la première fois en 1967 dans des feuilles de *Calophyllum inophyllum* provenant du Sud de l'Inde⁷.

Nos travaux confirment bien la présence de canophyllol (**74**) dans le *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française.

Position n°	Canophyllol (74)			Friedeline (73)
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹³ C littérature (δ, ppm)	¹³ C littérature (δ, ppm)
1		22.34	22.1	22.3
2		41.58	41.3	41.5
3		213.29	212.6	213.2
4		58.29	57.8	58.2
5		42.54	41.9	42.1
6		41.31	41.0	41.3
7		18.32	18.1	18.2
8		52.55	52.2	53.1
9		37.53	37.3	37.4
10		59.54	59.1	59.4
11		35.50	35.3	35.6
12		30.17	29.9	30.5
13		39.44	39.0	39.7
14		38.22	38.0	38.3
15		31.30	31.3	32.4
16		29.21	29.0	36.0
17		35.23	35.1	30.0
18		39.44	39.1	42.8
19		34.56	34.4	35.3
20		28.23	27.9	28.1
21		31.46	31.4	32.7
22		33.43	33.2	39.2
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.91	6.7	6.8
24	0.71, s	14.75	14.5	14.6
25	0.90, s	18.16	18.0	17.9
26	0.86, s	19.15	18.9	20.2
27	1.12, s	19.28	19.1	18.6
28	3.61 et 3.64, d, J=10.4 Hz	68.12	67.0	32.1
29	0.98, s	32.93	32.9	35.0
30	0.97, s	34.36	34.2	31.8

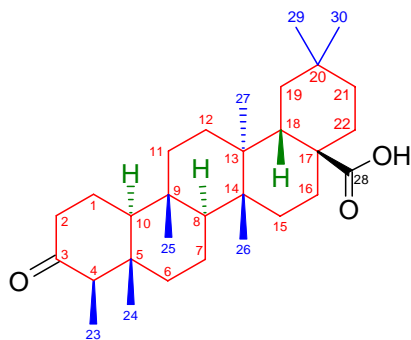
Tableau 11 : Attribution des signaux ¹H et ¹³C de **74** et comparaison à la littérature⁴



Spectre 2 : RMN ¹H du canophyllol (**74**) entre 2,5 et 4 ppm

a)3. L'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)

L'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**) est une molécule ayant une structure très proche de celle de la friedeline ; la seule différence est l'oxydation en acide carboxylique du groupement méthyle situé en position 28 de la friedeline (**73**).



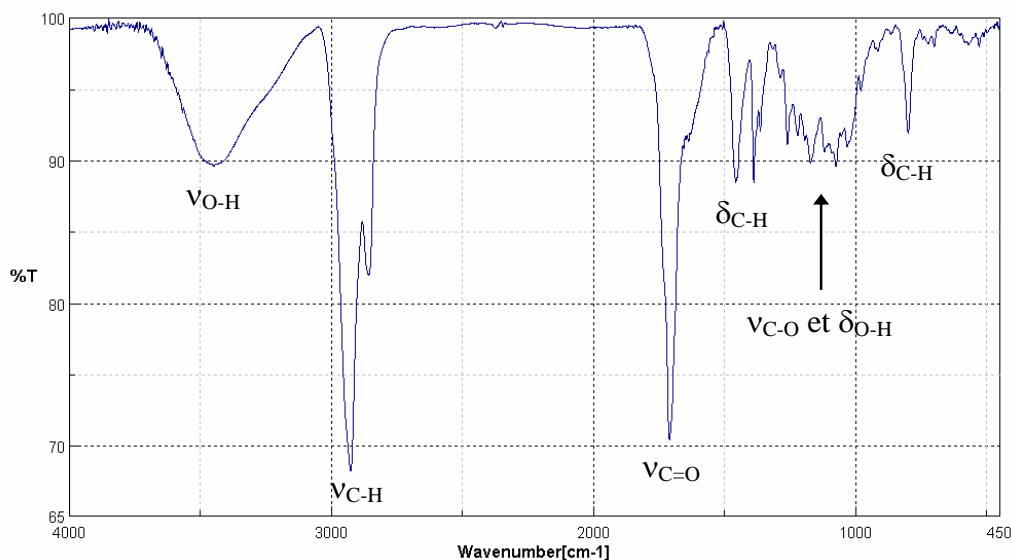
(75) Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque

Nous avons obtenu l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où l'acide canophyllique a été identifié : B1, FL17, FL18, FL33, FL119, FL120, FL126, FL134 (mélange))

Sa formule brute est $C_{30}H_{48}O_3$, et sa masse molaire est de 456 g.mol^{-1} . ($m/z [M+H]^+ = 457$ et $m/z [M+NH_4]^+ = 474$, déterminés par spectrométrie de masse ESI-SM, Cf. [p. 125](#))

Le spectre Infra-Rouge du produit isolé nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH_2 et CH_3 , ainsi qu'au moins un groupement carbonyle $C=O$ et une fonction alcool $C-OH$ (on peut donc être en présence d'un acide carboxylique $COOH$). Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

3448 cm^{-1} : Elongation de la liaison $O-H$; 2926 et 2858 cm^{-1} : Elongation des liaisons $C-H$; 1711 cm^{-1} : Elongation de la liaison $C=O$; 1458 , 1389 , et 799 cm^{-1} : Déformation des liaisons $C-H$ symétriques et asymétriques ; Bandes entre 900 et 1300 cm^{-1} : Elongation de la liaison $C-O$ et déformation de la liaison $O-H$.



Spectre 3 : Infra-Rouge de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**)

En ce qui concerne la RMN, le spectre du carbone ^{13}C révèle la présence de 30 atomes de carbone, ce qui va dans le sens d'une structure triterpénique. On note la présence de deux carbones fortement déblindés ($\delta=211,6$ ppm et $\delta=180,2$ ppm) qui correspondent à une fonction carbonyle $\text{C}=\text{O}$ et à une fonction acide carboxylique COOH , ce qui est en accord avec les résultats du spectre IR. Par ailleurs le spectre RMN ^1H nous dévoile la présence de 7 groupes méthyles CH_3 (déplacements chimiques entre 0,69 et 1,08 ppm, signaux intégrant pour 3 H). (Cf. [Tableau 12](#))

Pour déterminer avec certitude la structure de la molécule, nous avons eu recours à la RMN 2D, qui nous renseigne sur les couplages existant entre protons (COSY), entre un carbone et les protons portés par ce carbone (couplage direct HMQC) et entre un carbone et des protons éloignés (couplage longue distance, HMBC).

Le point de départ de l'affectation des protons et carbones de la molécule est la position du groupement $\text{CH}-\text{CH}_3$ [$\text{CH}-4$ ($\delta_{\text{H}}=2,32$ ppm, q, $J=6,7$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=58,36$ ppm)] détecté en HMBC par la corrélation entre le proton H-4 et le carbone C-3 de la fonction carbonyle ($\delta_{\text{C}}=211,59$ ppm), et entre le proton H-4 et le carbone C-23 du groupe méthyle CH_3 ($\delta=7,23$ ppm : la HMQC montre une corrélation directe entre ce signal ^{13}C et le doublet ($J=6.7$ Hz) engendré par les protons H-23 qui sortent à $\delta=0,79$ ppm).

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY [#]	HMBC [§]
1	22.84	-CH ₂ -	1.95, m ; 1.65, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	41.84	-CH ₂ -	2.37, dd ; 2.22, dm	H-1	H-1, H-4, H-10
3	211.59	-C=O	—	—	H-1, H-2, H-4, H-23
4	58.36	-CH-	2.32, q	H-23	H-2, H-6, H-10, H-23, H-24
5	42.50	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	41.75	-CH ₂ -	1.73, m ; 1.34, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.84	-CH ₂ -	1.44, m ; 1.40, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.76	-CH-	1.50, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	38.40	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	59.67	-CH-	1.67, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.23	-CH ₂ -	1.47, m ; 1.34, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	31.94	-CH ₂ -	1.51, m ; 1.43, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.59	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	39.72	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	33.69	-CH ₂ -	1.47, m ; 1.24, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.47	-CH ₂ -	2.37, m ; 1.73, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.19	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	38.61	-CH-	2.49, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.62	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.20, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.14	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.39	-CH ₂ -	1.29, m ; 1.22, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	36.54	-CH ₂ -	1.50, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	7.23	-CH ₃	0.79, d	H-4	H-4
24	14.93	-CH ₃	0.69, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.02	-CH ₃	0.88, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.55	-CH ₃	0.85, s	—	H-8, H-15
27	18.97	-CH ₃	1.08, s	—	H-12, H-18
28	180.24	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	30.26	-CH ₃	1.01, s	—	H-19, H-21
30	34.93	-CH ₃	0.93, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(§) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

Tableau 12 : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C et couplages observés pour **75**

De proche en proche, la HMQC et la HMBC permettent ensuite de déterminer l'enchaînement exact des carbones de la molécule, notamment en ce qui concerne les corrélations des autres protons méthyliques qui fournissent les connectivités principales des cinq cycles de la structure triterpénique :

- CH₃-24 ($\delta_H=0,69$ ppm) avec C-4, C-5, C-6 et C-10;
- CH₃-25 ($\delta_H=0,88$ ppm) avec C-8, C-9, C-10 et C-11;
- CH₃-26 ($\delta_H=0,85$ ppm) avec C-8, C-13, C-14 et C-15;
- CH₃-27 ($\delta_H=1,08$ ppm) avec C-12, C-13, C-14 et C-18;
- CH₃-29 ($\delta_H=1,01$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_H=0,93$ ppm) avec C-19, C-20 et C-21.

Pour finir, le couplage HMBC entre le carbone C-28 (fonction acide carboxylique, $\delta=180,24$ ppm) et les protons H-16 ($\delta=1,73$ ppm et $\delta=2,37$ ppm), H-18 ($\delta=2,49$ ppm) et H-22 ($\delta=1,50$ ppm) nous permet d'achever la détermination structurale précise de la molécule.

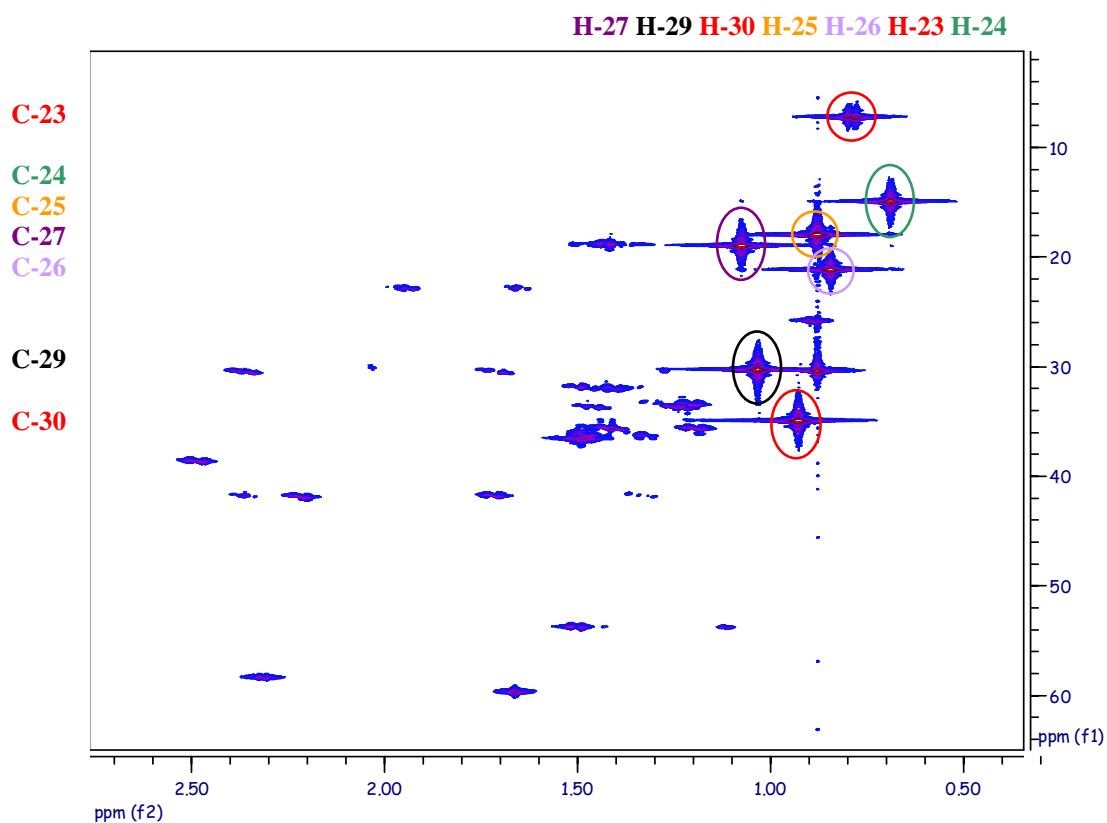
Les couplages entre protons observés sur le spectre de couplage COSY nous permettent de confirmer la structure précédemment définie.

Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure du triterpène **75** comme étant l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque. (Cf. [Tableau 12](#) et [Spectres 4 et 5](#))

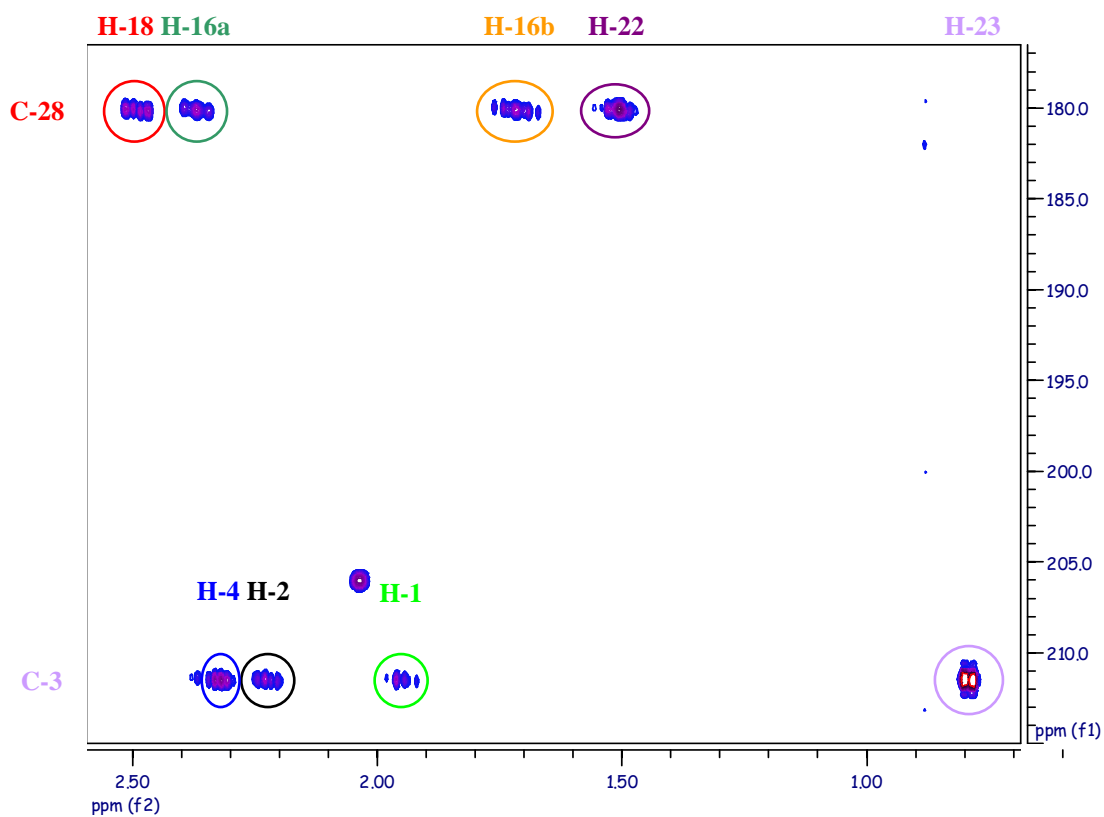
Cette structure déterminée par RMN en 2D est enfin une dernière fois confirmée par la comparaison à la littérature : d'abord comparaison aux données de la friedeline, et ensuite comparaison aux données de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (en particulier valeurs des déplacements chimiques en ¹³C : Cf. [Tableau 13](#)).

Position n°	Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (53)			Friedeline (51)
	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)	¹³ C Littérature (δ , ppm)	¹³ C Littérature (δ , ppm)
1	1.95, m; 1.65, m	22.84	22.2	22.3
2	2.37, dd; 2.22, dm	41.84	42.1	41.5
3		211.59	213.3	213.2
4	2.32, q, 6.7 Hz	58.36	58.2	58.2
5		42.50	44.7	42.1
6	1.73, m; 1.34, m	41.75	41.5	41.3
7	1.44, m; 1.40, m	18.84	18.0	18.2
8	1.50, m	53.76	53.0	53.1
9		38.40	37.8	37.4
10	1.67, m	59.67	59.2	59.4
11	1.47, m; 1.34, m	36.23	35.9	35.6
12	1.51, m; 1.43, m	31.94	31.0	30.5
13		38.59	41.1	39.7
14		39.72	38.9	38.3
15	1.47, m; 1.24, m	33.69	29.3	32.4
16	2.37, m; 1.73, m	30.47	32.6	36.0
17		45.19	37.6	30.0
18	2.49, dd, J=13.5, 4.4 Hz	38.61	37.6	42.8
19	1.42, m; 1.20, m	35.62	35.4	35.3
20		29.14	28.4	28.1
21	1.29, m; 1.22, m	33.39	34.8	32.7
22	1.50, m	36.54	32.6	39.2
23	0.79, d, 6.7 Hz	7.23	6.8	6.8
24	0.69, s	14.93	14.6	14.6
25	0.88, s	18.02	17.5	17.9
26	0.85, s	21.55	20.6	20.2
27	1.08, s	18.97	18.5	18.6
28		180.24	185.0	32.1
29	1.01, s	30.26	29.7	35.0
30	0.93, s	34.93	34.5	31.8

Tableau 13 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **75** à la littérature⁴



Spectre 4 : RMN 2D HMQC de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**)



Spectre 5 : RMN 2D HMBC de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**)

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une méthode autre que la RMN. Ces analyses ont été effectuées par introduction directe de l'échantillon dans une source d'ionisation électrospray (ESI-SM).

- SM (ordre 1)

Le spectre de masse de l'échantillon, acquis en mode positif sur la gamme de m/z 400-500 ([Figure 33](#)), montre la présence d'ions caractéristiques pouvant être attribués au composé recherché :

- l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, à m/z 457
- l'adduit ammonium, $[M+NH_4]^+$, à m/z 474
- l'adduit sodium, $[M+Na]^+$, à m/z 479
- l'adduit potassium, $[M+K]^+$, à m/z 495

Les ions Na^+ et K^+ permettant la formation des adduits sodium et potassium proviennent probablement de la verrerie de stockage des solvants.

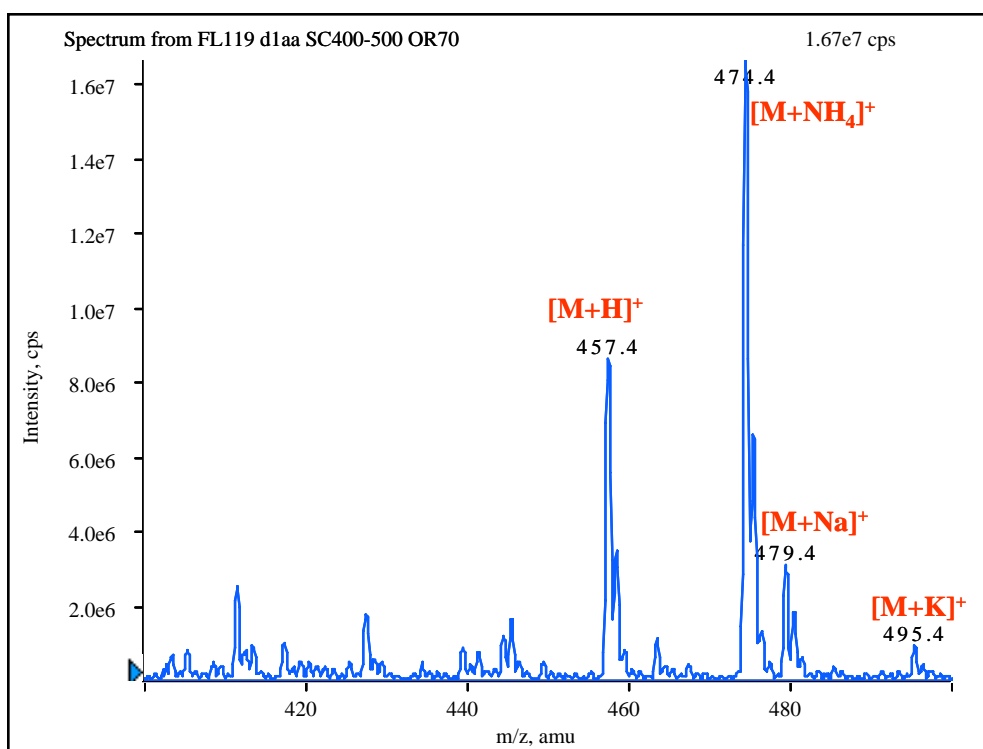
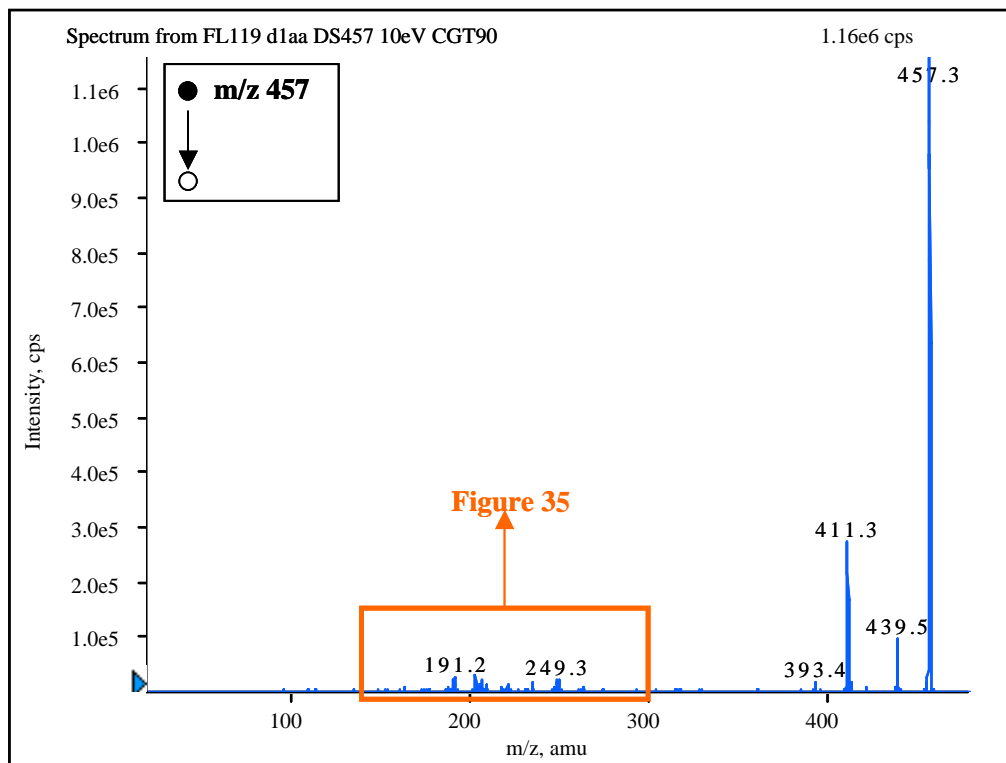


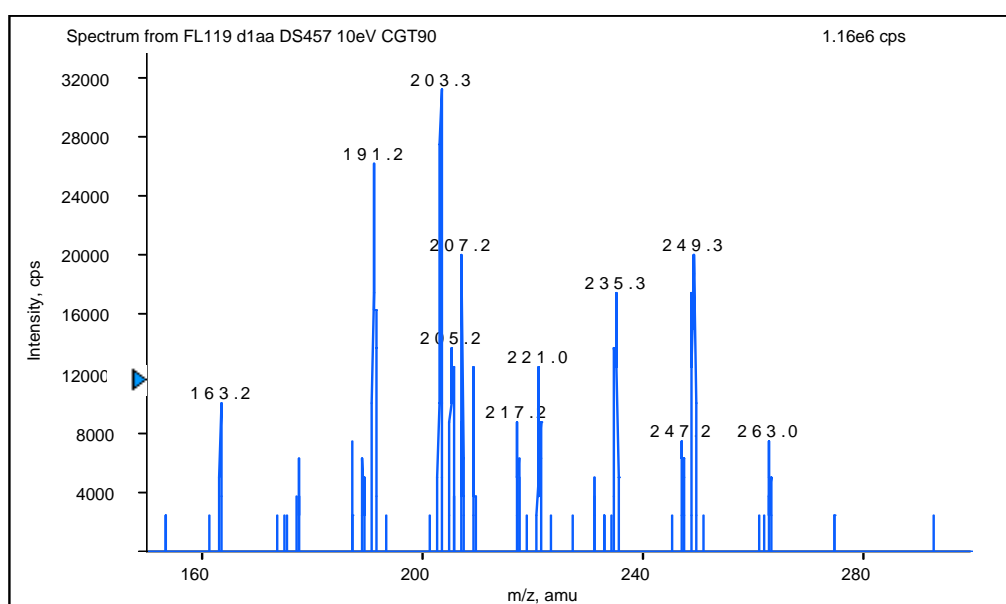
Figure 33 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène **75**

- SM/SM (ordre 2)

La structure de l'ion m/z 457 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ dont la structure a été proposée après les analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figures 34](#) et [35](#)).



[Figure 34](#) : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 457 (E_{coll} : 10eV ; CGT 90)

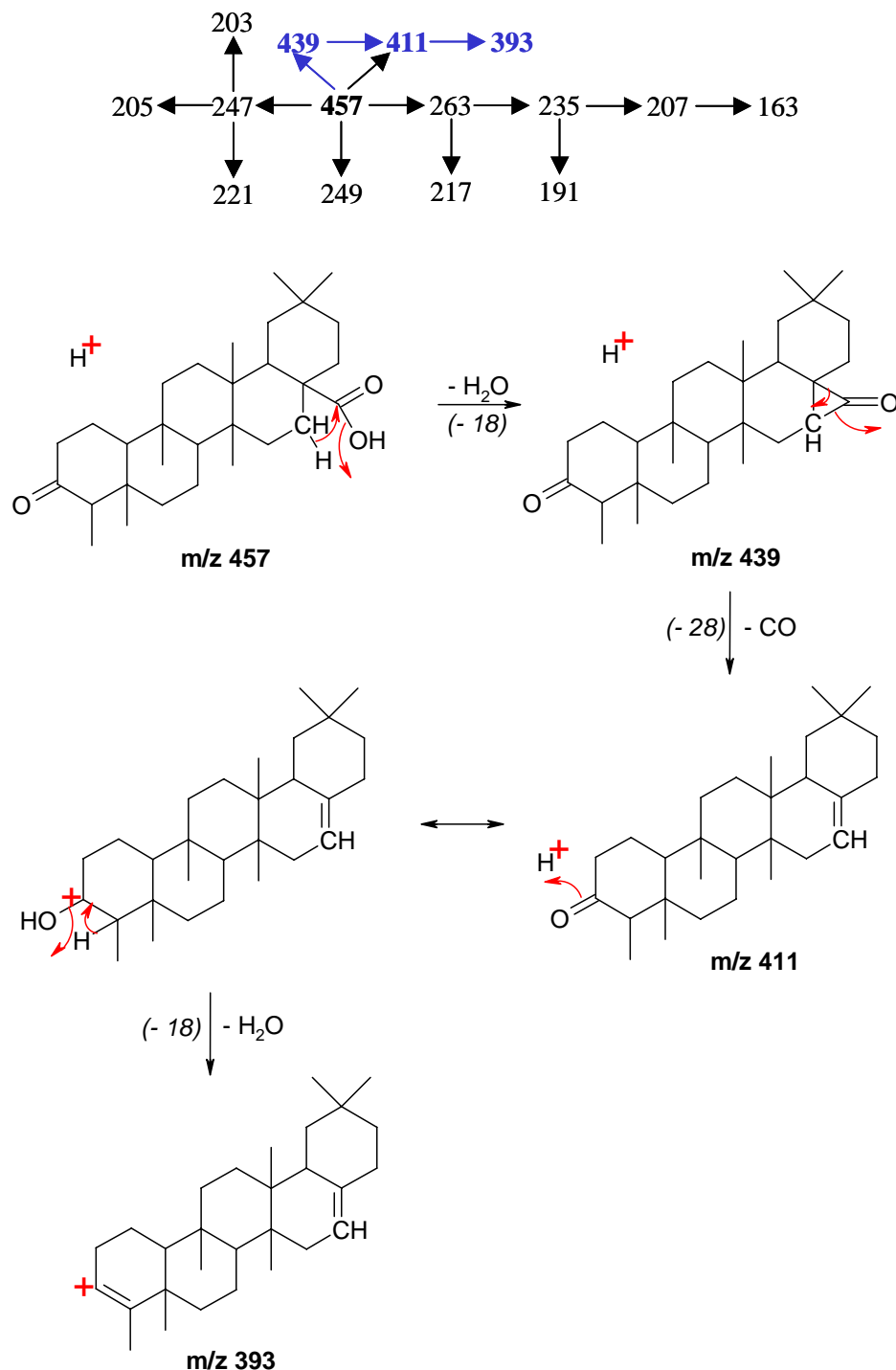


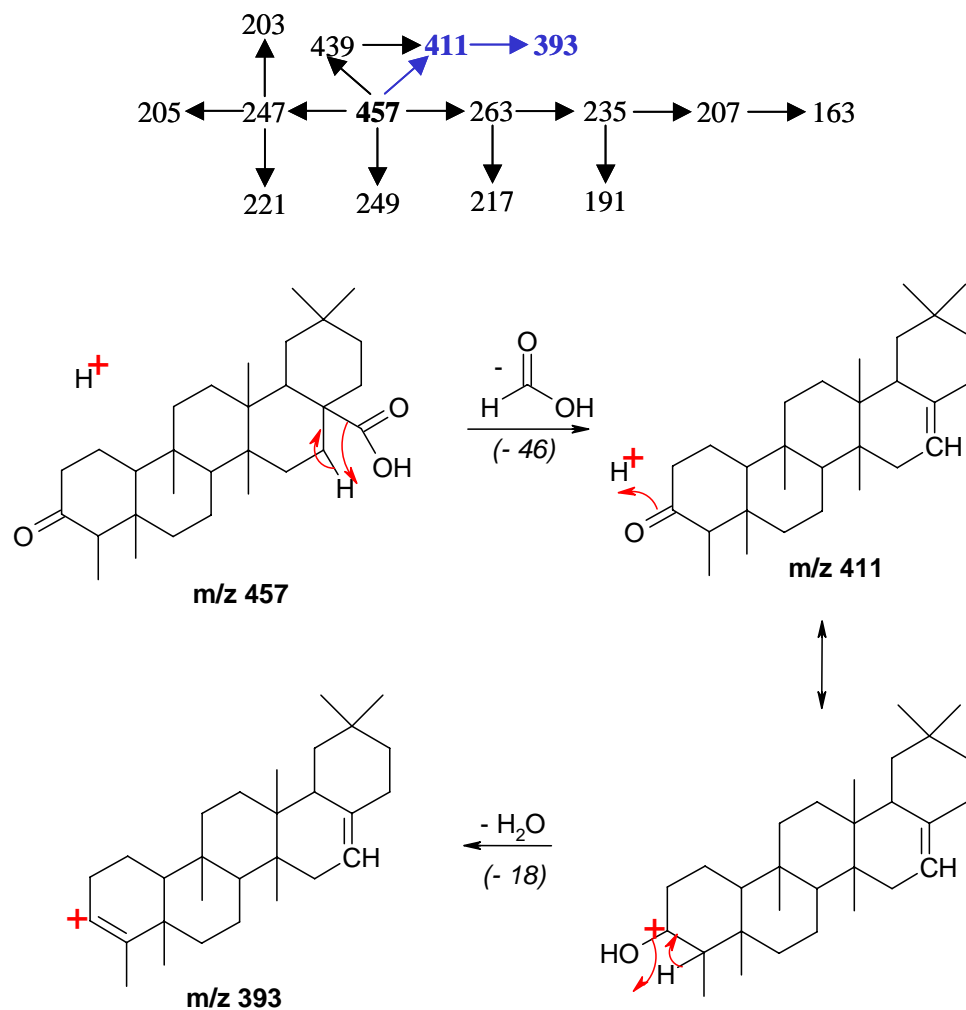
[Figure 35](#) : Agrandissement du spectre des ions fragments de l'ion m/z 457

Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 457 sont les suivants : m/z = 163, 191, 203, 205, 207, 217, 221, 235, 247, 249, 263, 393, 411 et 439.

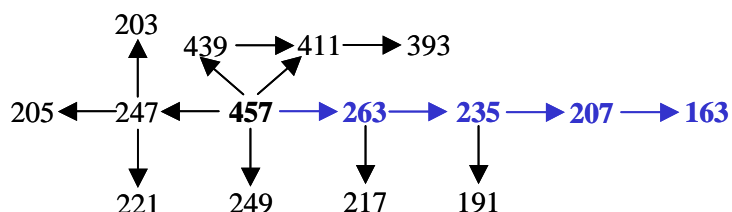
Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi. Les fragmentations correspondantes sont détaillées ci-après.

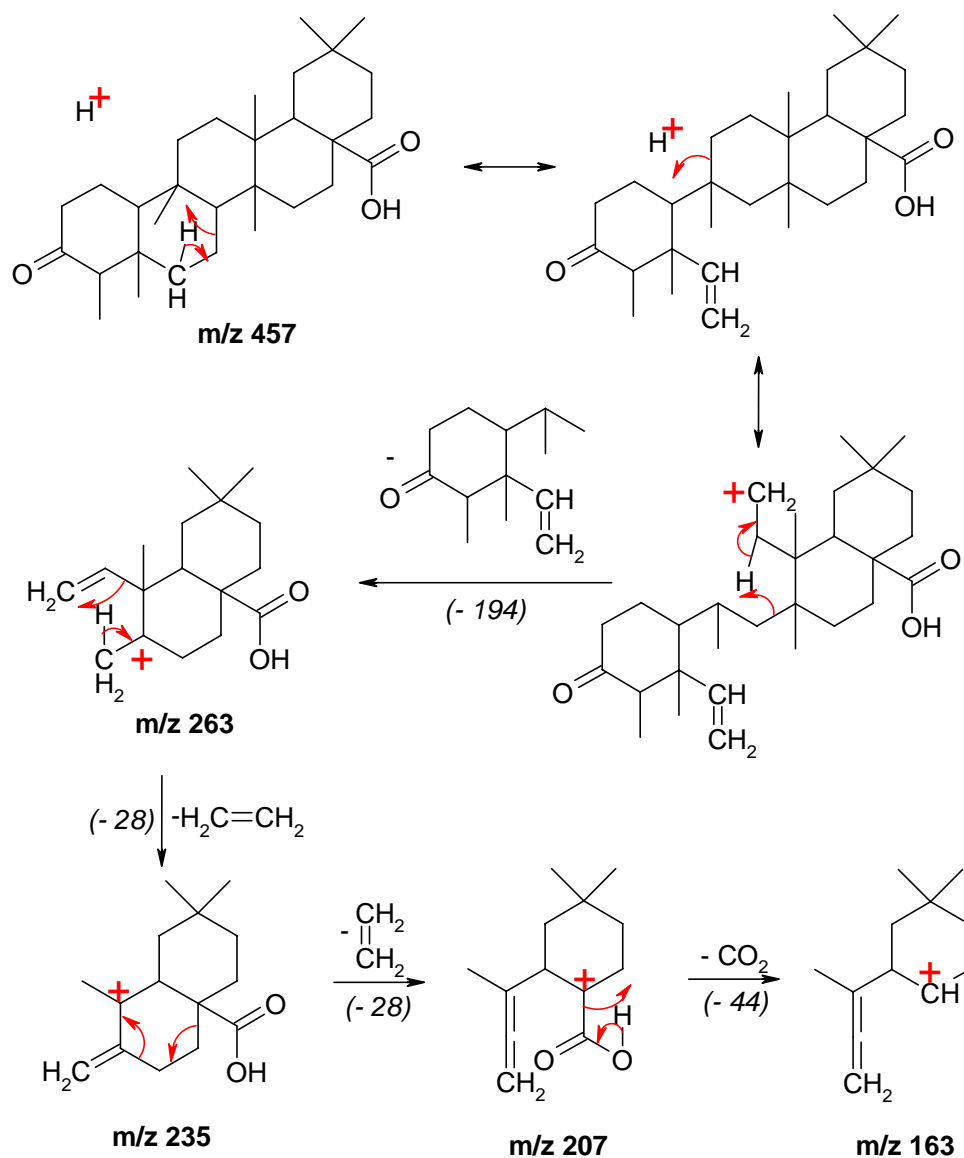
Considérons pour commencer les deux fragmentations qui conduisent à l'ion m/z 393. La fragmentation initiale est celle de la fonction acide carboxylique COOH, conduisant à un ion m/z 411, soit par perte d'eau (-18) puis perte de monoxyde de carbone (-28), soit directement par perte d'acide formique (-46). L'ion m/z 411 possède une fonction carbonyle qui peut être fragmentée par perte d'eau (-18) pour donner l'ion m/z 393.



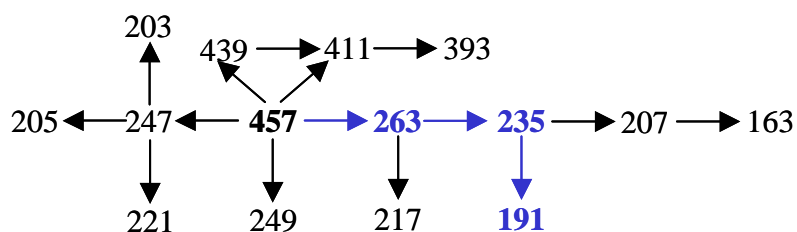


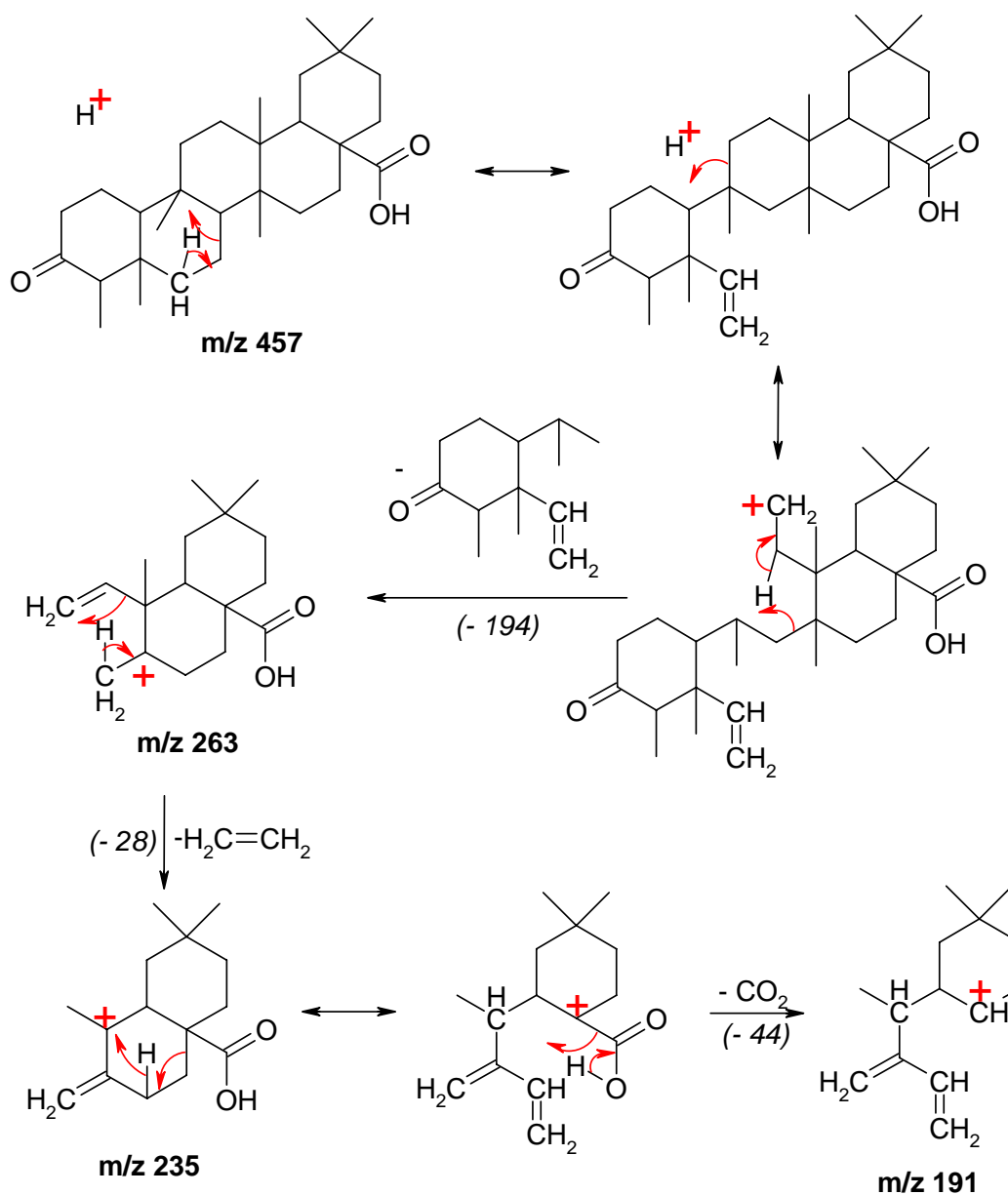
Une autre fragmentation peut avoir lieu, impliquant l'ouverture de deux des cinq cycles de la molécule. Une troisième rupture de liaison C-C conduit à la perte d'un fragment comportant le premier cycle carbonylé de la molécule (-194). L'ion m/z 263 alors formé peut à son tour subir une fragmentation et perdre une molécule d'éthylène (-28). L'ion formé m/z 235 peut perdre une deuxième molécule d'éthylène suite à l'ouverture de l'un des deux cycles restant, à savoir celui qui ne porte pas la fonction acide carboxylique. On forme alors un ion m/z 207 comportant un motif allénique, qui perd ensuite une molécule de dioxyde de carbone (-44) par fragmentation de la fonction acide carboxylique. On obtient un ion m/z 163.



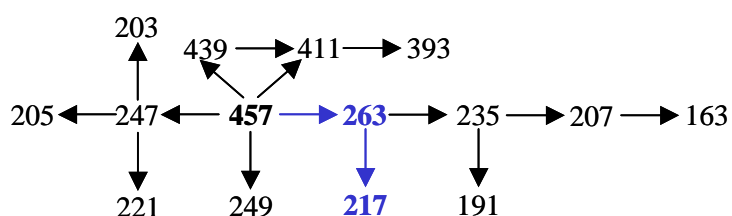


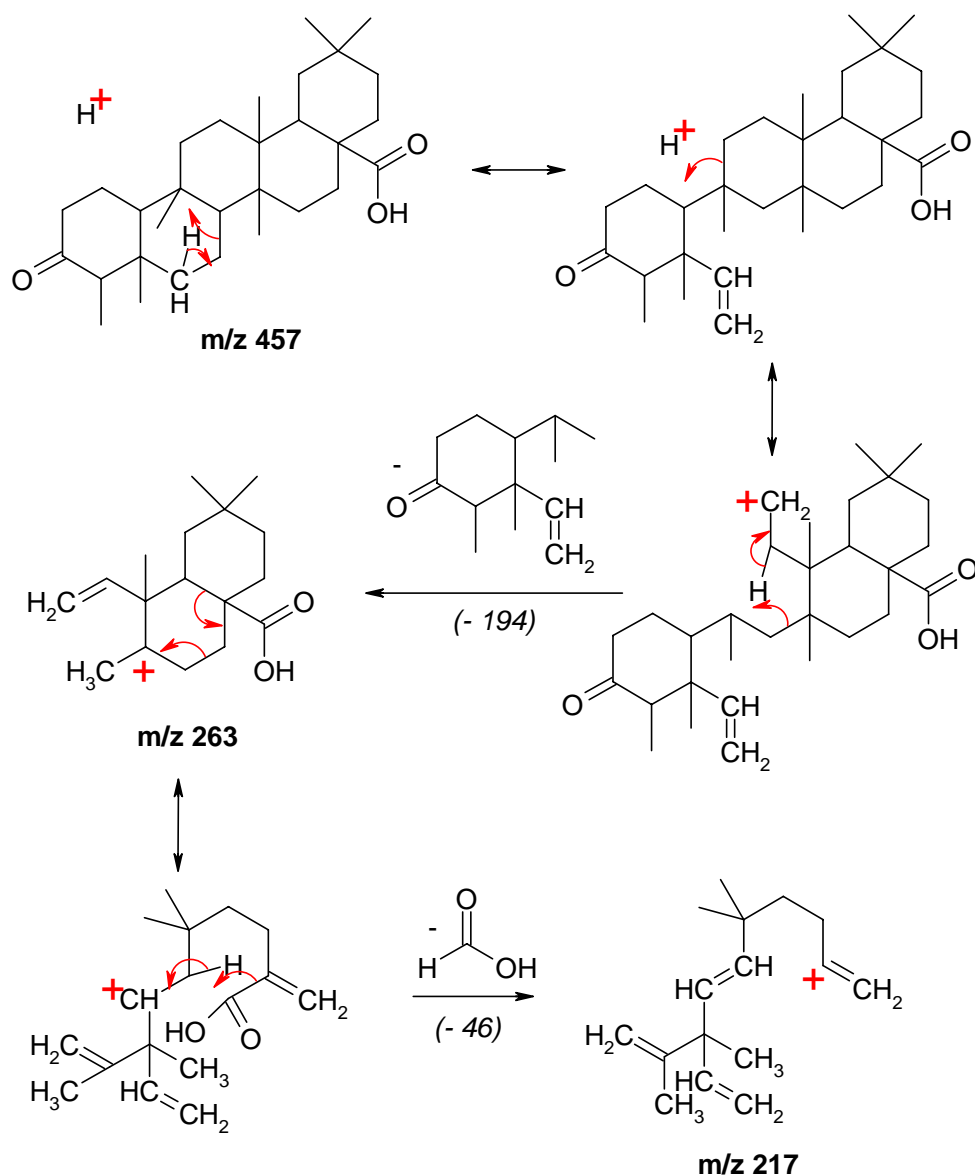
L'ion m/z 235 formé comme indiqué précédemment peut également subir la perte directe d'une molécule de CO_2 par fragmentation de la fonction acide carboxylique (-44) pour donner un ion m/z 191.



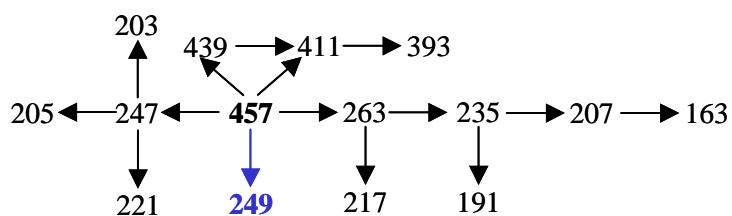


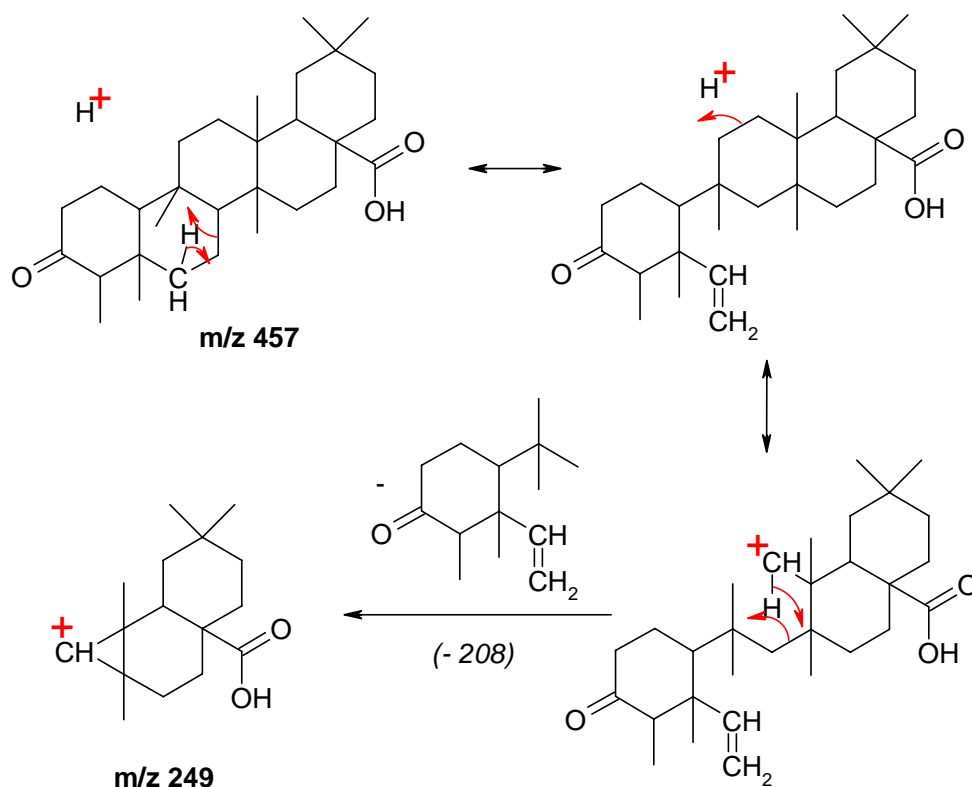
Par ailleurs, l'ion m/z 263 formé comme indiqué ci-dessus peut quant à lui, toujours suite à la fragmentation de la fonction acide carboxylique, perdre une molécule d'acide formique (-46) pour conduire à un ion m/z 217.



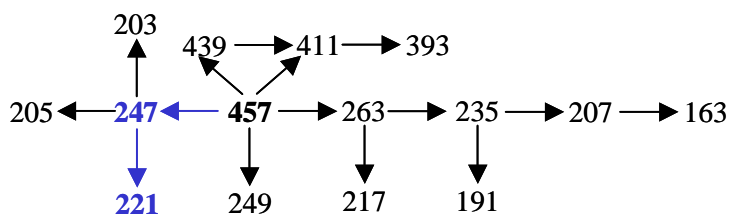


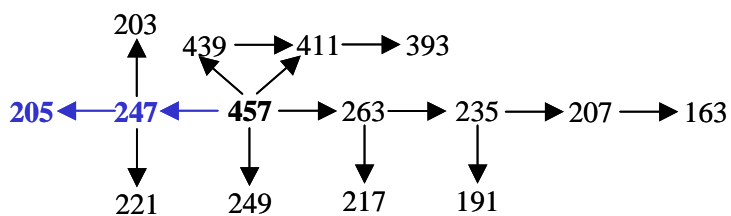
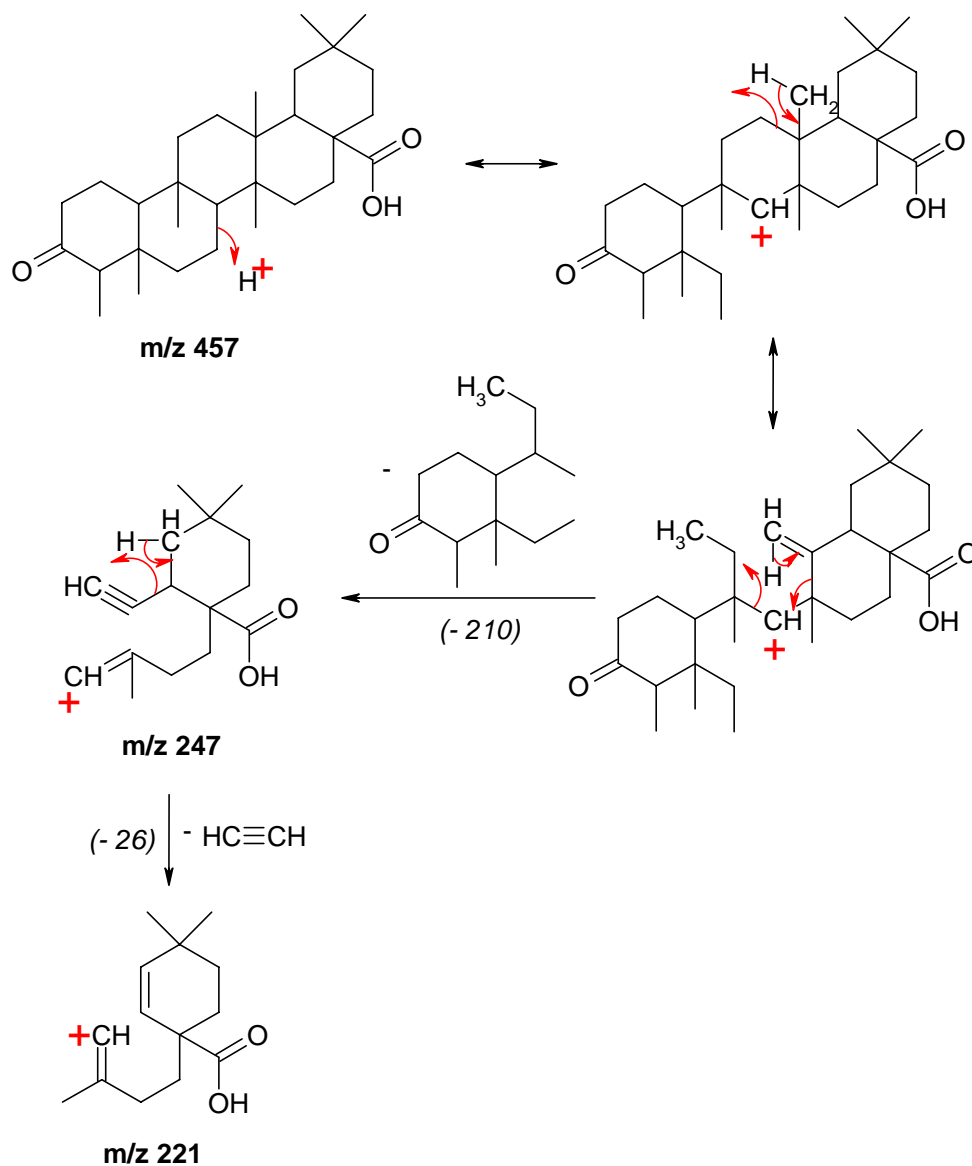
L'ion m/z 457 étudié peut encore, après l'ouverture des deux mêmes cycles que précédemment, perdre un fragment conduisant à l'ion m/z 249 (-208).

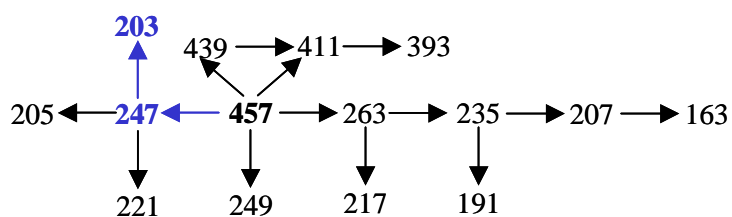
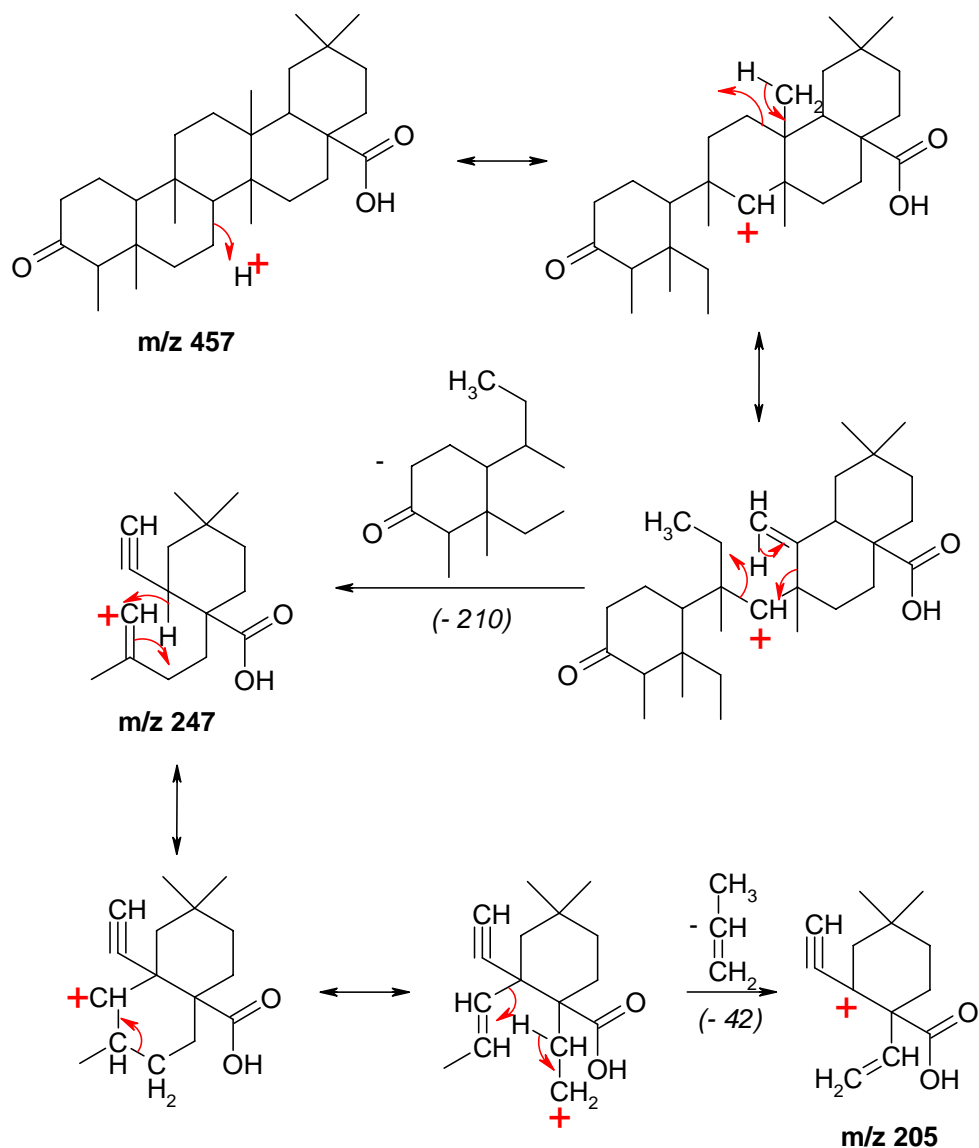


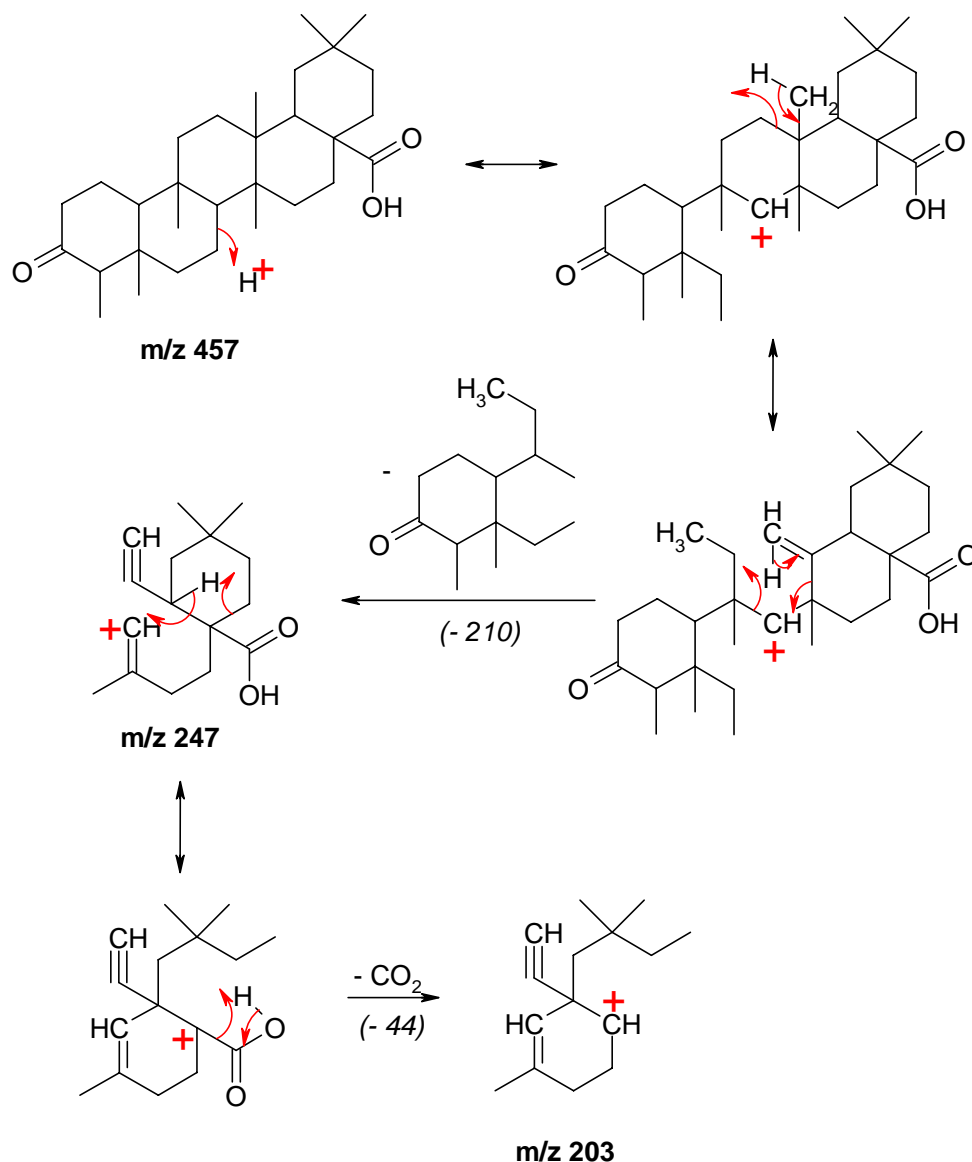


Enfin, l'ion m/z 457 peut, toujours après ouverture de ses deux cycles centraux, perdre un fragment de masse 210 afin d'engendrer un ion m/z 247, comportant une fonction acétylénique. Cet ion secondaire pourra alors soit perdre une molécule d'acétylène (-26) pour former un ion m/z 221, soit perdre après réarrangement une molécule de propène (-42) pour former un ion m/z 205, soit enfin perdre une molécule de dioxyde de carbone issue de la fragmentation de la fonction acide carboxylique (-44) pour former un ion m/z 203.









- Conclusion

Les nombreux adduits observés lors de l'ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon permettent de conclure que le poids moléculaire du composé présent en solution est 456 Da.

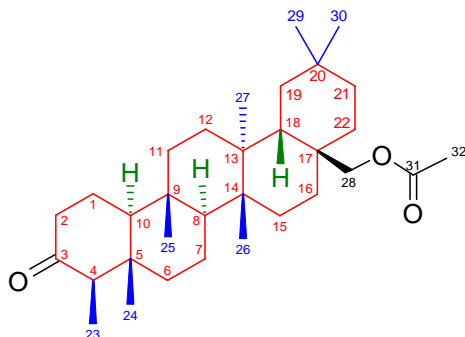
Les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire [M+H]⁺ dont la structure a été proposée après les analyses en RMN sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion m/z 457 observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode positif.

Nous pouvons donc conclure qu'il s'agit bien de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**) dont la structure a été proposée après analyse des spectres RMN.

Nos travaux confirment donc la présence d'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**) dans le Tamanu de Polynésie française.

a)4. L'acétate de canophyllol (86)

L'acétate de canophyllol (**86**) est une molécule ayant une structure très proche de celle du canophyllol (**74**) ; la seule différence est que la fonction alcool C₂₈-OH de celui-ci est maintenant acétylée.



Nous avons obtenu l'acétate de canophyllol par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#) (fractions où le canophyllol a été identifié : FL111 et FL121).

Sa formule brute est C₃₂H₅₂O₃, et sa masse molaire est de 484 g.mol⁻¹.

(86) Acétate de Canophyllol

De la même façon que pour le canophyllol, les spectres RMN ¹H et ¹³C suffisent pour déterminer la structure du composé contenu dans les fractions FL111 et FL121, à savoir l'acétate de canophyllol (**86**), par comparaison à la littérature.

Le spectre du carbone met en évidence un squelette à 32 atomes de carbone, mettant en évidence la présence de deux carbones supplémentaires, les carbones C-31 (C=O à δ=171,6 ppm) et C-32 (CH₃ à δ=21,2 ppm) qui peuvent correspondre à un groupement acétyle. Hormis ces deux carbones, le spectre est très voisin de celui du canophyllol, ce qui permet de conclure que nous sommes bien en présence d'un triterpène du même type. L'hypothèse est donc que la fonction alcool C₂₈-OH du canophyllol soit acétylée (Cf. [Tableau 14](#)).

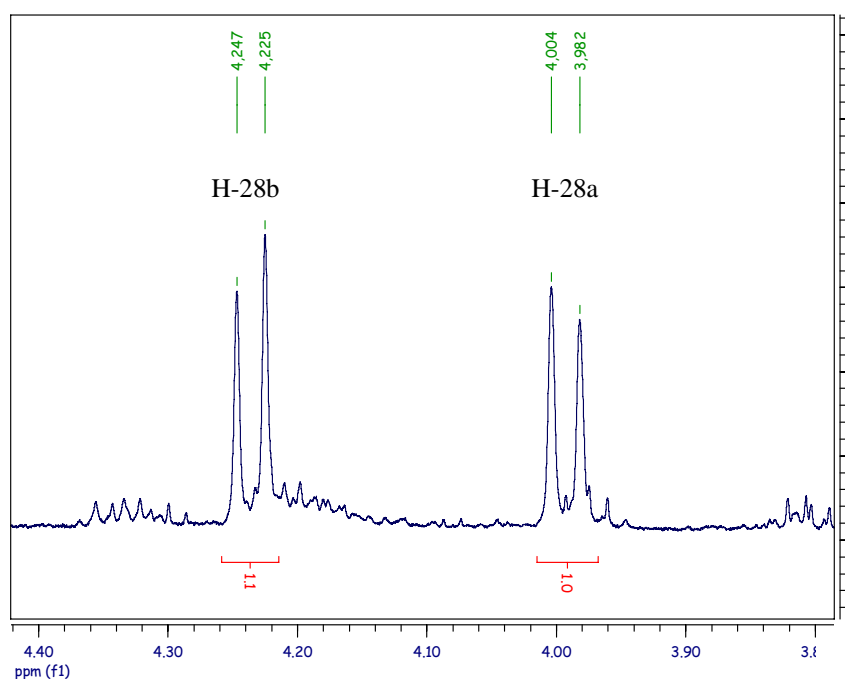
En RMN ¹H, trois signaux font leur apparition : un singulet à δ=2,05 ppm correspondant aux 3 protons portés par le carbone C-32, et deux doublets à δ=3,99 ppm et δ=4,24 ppm correspondant aux deux protons non équivalents portés par le carbone C-28. Par conséquent, les deux doublets à δ=3,61 ppm et δ=3,64 ppm qui correspondaient aux protons portés par le carbone C-28 du groupe CH₂-OH du canophyllol disparaissent. Ceci confirme l'hypothèse de l'acétylation de la fonction C₂₈-OH. Par ailleurs, les autres signaux observés sur le spectre du proton viennent confirmer cette conclusion, en mettant en évidence la présence de 7 groupements méthyles, dont 1 sous forme d'un doublet à δ=0,87 ppm de constante de couplage égale à 6,6 Hz, correspondant aux trois protons portés par le carbone C-23. (Cf. [Tableau 14](#) et [Spectre 6](#)).

Toutes ces données obtenues par RMN ¹H et ¹³C sont en accord avec la structure de l'acétate de canophyllol (**86**) proposée ci-dessus.

Nos travaux permettent donc de mettre en évidence la présence d'acétate de canophyllol (**86**) dans le *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'à présent.

Position n°	Acétate de canophyllol (86)		Canophyllol (74)	
	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		22.41		22.34
2		41.60		41.58
3		212.19		213.29
4		58.32		58.29
5		42.20		42.54
6		41.34		41.31
7		32.44		18.32
8		52.61		52.55
9		37.54		37.53
10		59.57		59.54
11		35.51		35.50
12		29.87		30.17
13		39.48		39.44
14		38.20		38.22
15		31.44		31.30
16		29.70		29.21
17		33.17		35.23
18		39.29		39.44
19		34.51		34.56
20		28.15		28.23
21		32.28		31.46
22		33.82		33.43
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.94	0.87, d, J=6.6 Hz	6.91
24	0.72, s	14.77	0.71, s	14.75
25	0.93, s	18.33	0.90, s	18.16
26	0.86, s	19.30	0.86, s	19.15
27	1.12, s	19.31	1.12, s	19.28
28	3.99 et 4.24, d, J=11Hz	67.43	3.61 et 3.64, d, J=10.4 Hz	68.12
29	0.98, s	32.80	0.98, s	32.93
30	0.97, s	34.43	0.97, s	34.36
31		171.60		
32	2.05, s	21.19		

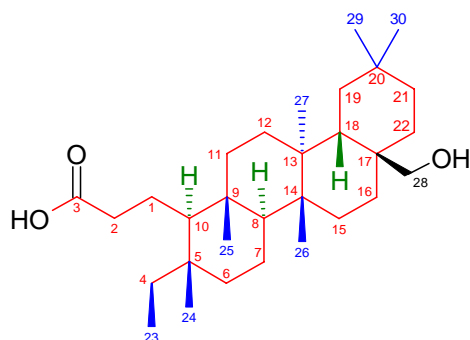
Tableau 14 : Attributions des signaux ^1H et ^{13}C de **86** et comparaison au canophyllol (**74**)



Spectre 6 : RMN ^1H de l'acétate de canophyllol (**86**) entre 3,9 et 4,4 ppm

a)5. L'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)

L'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (**87**) est une molécule ayant une structure proche de celle du canophyllol, à ceci près que le cycle portant la fonction carbonyle s'est ouvert pour former une fonction acide carboxylique.



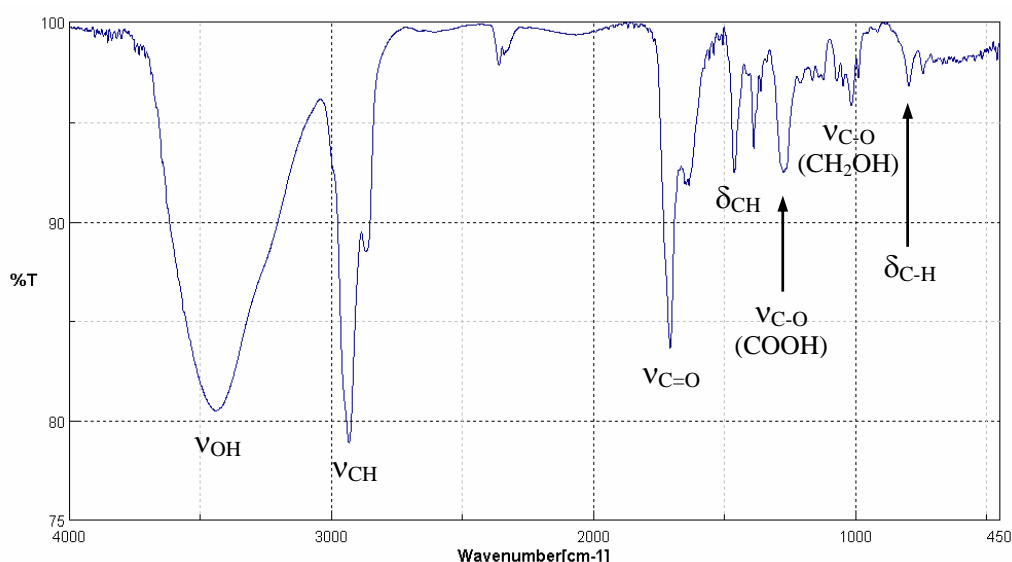
Nous l'avons obtenu l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#) (fractions où l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque a été identifié : FL43 et FL47).

Sa formule brute est $C_{30}H_{52}O_3$, et sa masse molaire est de 460 g.mol^{-1} .

(87) Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque

Le spectre Infra-Rouge du produit isolé nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH_2 et CH_3 , ainsi que la présence d'un groupement acide carboxylique $COOH$ et d'une fonction alcool primaire CH_2-OH . Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

3443 cm^{-1} : Elongation de la liaison O-H ; 2933 et 2870 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-H ; 1708 cm^{-1} : Elongation de la liaison C=O ; 1464 , 1389 , et 797 cm^{-1} : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ; 1275 cm^{-1} : Elongation de la liaison C-O de la fonction acide carboxylique ; 1016 cm^{-1} : Elongation de la liaison C-O de la fonction alcool.



[Spectre 7](#) : Infra-Rouge de l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (**87**)

Le spectre RMN du carbone ^{13}C révèle la présence de 30 atomes de carbone, ce qui va dans le sens d'une structure triterpénique. On note la présence d'un signal fortement déblindé ($\delta=169,3$ ppm) qui correspond à une fonction acide carboxylique, et d'un carbone de type CH_2 portant une fonction alcool ($\delta=69,0$ ppm), ce qui est en accord avec les résultats du spectre IR. La séquence ^{13}C DEPT nous permet de dire que la molécule comporte 7 groupements méthyle CH_3 , 13 carbones CH_2 , 3 carbones CH et 7 carbones quaternaires. Par ailleurs le spectre RMN ^1H nous confirme la présence des 7 groupes méthyles (déplacements chimiques entre $\delta=0,81$ ppm et $\delta=1,13$ ppm, signaux intégrant pour 3 H). (Cf. [Tableau 15](#) et [Spectres 8, 9 et 10](#))

A la vue des spectres ^1H et ^{13}C , on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit bien d'un triterpène, comportant 7 groupements méthyles, une fonction alcool et une fonction acide carboxylique. Il s'agit ensuite de placer ces substituants à la place adéquate. On a pour cela recours à la RMN 2D.

Le point de départ de l'affectation des protons et carbones de la molécule est la position du groupement méthylène [CH_2 -2 ($\delta_{\text{H}}=2,29$ ppm, m ; $\delta_{\text{C}}=39,0$ ppm)] détecté en HMBC, par la corrélation entre le proton H-2 et le carbone C-3 de la fonction acide carboxylique ($\delta_{\text{C}}=169,3$ ppm), le carbone CH_2 -1 ($\delta_{\text{C}}=22,66$ ppm) et le carbone CH -10 ($\delta_{\text{C}}=60,99$ ppm), indiquant que la molécule **87** comporte le chaînon $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$. De plus, les protons méthyliques à $\delta_{\text{H}}=0,81$ ppm (t, $J=7,4\text{Hz}$) portés par le carbone C-23 sont corrélés avec le carbone CH_2 -4 ($\delta_{\text{C}}=37,14$ ppm) et avec le carbone C-5 ($\delta_{\text{C}}=38,86$ ppm), ce qui confirme que le cycle terminal du triterpène (qui comporte normalement 5 cycles à 6 centres) est bien ouvert.

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC ^s
1	22.66	-CH ₂ -	1.56, m ; 1.48, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	39.00	-CH ₂ -	2.29, m	H-1	H-1, H-10
3	169.34	-COOH	—	—	H-1, H-2
4	37.14	-CH ₂ -	1.36, m ; 1.14, m	H-23	H-6, H-10, H-23, H-24
5	38.86	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	40.07	-CH ₂ -	1.52, m ; 1.20, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	19.20	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.35, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.69	-CH-	1.33, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	40.17	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	60.99	-CH-	0.88, t	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.11	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.26, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	31.02	-CH ₂ -	1.38, m ; 1.31, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	39.31	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	40.41	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	32.36	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.32, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.34	-CH ₂ -	1.88, ddd ; 1.24, ddd	H-15	H-15, H-18, H-22, H-28
17	36.40	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22, H-28
18	40.79	-CH-	1.30, m	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22, H-28
19	35.56	-CH ₂ -	1.50, m ; 1.29, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	28.97	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	34.34	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.22, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	32.43	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.30, m	H-21	H-16, H-18, H-21, H-28
23	7.96	-CH ₃	0.81, t	H-4	H-4
24	19.95	-CH ₃	0.81, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.75	-CH ₃	0.90, s	—	H-8, H-10, H-11
26	19.53	-CH ₃	0.93, s	—	H-8, H-15
27	20.03	-CH ₃	1.13, s	—	H-12, H-18
28	69.04	-CH ₂ -OH	3.54, d ; 3.57, d	—	H-16, H-18, H-22
29	33.44	-CH ₃	0.97, s	—	H-19, H-21
30	34.68	-CH ₃	0.98, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(\$) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

Tableau 15 : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C et couplages observés pour **87**

D'autre part, les corrélations des autres protons méthyliques fournissent les connectivités principales des quatre cycles de la structure triterpénique :

- CH₃-24 ($\delta_H=0,81$ ppm) avec C-4, C-5, C-6 et C-10;
- CH₃-25 ($\delta_H=0,90$ ppm) avec C-8, C-9, C-10 et C-11;
- CH₃-26 ($\delta_H=0,93$ ppm) avec C-8, C-13, C-14 et C-15;
- CH₃-27 ($\delta_H=1,13$ ppm) avec C-12, C-13, C-14 et C-18;
- CH₃-29 ($\delta_H=0,97$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_H=0,98$ ppm) avec C-19, C-20 et C-21.

Finalement, le signal à $\delta_H=1.30$ ppm, attribué au groupe CH-18, montre une corrélation avec le carbone C-28 portant la fonction alcool ($\delta=69,0$ ppm). (Cf. [Tableau 15](#) et [Spectres 11, 12 et 13](#))

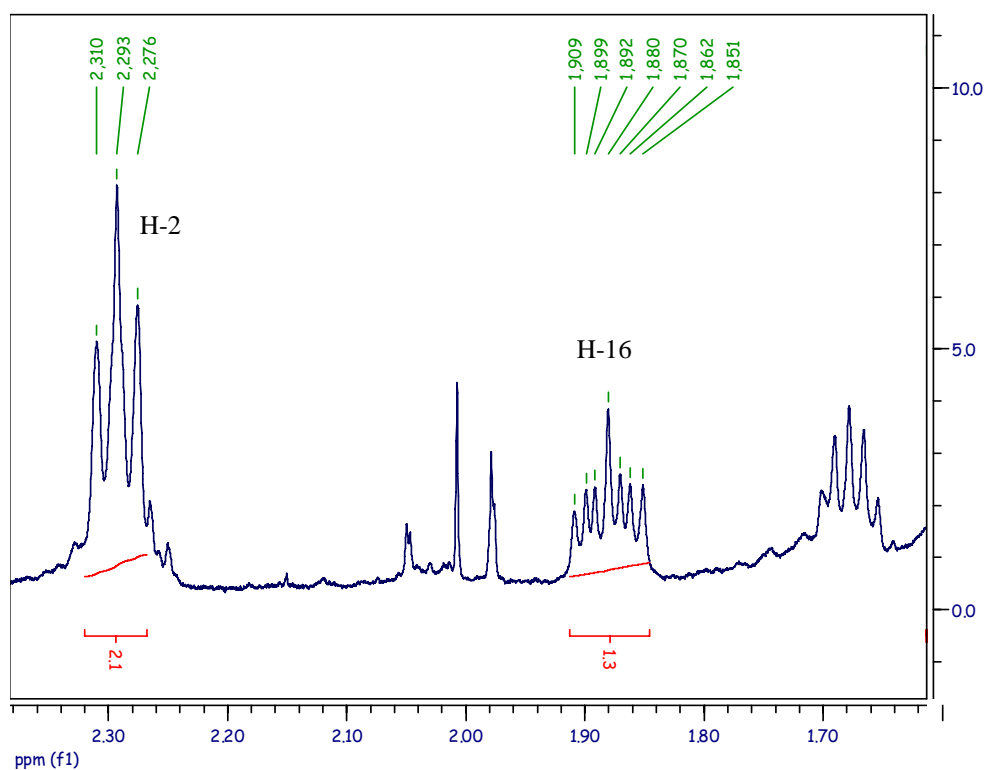
Cette structure déterminée par RMN en 2D est enfin une dernière fois confirmée par la comparaison à la littérature concernant le canophyllol (en particulier valeurs des déplacements chimiques en ¹³C : Cf. [Tableau 16](#)).

Position n°	Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)			
	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)	¹ H littérature (δ , ppm)	¹³ C littérature (δ , ppm)
1	1.56, m; 1.48, m	22.66	1.64	21.26
2	2.29, t, J=8.5 Hz	39.00	2.42, t, J=8.8 Hz	38.02
3	—	169.34	—	176.25
4	1.36, m; 1.14, m	37.14	1.37, 1.14	35.77
5	—	38.86	—	37.52
6	1.52, m; 1.20, m	40.07	1.50, 1.19	38.72
7	1.42, m; 1.35, m	19.20	1.36, 1.31	17.86
8	1.33, m	53.69	1.28	52.14
9	—	40.17	—	38.80
10	0.88, t	60.99	0.86, m	59.59
11	1.43; 1.26	36.11	1.44, 1.30	34.68
12	1.38; 1.31	31.02	1.42	29.54
13	—	39.31	—	39.03
14	—	40.41	—	37.91
15	1.43, m; 1.32, m	32.36	1.43	31.10
16	1.88, ddd; 1.24	30.34	1.96, 1.41	29.04
17	—	36.40	—	35.02
18	1.30, m	40.79	1.28	39.26
19	1.50, m; 1.29, m	35.56	1.24	34.29
20	—	28.97	—	27.80
21	1.41, m; 1.22, m	34.34	1.40, 1.26	33.17
22	1.41, m; 1.30, m	32.43	1.46	31.27
23	0.81, t, J=7.2 Hz	7.96	0.79, t, J=7.5 Hz	7.30
24	0.81, s	19.95	0.80, s	19.20
25	0.90, s	18.75	0.88, s	17.79
26	0.93, s	19.53	0.90, s	18.61
27	1.13, s	20.03	1.10, s	18.99
28	3.54 et 3.57, d, J=11 Hz	68.02	3.66, s	67.32
29	0.97, s	33.44	0.97, s	32.64
30	0.98, s	34.68	0.98, s	33.93

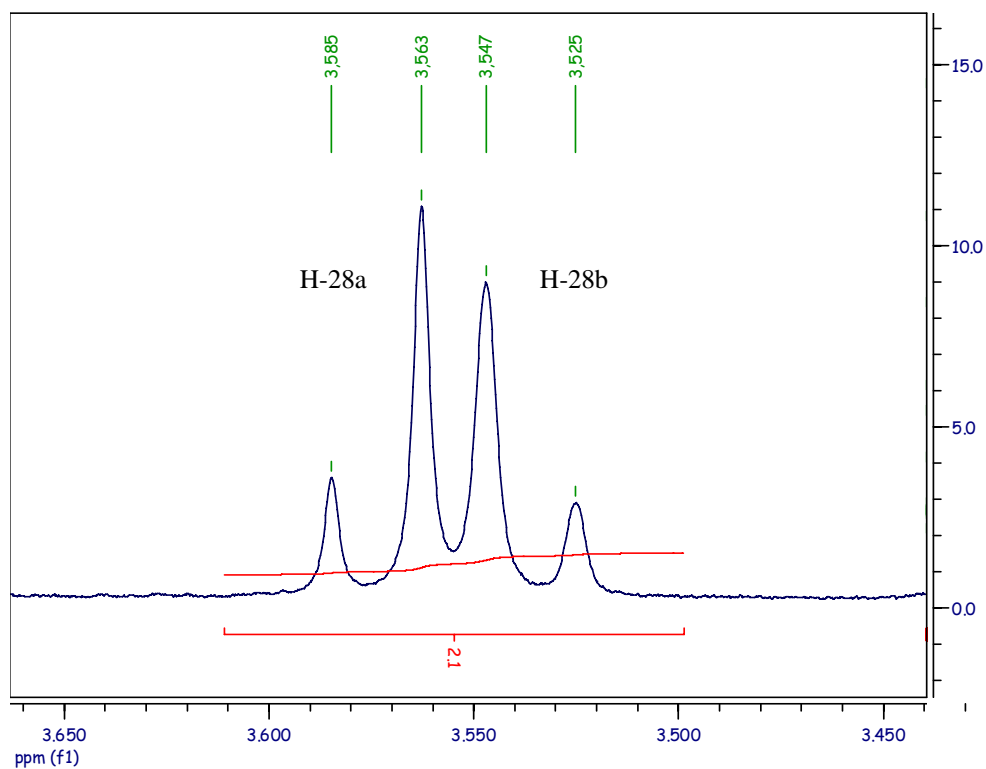
Tableau 16 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **87** à la littérature¹³

Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure du triterpène **87** comme étant l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque.

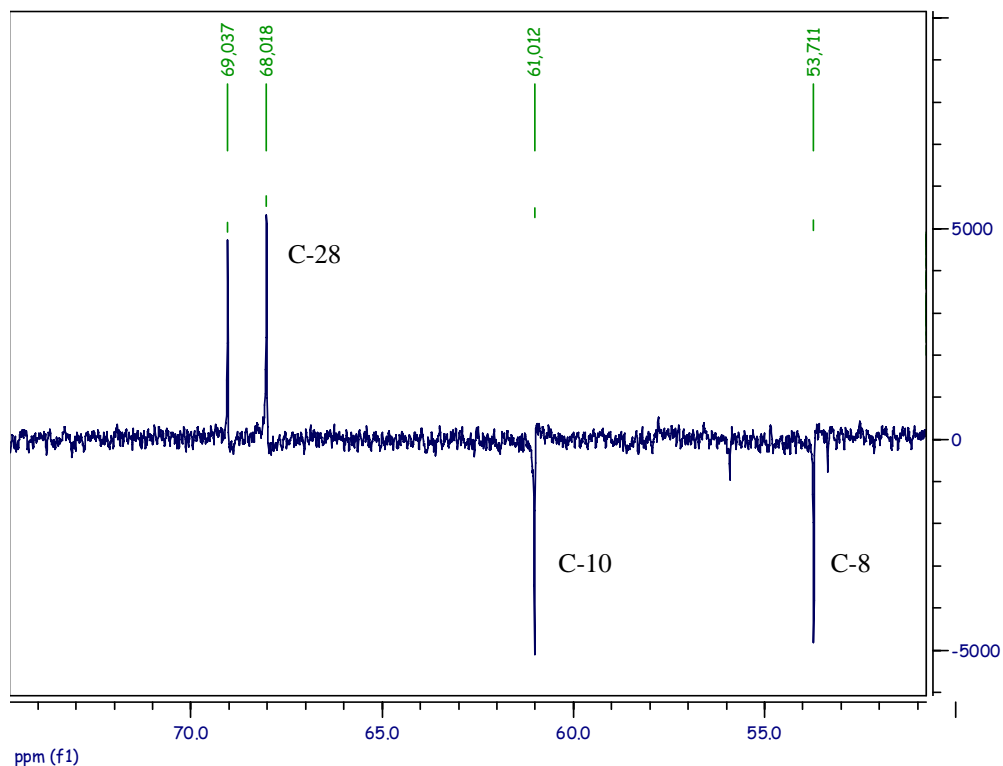
Nos travaux permettent pour la première fois de l'identifier à partir du *C. inophyllum*.



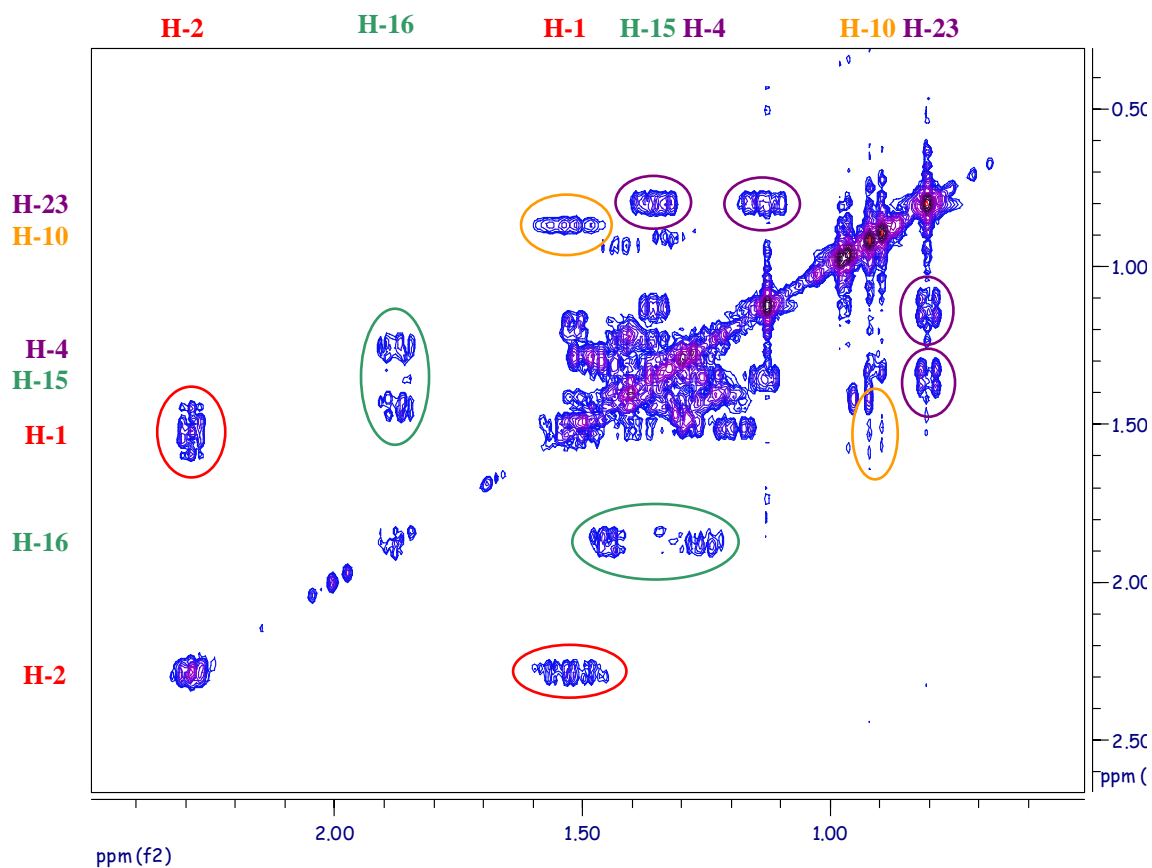
Spectre 8 : RMN ^1H du triterpène **87** entre 1,6 et 2,4 ppm



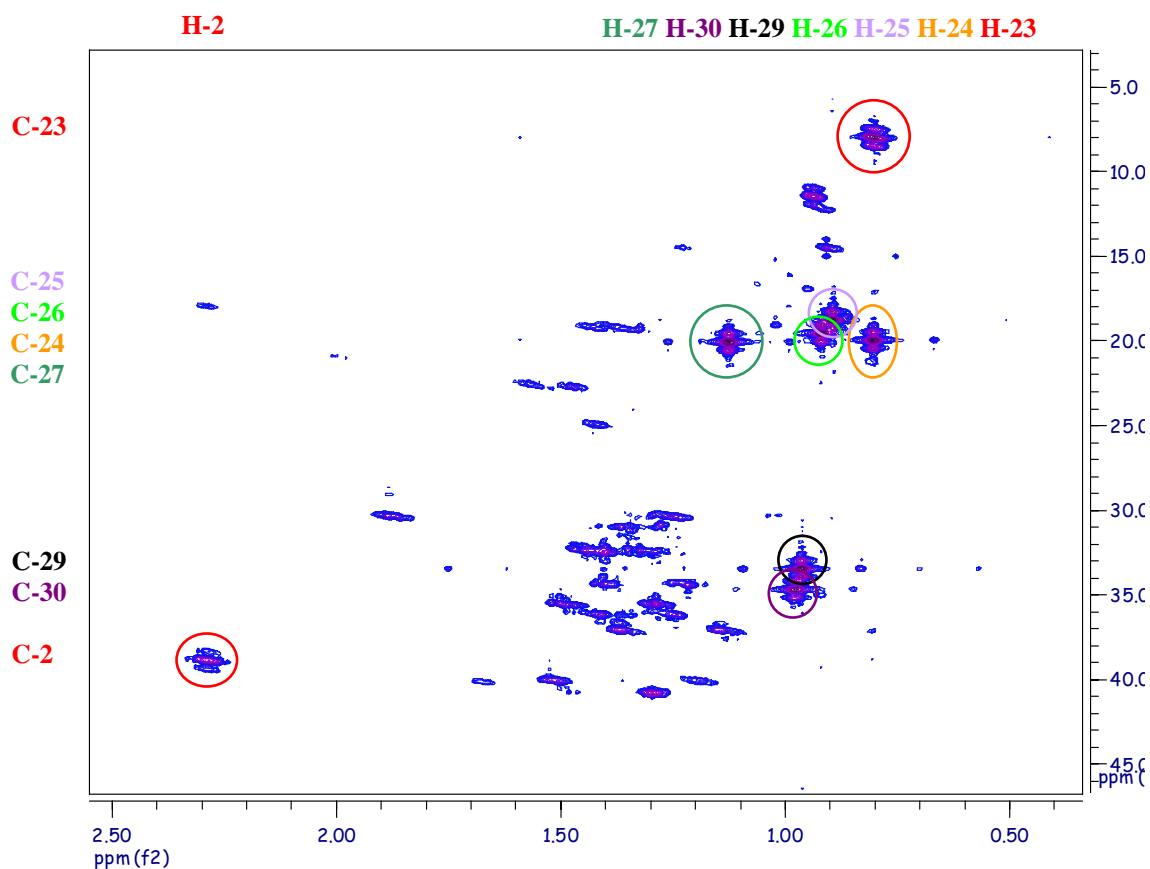
Spectre 9 : RMN ^1H du triterpène **87** entre 3,2 et 4,3 ppm



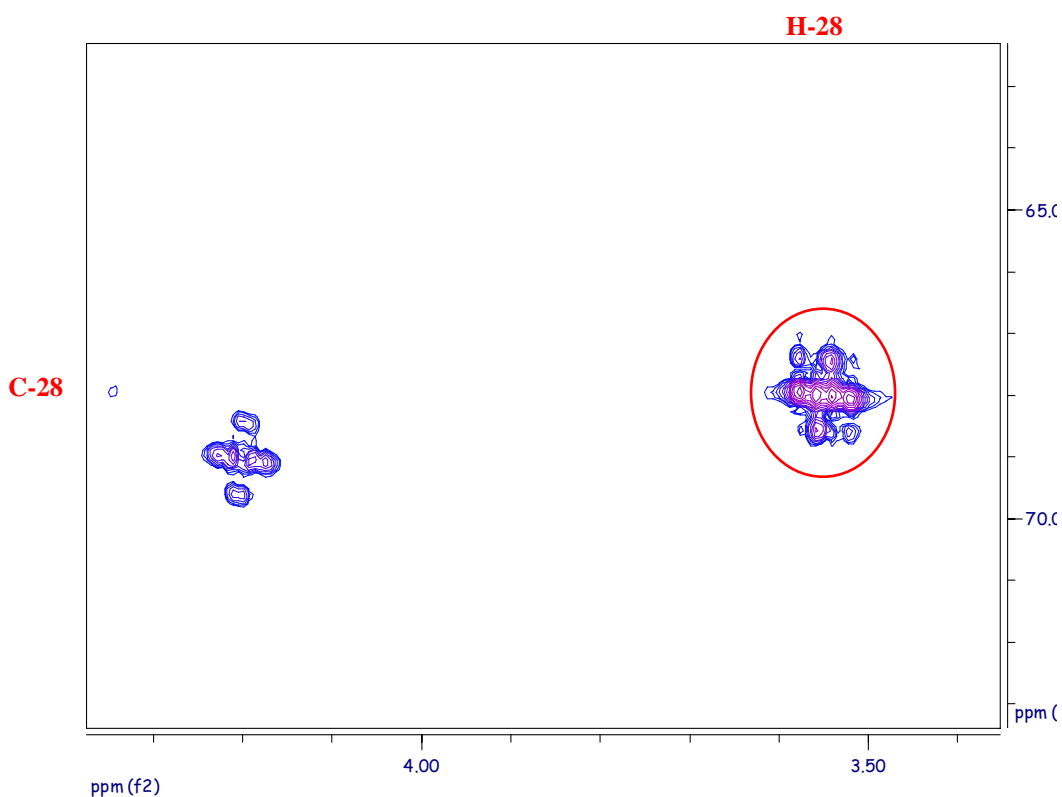
Spectre 10 : RMN ^{13}C DEPT du triterpène **87** entre 45 et 75 ppm



Spectre 11 : RMN 2D COSY du triterpène **87** entre 0,5 et 2,5 ppm



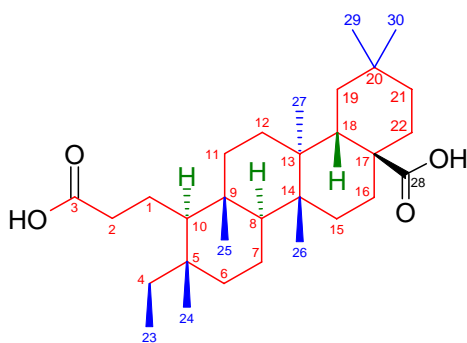
Spectre 12 : RMN 2D HMQC n° 1 du triterpène **87**



Spectre 13 : RMN 2D HMQC n° 2 du triterpène **87**

b) Nouveaux triterpènesb)1. L'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (88)

L'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**) est une molécule dont la structure n'avait jamais été décrite jusqu'à présent. Elle a une structure voisine de celle de l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (**87**) décrit précédemment, où la fonction alcool portée par le carbone C-28 a été oxydée en une deuxième fonction acide carboxylique.



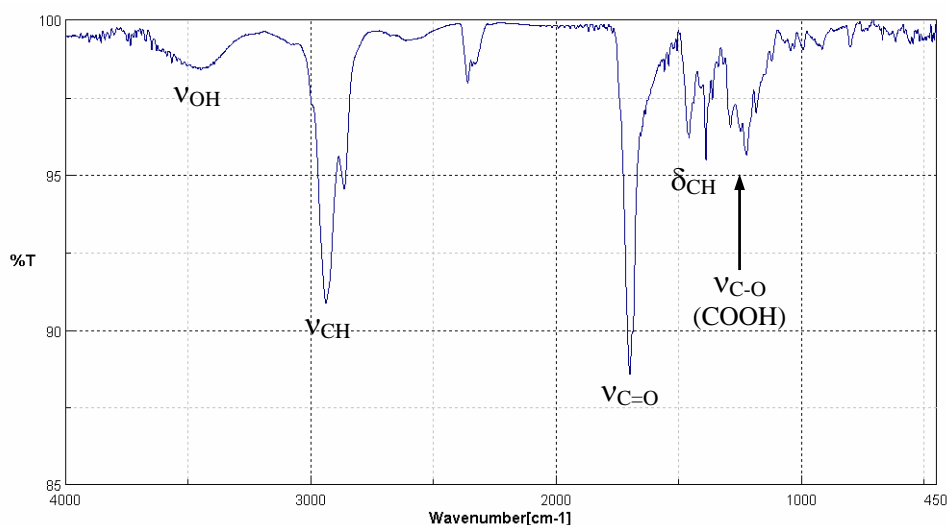
(88) Acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque

Nous avons obtenu cet acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fraction où l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque a été identifié : FL41)

Sa formule brute est $C_{30}H_{50}O_4$, et sa masse molaire est de 474 g.mol^{-1} ($m/z [M+NH_4]^+ = 492$ et $m/z [M-H]^- = 473$, déterminés par spectrométrie de masse ESI-SM, Cf. p. 149 et 150)

Le spectre IR de la molécule nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH_2 et CH_3 , ainsi que la présence de deux groupements acide carboxylique $COOH$. Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

- 3448 cm^{-1} : Elongation des liaisons O-H des deux fonctions acide carboxylique, dont le signal est très atténué du fait de l'existence de liaisons hydrogènes entre le proton d'une fonction et le carbonyle de l'autre fonction ;
- 2938 et 2864 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-H ;
- 1699 cm^{-1} : Elongation des liaisons C=O ;
- 1458 et 1389 cm^{-1} : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ;
- 1289 et 1223 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-O des fonctions acide carboxylique.



Spectre 14 : Infra-Rouge de l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**)

Le spectre RMN du carbone ^{13}C révèle la présence de 30 atomes de carbone, ce qui va dans le sens d'une structure triterpénique. On note la présence de deux signaux fortement déblindés ($\delta=178$ ppm et $\delta=183$ ppm) qui correspondent à deux fonctions acide carboxylique, ce qui est en accord avec les résultats du spectre IR.

Par ailleurs le spectre RMN ^1H nous indique la présence de 7 groupes méthyle (déplacements chimiques entre $\delta=0,81$ ppm et $\delta=1,04$ ppm, signaux intégrant pour 3 H). (Cf. [Tableau 17](#) et [Spectres 15 et 16](#))

A la vue des spectres ^1H et ^{13}C , on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit bien d'un triterpène, comportant 7 groupements méthyle et deux fonctions acide carboxylique. Il s'agit ensuite de placer ces substituants à la place adéquate.

Le point de départ de l'affectation des protons et carbones de la molécule est la position du groupement méthylène [$\text{CH}_2\text{-2}$ ($\delta_{\text{H}}=2,29$ ppm, t, $J=7,0$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=38,93$ ppm)] détecté en HMBC. En effet, la corrélation entre le proton H-2 et les carbones C-3 (de la fonction acide carboxylique, $\delta_{\text{C}}=177,88$ ppm), $\text{CH}_2\text{-1}$ ($\delta_{\text{C}}=22,55$ ppm) et CH-10 ($\delta_{\text{C}}=60,83$ ppm) indique que la molécule **88** comporte le chaînon $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$. De plus, les protons méthyliques à $\delta_{\text{H}}=0,81$ ppm (t, $J=7,3\text{Hz}$) portés par le carbone C-23 sont corrélés avec le carbone $\text{CH}_2\text{-4}$ ($\delta_{\text{C}}=37,17$ ppm) et avec le carbone C-5 ($\delta_{\text{C}}=38,84$ ppm) ; ceci confirme que le cycle terminal du triterpène (qui comporte normalement 5 cycles à 6 centres) est bien ouvert.

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC ^s
1	22.55	-CH ₂ -	1.56, m ; 1.49, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	38.93	-CH ₂ -	2.29, t	H-1	H-1, H-10
3	177.88	-COOH	—	—	H-1, H-2
4	37.17	-CH ₂ -	1.37, m ; 1.13, m	H-23	H-6, H-10, H-23, H-24
5	38.84	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	39.96	-CH ₂ -	1.51, m ; 1.20, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	19.06	-CH ₂ -	1.40, m ; 1.35, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	54.32	-CH-	1.34, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	40.38	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	60.83	-CH-	0.87, t	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.21	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.26, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	32.01	-CH ₂ -	1.45, m ; 1.38, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.84	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	39.96	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	33.83	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.19, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.82	-CH ₂ -	2.34, ddd ; 1.69, ddd	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.84	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	39.09	-CH-	2.44, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.97	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.18, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.40	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.66	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.27, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	37.10	-CH ₂ -	1.49, m ; 1.38, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	7.94	-CH ₃	0.81, t	H-4	H-4
24	19.89	-CH ₃	0.81, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.11	-CH ₃	0.89, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.27	-CH ₃	0.82, s	—	H-8, H-15
27	19.14	-CH ₃	1.04, s	—	H-12, H-18
28	182.69	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	30.31	-CH ₃	1.03, s	—	H-19, H-21
30	35.03	-CH ₃	0.93, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(§) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

Tableau 17 : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C et couplages observés pour **88**

D'autre part, les corrélations des autres protons méthyliques fournissent les connectivités principales des quatre cycles de la structure triterpénique :

- CH₃-24 ($\delta_H=0,81$ ppm) avec C-4, C-5, C-6 et C-10;
- CH₃-25 ($\delta_H=0,89$ ppm) avec C-8, C-9, C-10 et C-11;
- CH₃-26 ($\delta_H=0,82$ ppm) avec C-8, C-13, C-14 et C-15;
- CH₃-27 ($\delta_H=1,04$ ppm) avec C-12, C-13, C-14 et C-18;
- CH₃-29 ($\delta_H=1,03$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_H=0,93$ ppm) avec C-19, C-20 et C-21.

Finalement, le signal à $\delta_H=2,44$ ppm, attribué au groupe CH-18, montre une corrélation avec le second groupe carboxylique C-28. (Cf. [Tableau 17](#) et [Spectres 17 et 18](#))

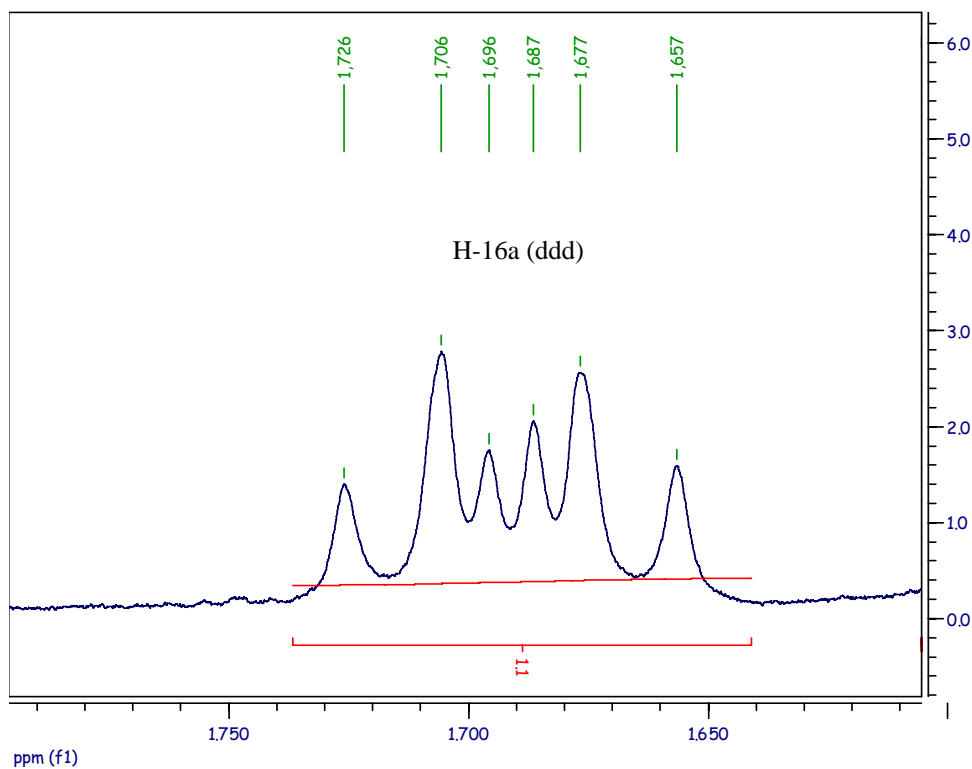
Cette structure déterminée par RMN en 2D est enfin confirmée par la comparaison des signaux ¹H et ¹³C obtenus avec cet échantillon à ceux obtenus avec l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (**88**).

(en particulier valeurs des déplacements chimiques en ¹³C : Cf. [Tableau 18](#)).

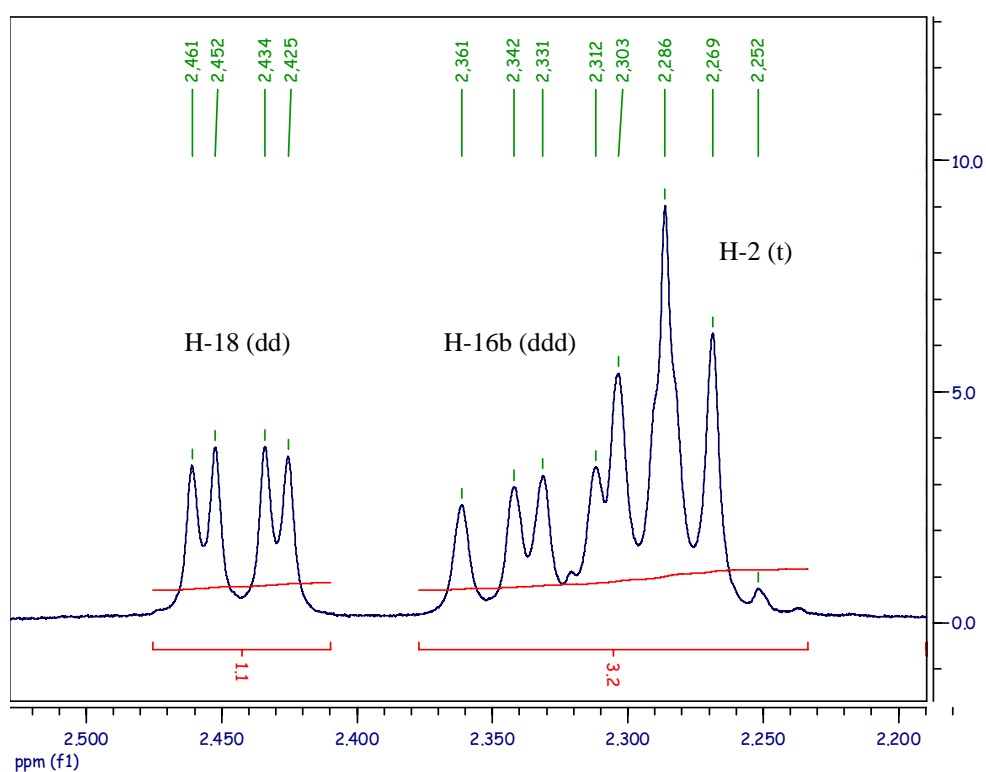
Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure du triterpène **88** comme étant l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque.

Position n°	Acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (88)		Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)	
	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)
1	1.56, m; 1.49, m	22.55	1.56, m; 1.48, m	22.66
2	2.29, t	38.93	2.29, t	39.00
3	—	177.88	—	169.34
4	1.37, m; 1.13, m	37.17	1.36, m; 1.14, m	37.14
5	—	38.84	—	38.86
6	1.51, m; 1.20, m	39.96	1.52, m; 1.20, m	40.07
7	1.40, m; 1.35, m	19.06	1.42, m; 1.35, m	19.20
8	1.34, m	54.32	1.33, m	53.69
9	—	40.38	—	40.17
10	0.87, t	60.83	0.88, t	60.99
11	1.41; 1.26	36.21	1.43; 1.26	36.11
12	1.45; 1.38	32.01	1.38; 1.31	31.02
13	—	38.84	—	39.31
14	—	39.96	—	40.41
15	1.43, m; 1.19, m	33.83	1.43, m; 1.32, m	32.36
16	2.34, ddd; 1.69, ddd	30.82	1.88, ddd; 1.24, ddd	30.34
17	—	45.84	—	36.40
18	2.44, dd	39.09	1.30, m	40.79
19	1.41, m; 1.18, m	35.97	1.50, m; 1.29, m	35.56
20	—	29.40	—	28.97
21	1.42, m; 1.27, m	33.66	1.41, m; 1.22, m	34.34
22	1.49, m; 1.38, m	37.10	1.41, m; 1.30, m	32.43
23	0.81, t	7.94	0.81, t	7.96
24	0.81, s	19.89	0.81, s	19.95
25	0.89, s	18.11	0.90, s	18.75
26	0.82, s	21.27	0.93, s	19.53
27	1.04, s	19.14	1.13, s	20.03
28	—	182.69	3.54, d; 3.57, d	69.04
29	1.03, s	30.31	0.97, s	33.44
30	0.93, s	35.03	0.98, s	34.68

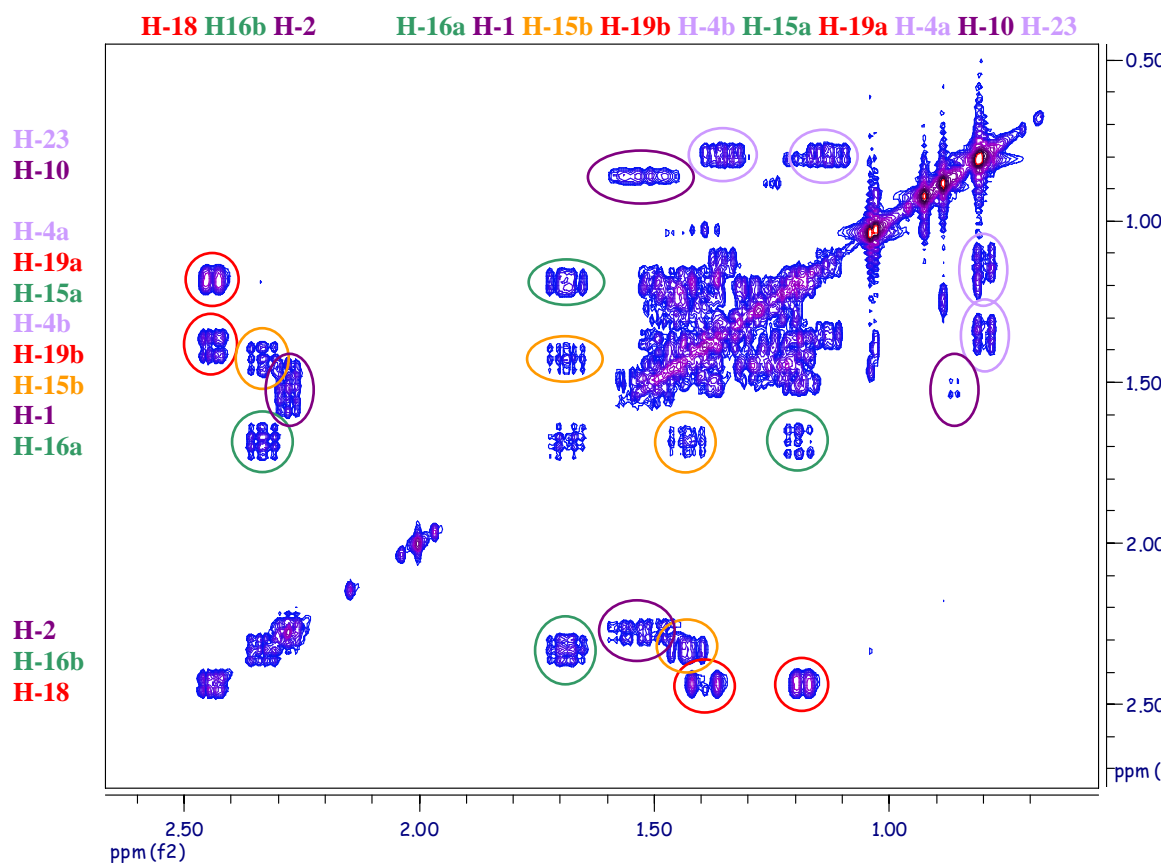
Tableau 18 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **88** à ceux de **87**



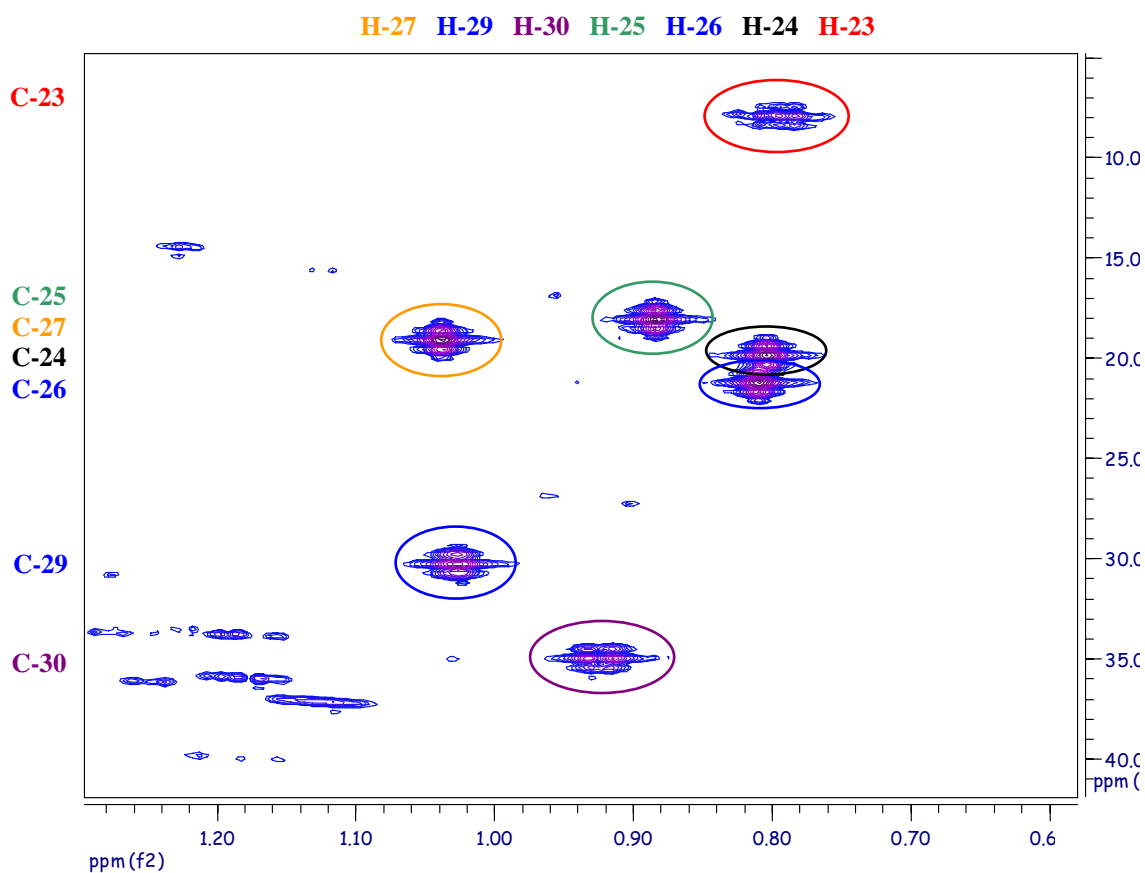
Spectre 15 : RMN ^1H du triterpène **88** entre 1,6 et 1,8 ppm



Spectre 16 : RMN ^1H du triterpène **88** entre 2,2 et 2,5 ppm



Spectre 17 : RMN 2D COSY du triterpène **88** entre 0,5 et 2,5 ppm



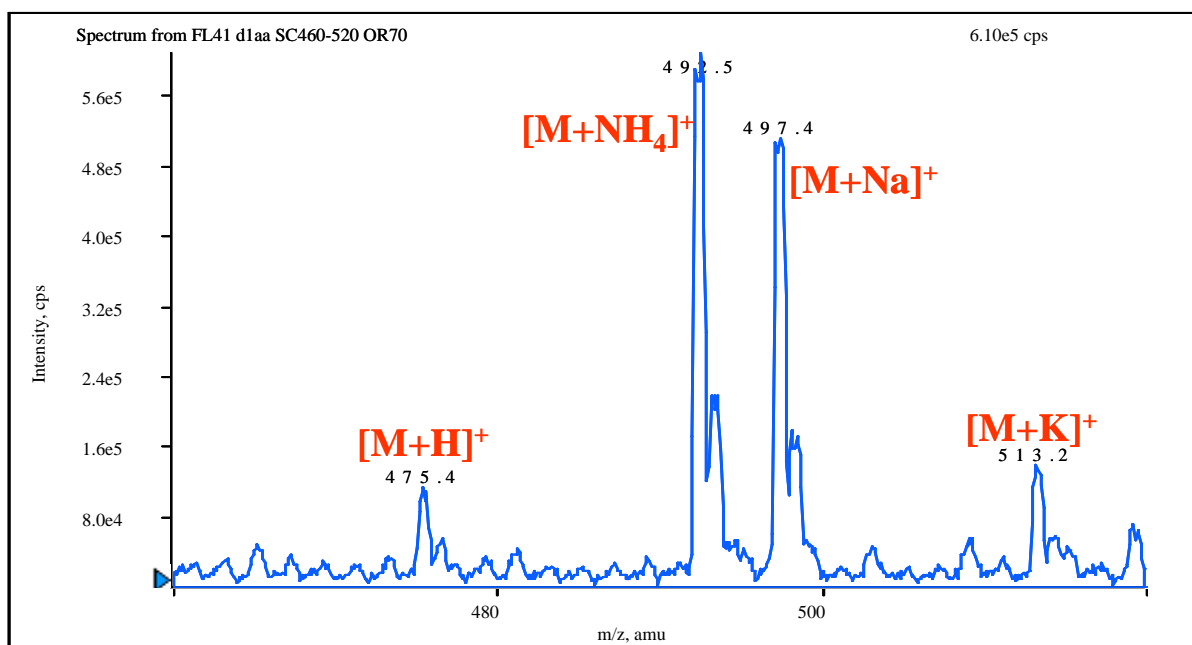
Spectre 18 : RMN 2D HMQC du triterpène **88**

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure de la molécule. Ces analyses ont été effectuées par introduction directe de l'échantillon dans une source d'ionisation électrospray (ESI-SM).

- SM (ordre 1)

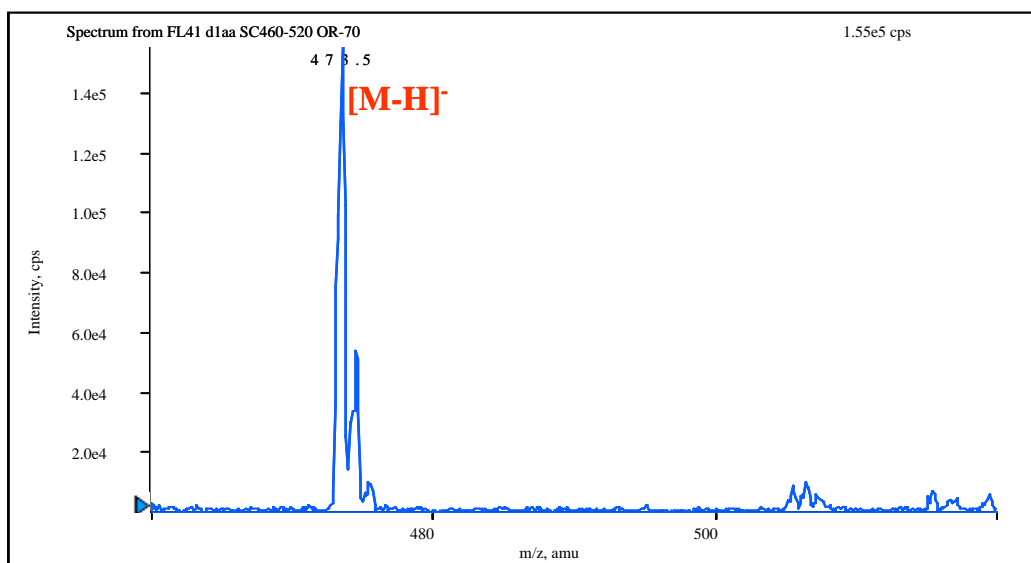
Le spectre de masse de l'échantillon, acquis en mode positif sur la gamme de m/z 460-520 ([Figure 36](#)), montre la présence d'ions caractéristiques pouvant être attribués au composé recherché :

- l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, à m/z 475
- l'adduit ammonium, $[M+NH_4]^+$, à m/z 492
- l'adduit sodium, $[M+Na]^+$, à m/z 497
- l'adduit potassium, $[M+K]^+$, à m/z 513



[Figure 36](#) : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène **88**

En mode négatif, le spectre de masse montre un ion principal à m/z 473 ([Figure 37](#)) qui pourrait correspondre au $[M-H]^-$ de la molécule recherchée.

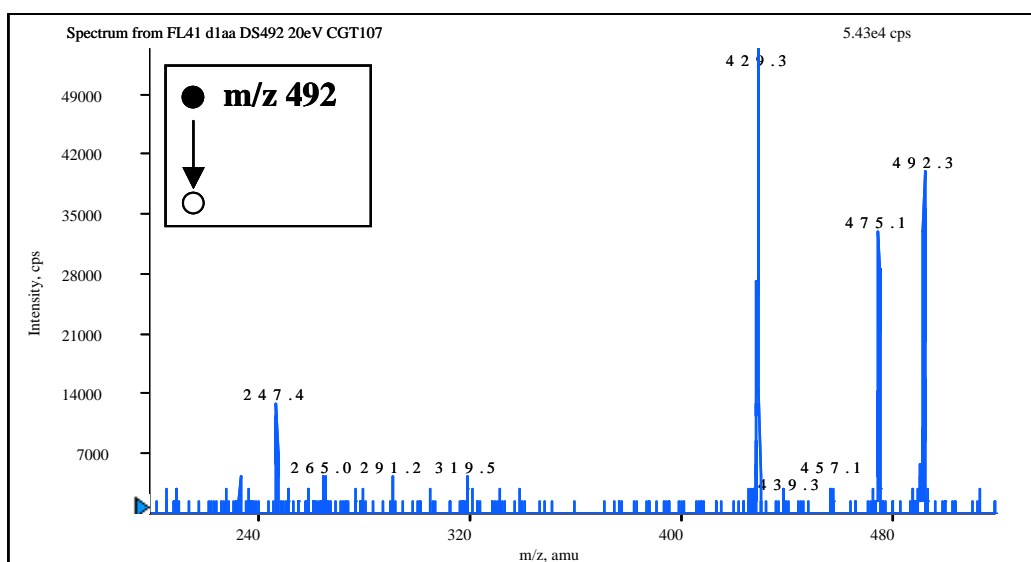


[Figure 37](#) : Spectre de masse (ESI- SM) en mode négatif du triterpène **88**

- SM/SM (ordre 2)

Mode positif

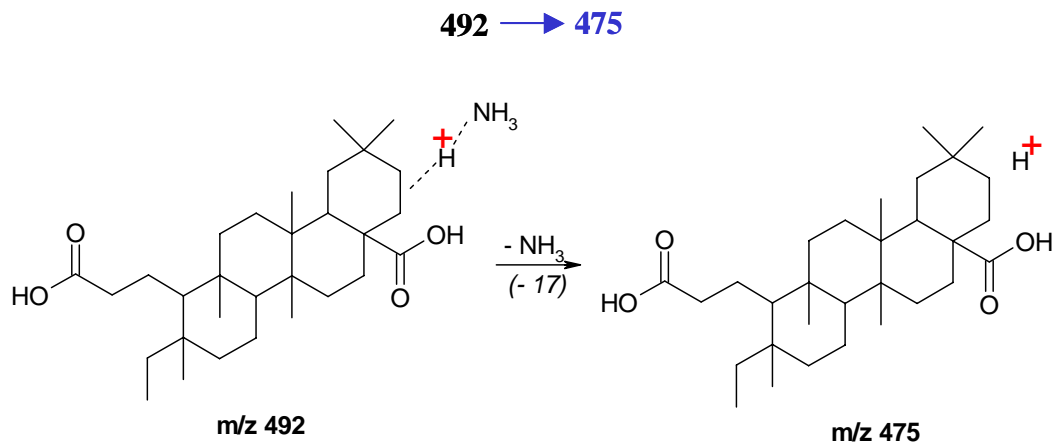
La structure de l'ion m/z 492 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'adduit ammonium $[M+NH_4]^+$ dont la structure a été proposées après les analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 38](#)).



[Figure 38](#) : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 492 (E_{coll} : 20eV ; CGT 107)

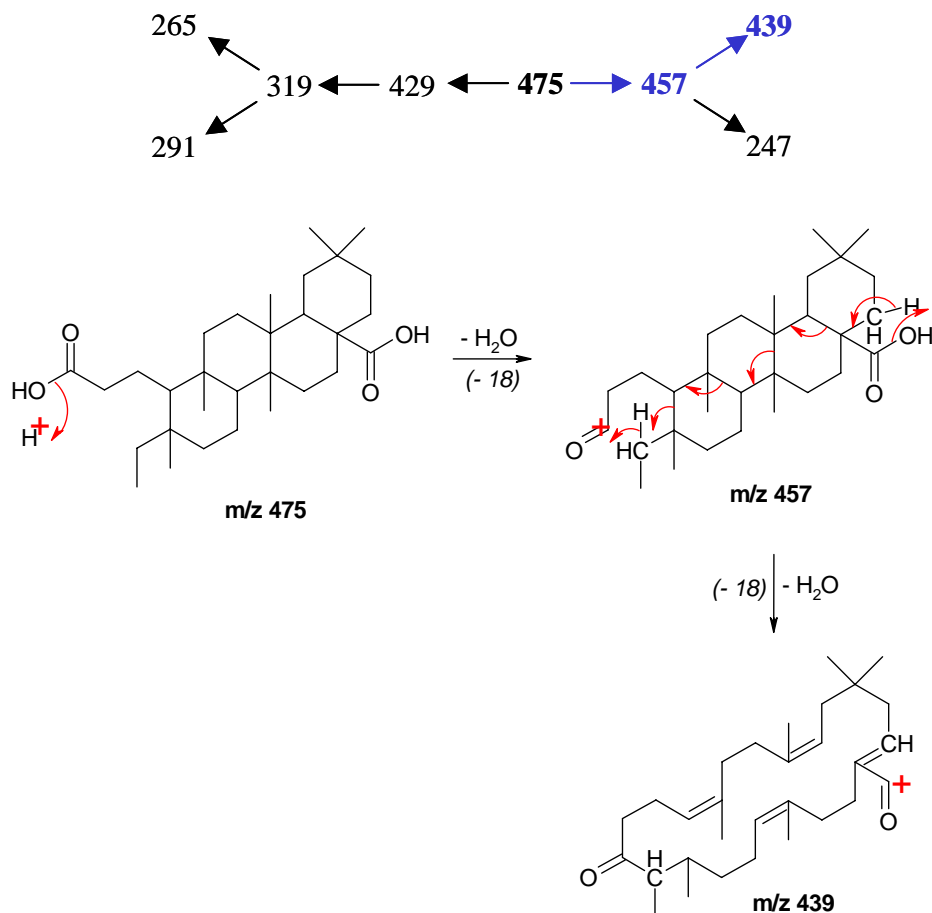
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 492 sont les suivants : m/z = 247, 265, 291, 319, 429, 439, 457, et 475 qui correspond à la perte de la molécule d'ammoniac NH_3 de l'adduit ammonium.

Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi. Tous les ions fragments sont ainsi issus de l'ion m/z 475.

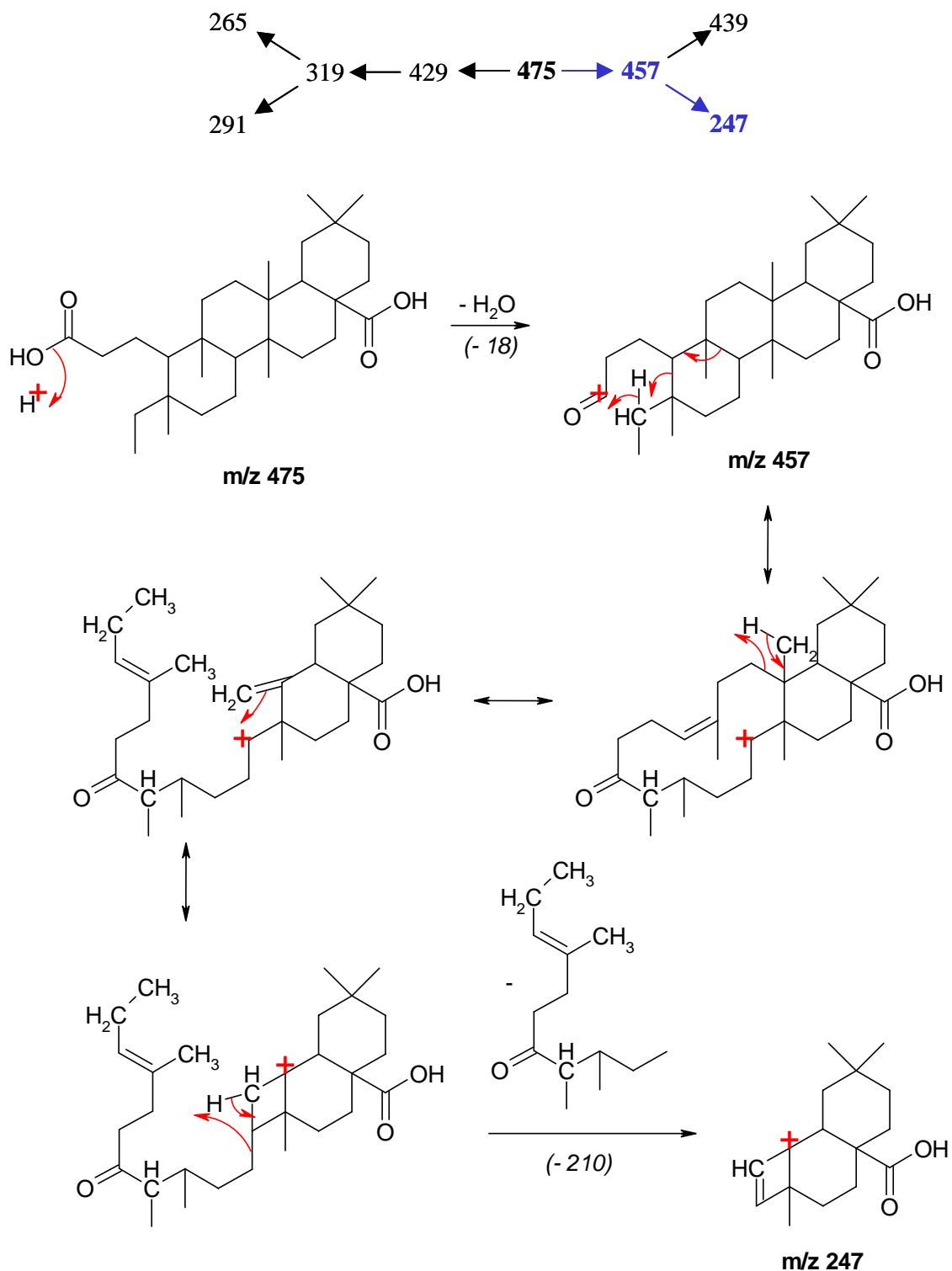


Les fragmentations correspondantes sont détaillées ci-après.

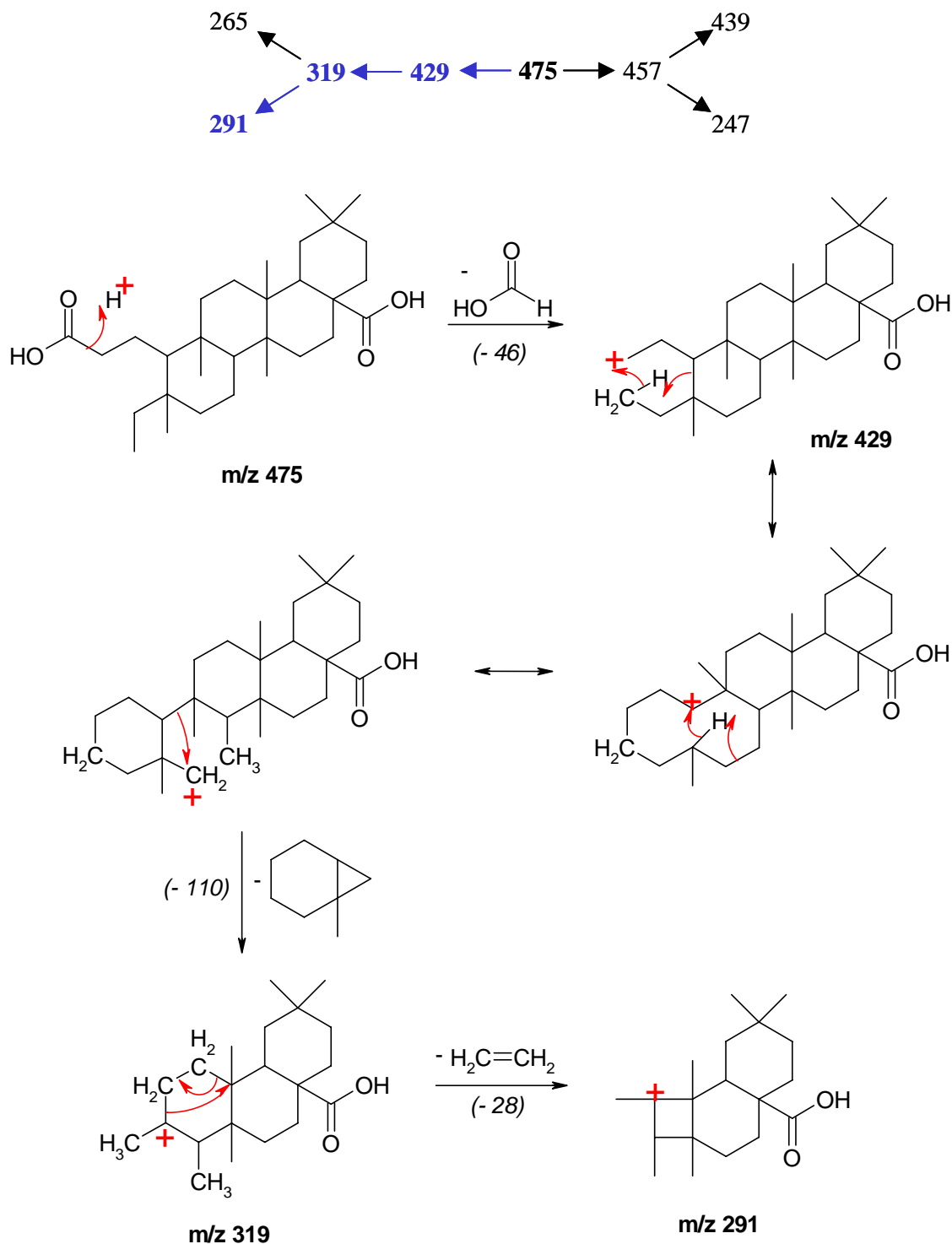
Considérons pour commencer la fragmentation qui conduit aux ions m/z 457 et 439. Chacune de ces deux fragmentations correspond à la perte d'une molécule d'eau au niveau des deux fonctions acide carboxylique COOH (-18).



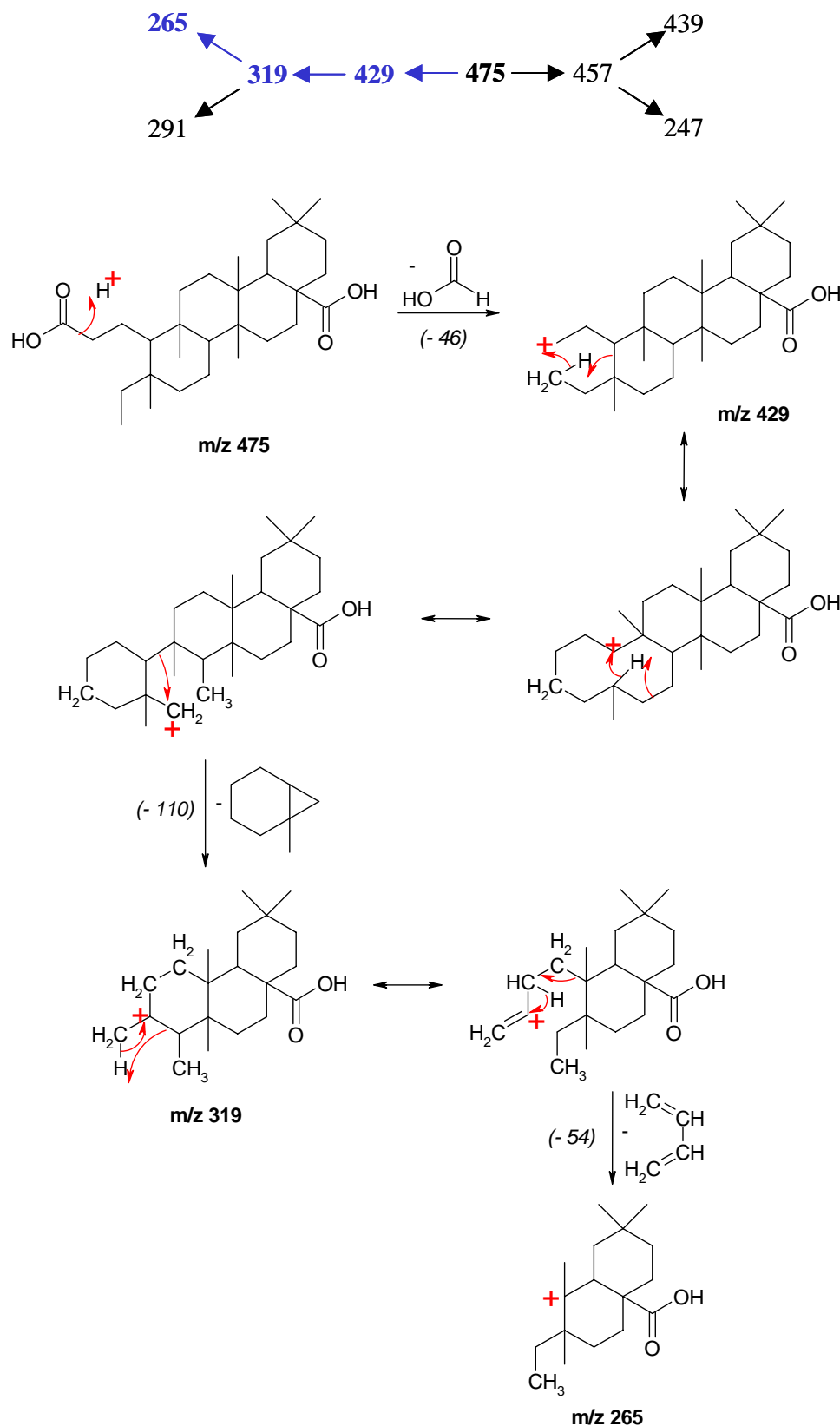
L'ion intermédiaire m/z 457 peut subir une série de réarrangements conduisant à la perte d'un fragment de masse 210. On forme ainsi un ion m/z 247.



L'ion m/z 475 peut également perdre une molécule d'acide formique provenant de la fragmentation d'une fonction acide carboxylique, pour engendrer un ion m/z 429. Après des réarrangements successifs cet ion peut être amené à perdre un fragment conduisant à un ion m/z 319 (-110). Enfin, cet ion peut perdre une molécule d'éthylène et donner un ion m/z 291 (-28).



Outre la perte d'une molécule d'éthylène, l'ion m/z 319 peut perdre une molécule de butadiène pour conduire à un ion m/z 265.



Mode négatif

La structure de l'ion m/z 473 est étudiée en SM/SM mais le spectre de fragmentation ne comporte aucun ion. L'énergie nécessaire pour induire la décomposition de cet ion semble trop importante et les ions sont défocalisés avant de pouvoir atteindre cette énergie.

- Conclusion

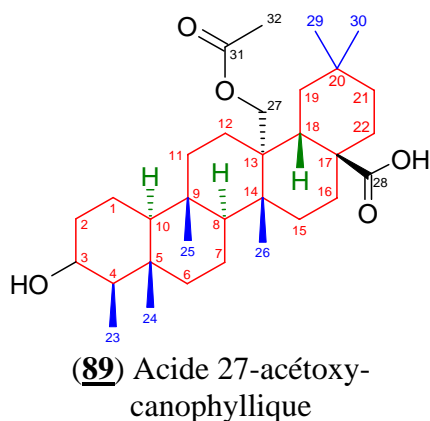
Les nombreux adduits observés lors de l'ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon, de même que le signal obtenu en mode négatif, permettent de conclure que le poids moléculaire du composé présent en solution est 474 Da.

Les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$, issu de l'adduit ammonium du composé attendu sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion m/z 492 observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode positif.

Nous pouvons donc conclure qu'il s'agit bien de l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**) dont la structure a été proposée après analyse des spectres RMN.

b)2. L'acide 27-acétoxy-canophyllique (89)

L'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**) est une molécule dont la structure n'avait jamais été décrite jusqu'à présent. Elle a une structure voisine de celle de l'acide canophyllique (**76**) : le groupe méthyle en position 27 a été oxydé et porte une fonction alcool acétylée.

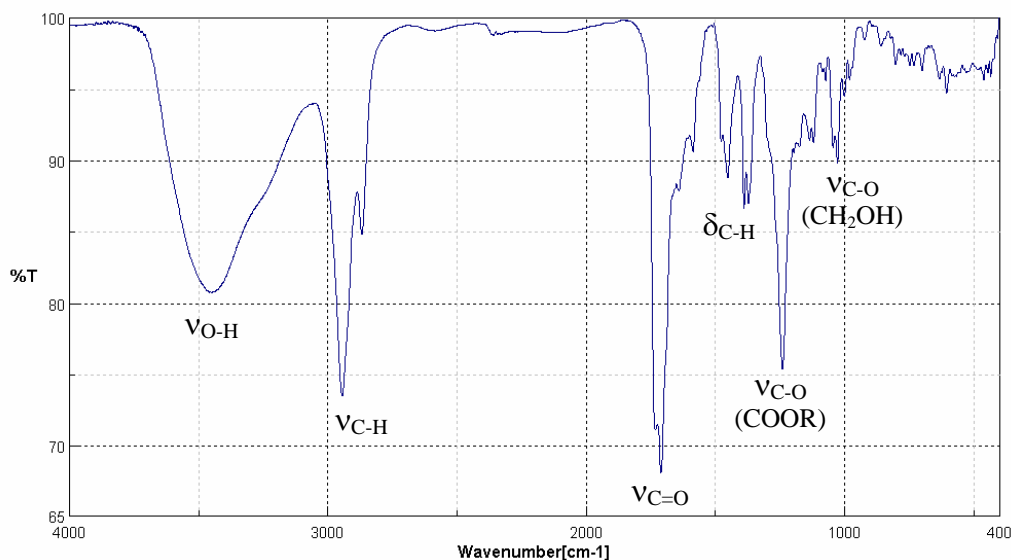


Nous avons obtenu l'acide 27-acétoxy-canophyllique par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#) (fractions où l'acide 27-acétoxy-canophyllique a été identifié : FL38, FL61, FL62 et FL65 (mélange)).

Sa formule brute est $C_{32}H_{52}O_5$, et sa masse molaire est $516 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($m/z [M-H]^- = 515$ et $m/z [M+NH_4]^+ = 534$, déterminés par spectrométrie de masse ESI-SM, Cf. [p. 162](#) et [163](#))

Le spectre Infra-Rouge de la molécule nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH_2 et CH_3 , ainsi que la présence d'une fonction acide carboxylique $COOH$, d'une fonction ester et d'une fonction alcool. Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

3449 cm^{-1} : Elongation des liaisons O-H de la fonction acide carboxylique et de la fonction alcool ; 2945 et 2869 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-H ; 1712 cm^{-1} : Elongation des liaisons C=O ; 1453 , 1390 et 1372 cm^{-1} : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ; 1241 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-O des fonctions acide carboxylique et ester ; 1029 cm^{-1} : Elongation de la liaison C-O de la fonction alcool.



Spectre 19 : Infra-Rouge de l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**)

Le spectre RMN du carbone ^{13}C révèle la présence de 32 atomes de carbone, ce qui va dans le sens d'une structure triterpénique, avec une chaîne carbonée adjacente. On note par ailleurs la présence de deux signaux fortement déblindés ($\delta=173,1$ ppm et $\delta=182,2$ ppm) qui correspondent à une fonction ester (O-C=O) et à une fonction acide carboxylique (COOH), ce qui est en accord avec les résultats du spectre IR.

Par ailleurs le spectre RMN ^1H nous indique la présence de 7 groupes méthyle (déplacements chimiques entre $\delta=0,88$ ppm et $\delta=2,04$ ppm, signaux intégrant pour 3 H). (Cf. [Tableau 19](#) et [Spectres 20, 21 et 22](#))

A la vue des spectres ^1H et ^{13}C , on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit bien d'un triterpène, comportant 7 groupements méthyle, une fonction alcool, une fonction ester et une fonction acide carboxylique. Le déplacement chimique important d'un des 7 groupes méthyle ($\delta=2,04$ ppm) semble indiquer que celui-ci est porté par un C=O ; la présence d'une fonction acétate est donc très probable. Il s'agit ensuite de placer ces substituants à la place adéquate.

Le point de départ de l'affectation des protons et carbones de la molécule est la position de la fonction alcool [HO-CH-3 ($\delta_{\text{H}}=3,67$ ppm, q, $J=2,5$ Hz ; $\delta_{\text{C}}=73,10$ ppm)] détecté en HMBC, par la corrélation entre le proton H-3 et le carbone CH₂-2 ($\delta_{\text{C}}=36,20$ ppm), le carbone CH-4 ($\delta_{\text{C}}=50,77$ ppm), le carbone CH₂-1 ($\delta_{\text{C}}=17,11$ ppm) et le carbone CH₃-23 ($\delta_{\text{C}}=12,15$ ppm).

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC §
1	17.11	-CH ₂ -	1.58, m ; 1.35, m	H-2, H-10	H-2, H-3, H-10
2	36.20	-CH ₂ -	1.85, dm ; 1.49, m	H-1, H-3	H-1, H-3, H-4, H-10
3	73.10	-CH-OH	3.67, q	H-2, H-4	H-1, H-2, H-4, H-23
4	50.77	-CH-	1.20, m	H-3, H-23	H-2, H-3, H-6, H-10, H-23, H-24
5	39.03	-C-	—	—	H-1, H-3, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	42.87	-CH ₂ -	1.74, dm ; 0.99, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.77	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.33, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	54.73	-CH-	1.33, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	38.48	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	62.71	-CH-	0.89, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	37.53	-CH ₂ -	1.50, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	26.18	-CH ₂ -	1.98, dm ; 1.35, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	39.36	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	43.83	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	32.71	-CH ₂ -	1.50, m ; 1.15, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	37.13	-CH ₂ -	1.45, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.85	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	39.52	-CH-	2.49, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	36.79	-CH ₂ -	1.60, m ; 1.17, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.25	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.59	-CH ₂ -	1.20, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	30.73	-CH ₂ -	2.47, dd ; 1.60, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	12.15	-CH ₃	0.91, d	H-4	H-3, H-4
24	16.92	-CH ₃	0.96, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.49	-CH ₃	0.92, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.98	-CH ₃	0.88, s	—	H-8, H-15
27	66.33	-CH ₂ -	4.43, d ; 4.48, d	—	H-12, H-18
28	182.18	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	29.94	-CH ₃	1.03, s	—	H-19, H-21
30	35.00	-CH ₃	0.90, s	—	H-19, H-21
31	173.08	-COO-	—	—	H-27, H-32
32	21.22	-CH ₃	2.04, s	—	—

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(\S) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

Tableau 19 : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C et couplages observés pour **89**

D'autre part, les corrélations des autres protons méthyliques fournissent les connectivités principales des quatre cycles de la structure triterpénique :

- CH₃-24 ($\delta_{\text{H}}=0,96$ ppm) avec C-4, C-5, C-6 et C-10;
- CH₃-25 ($\delta_{\text{H}}=0,92$ ppm) avec C-8, C-9, C-10 et C-11;
- CH₃-26 ($\delta_{\text{H}}=0,88$ ppm) avec C-8, C-13, C-14 et C-15;
- CH₂-27 ($\delta_{\text{H}}=4,43$ et $4,48$ ppm) avec C-12, C-13, C-14 et C-18;
- CH₃-29 ($\delta_{\text{H}}=1,03$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_{\text{H}}=0,90$ ppm) avec C-19, C-20 et C-21.

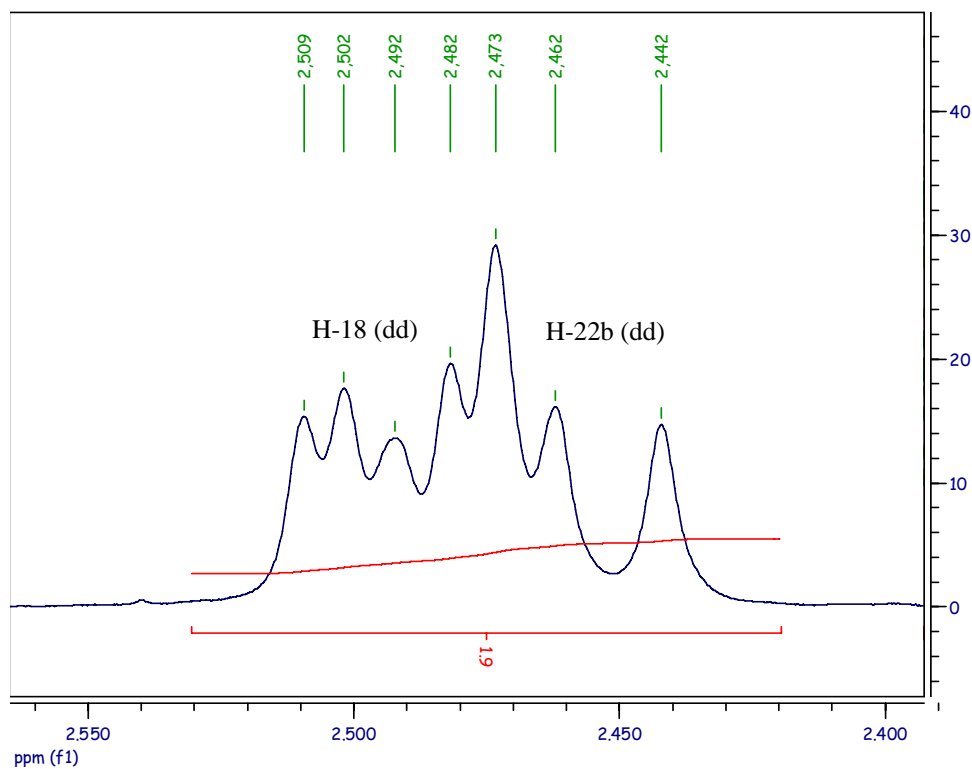
Finalement, le signal à $\delta_{\text{H}}=2,49$ ppm, attribué au groupe CH-18, montre une corrélation avec le groupe carboxylique C-28. (Cf. [Tableau 19](#) et [Spectres 23, 24 et 25](#))

Cette structure déterminée par RMN 2D est enfin confirmée par la comparaison à la littérature concernant l'acide canophyllique (**76**) (en particulier valeurs des déplacements chimiques en ¹³C : Cf. [Tableau 20](#)).

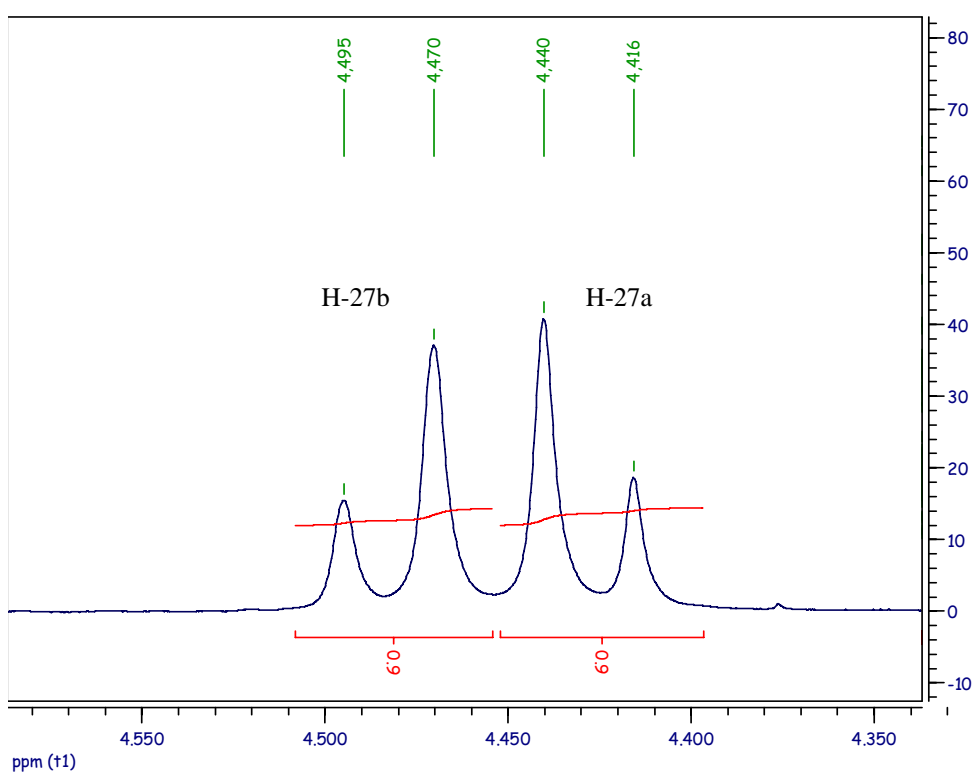
Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure du triterpène **89** comme étant l'acide 27-acétoxy-canophyllique.

Position n°	Acide 27-acétoxy-canophyllique (89)		Acide canophyllique (76)
	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)	¹ H littérature (δ , ppm)
1	1.58, m; 1.35, m	17.11	
2	1.85, dm; 1.49, m	36.20	
3	3.67, q, J=2.5 Hz	73.10	
4	1.20, m	50.77	
5	—	39.03	
6	1.74, dm; 0.99, m	42.87	
7	1.41, m; 1.33, m	18.77	
8	1.33, m	54.73	
9	—	38.48	
10	0.89, m	62.71	
11	1.50, m	37.53	
12	1.98, dm; 1.35, m	26.18	
13	—	39.36	
14	—	43.83	
15	1.50, m; 1.15, m	32.71	
16	1.45, m	37.13	
17	—	45.85	
18	2.49, dd	39.52	
19	1.60, m; 1.17, m	36.79	
20	—	29.25	
21	1.20, m	33.59	
22	2.47, dd; 1.60, m	30.73	
23	0.91, d, J=6.9 Hz	12.15	0.86, d, J=6.52 Hz
24	0.96, s	16.92	0.70, s
25	0.92, s	18.49	0.85, s
26	0.88, s	21.98	0.80, s
27	4.43, d; 4.48, d; J=12.3 Hz	66.33	1.02, s
28	—	182.18	—
29	1.03, s	29.94	1.02, s
30	0.90, s	35.00	0.92, s
31	—	173.08	—
32	2.04, s	21.22	—

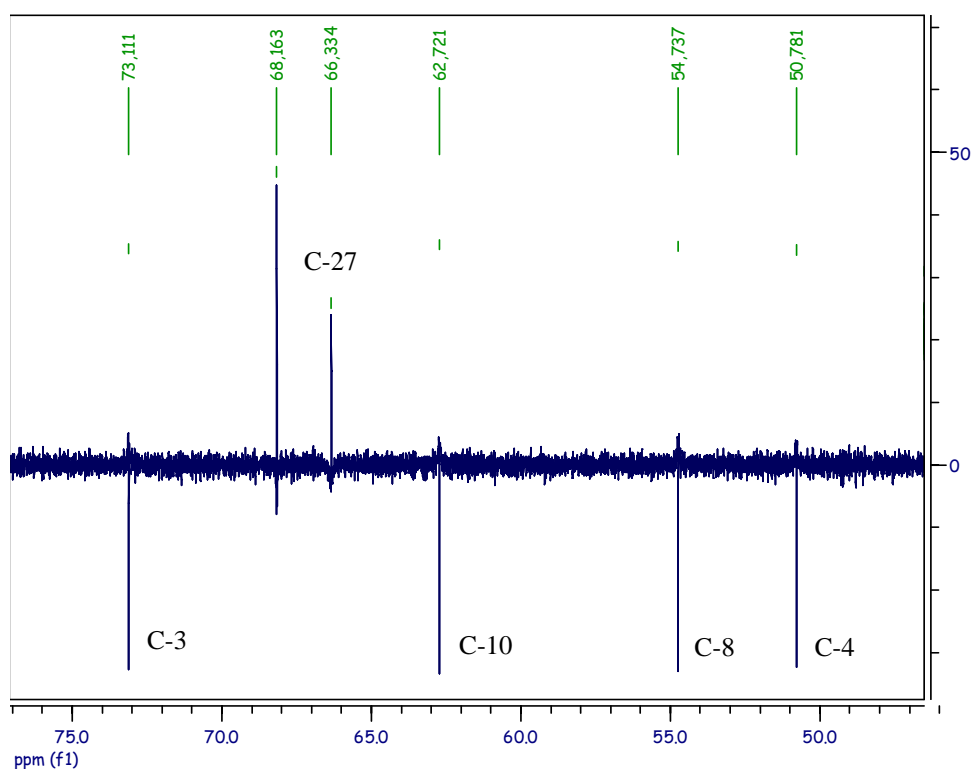
[Tableau 20](#) : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **89** à ceux de **76**⁷



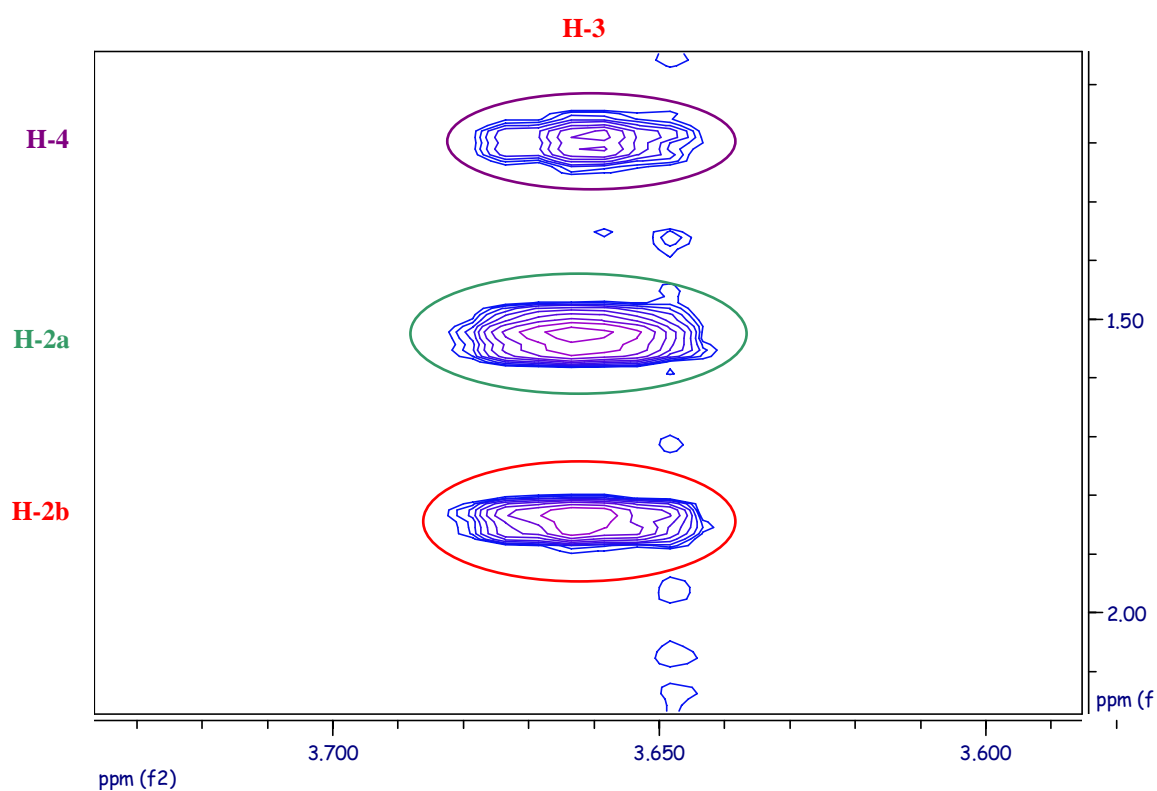
Spectre 20 : RMN ^1H du triterpène **89** entre 2,4 et 2,6 ppm



Spectre 21 : RMN ^1H du triterpène **89** entre 4,3 et 4,6 ppm



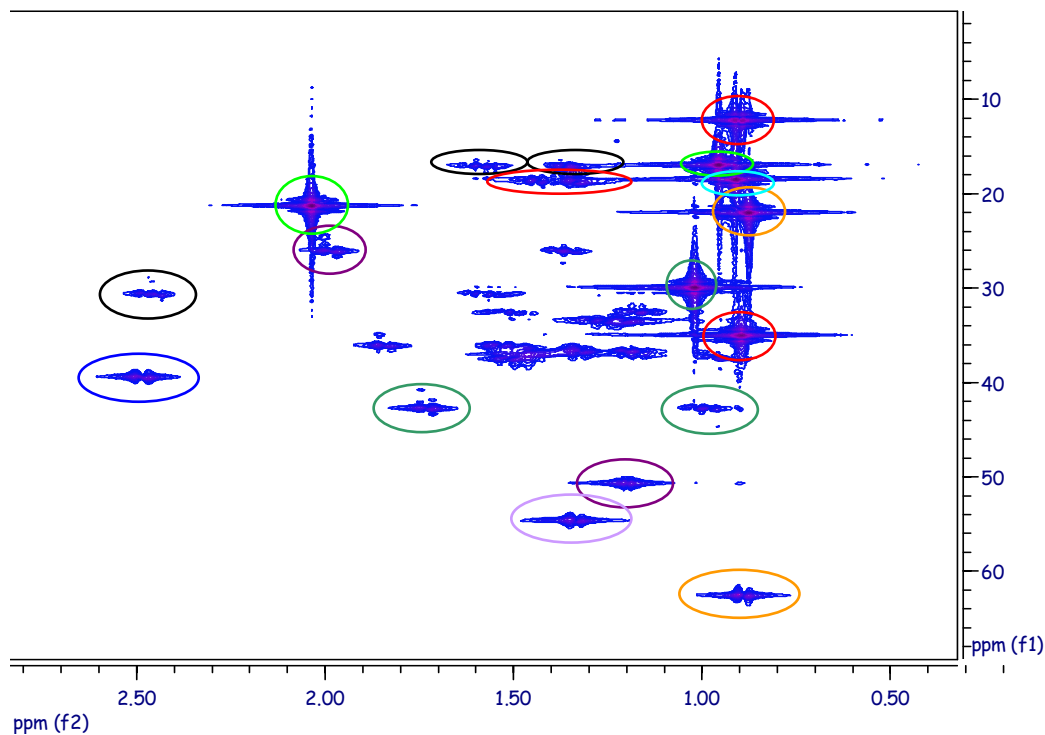
Spectre 22 : RMN ^{13}C DEPT du triterpène **89** entre 45 et 75 ppm



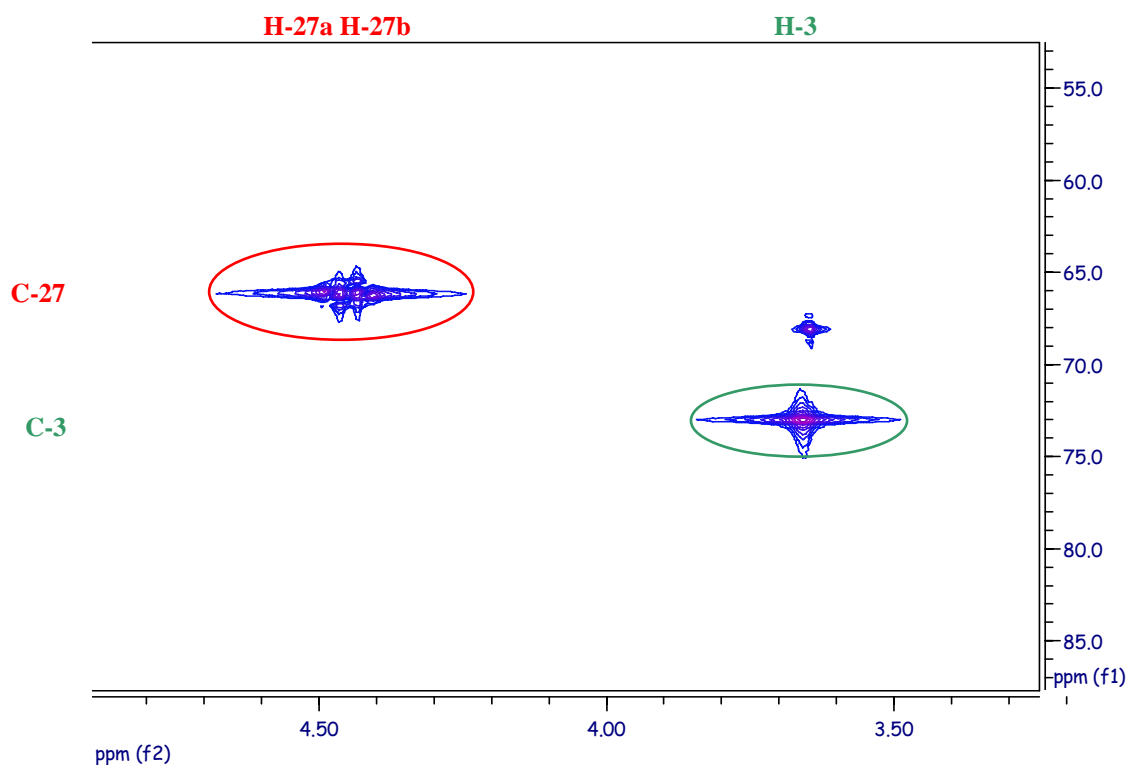
Spectre 23 : RMN 2D COSY du triterpène **89** (zoom)

H-18 H-22 H-32 H-12 H-6b H-1b H-7b H-1a H-7a H-8 H-4 H-29 H-6a H-24 H-25 H-23 H-30 H-10 H-26

C-23
C-24
C-1
C-7
C-25
C-32
C-26
C12
C-29
C-22
C-30
C-18
C-6
C-4
C-8
C-10



Spectre 24 : RMN 2D HMQC n° 1 du triterpène **89**



Spectre 25 : RMN 2D HMQC n° 2 du triterpène **89**

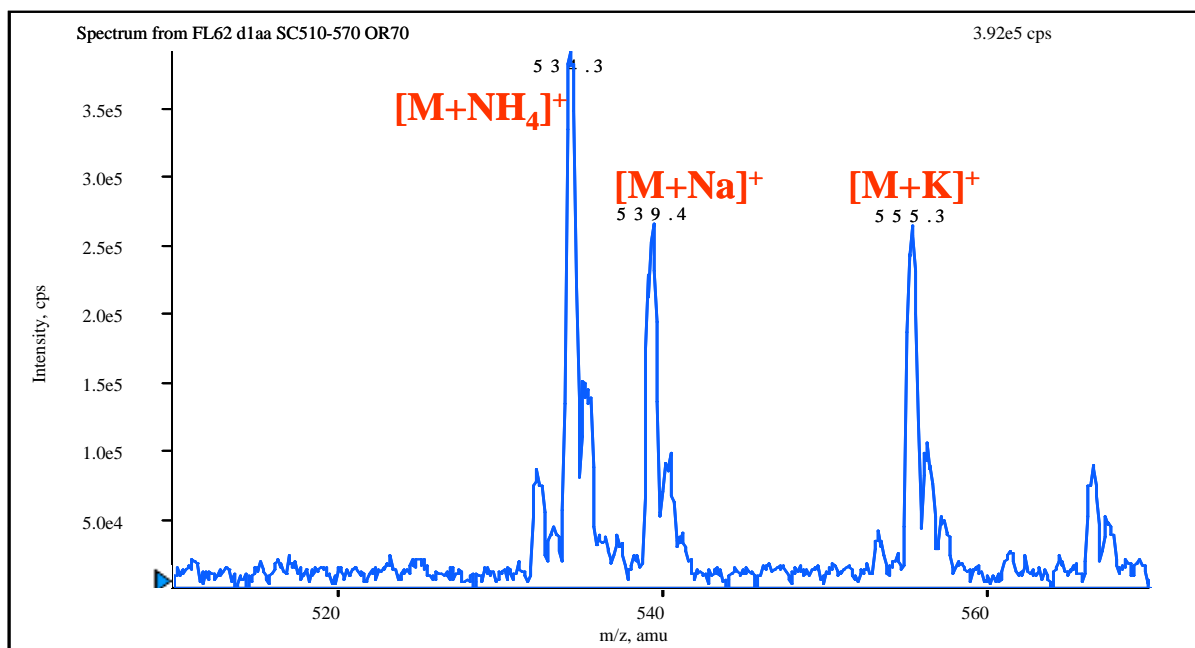
Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une méthode autre que la RMN. Ces analyses ont été effectuées par introduction directe de l'échantillon dans une source d'ionisation électrospray (ESI-SM).

- SM (ordre 1)

Le spectre de masse de l'échantillon, acquis en mode positif sur la gamme de m/z 510-570 ([Figure 39](#)), montre la présence d'ions caractéristiques pouvant être attribués au composé recherché :

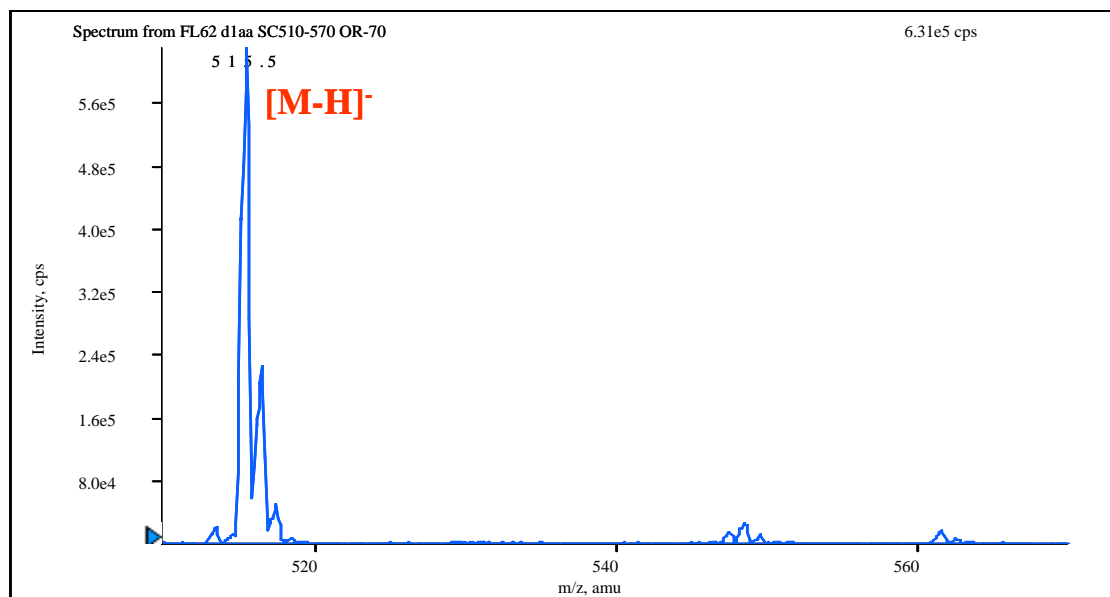
- l'adduit ammonium, $[M+NH_4]^+$, à m/z 534
- l'adduit sodium, $[M+Na]^+$, à m/z 539
- l'adduit potassium, $[M+K]^+$, à m/z 555

L'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, attendu à m/z 517, n'est pas formé dans la source.



[Figure 39](#) : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène **89**

En mode négatif, le spectre de masse montre un ion principal à m/z 515 ([Figure 40](#)) qui pourrait correspondre au $[M-H]^-$ de la molécule recherchée.

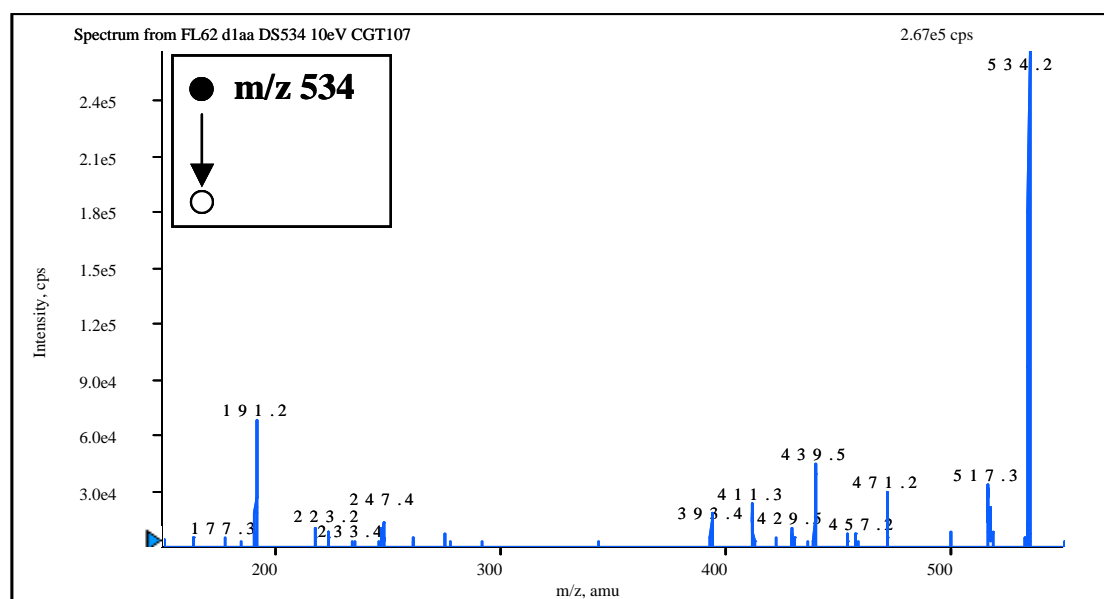


[Figure 40](#) : Spectre de masse (ESI- SM) en mode négatif du triterpène **89**

- SM/SM (ordre 2)

Mode positif

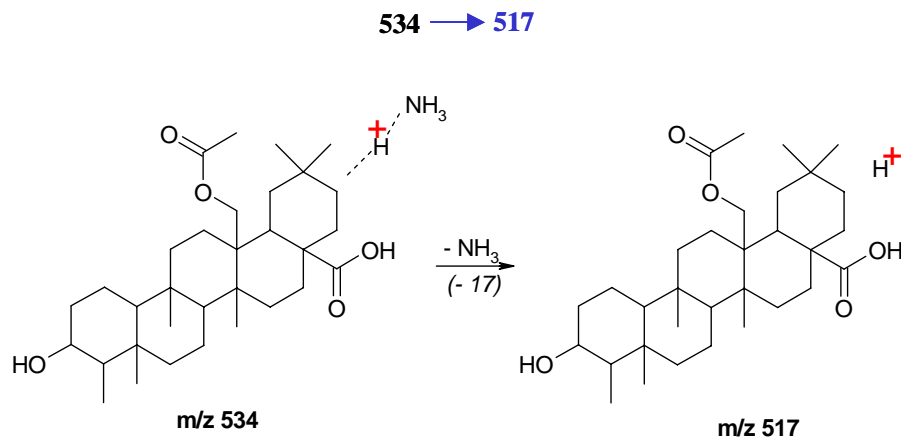
La structure de l'ion m/z 534 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'adduit ammonium $[M+NH_4]^+$ dont la structure a été proposée après les analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 41](#)).



[Figure 41](#) : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 534 (E_{coll} : 10eV ; CGT 107)

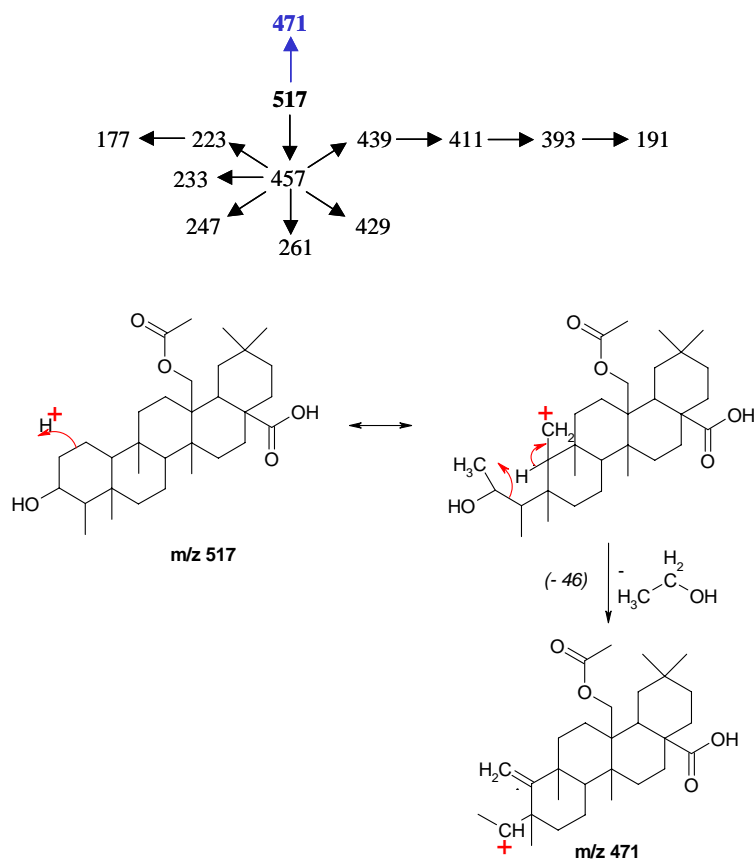
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 534 sont les suivants : m/z = 177, 191, 223, 233, 247, 261, 393, 411, 429, 439, 471 et 517 qui correspond à la perte de la molécule d'ammoniac NH_3 de l'adduit ammonium.

Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi. Tous les ions fragments sont ainsi issus de l'ion m/z 517.

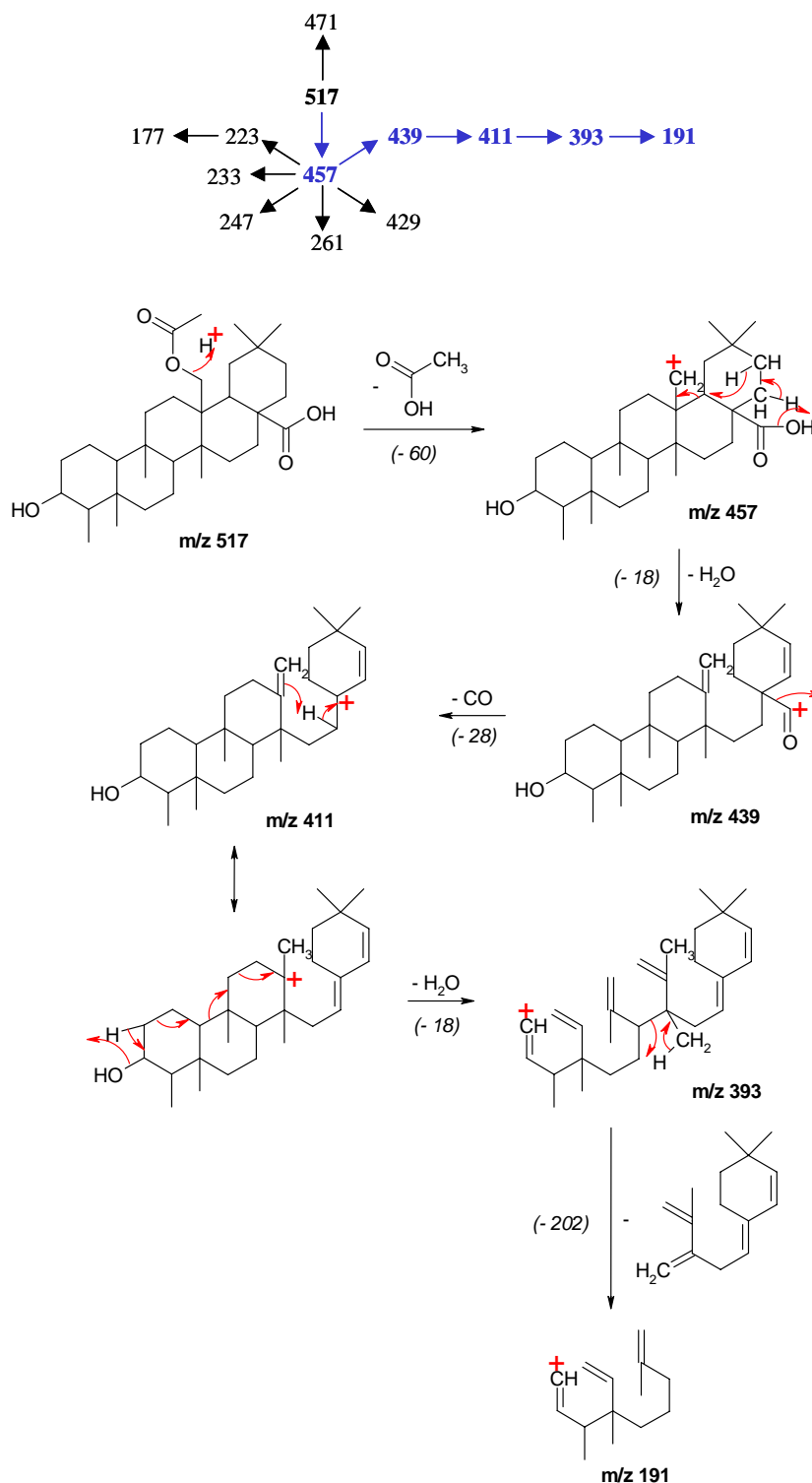


Les fragmentations correspondantes sont détaillées ci-après.

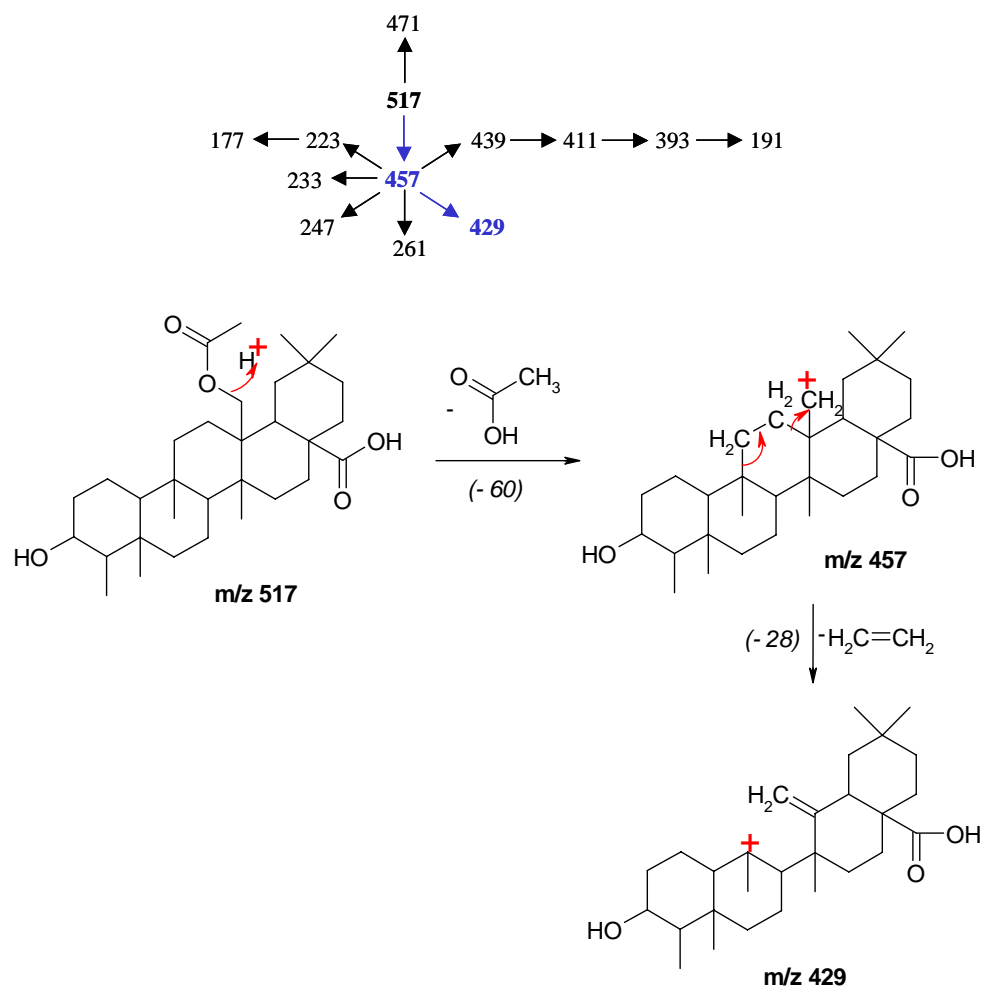
Considérons pour commencer la fragmentation qui conduit à un ion m/z 471. Cette fragmentation correspond à la perte d'une molécule d'éthanol (-46) après ouverture du cycle terminal de la molécule comportant la fonction alcool.



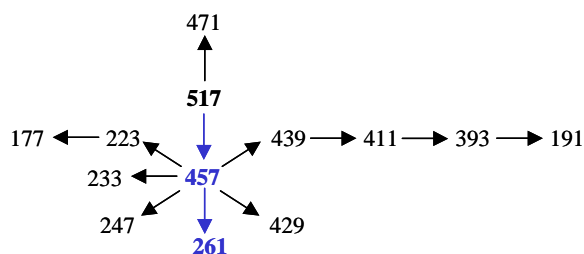
L'ion m/z 517 peut par ailleurs perdre une molécule d'acide acétique (-60) provenant de la fragmentation de la fonction alcool acétylée, pour former un ion m/z 457. Cet ion peut ensuite se fragmenter et former un ion m/z 439 par perte d'une molécule d'eau (-18) provenant de la fonction acide carboxylique. La perte d'une molécule d'oxyde de carbone (-28) intervient ensuite logiquement pour former un ion m/z 411. La fonction alcool peut alors se fragmenter à son tour par perte d'une molécule d'eau (-18) pour former un ion m/z 393. Cet ion peut enfin se scinder en deux par perte d'un fragment de masse 202 et formation d'un ion m/z 191.

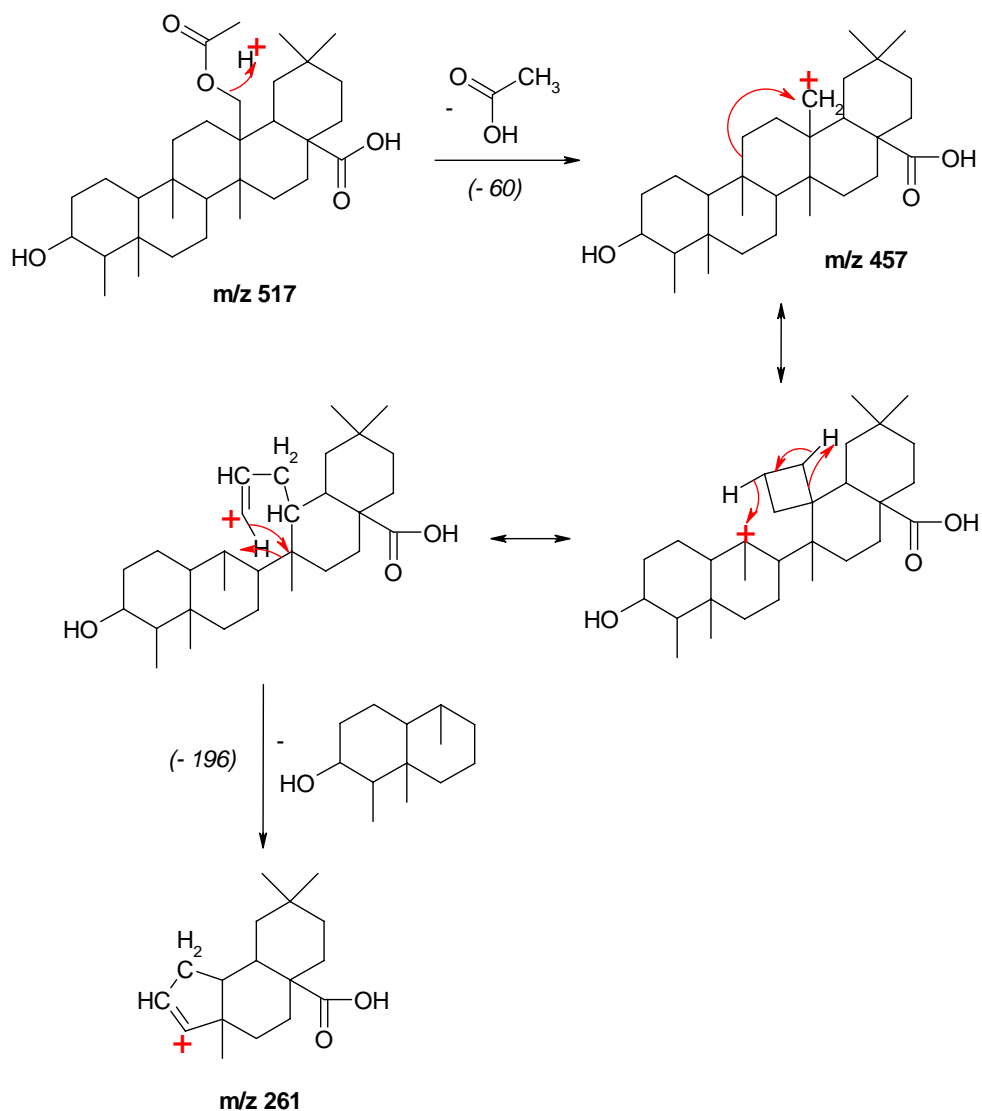


L'ion m/z 457 formé après la perte d'une molécule d'acide formique peut perdre une molécule d'éthylène (-28) pour former un ion m/z 429.

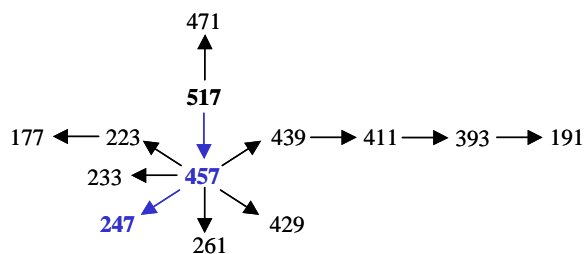


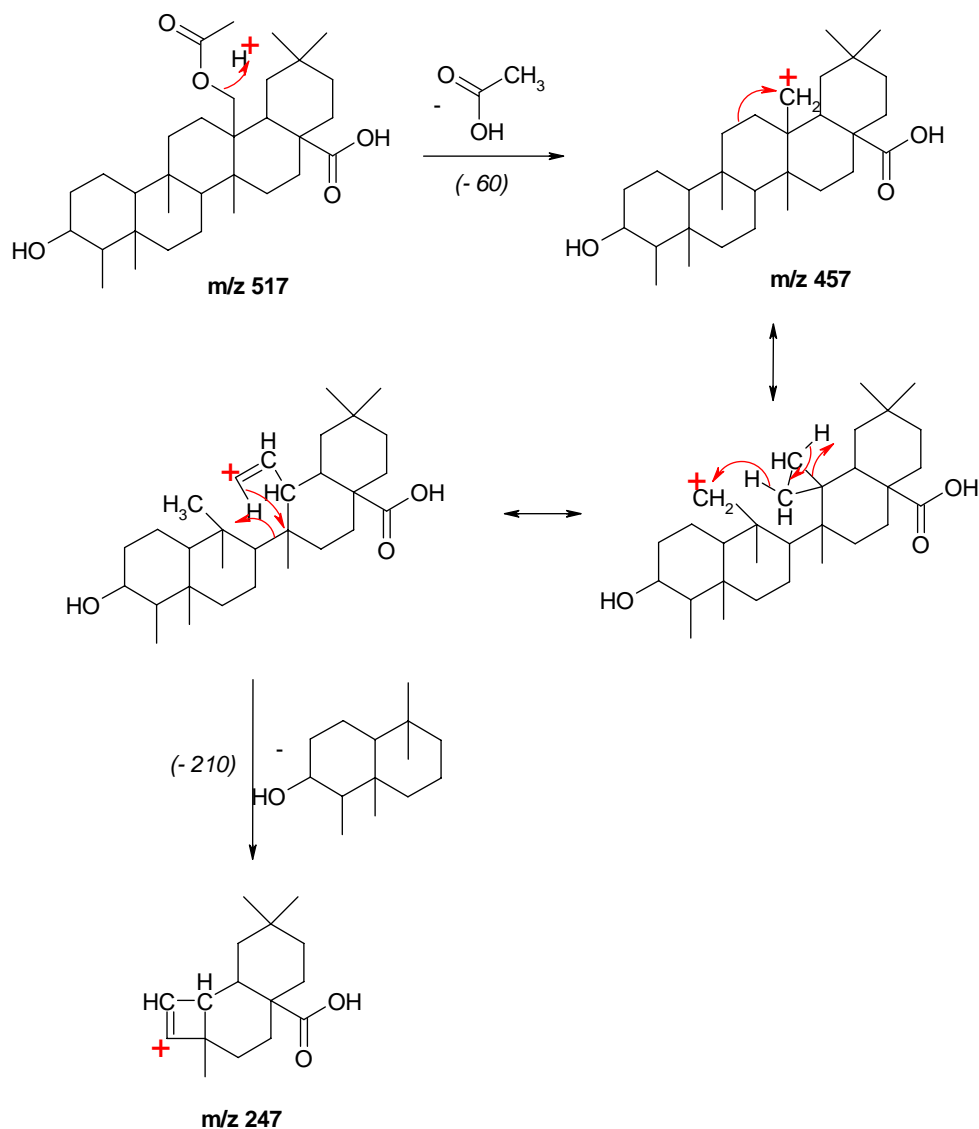
L'ion m/z 457 peut aussi se réarranger pour conduire à la perte d'un fragment de masse 196, correspondant aux deux cycles cyclohexane portant la fonction alcool, et à la formation d'un ion m/z 261.



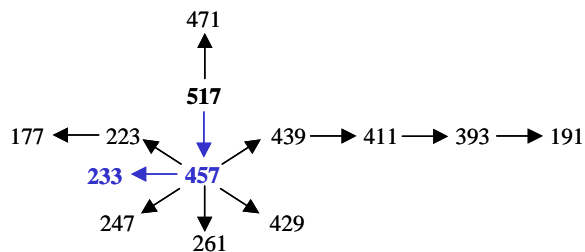


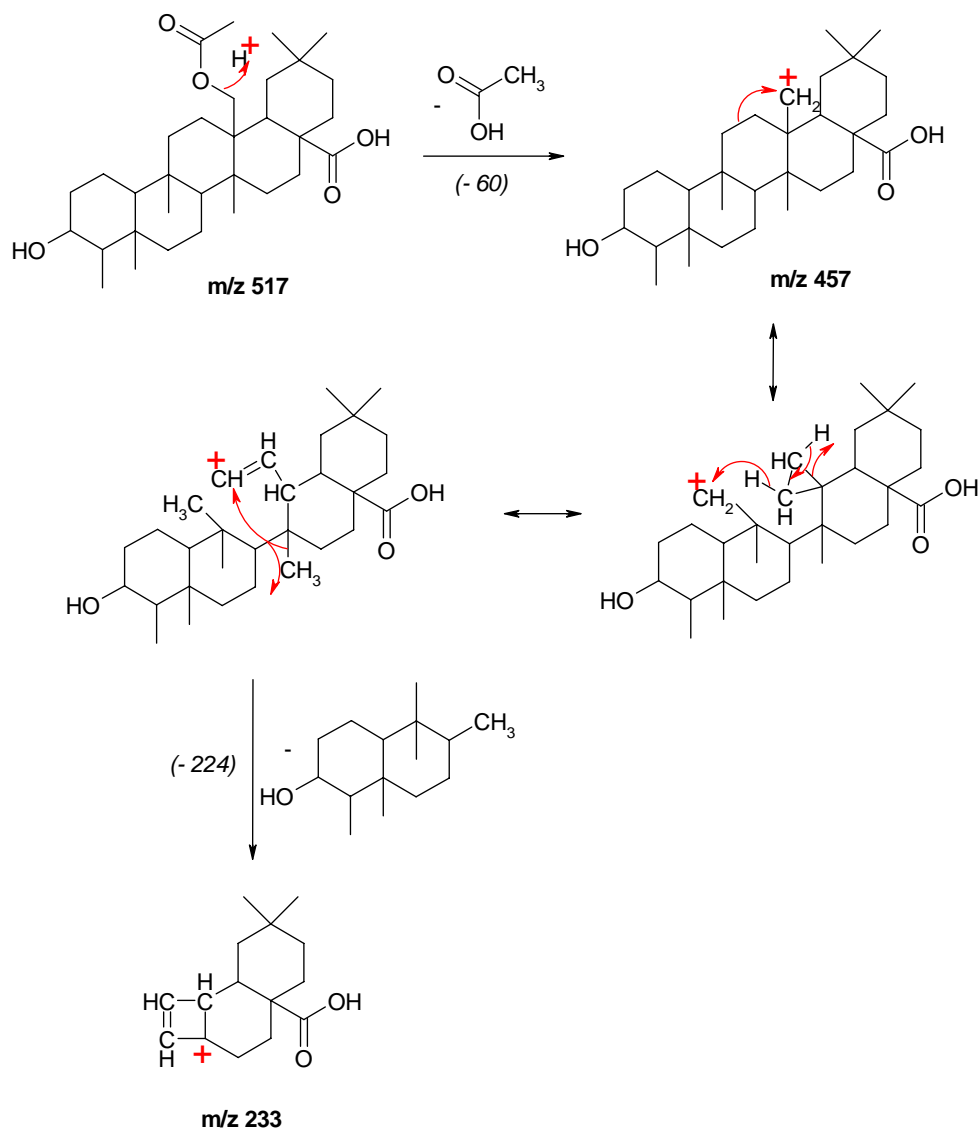
Selon un processus similaire, cet ion m/z 457 peut se scinder en un fragment de masse 210 (un groupement méthyle de plus sur le second cycle cyclohexane) et un ion m/z 247.



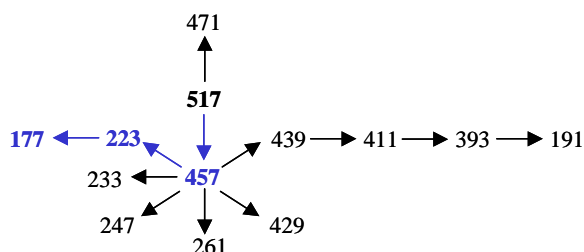


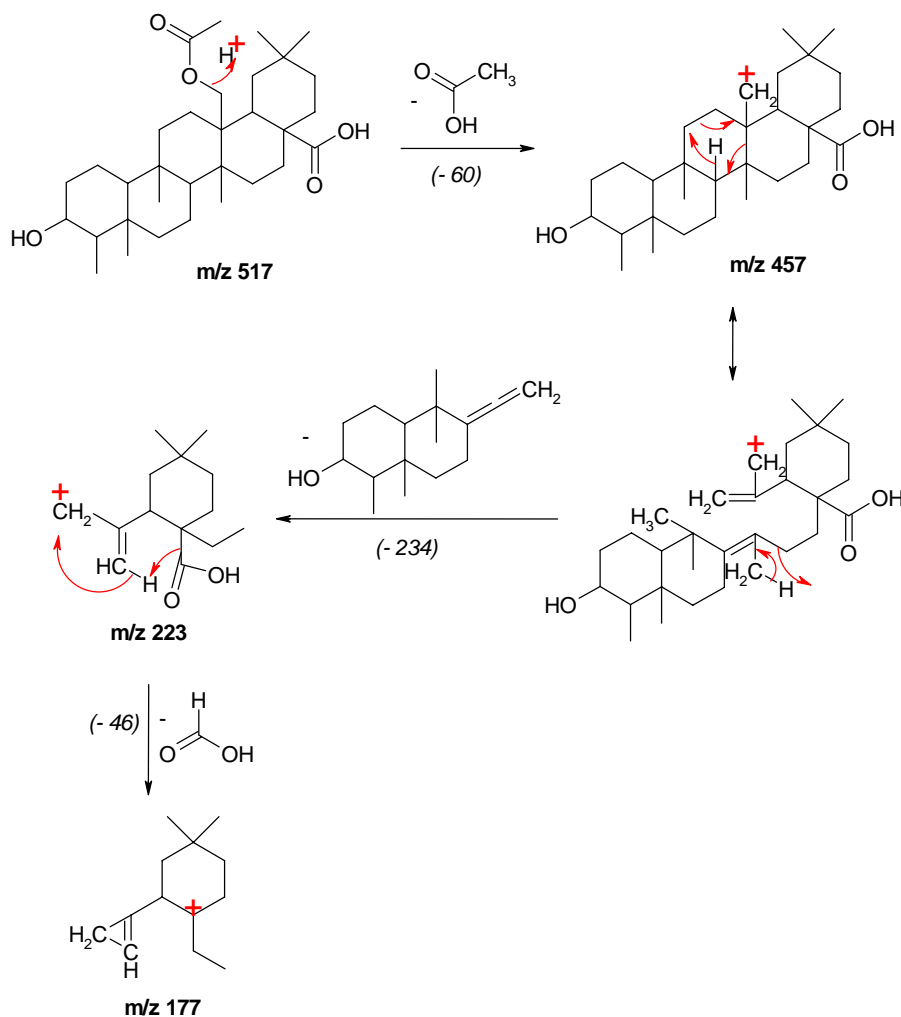
De même, l'ion m/z 457 peut se scinder en un fragment de masse 224 (encore un groupement méthyle en plus) et ion m/z 233.





Enfin, l'ion m/z 457 peut perdre un fragment de type allène (-234) pour former un ion m/z 223, qui peut à son tour perdre une molécule d'acide formique (-46) et engendrer un ion m/z 177.





Mode négatif

La structure de l'ion m/z 515 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'ion $[M-H]^-$ dont la structure a été proposée par des analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 42](#)).

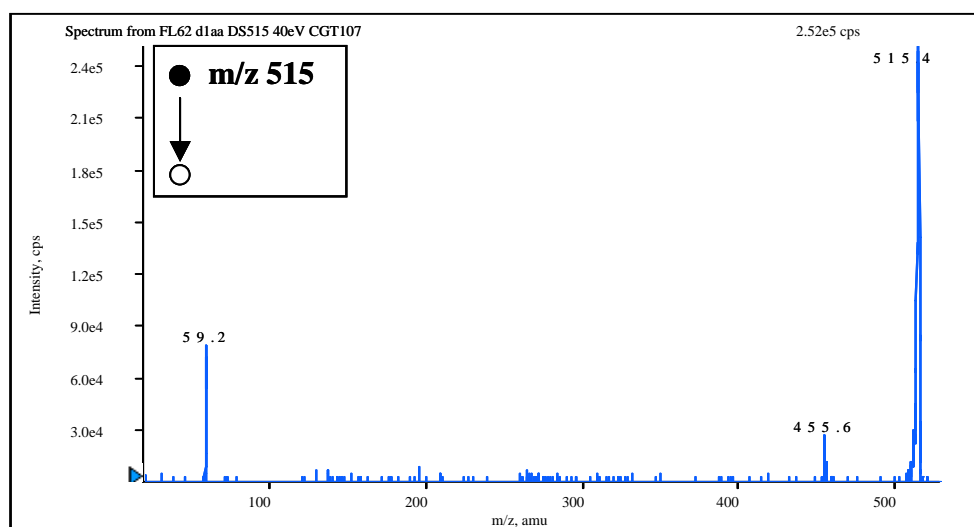
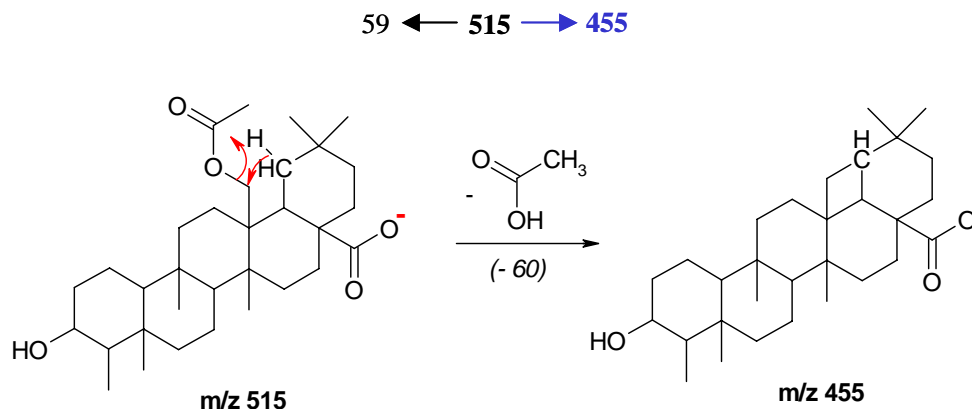


Figure 42 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 515 (E_{coll} : 40eV ; CGT 107)

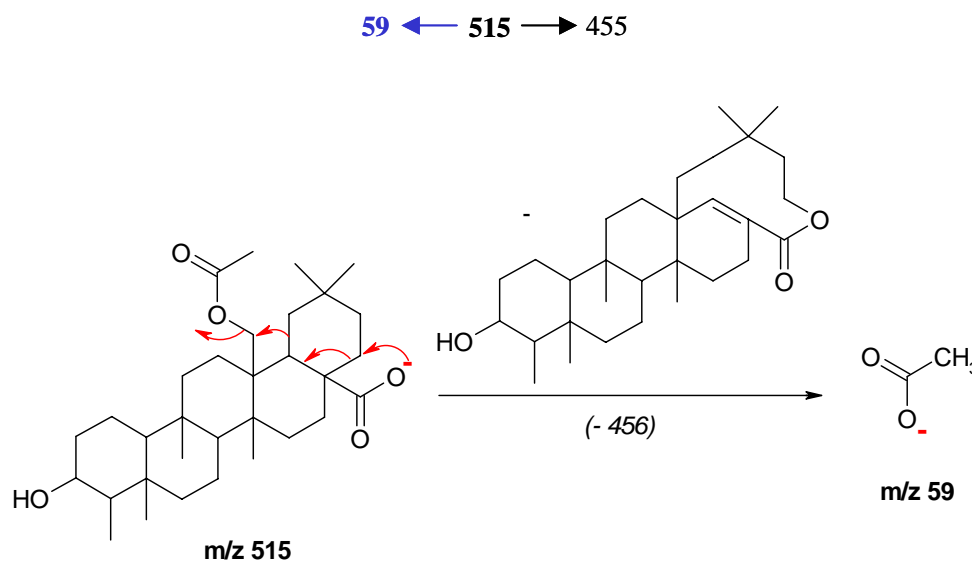
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 515 sont les suivants : m/z = 59 et 455.

Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi.

L'ion pseudo-moléculaire m/z 515 peut perdre une molécule d'acide acétique (-60) provenant de la fonction alcool acétylée. L'ion ainsi formé est m/z 455.



Inversement, l'ion pseudo-moléculaire peut perdre un fragment de masse 456 pour conduire à l'ion acétate m/z 59 (formation d'un hétérocycle à 9 centres par migration d'un doublet d'un atome d'oxygène).



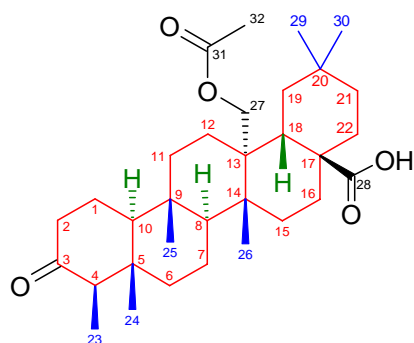
▪ Conclusion

Les nombreux adduits observés lors de l'ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon, de même que le signal obtenu en mode négatif, permettent de conclure que le poids moléculaire du composé présent en solution est 516 Da.

Les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ attendu, issu de l'adduit ammonium, sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion m/z 534 observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode positif. De plus les hypothèses de décomposition de l'ion $[M-H]^-$ attendu sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion m/z 515 observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode négatif. Il s'agit donc bien de l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**) dont la structure a été proposée.

b)3. L'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (85)

L'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**) est une molécule dont la structure n'avait jamais été décrite jusqu'à présent. Elle a une structure voisine de celle de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**) décrit précédemment, où le méthyle en position 27 a été oxydé et porte désormais une fonction alcool acétylée.



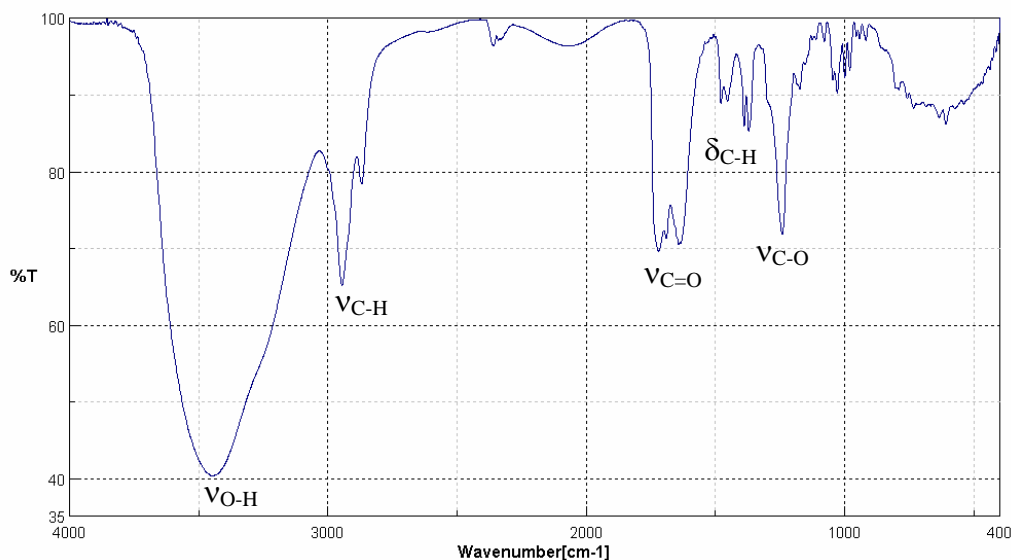
(85) Acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque

Nous avons obtenu l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fraction où l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque a été identifié : FL35)

Sa formule brute est $C_{32}H_{50}O_5$, et sa masse molaire est $514 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($m/z [M-H]^- = 513$ et $m/z [M+NH_4]^+ = 532$, déterminés par spectrométrie de masse ESI-SM, Cf. p. 177 et 178)

Le spectre Infra-Rouge de la molécule nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH_2 et CH_3 , ainsi que la présence de fonctions acide carboxylique, ester et carbonyle. Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

3444 cm^{-1} : Elongation de la liaison O-H de la fonction acide carboxylique ; 2946 et 2870 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-H ; 1720 et 1642 cm^{-1} : Elongation des liaisons C=O ; 1478 , 1454 , 1389 et 1371 cm^{-1} : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ; 1242 cm^{-1} : Elongation des liaisons C-O des fonctions acide carboxylique et ester.



Spectre 26 : Infra-Rouge de l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**)

Le spectre RMN du carbone ^{13}C révèle la présence de 32 atomes de carbone, ce qui va dans le sens d'une structure triterpénique, avec une chaîne carbonée adjacente. On note par ailleurs la présence de trois signaux fortement déblindés ($\delta=213,0$ ppm, $\delta=182,9$ ppm et $\delta=171,5$ ppm) qui correspondent à une fonction carbonyle (C=O), une fonction acide carboxylique (COOH) et une fonction ester (O-C=O), ce qui est en accord avec les résultats du spectre IR.

Par ailleurs le spectre RMN ^1H nous indique la présence de 7 groupes méthyle (déplacements chimiques entre $\delta=0,71$ ppm et $\delta=2,09$ ppm, signaux intégrant pour 3 H). (Cf. [Tableau 21](#) et [Spectres 27 et 28](#))

A la vue des spectres ^1H et ^{13}C , on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit bien d'un triterpène, comportant 7 groupements méthyle, une fonction carbonyle, une fonction ester et une fonction acide carboxylique. Le déplacement chimique important d'un des 7 groupes méthyle ($\delta=2,09$ ppm) semble indiquer que celui-ci est porté par un C=O ; la présence d'une fonction acétate est donc très probable. Il s'agit ensuite de placer ces substituants à la place adéquate.

Le point de départ de l'affectation des protons et carbones de la molécule est la position du groupement CH-CH₃ [CH-4 ($\delta_{\text{H}}=2,23$ ppm, q, J=6,7 Hz ; $\delta_{\text{C}}=58,12$ ppm)] détecté en HMBC par la corrélation entre le proton H-4 et le carbone C-3 de la fonction carbonyle ($\delta_{\text{C}}=213,03$ ppm), et entre le proton H-4 et le carbone C-23 du groupe méthyle CH₃ ($\delta=6,90$ ppm : la HMQC montre une corrélation directe entre ce signal ^{13}C et le doublet (J=6.6 Hz) engendré par les protons H-23 qui sortent à $\delta=0,86$ ppm).

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC [§]
1	22.30	-CH ₂ -	1.96, m; 1.70, m	H-2, H-10	H-2, H-3, H-10
2	41.48	-CH ₂ -	2.39, m; 2.27, m	H-1	H-1, H-3, H-4, H-10
3	213.03	-C=O	—	—	H-1, H-2, H-4, H-23
4	58.12	-CH-	2.37, m	H-23	H-2, H-3, H-6, H-10, H-23, H-24
5	42.43	-C-	—	—	H-1, H-3, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	40.93	-CH ₂ -	1.74, m; 1.38, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.36	-CH ₂ -	1.48, m; 1.44, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.11	-CH-	1.48, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	37.70	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	59.10	-CH-	1.60, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.24	-CH ₂ -	1.55, m; 1.13, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	25.01	-CH ₂ -	2.01, m; 1.41, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.04	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	42.06	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	31.49	-CH ₂ -	1.56, m; 1.18, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	36.00	-CH ₂ -	1.47, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	44.75	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	38.24	-CH-	2.54, m	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.57	-CH ₂ -	1.34, m; 1.20, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	28.34	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	32.25	-CH ₂ -	1.20, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	29.32	-CH ₂ -	2.50, m; 1.60, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	6.90	-CH ₃	0.86, d	H-4	H-3, H-4
24	14.79	-CH ₃	0.71, s	—	H-4, H-6, H-10
25	17.61	-CH ₃	0.91, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.57	-CH ₃	0.90, s	—	H-8, H-15
27	65.14	-CH ₂ -O-	4.36, d; 4.49, d	—	H-12, H-18
28	182.87	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	29.47	-CH ₃	1.02, s	—	H-19, H-21
30	34.59	-CH ₃	0.87, s	—	H-19, H-21
31	171.46	-COO-	—	—	H-27, H-32
32	21.51	-CH ₃	2.09, s	—	—

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H}/^1\text{H}$

(§) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

Tableau 21 : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C et couplages observés pour **85**

De proche en proche, la HMQC et la HMBC permettent ensuite de déterminer l'enchaînement exact des carbones de la molécule, notamment en ce qui concerne les corrélations des autres protons méthyliques qui fournissent les connectivités principales des quatre cycles de la structure triterpénique :

- CH₃-24 ($\delta_H=0,71$ ppm) avec C-4, C-5, C-6 et C-10;
- CH₃-25 ($\delta_H=0,91$ ppm) avec C-8, C-9, C-10 et C-11;
- CH₃-26 ($\delta_H=0,90$ ppm) avec C-8, C-13, C-14 et C-15;
- CH₂-27 ($\delta_H=4,36$ ppm et $\delta_H=4,49$ ppm) avec C-12, C-13, C-14 et C-18;
- CH₃-29 ($\delta_H=1,02$ ppm) et CH₃-30 ($\delta_H=0,87$ ppm) avec C-19, C-20 et C-21.

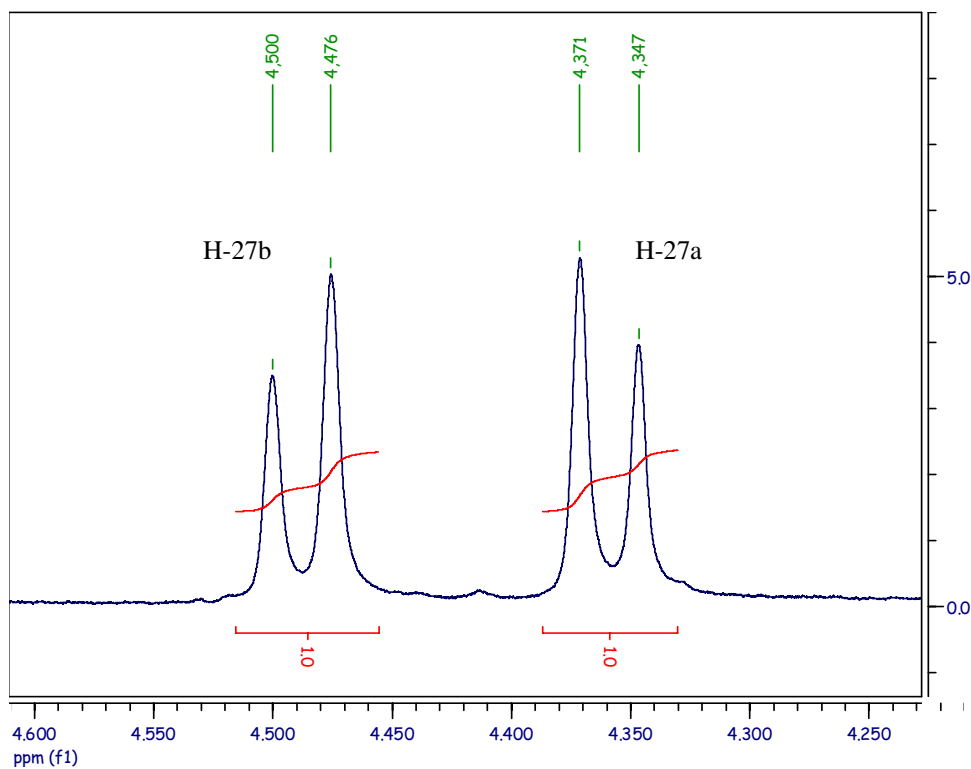
Les couplages entre protons observés sur le spectre de couplage COSY nous permettent de confirmer la structure précédemment définie. (Cf. [Tableau 21](#) et [Spectres 29 et 30](#))

Cette structure déterminée par RMN en 2D est enfin confirmée par la comparaison à l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (en particulier valeurs des déplacements chimiques en ¹³C : Cf. [Tableau 22](#)).

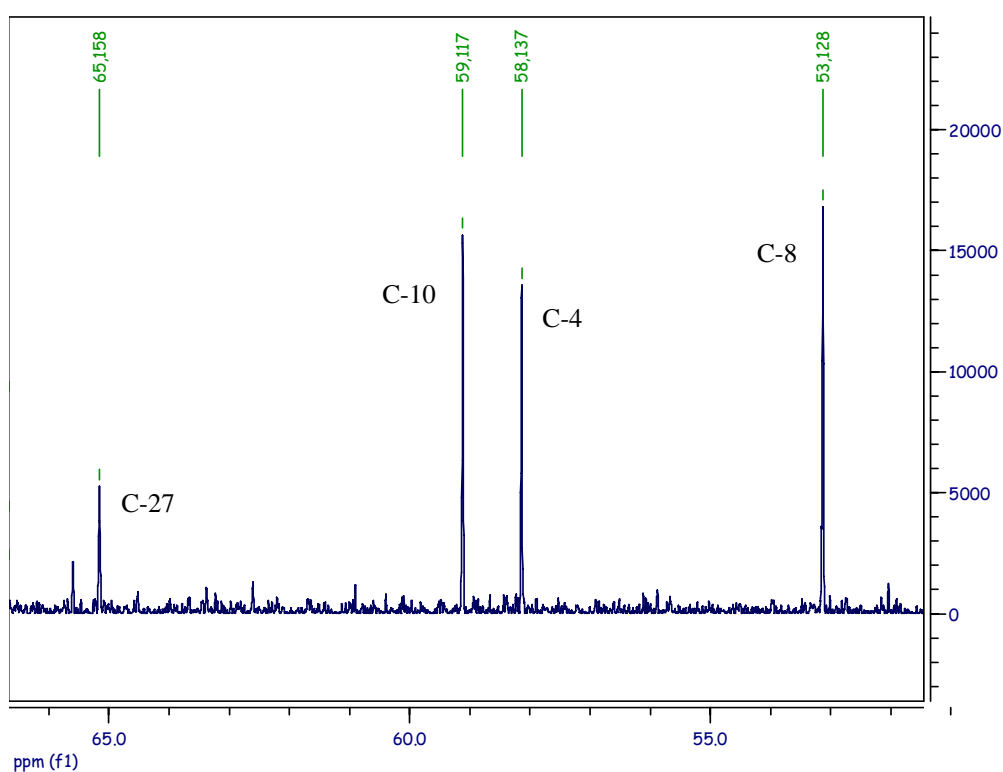
Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure du triterpène **85** comme étant l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque.

Position n°	Acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (85)		Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	
	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)	¹ H (δ , ppm)	¹³ C (δ , ppm)
1	1.96, m; 1.70, m	22.30	1.95, m; 1.65, m	22.84
2	2.39, m; 2.27, m	41.48	2.37, dd; 2.22, dm	41.84
3	—	213.03	—	211.59
4	2.37, m	58.12	2.32, q, J=6.7 Hz	58.36
5	—	42.43	—	42.50
6	1.74, m; 1.38, m	40.93	1.73, m; 1.34, m	41.75
7	1.48, m; 1.44, m	18.36	1.44, m; 1.40, m	18.84
8	1.48, m	53.11	1.50, m	53.76
9	—	37.70	—	38.40
10	1.60, m	59.10	1.67, m	59.67
11	1.55, m; 1.13, m	36.24	1.47, m; 1.34, m	36.23
12	2.01, m; 1.41, m	25.01	1.51, m; 1.43, m	31.94
13	—	38.04	—	38.59
14	—	42.06	—	39.72
15	1.56, m; 1.18, m	31.49	1.47, m; 1.24, m	33.69
16	1.47, m	36.00	2.37, m; 1.73, m	30.47
17	—	44.75	—	45.19
18	2.54, m	38.24	2.49, dd, J=13.5, 4.4 Hz	38.61
19	1.34, m; 1.20, m	35.57	1.42, m; 1.20, m	35.62
20	—	28.34	—	29.14
21	1.20, m	32.25	1.29, m; 1.22, m	33.39
22	2.50, m; 1.60, m	29.32	1.50, m	36.54
23	0.86, d, J=6.6 Hz	6.90	0.79, d, J=6.7 Hz	7.23
24	0.71, s	14.79	0.69, s	14.93
25	0.91, s	17.61	0.88, s	18.02
26	0.90, s	21.57	0.85, s	21.55
27	4.36, d; 4.49, d; J=12.3 Hz	65.14	1.08, s	18.97
28	—	182.87	—	180.24
29	1.02, s	29.47	1.01, s	30.26
30	0.87, s	34.59	0.93, s	34.93
31	—	171.46	—	—
32	2.09, s	21.51	—	—

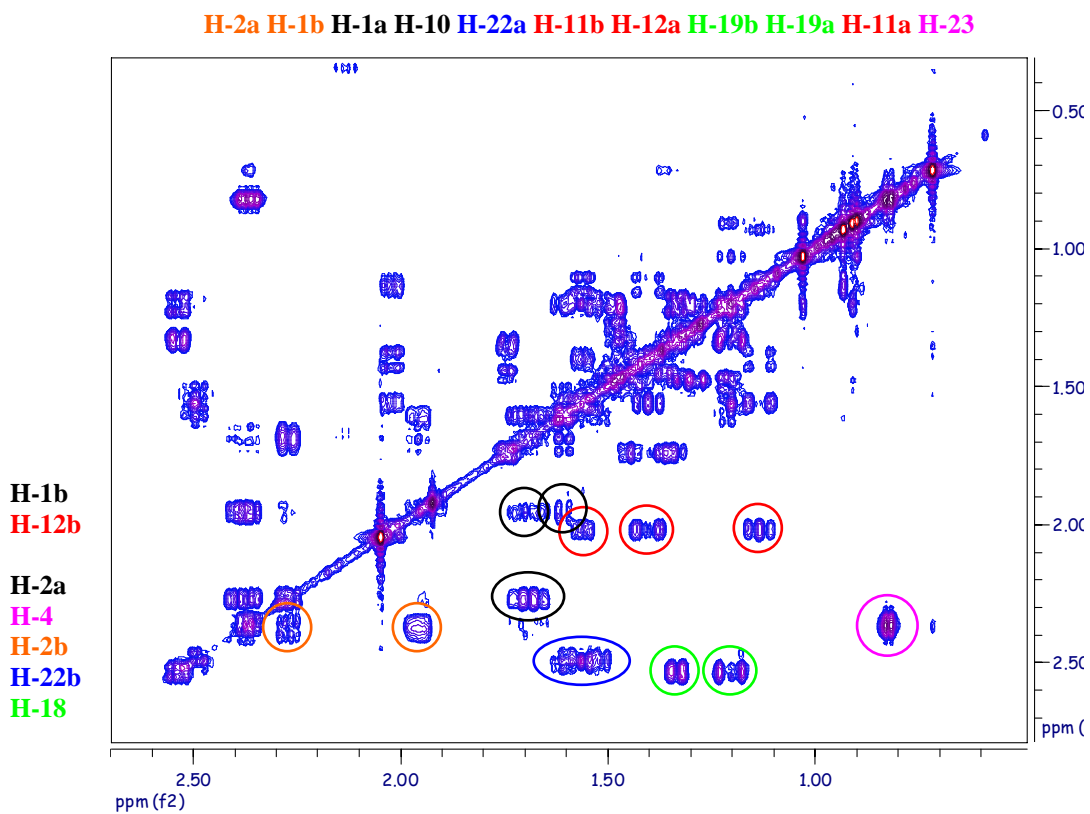
Tableau 22 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **85** à ceux de **75**



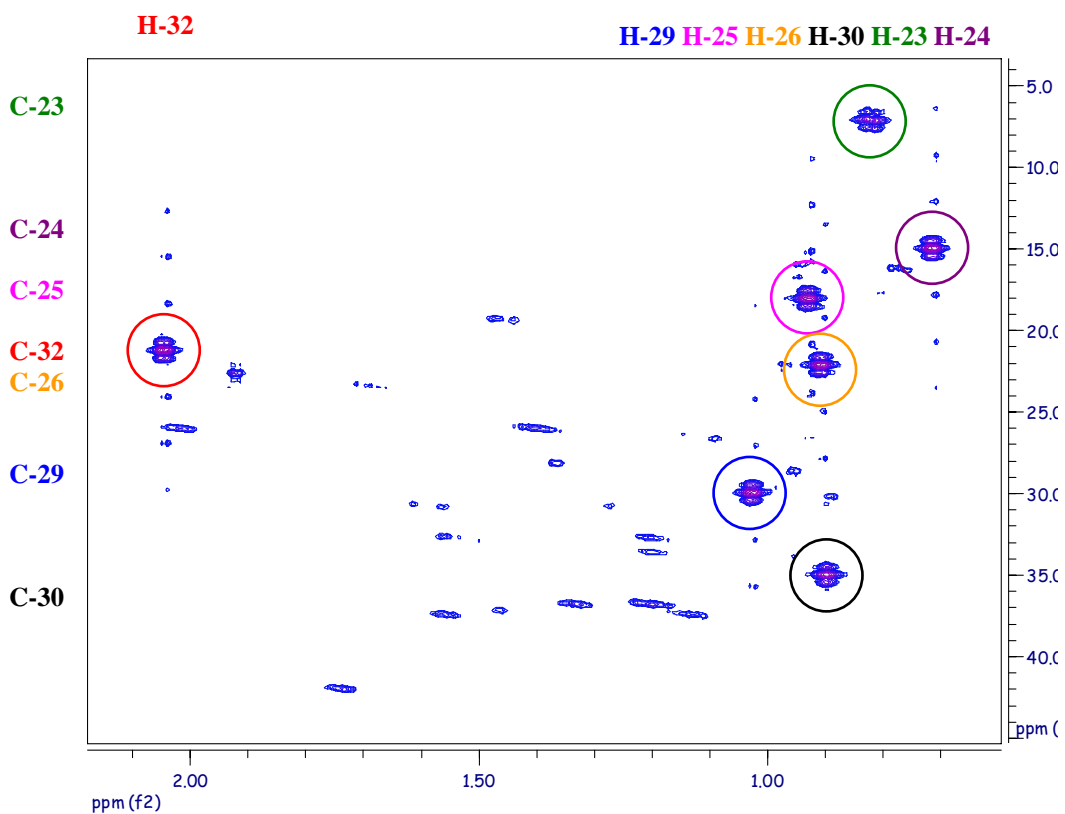
Spectre 27 : RMN ^1H du triterpène **85** entre 4,3 et 4,6 ppm



Spectre 28 : RMN ^{13}C du triterpène **85** entre 52 et 67 ppm



Spectre 29 : RMN 2D COSY du triterpène **85** entre 0,5 et 2,5 ppm



Spectre 30 : RMN 2D HMQC du triterpène **85**

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une méthode autre que la RMN. Ces analyses ont été effectuées par introduction directe de l'échantillon dans une source d'ionisation électrospray (ESI-SM).

- SM (ordre 1)

Le spectre de masse de l'échantillon, acquis en mode positif sur la gamme de m/z 500-560 ([Figure 43](#)), montre la présence d'ions caractéristiques pouvant être attribués au composé recherché :

- l'ion pseudo-moléculaire, $[M+H]^+$, à m/z 515
- l'adduit ammonium, $[M+NH_4]^+$, à m/z 532
- l'adduit sodium, $[M+Na]^+$, à m/z 537
- l'adduit potassium, $[M+K]^+$, à m/z 553

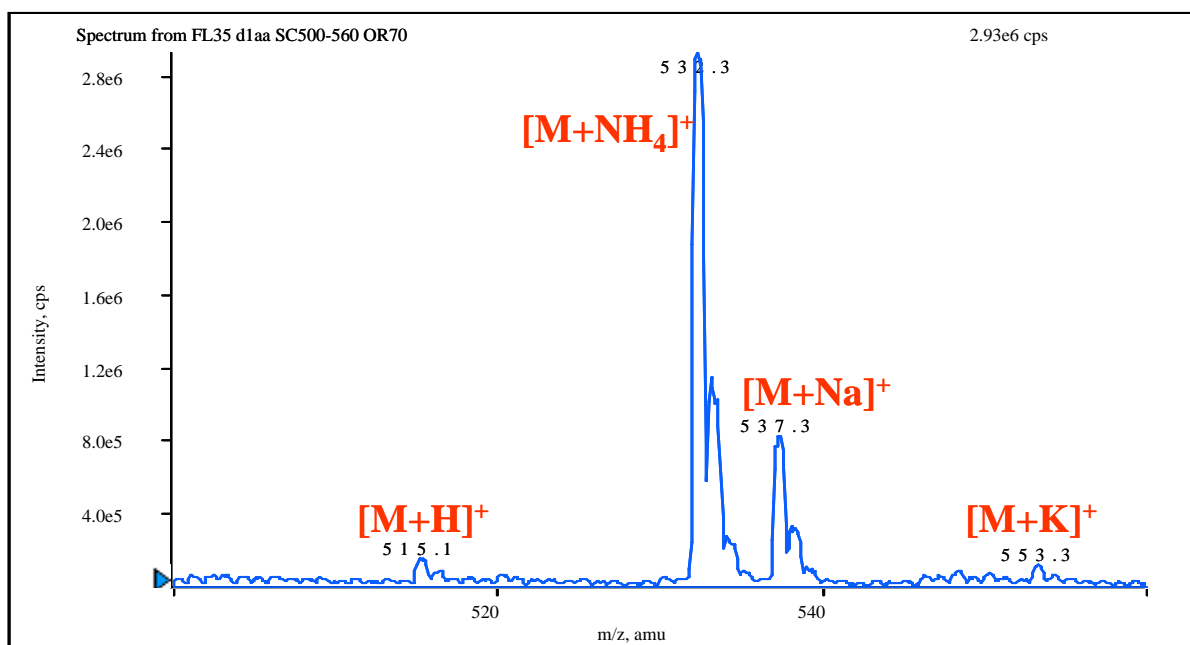
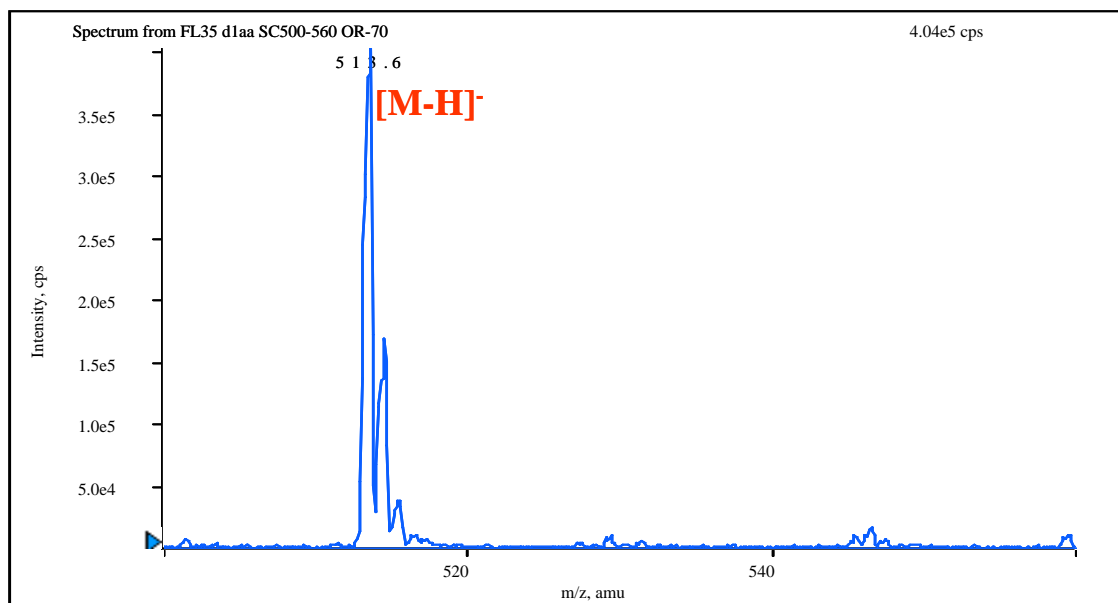


Figure 43 : Spectre de masse (ESI + SM) en mode positif du triterpène **85**

En mode négatif, le spectre de masse montre un ion principal à m/z 513 ([Figure 44](#)) qui pourrait correspondre au $[M-H]^-$ de la molécule recherchée.

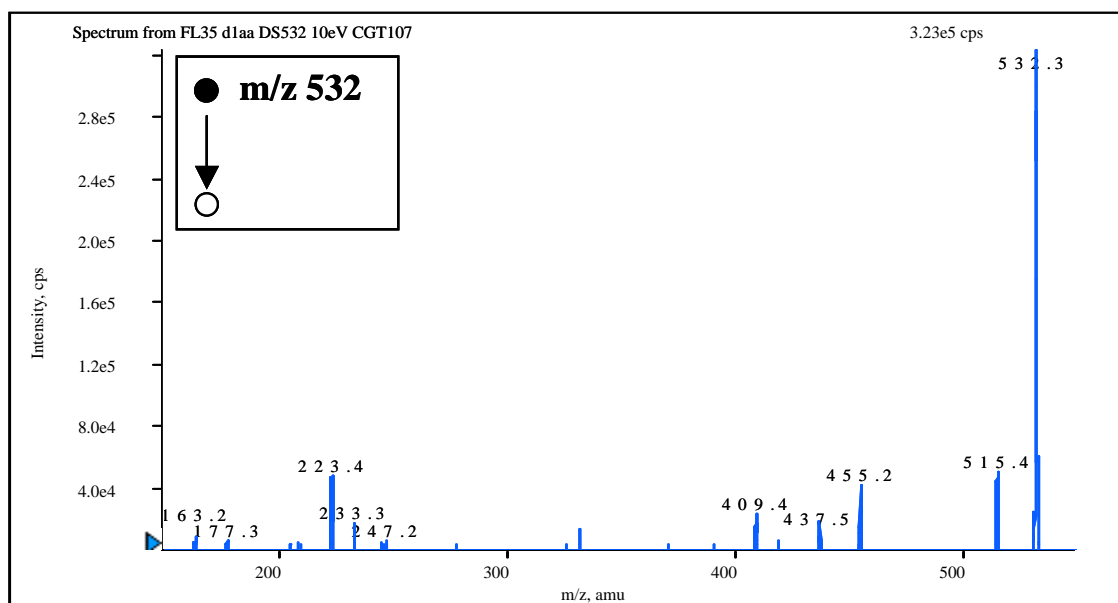


[Figure 44](#) : Spectre de masse (ESI - SM) en mode négatif du triterpène **85**

- SM/SM (ordre 2)

Mode positif

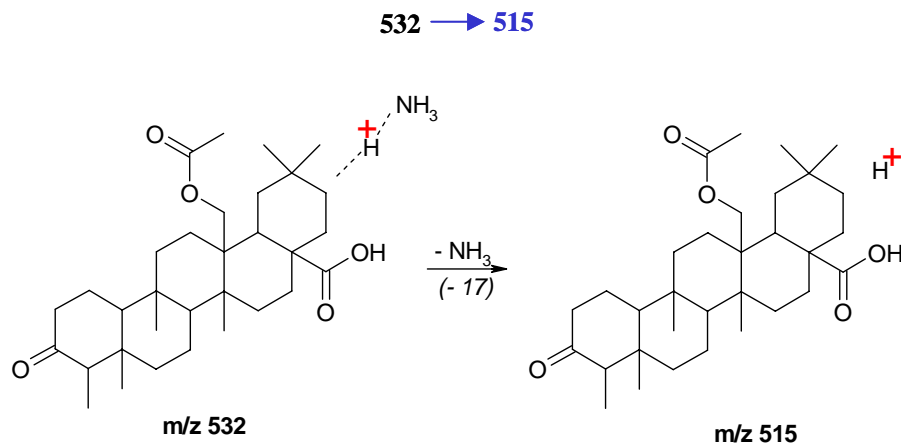
La structure de l'ion m/z 532 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'adduit ammonium $[M+NH_4]^+$ dont la structure a été proposée par les analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 45](#)).



[Figure 45](#) : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 532 (E_{coll} : 10eV ; CGT 107)

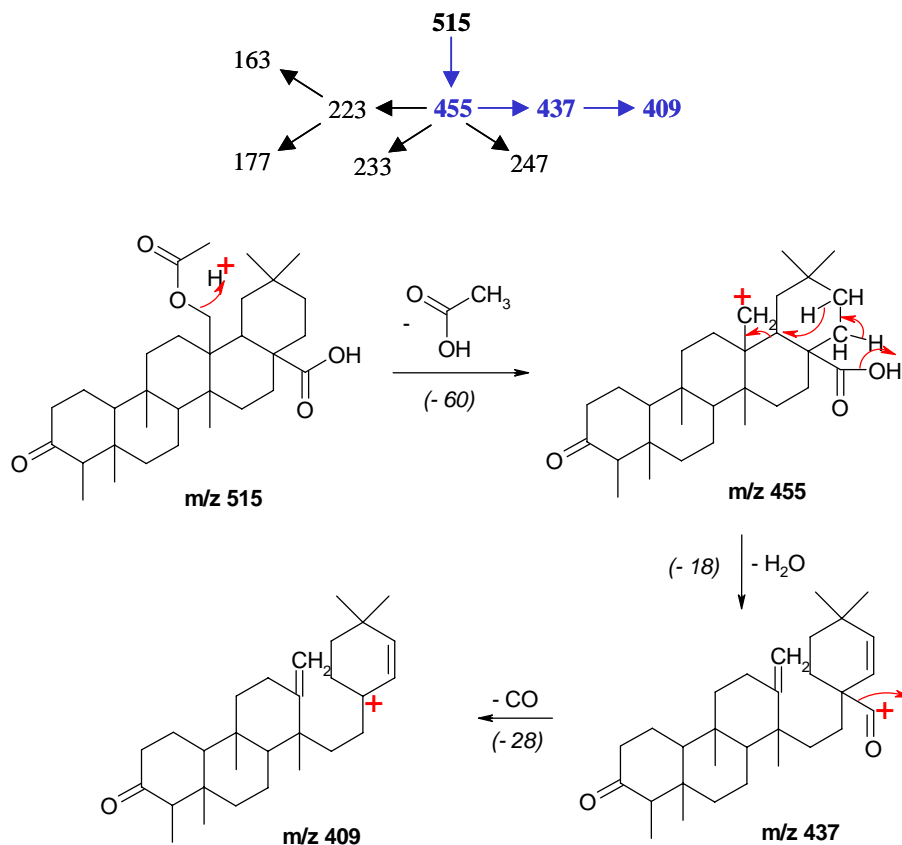
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 532 sont les suivants : m/z = 163, 177, 223, 233, 247, 409, 437, 455 et 515 qui correspond à la perte de la molécule d'ammoniac NH_3 de l'adduit ammonium.

Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi. Tous les ions fragments sont ainsi issus de l'ion m/z 515.

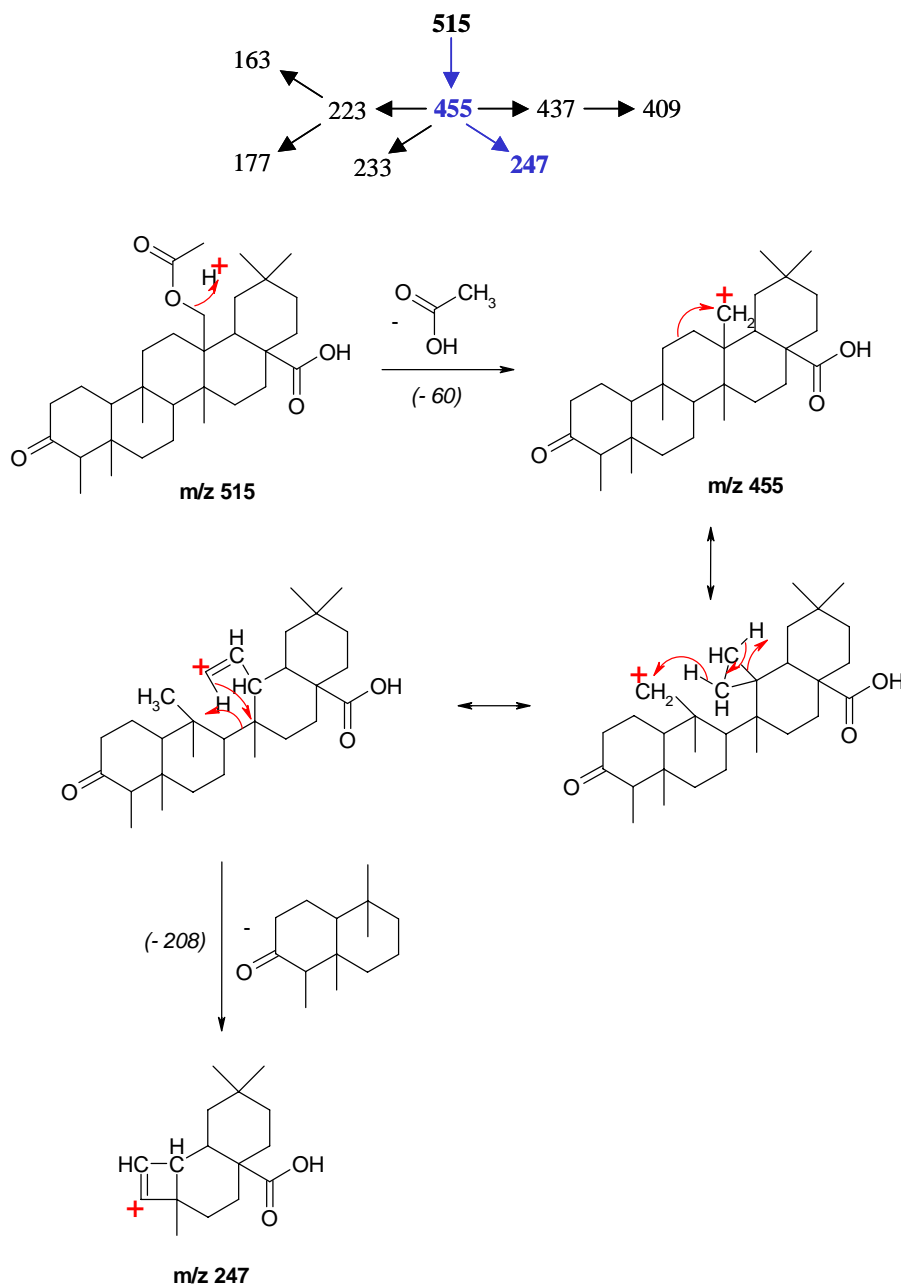


Les fragmentations correspondantes sont détaillées ci-après.

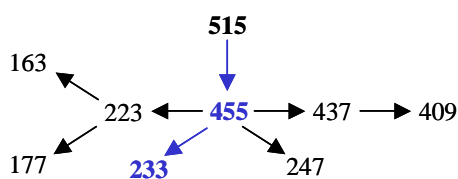
Considérons pour commencer la fragmentation qui conduit aux ions m/z 455, 437 et 409. Cette fragmentation correspond successivement à la perte d'une molécule d'acide acétique (-60) pour former un ion m/z 455, puis à la perte d'une molécule d'eau (-18) pour former un ion m/z 437, et enfin à la perte d'une molécule d'oxyde de carbone (-28) conduisant à l'ion m/z 409.

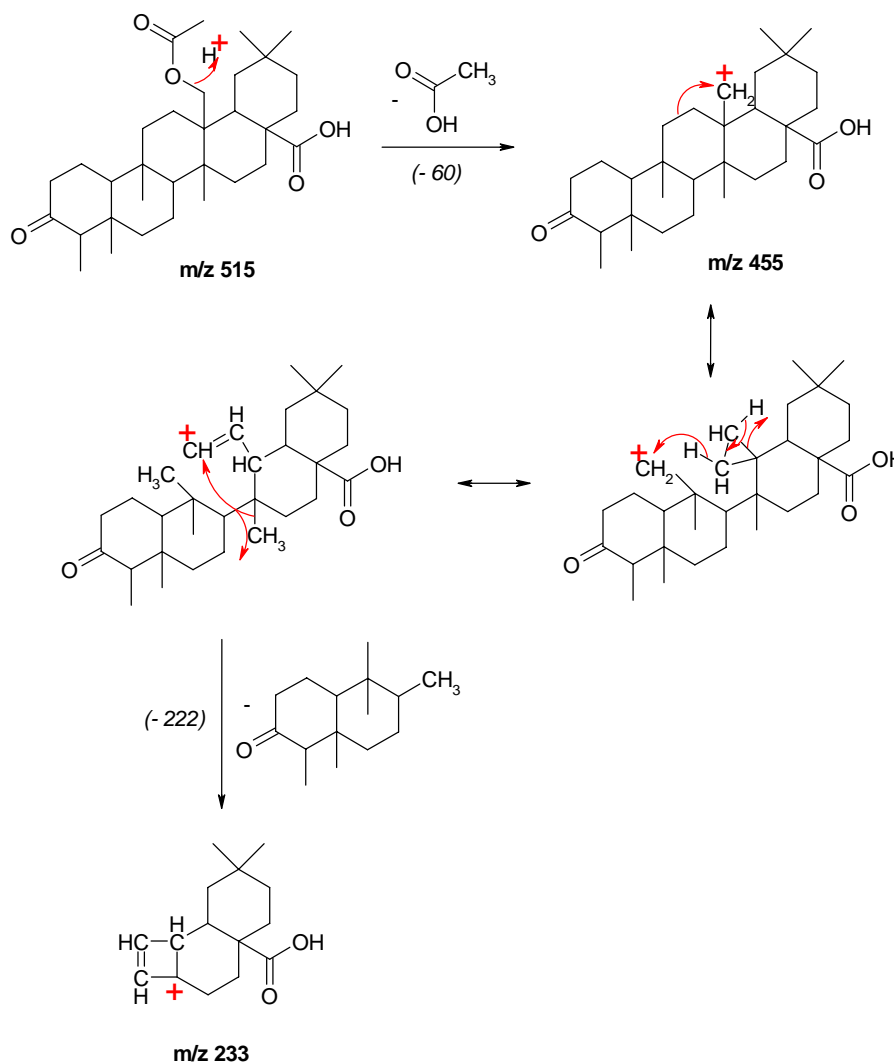


L'ion m/z 455 peut également se réarranger et perdre un fragment de masse 208 après ouverture du cycle central de la molécule. L'ion formé est alors m/z 247.

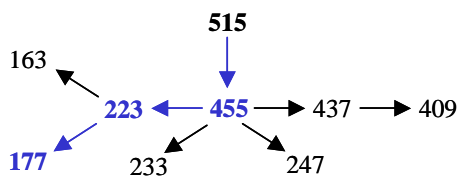


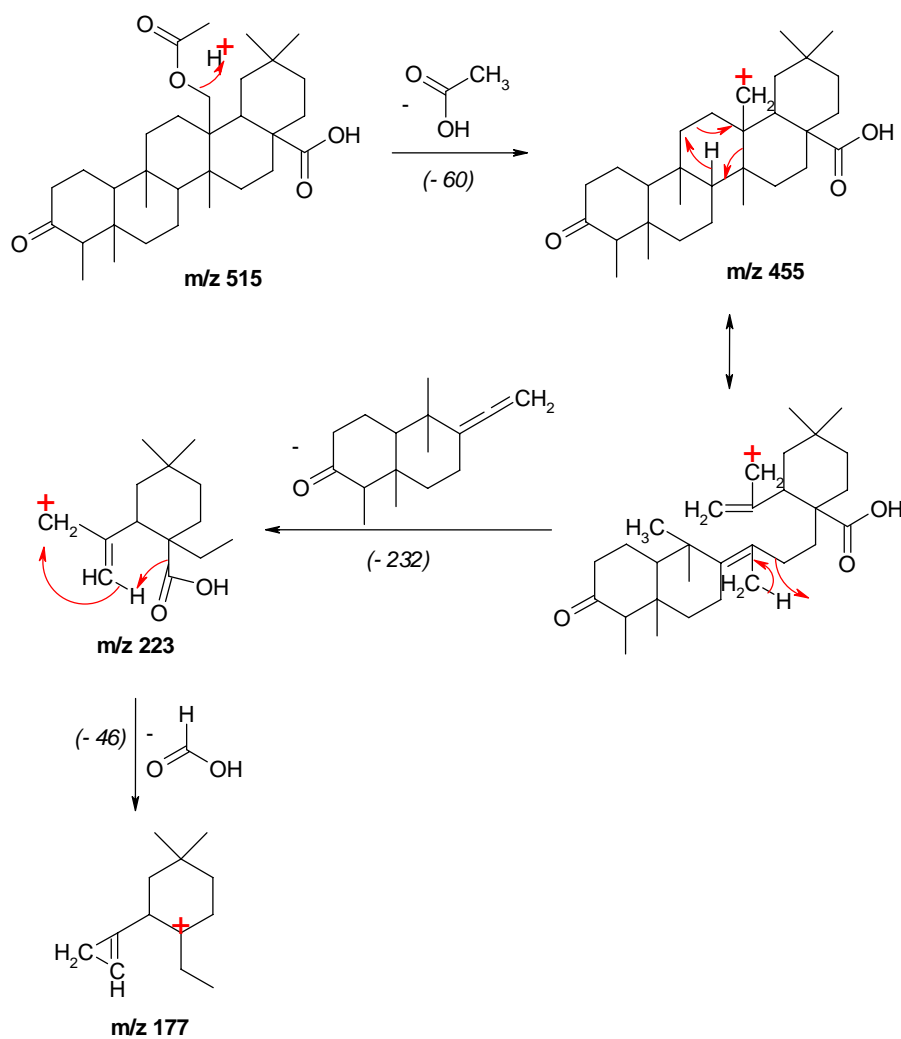
Selon un processus similaire, l'ion m/z 455 peut perdre un fragment de masse 222 (un groupe méthyle en plus) pour conduire à un ion m/z 233.



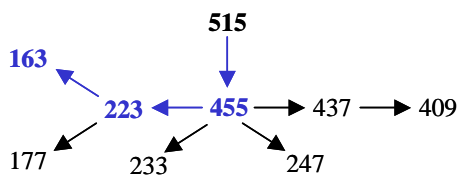


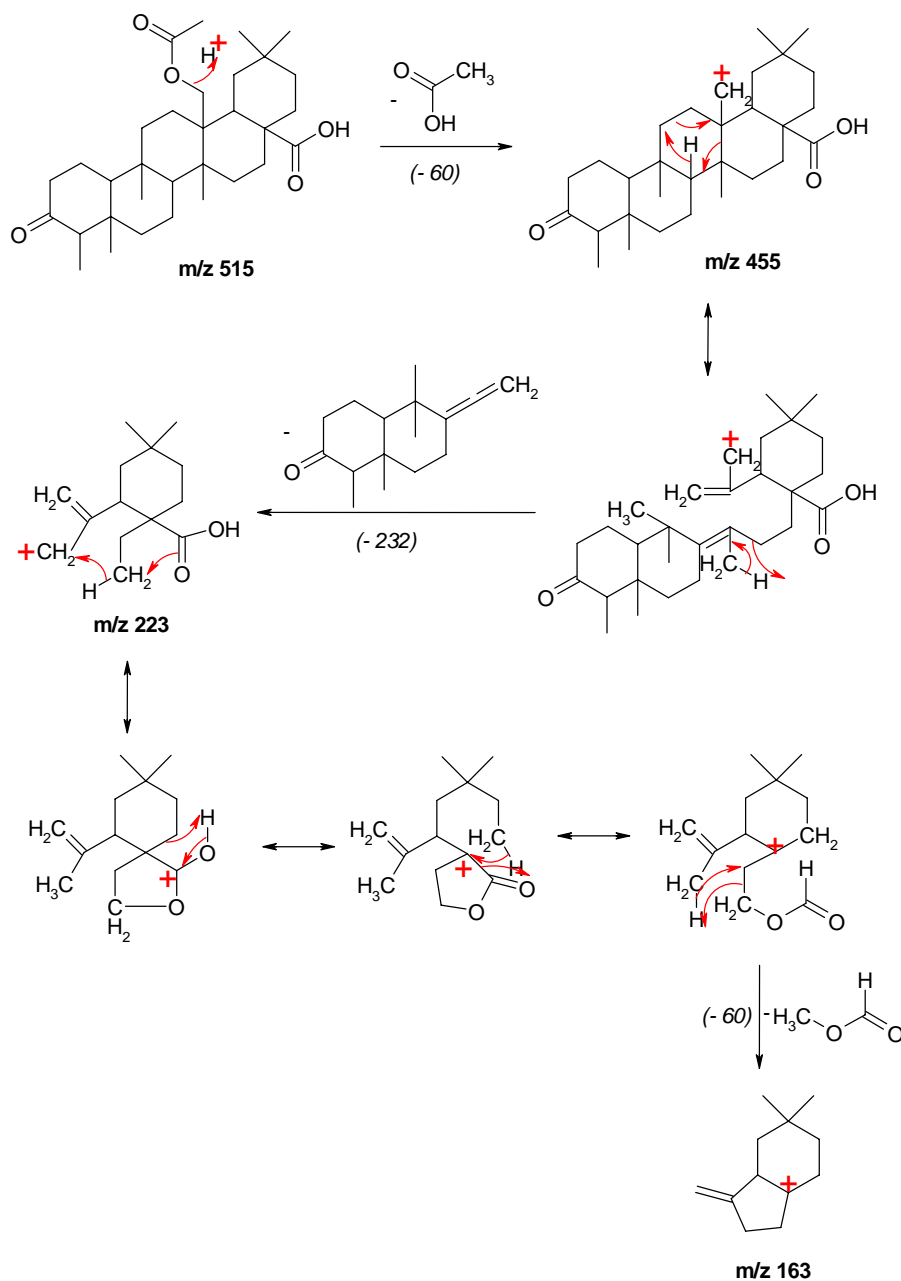
Une ouverture du cycle central peut enfin conduire à la perte d'un fragment de type allène de masse 232, pour former un ion m/z 223. Cet ion peut alors perdre une molécule d'acide formique (-46) provenant de la fonction acide carboxylique, pour conduire à la formation d'un ion m/z 177.





Cet ion m/z 223 peut aussi subir une suite assez complexe de réarrangements qui conduisent finalement à la perte d'une molécule de méthyle formate (-60) et à la formation d'un ion m/z 163.





Mode négatif

La structure de l'ion m/z 513 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'ion $[M-H]^-$ dont la structure a été proposée par les analyses en RMN sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 46](#)) :

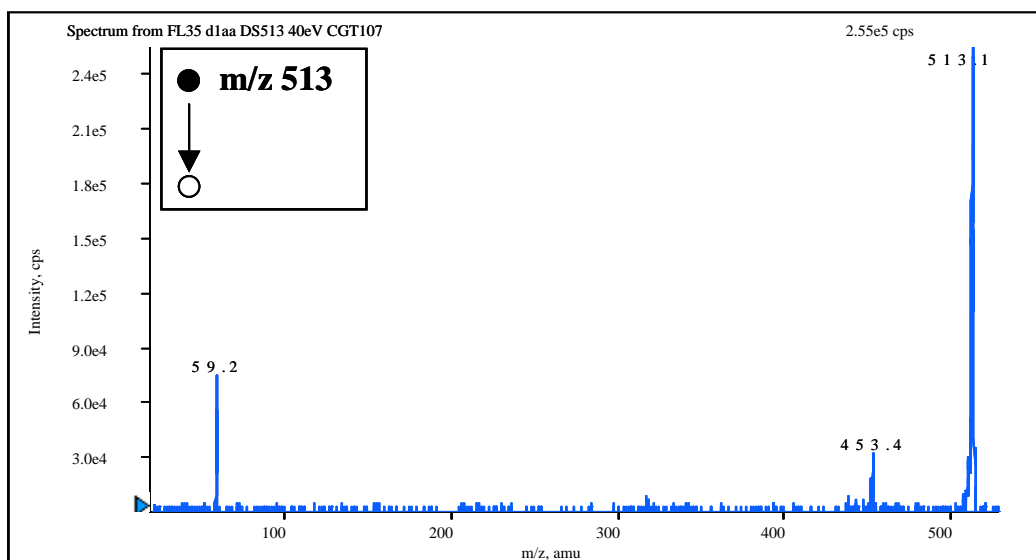
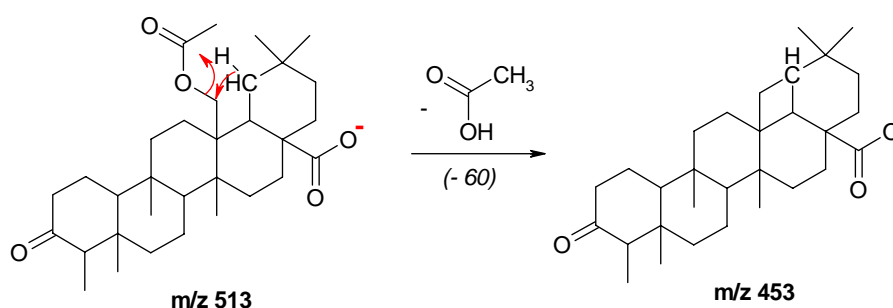
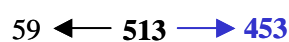


Figure 46 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 513 (E_{coll} : 40eV ; CGT 107)

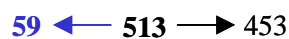
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 513 sont les suivants : m/z = 59 et 453.

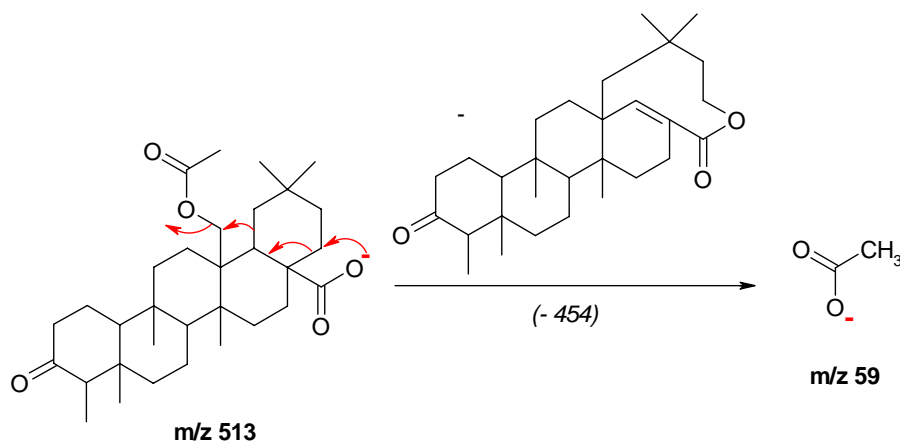
Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi.

L'ion pseudo-moléculaire m/z 513 peut perdre une molécule d'acide acétique (-60) provenant de la fonction alcool acétylée. L'ion ainsi formé est m/z 455.



Inversement, l'ion pseudo-moléculaire peut perdre un fragment de masse 454 pour conduire à l'ion acétate m/z 59.





- Conclusion

Les nombreux adduits observés lors de l'ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon, de même que le signal obtenu en mode négatif, permettent de conclure que le poids moléculaire du composé présent en solution est 514 Da.

Les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ attendu, issu de l'adduit ammonium, sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion $m/z\ 532$ observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode positif.

Les hypothèses de décomposition de l'ion $[M-H]^-$ attendue sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion $m/z\ 513$ observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode négatif.

Il s'agit donc bien de l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**) dont la structure a été proposée.

Références

- 1) S. Mahmud, G.H. Rizwani, M. Ahmad, S. Ali, S. Perveen, et al., “Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn.”, Pak. J. Pharmacol., 1998, vol 15, n° 2, pp 13-25.
- 2) M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, G.H. Rizwani et V.U. Ahmad, “Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae”, J. Chem. Soc. Pak., 1999, vol 21, n° 2, pp 174-178.
- 3) S.G. Cao, K.Y. Sim, S.H. Goh, F. Xue et T.C.W. Mak, “Gracilipene : a heterocyclic seco-trisnor-oleanane from *Calophyllum gracilipes* (Guttiferae)”, Tetrahedron Lett., 1997, vol 38, n° 27, pp 4783-4786.
- 4) S.B. Mahato et A.P. Kundu, “Review article number 98 : ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features”, Phytochemistry, 1994, vol 37, n° 6, pp 1517-1575.
- 5) H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran et S. Balasubramaniam, “Triterpenes and neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*”, Phytochemistry, 1984, vol 23, n° 11, pp 2601-2603.
- 6) A.A.L. Gunatilaka, A.M.Y.J. De Silva, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et M.I.M. Wazeer, “Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum calaba* and *Garcinia spicata* from Sri Lanka”, Phytochemistry, 1984, vol 23, n° 2, pp 323-328.
- 7) T.R. Govindachari et N. Viswanathan, “Triterpenes of *Calophyllum ionophyllum* Linn.”, Tetrahedron, 1967, vol 23, n° 4, pp 1901-1910.
- 8) A.-E. Hay, “Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique”, Thèse de l'Université d'Angers, France, 2003.
- 9) J. Bruneton, “Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales”, Ed. TEC et DOC, 3^e édition, Paris, France, 1999.
- 10) M.U.S. Sultanbawa, “Chemistry of the Guttiferae of Ceylon”, J. Natl. Sci. Council of Sri Lanka, 1973, vol 1, pp 123-165.
- 11) Istrati et Ostrogovich, Compt. Rend. Chim. Fr., 1899, n° 128, p 1581.
- 12) Brownlie et al., 1955, Chem. & Ind. (London), p 1156.
- 13) S.A. Vieira Filho, L.P. Duarte, G.D.F. Silva, I.S. Lula et M.H. dos Santos, “Total assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of two 3,4-secofriedelanes from *Austroplenckia populnea*”, Magn. Reson. Chem., 2001, vol 39, n° 12, pp 746-748.

III.2.4. Conclusion

En ce qui concerne le Tamanu, qui est l'espèce *inophyllum*, nous avons pu isoler cinq molécules déjà décrites dans la littérature, qui sont la friedeline (**73**), le canophyllol (**74**), l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (**75**), l'acétate de canophyllol (**86**), et l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (**87**). Il est à noter que la molécule (**75**) est souvent désignée à tort acide canophyllique dans la littérature. L'acide canophyllique correspond en effet à la structure (**76**) qui comporte un groupe hydroxy en position 3 à la place du substituant oxo. Même si la nomenclature qui a été adoptée dans les dernières publications traitant des friedelanes est la plus logique (le canophyllol **74** porte lui aussi un groupe oxo en position 3), nous avons choisi de conserver la nomenclature historique de Govindachari (1967) pour éviter les confusions, d'autant plus que cette nomenclature initiale est celle officiellement adoptée par la CAS (Chemical Abstracts Society).

Par ailleurs, trois molécules nouvelles qui n'avaient jamais été décrites auparavant ont été isolées du *Calophyllum inophyllum* : l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**), l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**), et l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**).

Toutes ces molécules sont biologiquement intéressantes car celles déjà décrites dans la littérature présentent des bioactivités significatives dans plusieurs domaines (antibiotique et antifongique). Il serait ainsi intéressant de poursuivre ces études de bioactivité en effectuant toute une série de tests biologiques sur les nouvelles molécules obtenues et dont nous avons déterminé la structure (**85**, **88** et **89**).

III.3. Les coumarines et les néo-flavonoïdes

Les coumarines ainsi que les néo-flavonoïdes sont des molécules qui sont très abondantes dans les plantes de la famille des Clusiaceae, et en particulier dans le genre *Calophyllum*. En ce qui concerne le Tamanu, qui est l'espèce *inophyllum*, un grand nombre de coumarines et de néo-flavonoïdes entrent dans sa composition ; on peut citer l'acide calophyllique, le calophyllolide, la série des inophyllums décrite par Patil, etc...(Cf. **Chap. II**). Cependant le Tamanu polynésien n'a jusqu'alors jamais fait l'objet d'investigations d'ordre chimique, il sera donc intéressant de comparer sa composition à celle décrite dans la littérature. Par ailleurs, on peut penser que cet arbre est susceptible de contenir d'autres molécules minoritaires de la même famille n'ayant pas encore été découvertes. Nombre de ces molécules ont été testées et ont montré des activités biologiques variées, les plus importantes étant les activités anticancéreuses et anti HIV (Cf. **Chap. II**). Ceci rend les recherches sur ces molécules d'autant plus intéressantes.

III.3.1. CCM analytiques avec révélation à la vanilline sulfurique

Cf. § III.1. pour des exemples de CCM analytiques réalisées pour contrôler les fractions issues des premières CLBP mises en œuvre.

III.3.2. CLHP analytiques avec détection UV-DAD

Une première série d'analyses CLHP est effectuée sur les fractions obtenues après les premières colonnes à basse pression réalisées successivement à partir de l'extrait brut de feuilles de Tamanu à l'hexane ou à l'acétate d'éthyle. Ces analyses ont pour but de rechercher les fractions contenant le plus de coumarines possible, que ce soit en diversité ou en quantité, afin de les sélectionner pour des CLHP préparatives qui nous permettront d'isoler certaines molécules pures.

Dans la littérature, les molécules de type coumarine sont la plupart du temps séparées par chromatographie liquide sur des phases inverses C18. Cependant, nous avons obtenu les meilleures séparations sur des colonnes de silice en phase normale, avec des mélanges d'iso-octane et d'acétate d'éthyle. Nous avons d'abord utilisé deux méthodes isocratiques : un mélange iso-octane / acétate d'éthyle 84:16 pour les fractions les moins polaires et un mélange iso-octane / acétate d'éthyle 60:40 pour les fractions les plus polaires. Les séparations ont alors les allures suivantes : ([Figures 47 à 49](#))

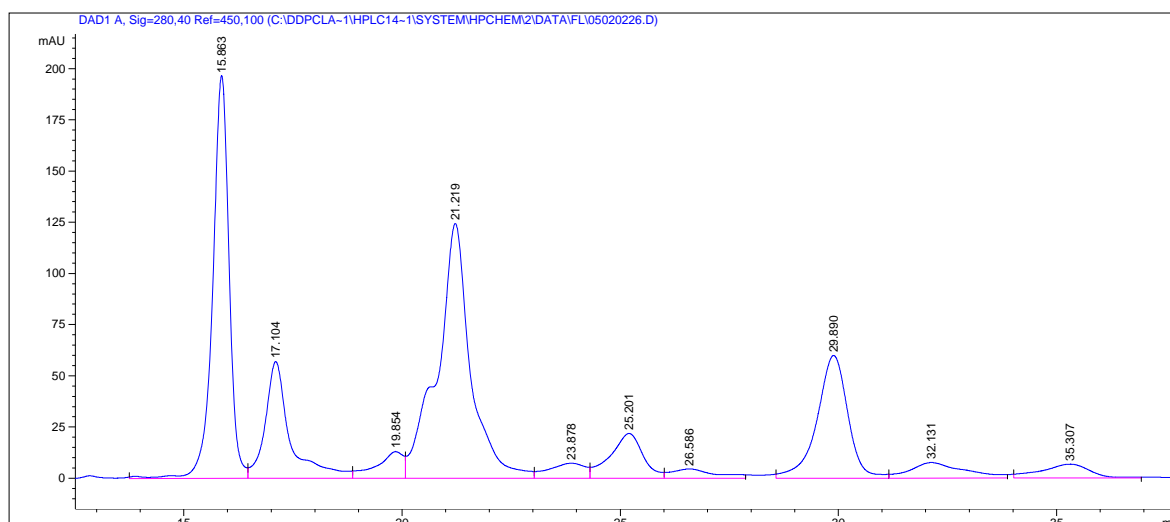


Figure 47 : Chromatogramme silice du tube 135 de la colonne n°1, mélange 84:16

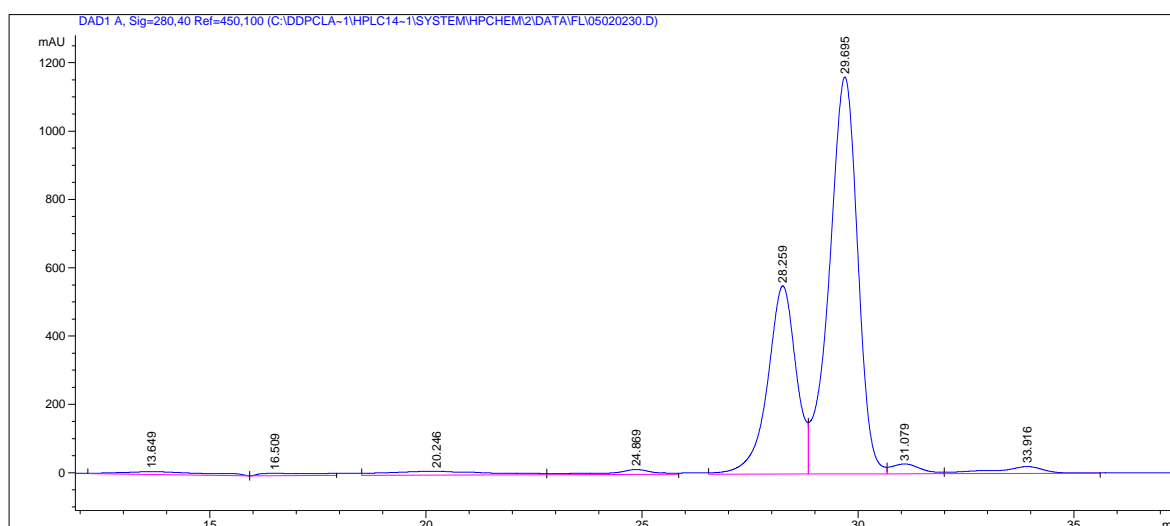


Figure 48 : Chromatogramme silice du tube 139 de la colonne n°1, mélange 84:16

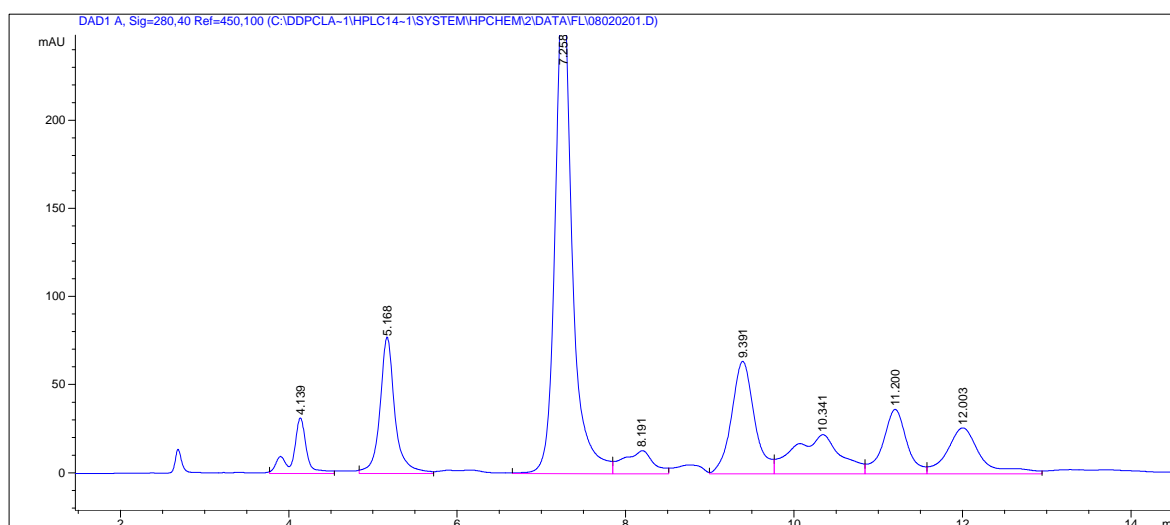


Figure 49 : Chromatogramme silice du tube 145 de la colonne n°1, mélange 60:40

A la [Figure 47](#), les coumarines identifiées dans le tube 135 par leur spectre UV sont le calophyllolide (15,9 min) et l'inophyllum P (29,9 min). On remarque que ces deux pics sont séparés de 14 minutes, ce qui les rendra très facilement séparables par une CLHP préparative réalisée dans les mêmes conditions.

A la [Figure 48](#), la même méthode CLHP est utilisée pour analyser le tube 139 : on voit bien que les pics correspondant aux inophyllums B (28,3 min) et P (29,7 min) sont bien résolus, et pourront être séparés par CLHP préparative. Pour les tubes suivant contenant des molécules plus polaires, on est obligé d'augmenter la polarité de notre solvant, sous peine de laisser les molécules les plus polaires sur la colonne.

La [Figure 49](#) montre la séparation des molécules du tube 145 avec un mélange 60:40 d'iso-octane et d'acétate d'éthyle. Le pic à 11,2 min a un spectre UV qui correspond à celui de l'inophyllum C.

Ces méthodes isocratiques sont donc bien adaptées dans le cas de fractions homogènes du point de vue de la polarité, mais elles deviennent peu efficaces lorsqu'il s'agit de fractions brutes comportant des molécules de polarités très différentes. C'est pourquoi nous avons mis au point une dernière méthode analytique, anisocratique cette fois, qui pourra être utilisée dans tous les cas, avec une efficacité toujours satisfaisante, quelque soit l'échantillon ou la fraction analysée.

Cette fois, le modérateur de l'iso-octane que nous utilisons est l'iso-propanol. Celui-ci est plus polaire, on en utilise donc beaucoup moins que l'acétate d'éthyle (jusqu'à 7 % d'iso-propanol, alors qu'on allait jusqu'à 100 % avec l'acétate d'éthyle en anisocratique). Par ailleurs, l'iso-propanol absorbe moins en UV que l'acétate d'éthyle, ce qui donne des spectres UV plus faciles à interpréter, surtout dans les plus faibles longueurs d'onde (entre 200 et 280 nm). Enfin, les pics sont encore mieux séparés (notamment les inophyllum B et P).

Remarque : Cette séparation sera encore améliorée pour l'étude de la biodiversité en mettant en série 3 colonnes de silice ayant les mêmes caractéristiques que précédemment, tout en augmentant le pourcentage d'iso-propanol jusqu'à 20 %.

III.3.3. CLHP préparatives avec détection réfractométrique et UV

Après les premières CLHP analytiques qui nous ont orienté vers les fractions les plus riches en coumarines, des CLHP préparatives portant sur des quantités plus importantes sont mises en œuvre. Pour pouvoir séparer de grandes quantités de matière à la fois, on passe d'une colonne de 4,6 mm à une colonne de 21,4 mm de diamètre ; le diamètre est donc environ multiplié par un facteur 4,7, ce qui veut dire que la section de la colonne est, elle, multipliée par 21,6 ($S=\pi.r^2$). Pour obtenir une séparation équivalente à celle de la CLHP analytique sur des très faibles quantités de matière, il nous faut donc théoriquement multiplier le débit de la pompe par 21,6, ce qui nous donnerait un débit de 21,6 mL / min. Comme notre pompe quaternaire est limitée à un débit de 10 mL / min, nous nous en contenterons, tout en sachant que les séparations réalisées dureront environ deux fois plus longtemps que les CLHP analytiques préliminaires.

Pour bien comprendre la démarche que nous avons adoptée pour parvenir à isoler des coumarines pures, prenons un exemple. Considérons la série de chromatographies qui nous a permis d'isoler la fraction FL241, contenant l'inophyllum F.

La CLHP analytique (sur silice, en isocratique avec comme éluant un mélange iso-octane / acétate d'éthyle 84:16) du groupe de fractions n°6 ($m = 1,64$ g) obtenu après les colonnes CLBP n°3 et 4 nous apprend que ce groupe contient entre autres coumarines de l'inophyllum F (F1 ou F2). On en fait alors la CLHP préparative en isocratique avec un mélange iso-octane / acétate d'éthyle (80:20).

Le détecteur réfractométrique est universel, il nous permet donc de détecter toutes les molécules présentes dans le groupe n°6, même si elles n'absorbent pas en UV.

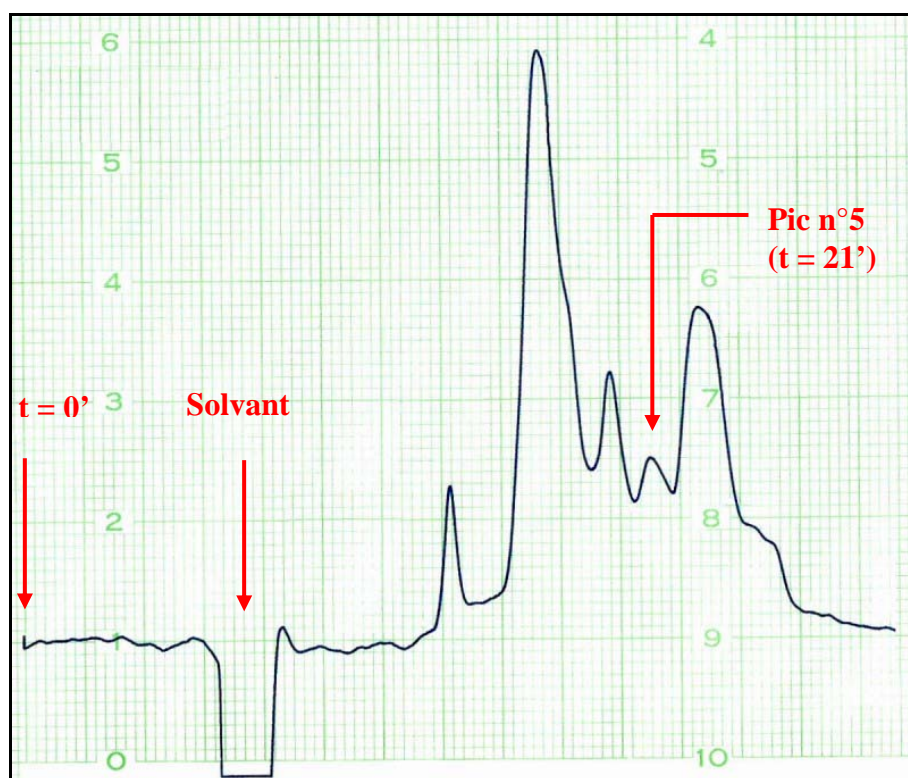


Figure 50 : Chromatogramme réfractométrique du groupe n°6 issu des CLBP n°3 et 4

Cette chromatographie est répétée une dizaine de fois, et les pics identiques de chaque chromatographie sont mélangés. Les 8 sous fractions obtenues sont contrôlées par CLHP analytique sur silice avec un mélange isocratique iso-octane / acétate d'éthyle 84:16 (Cf. § précédent), et éventuellement purifiées sur CCM préparatives avant d'être envoyées à la RMN pour déterminer la structure des molécules ainsi isolées.

Cependant, en RMN, on s'aperçoit que certaines fractions, dont la fraction correspondant à notre pic n°5 et qui contient les inophyllum F1 et F2, ne sont pas pures. Après avoir mis au point une méthode CLHP analytique plus efficace, en anisocratique avec un gradient d'iso-propanol (Cf. § précédent), on peut achever la purification en réalisant une CLHP préparative similaire, avec cette fois une détection UV non universelle, car le détecteur réfractométrique ne peut bien entendu ne s'utiliser qu'en isocratique, puisque les modifications de la composition du solvant font varier l'indice de réfraction de façon très importante.

La CLHP analytique à gradient d'iso-propanol du pic n°5 revenu de la RMN a l'allure suivante :

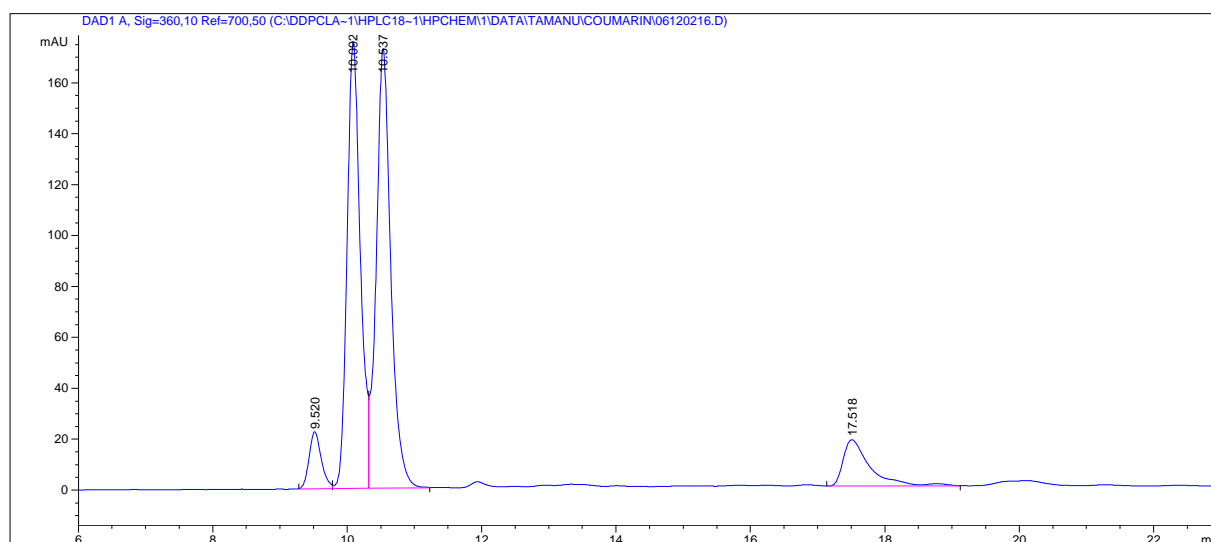


Figure 51 : Chromatogramme UV analytique du pic n°5

La CLHP préparative qui correspond le mieux à cette CLHP analytique est effectuée à un débit de 10 mL / min avec un gradient allant de 1 à 20 % d'isopropanol.

Cette CLHP préparative nous permet d'isoler les 4 pics grâce à la détection UV en temps réel. Les pics isolés sont passés en CLHP analytique anisocratique pour contrôler leur pureté. Les chromatogrammes obtenus sont donnés ci-dessous :

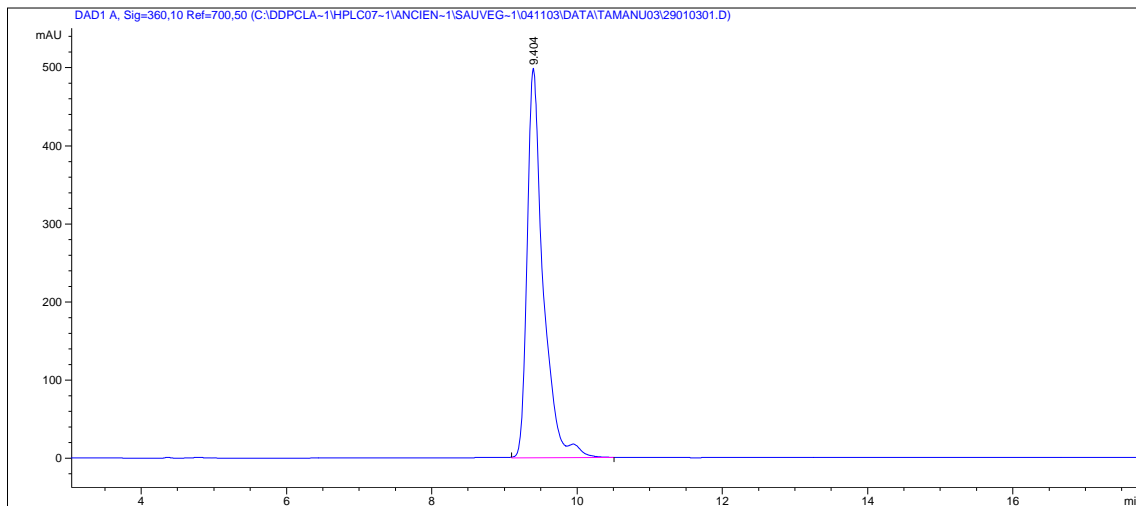


Figure 52 : Pic n°1 correspondant à l'inophyllum B ou P

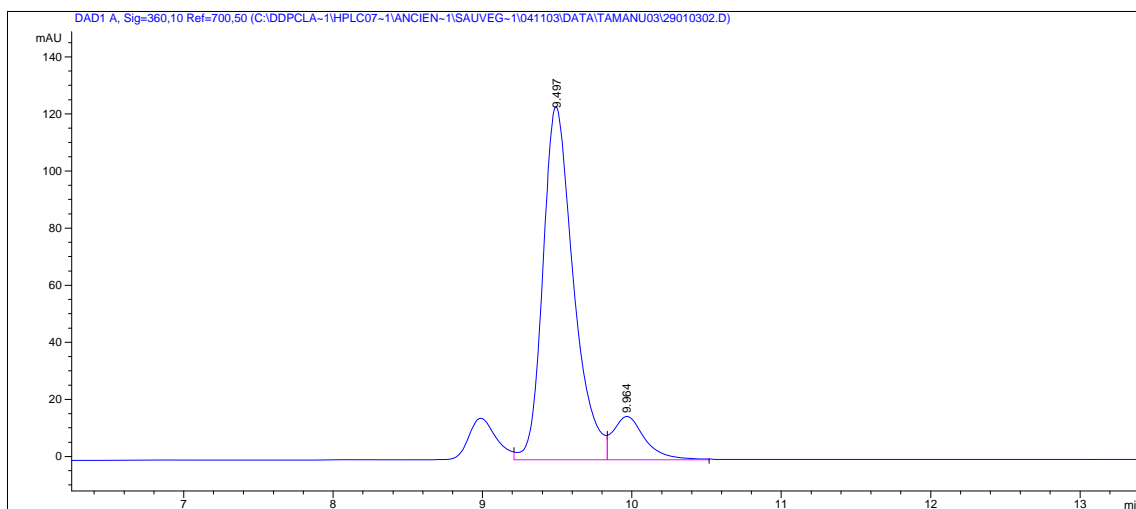


Figure 53 : Pic n°2 correspondant à l'inophyllum F1

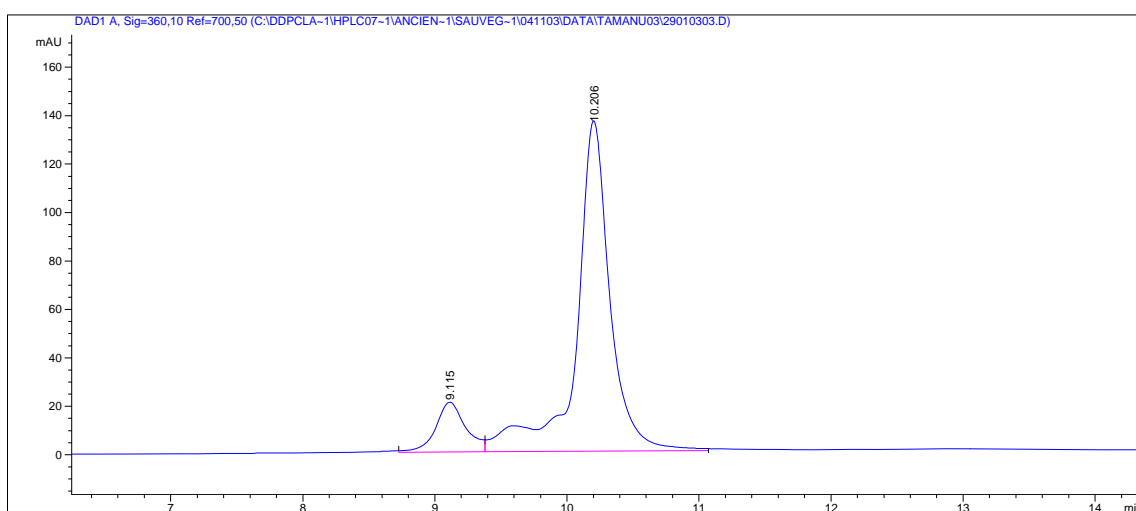


Figure 54 : Pic n°3 correspondant à l'inophyllum F2

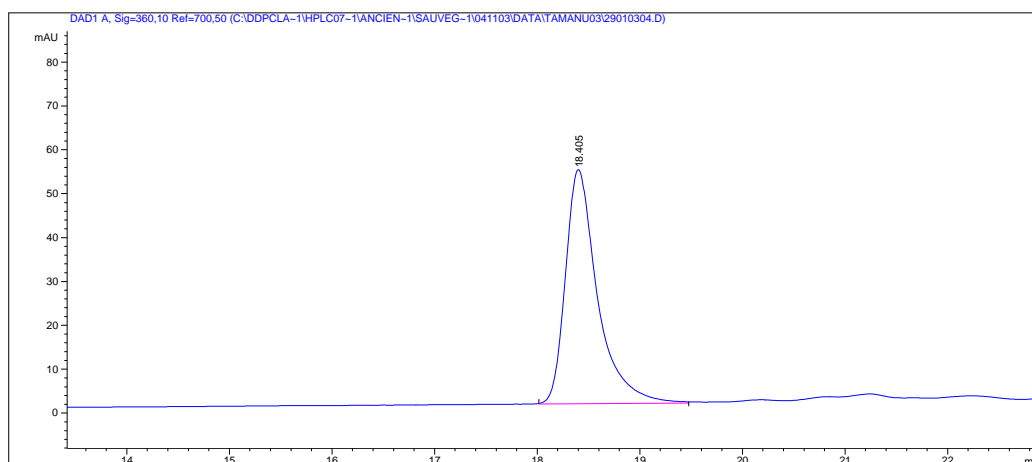
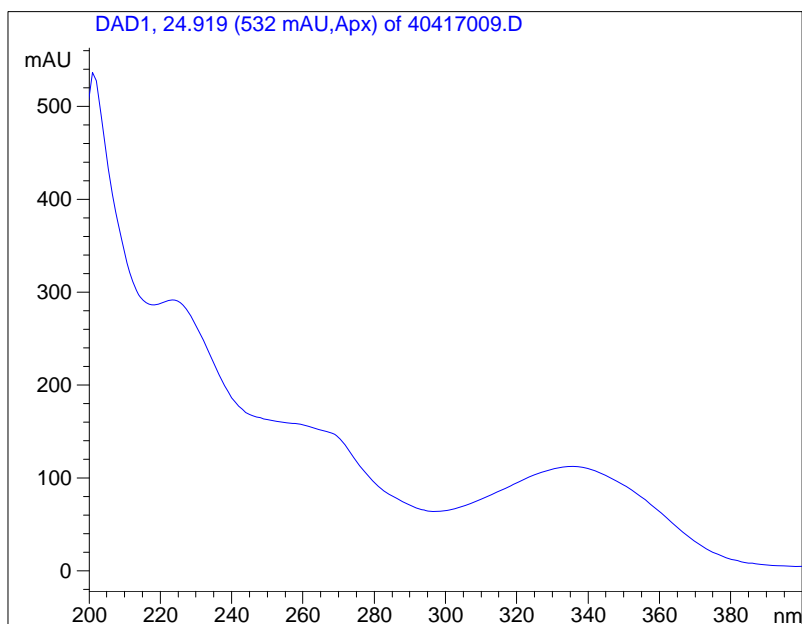


Figure 55 : Pic n°4 correspondant à l'inophyllum C

Le détecteur UV DAD nous fournit pour chaque pic le spectre UV complet caractéristique de la molécule correspondante, ce qui nous permet de confirmer les attributions des pics effectuées grâce à leur temps de rétention :



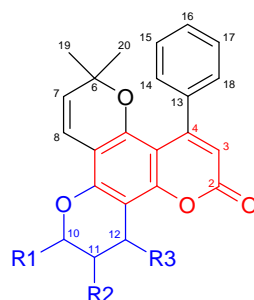
Spectre 31 : Ultra-Violet des inophyllums F1 et F2

Cette série de chromatographies, préparatives et analytiques, même si elle paraît laborieuse, a finalement permis d'obtenir 7 coumarines dont deux nouvelles molécules, F1 et F2, avec une pureté très importante, ce qui a permis ensuite de réaliser d'autres analyses pour connaître un maximum de données physiques comme chimiques, permettant de les caractériser. Les masses de ces molécules pures étaient toutefois trop faibles pour permettre d'effectuer des tests de bioactivité, il pourrait donc être intéressant de reprendre les groupes contenant beaucoup de F1 et F2, pour en obtenir d'avantage et assez pures, pour mener à bien ces tests biologiques.

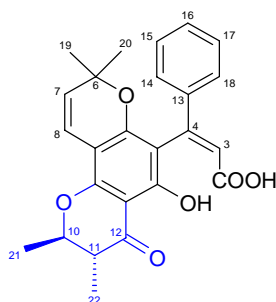
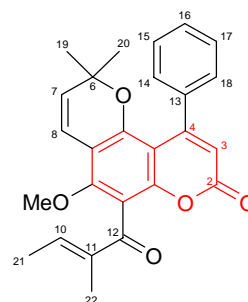
Remarque : La pureté importante observée en UV peut être confirmée par le DDL, qui est un détecteur universel, avant une ultime vérification par RMN.

III.3.4. Etude structurale

Les coumarines déjà décrites que nous avons isolées dans le *Calophyllum inophyllum* ont toutes un motif commun qui est le squelette suivant :



A ceci près que deux d'entre elles résultent de l'ouverture d'un des cinq cycles de la molécule. L'acide calophyllique (qui n'est alors plus une coumarine mais seulement un néo-flavonoïde) et le calophyllolide ont ainsi les structures suivantes :

Acide calophyllique (21)Calophyllolide (22)

Les signaux caractéristiques de toutes ces molécules que l'on obtient en RMN du proton ^1H sont ainsi dus :

- au proton H-3 qui donne un singulet à environ $\delta=6$ ppm,
- aux protons H-7 et H-8 qui donnent deux doublets (couplage 10 Hz) à environ $\delta=5,5$ ppm et $\delta=6,5$ ppm,
- aux protons aromatiques H-14 à H-18 qui donnent des signaux entre $\delta=7,2$ ppm et $\delta=7,5$ ppm,
- aux protons H-10, H-11 des molécules 12-carbonylées qui donnent des signaux complexes à couplages multiples aux environs respectivement de $\delta=4,3$ ppm et $\delta=2,7$ ppm, (sauf le calophyllolide dont le proton H-10 éthylénique donne un quadruplet caractéristique à $\delta=6,6$ ppm avec une constante de couplage de 7 Hz)
- aux protons H-10, H-11 et H-12 des molécules 12-hydroxylées qui donnent des signaux complexes à couplages multiples aux environs respectivement de $\delta=4,2$ ppm, $\delta=1,8$ ppm et $\delta=4,8$ ppm.

En ce qui concerne la RMN du carbone ^{13}C , les signaux caractéristiques (fortement déblindés) sont ceux dus aux carbones carbonylés C=O, aux carbones hydroxylés C-O, aux carbones aromatiques et aux carbones éthyléniques.

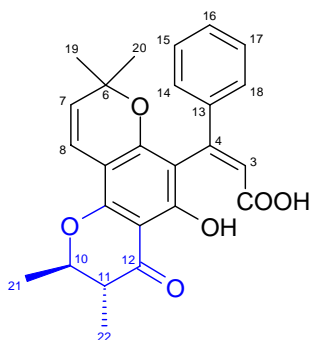
Les deux nouvelles coumarines isolées (inophyllums F1 et F2) ont quant à elles un cycle diméthyl-cyclopropano-furanne qui remplace le cycle 6,6-diméthyl-chromène des molécules présentées ci-dessus. (Cf. p.225)

a) Coumarines connues

Les coumarines sont des molécules qui entrent dans la composition de nombreuses espèces du genre *Calophyllum*. Nous présentons ici les coumarines déjà décrites que nous avons isolées des extraits de feuilles de Tamanu de Polynésie française.

a)1. L'acide calophyllique (21)

L'acide calophyllique (**21**) n'est pas à proprement parlé une coumarine puisque le cycle lactonique caractéristique de cette famille de molécules est ouvert (cycle B). Néanmoins, ce néo-flavonoïde mérite de figurer dans cette liste car le reste de sa structure est très proche des coumarines que nous présenterons par la suite, notamment en ce qui concerne son cycle **chromanone** (cycle D).



(**21**) Acide calophyllique

Nous avons obtenu l'acide calophyllique par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où l'acide calophyllique a été identifié : JPB cristaux, FL251)

Sa formule brute est $C_{25}H_{24}O_6$, et sa masse molaire est de $420 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Cette molécule d'acide calophyllique est particulière car elle possède à température ambiante et en solution deux rotamères stables résultant de la rotation autour de la liaison C-4 / C-4a. Ceci explique que les signaux observés sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C soient tous dédoublés : chaque proton et chaque carbone donne ainsi deux pics d'à peu près même intensité, décalés d'une dizaine de Hertz en proton, et d'un cinquantaine de Hertz en carbone. Il est à noter qu'à partir de 60°C , les deux signaux deviennent coalescents : il n'y a plus alors qu'un seul isomère stable en solution à cette température. Les spectres RMN que nous présentons ici ont été réalisés à température ambiante, tous les signaux enregistrés apparaissent donc dédoublés.

Pour des raisons de clarté, nous ne donnerons par la suite que les déplacements chimiques d'un des deux rotamères, à savoir celui ayant les signaux les plus blindés. Les déplacements chimiques des deux rotamères sont cependant listés dans le [Tableau 24](#) ci-après.

Le spectre du carbone ^{13}C révèle la présence dans la molécule de 25 atomes de carbone. Nombreux sont ceux qui sont fortement déblindés ce qui tend à prouver que nous sommes en présence d'un carbonyle (pour le carbone C-12, $\delta_{\text{C}}=200,2 \text{ ppm}$), d'un acide carboxylique (pour le carbone C-2, $\delta_{\text{C}}=166,7 \text{ ppm}$), et de carbones aromatiques ou éthyléniques (pour les carbones C-3, C-4, C-4a, C-4b, C-7, C-8, C-8a, C-8b, C-12a, C-12b, et C-13 à C-18 ; δ_{C} compris entre 102 ppm et $161,5 \text{ ppm}$). (Cf. [Tableau 23](#))

Le spectre du proton ^1H nous montre quant à lui la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,40$ ppm, 2H et $\delta_{\text{H}}=7,33$ ppm, 3H), qui pourraient être portés par les carbones C-14 à C-18. Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont deux portés par des carbones quaternaires sont sous forme de singulets, ($\delta_{\text{H}}=0,93$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,24$ ppm) les deux autres portés par des carbones tertiaires (CH) étant sous forme de doublets ($\delta_{\text{H}}=1,18$ ppm, $J=6,9$ Hz et $\delta_{\text{H}}=1,53$ ppm, $J=6,3$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=6,42$ ppm ; deux doublets à $\delta_{\text{H}}=5,52$ ppm ($J=10,0$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,54$ ppm ($J=10,0$ Hz) ; deux doublets de quadruplets à $\delta_{\text{H}}=2,71$ ppm ($J=6,9$ et $11,5$ Hz) et à $\delta_{\text{H}}=4,33$ ppm ($J=6,3$ et $11,5$ Hz). On peut donc déjà émettre les hypothèses suivantes : les doublets à $5,52$ ppm et $6,54$ ppm sont couplés avec une constante de 10 Hz ; les signaux à $1,18$ ppm et $2,71$ ppm sont couplés avec une constante de $6,9$ Hz ; les signaux à $1,53$ ppm et $4,33$ ppm sont couplés avec une constante de $6,3$ Hz ; les signaux à $2,71$ ppm et $4,33$ ppm sont couplés avec une constante de $11,5$ Hz.

(Cf. [Tableau 23](#) et [Spectres 32 et 33](#))

Le spectre RMN 2D de couplage proton / proton COSY nous permet de confirmer les hypothèses posées à la vue du simple spectre du proton ^1H :

- Tout d'abord, les protons H-3, H-19 et H-20 ne sont pas couplés avec d'autres protons : les carbones voisins de celui qui porte ces protons sont quaternaires.
- Le proton H-7 est couplé au proton H-8, avec une constante de couplage valant 10 Hz.
- Le proton H-8 est couplé au proton H-7, avec une constante de couplage valant 10 Hz.
- Le proton H-10 est couplé à deux types de protons : le proton H-11 et les protons H-21, avec comme constantes de couplage $11,5$ et $6,3$ Hz.
- Le proton H-11 est couplé à deux types de protons : le proton H-10 et les protons H-22, avec comme constantes de couplage $11,5$ et $6,9$ Hz.
- Les protons H-21 sont couplés au proton H-10 avec une constante de couplage valant $6,3$ Hz.
- Les protons H-22 sont couplés au proton H-11 avec une constante de couplage valant $6,9$ Hz.

Le spectre RMN 2D HMQC de couplage direct entre protons et carbones nous permet de connaître les signaux obtenus en proton qui correspondent aux signaux obtenus en carbone.

Le spectre RMN 2D HMBC de couplage indirect entre protons et carbones nous permet d'achever la détermination structurale : en partant des carbones C-2, C-6 et C-12, on peut de proche en proche reconstituer les structures des trois parties de la molécule concernées.

Les couplages COSY, HMQC et HMBC sont présentés dans le [Tableau 23](#) ci-après.

(Cf. [Spectres 34 à 37](#))

Position n°	¹³ C (δ, ppm)	Type de carbone	HMQC*	COSY [#]	HMBC ^{\$}
2	166.66	COOH	—	—	H-3
3	121.53	-CH=	6.42, s	—	—
4	148.30	-C=	—	—	H-3, H-14, H-18
4a	109.28	-C=	—	—	H-3
4b	159.35	-C=	—	—	H-8
6	78.81	-C-	—	—	H-7, H-8, H-19, H-20
7	127.21	-CH=	5.52, d, J=10.0 Hz	H-8	H-8, H-19, H-20
8	116.26	-CH=	6.54, d, J=10.0 Hz	H-7	H-7
8a	102.30	-C=	—	—	H-7, H-8
8b	157.26	-C=	—	—	H-8, H-10
10	79.98	-CH-	4.33, dq, J=11.5, 6.3 Hz	H-11, H-21	H-11, H-21, H-22
11	46.34	-CH-	2.71, dq, J=11.5, 6.9 Hz	H-10, H-22	H-10, H-21, H-22
12	200.17	-C=O	—	—	H-10, H-11, H-22
12a	101.99	-C=	—	—	H-11
12b	161.33	-C=	—	—	—
13	141.61	-C=	—	—	H-14, H-15, H-17, H-18
14, 18	127.85	-CH=	7.40, m	H-15, H-17	H-15, H-16, H-17
15, 17	129.20	-CH=	7.33, m	H-14, H-16, H-18	H-14, H-16, H-18
16	129.68	-CH=	7.33, m	H-15, H-17	H-14, H-15, H-17, H-18
19	28.49	-CH ₃	1.24, s	—	H-7, H-20
20	27.71	-CH ₃	0.93, s	—	H-7, H-19
21	19.90	-CH ₃	1.53, d, J=6.3 Hz	H-10	H-10, H-11
22	10.04	-CH ₃	1.18, d, J=6.9 Hz	H-11	H-10, H-11

(*) HMQC : Couplage direct avec ¹H (δ, ppm)

(#) COSY : Couplage ¹H / ¹H

(\$) HMBC : Couplage indirect avec ¹H

Tableau 23 : Attribution des signaux ¹H et ¹³C et couplages observés pour **21**

Cette structure déterminée par RMN 2D est enfin confirmée par la comparaison des signaux ¹H et ¹³C obtenus à ceux de l'acide calophyllique décrits dans la littérature (Patil, 1993 : Cf. [Tableau 24](#)).

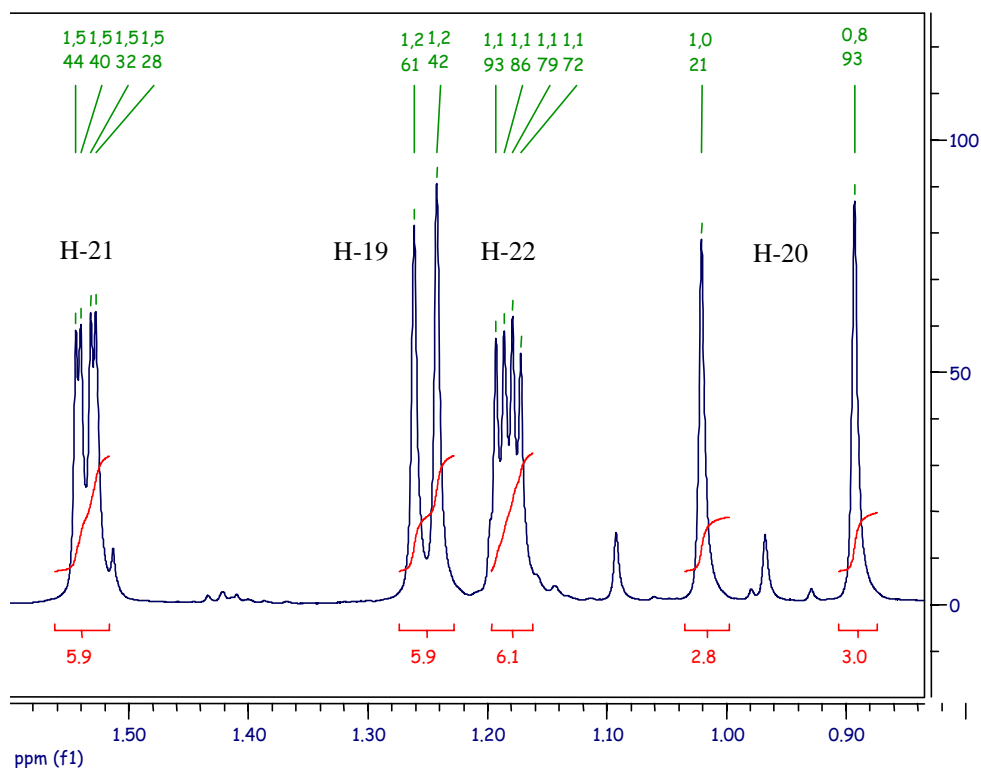
Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure de la molécule **21** comme étant l'acide calophyllique.

Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1951 par Potier à partir des amandes du *Calophyllum inophyllum*⁴. Depuis, il a été isolé de nouveau à partir d'extraits de *Calophyllum inophyllum*, notamment des feuilles (Patil, 1993).

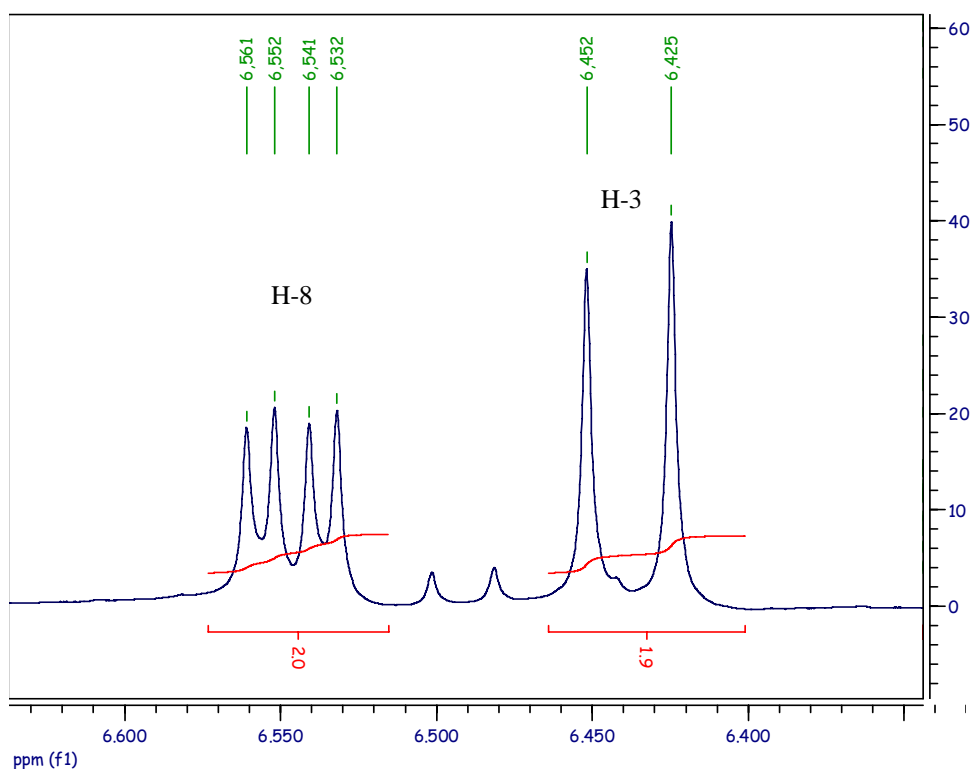
Acide calophyllique (21)				
Position n°	¹ H (δ, ppm)	¹ H littérature* (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹³ C littérature* (δ, ppm)
2	—	—	166,66	168.3
			166,69	
3	6.42, s	6.40, s	121.53	121.1
	6.45, s		121.62	
4	—	—	148.30	148.5
			148.36	
4a	—	—	109.28	108.6
			109.42	
4b	—	—	159.35	159.1
			159.41	
6	—	—	78.81	78.6
			78.95	
7	5.52, d, J=10.0 Hz	5.40, d, J=10.0 Hz	127.21	126.6
	5.54, d, J=10.0 Hz		127.24	
8	6.54, d, J=10.0 Hz	6.50, d, J=10.0 Hz	116.26	115.8
	6.55, d, J=10.0 Hz		116.31	
8a	—	—	102.30	101.7
			102.33	
8b	—	—	157.26	160.4
			157.33	
10	4.33, dq, J=11.5, 6.3 Hz	4,21, dq, J=6.4, 11.4 Hz	79.98	79.5
			80.11	
11	2.71, dq, J=11.5, 6.9 Hz	2,58, dq, J=6.9, 11.3 Hz	46.34	46.0
			46.35	
12	—	—	200.17	199.4
			200.20	
12a	—	—	101.99	101.9
			102.10	
12b	—	—	161.33	156.9
			161.54	
13	—	—	141.61	141.1
			141.93	
14, 18	7.40, m	7.35, m	127.85	127.4
			127.91	
15, 17	7.33, m	7.28, m	129.20	128.7
			129.23	
16	7.33, m	7.28, m	129.68	129.3
			129.74	
19	1.24, s	1.24, s	28.49	28.0
	1.26, s		28.60	
20	0.93, s	0.92, s	27.71	28.0
	1.02, s		28.23	
21	1.53, d, J=6.3 Hz	1.50, d, J=6.2 Hz	19.90	19.8
	1.54, d, J=6.3 Hz		19.92	
22	1.18, d, J=6.9 Hz	1.18, d, J=6.9 Hz	10.04	10.4
	1.19, d, J=6.9 Hz		10.18	

(*) Valeurs moyennes tenant compte des deux rotamères observés.

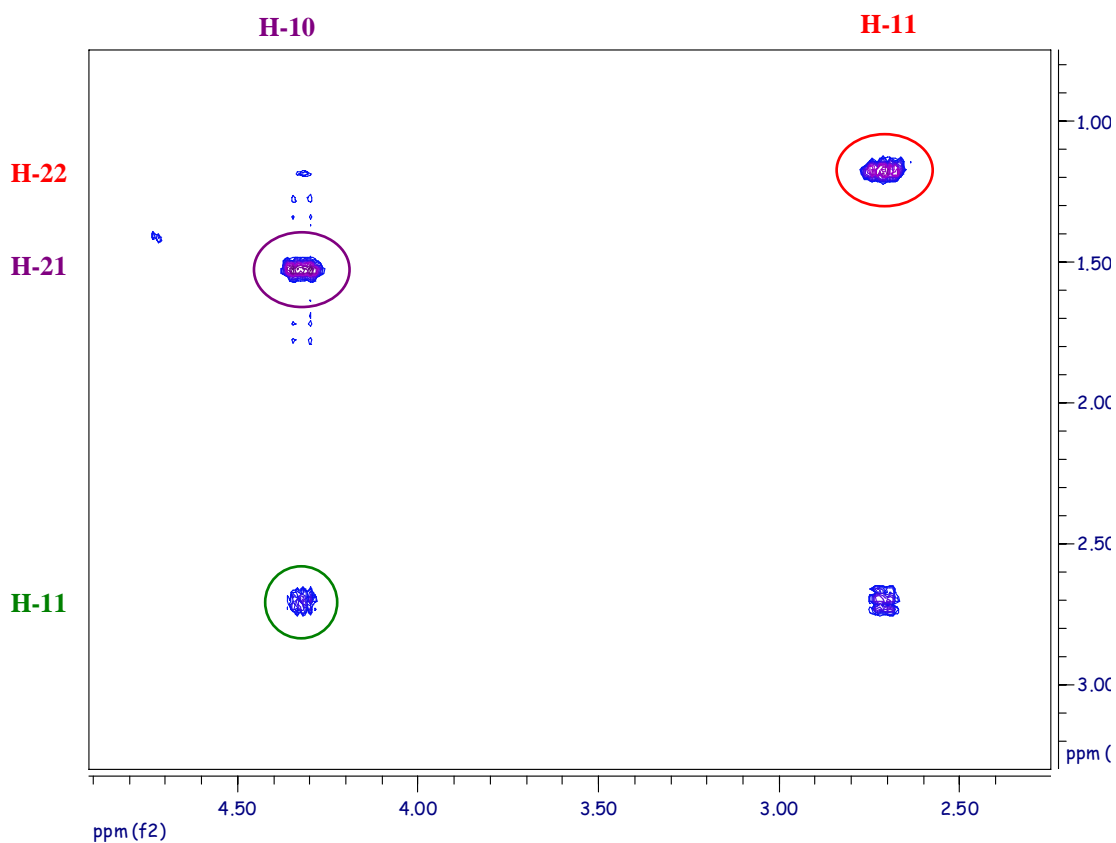
Tableau 24 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **21** à la littérature¹



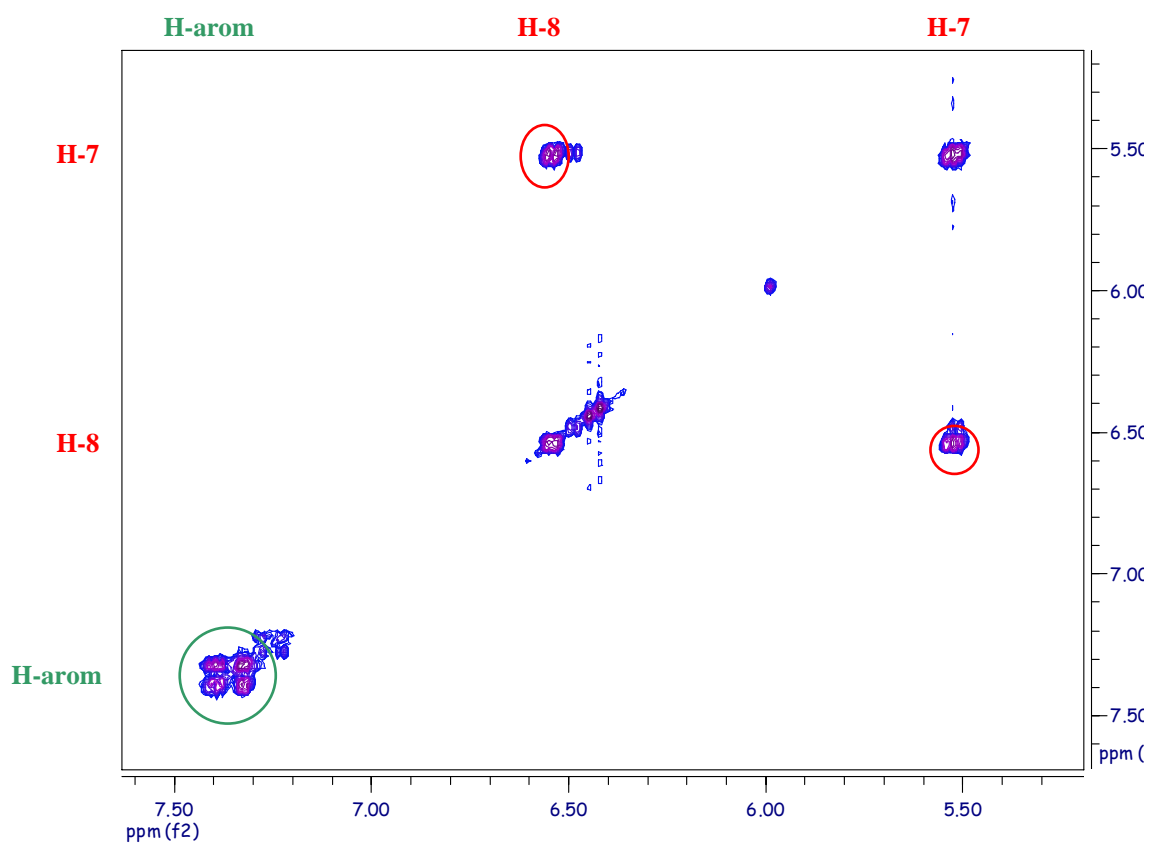
Spectre 32 : RMN ^1H de l'acide calophyllique (**21**) entre 0,8 et 1,3 ppm



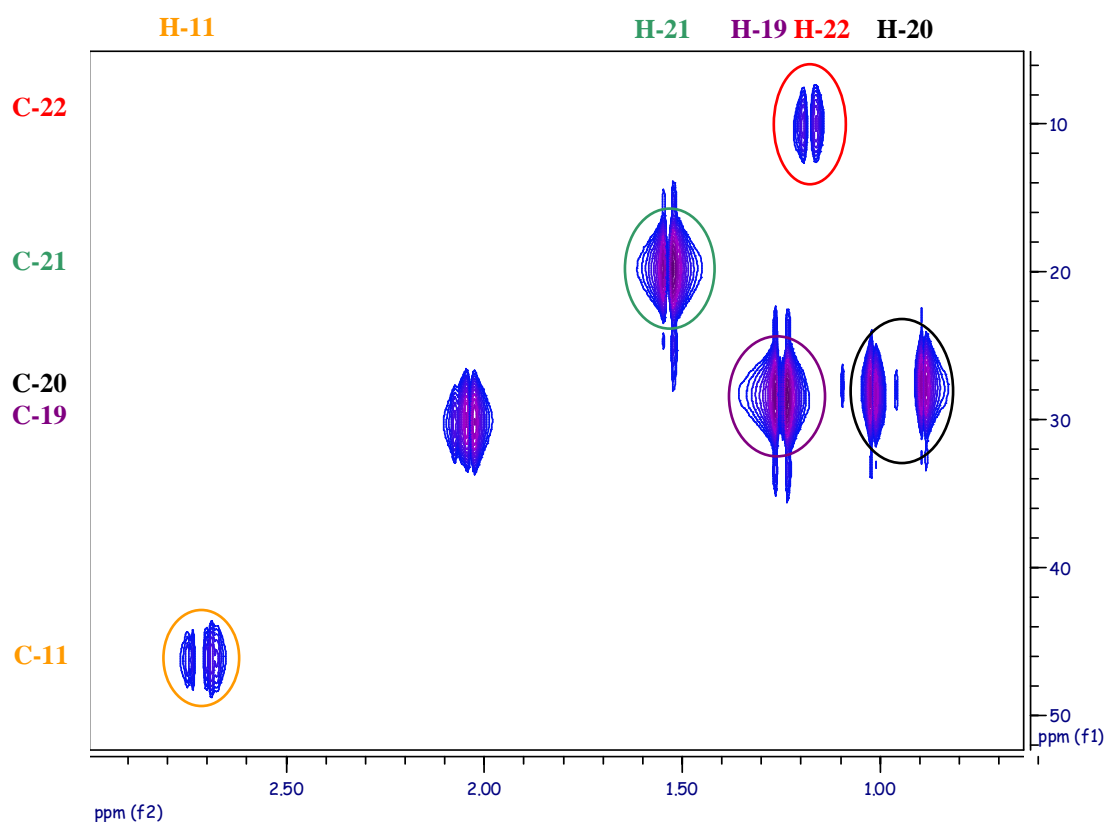
Spectre 33 : RMN ^1H de l'acide calophyllique (**21**) entre 6,4 et 6,6 ppm



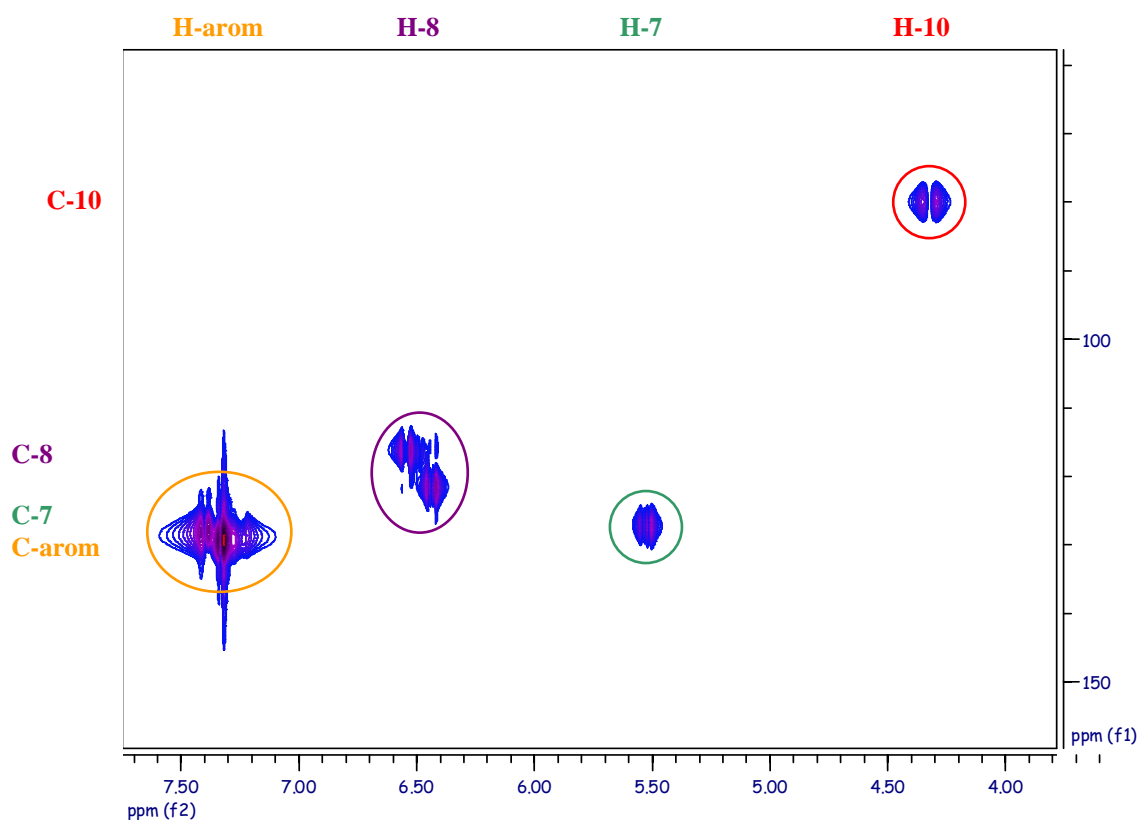
Spectre 34 : RMN 2D COSY de l'acide calophyllique (**21**) entre 2,5 et 5 ppm



Spectre 35 : RMN 2D COSY de l'acide calophyllique (**21**) entre 5,5 et 7,5 ppm



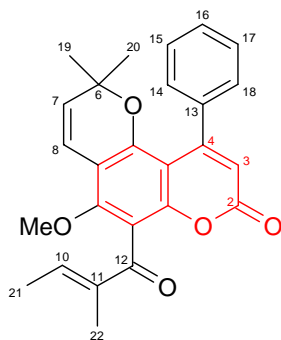
Spectre 36 : RMN 2D HMQC n° 1 de l'acide calophyllique (**21**)



Spectre 37 : RMN 2D HMQC n° 2 de l'acide calophyllique (**21**)

a)2. Le calophyllolide (22)

Le calophyllolide (22) est une coumarine dont le cycle D est ouvert. C'est la seule seule molécule parmi celles que nous avons isolées du Tamanu polynésien qui ne possède ni un cycle chromanone, ni un cycle chromanol.

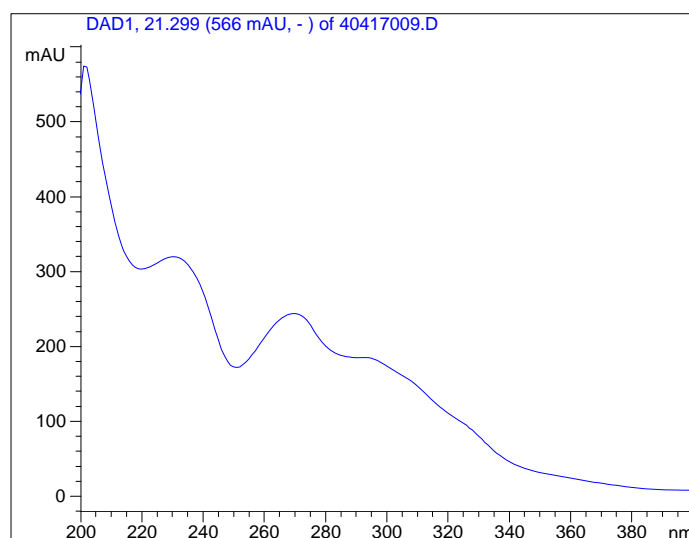


(22) Calophyllolide

Nous avons obtenu le calophyllolide par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où le calophyllolide a été identifié: FL20, FL21 (mélange), FL149, FL161, FL178 (mélange), FL184 (mélange) et FL410).

Sa formule brute est $C_{26}H_{24}O_5$, et sa masse molaire est de $416 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. ($m/z [M+H]^+ = 417$ déterminé en spectrométrie de masse ESI-SM/SM, Cf. [p. 207](#)).

Le spectre Ultra-Violet a d'abord été enregistré grâce au détecteur UV-DAD du système de CLHP analytique. Les maxima caractéristiques du spectre UV du calophyllolide sont observés aux longueurs d'onde $\lambda = 292 \text{ nm}$ et à $\lambda = 270 \text{ nm}$ (le maximum à $\lambda = 230 \text{ nm}$ n'est pas significatif à cause des perturbations dues au solvant dans les longueurs d'onde courtes)



[Spectre 38](#) : Ultra-Violet du calophyllolide (22)

Le calophyllolide est la seule coumarine isolée dans cette étude dont le cycle chromanone est ouvert, et qui possède un groupement méthoxy sur le carbone C-8b et une double liaison C=C liant les carbones C-10 et C-11. Ceci modifie complètement les signaux en RMN pour les protons et les carbones 10, 11, 21 et 22, par rapport aux autres coumarines ayant un cycle chromanone fermé.

Seul le spectre RMN ^1H a été enregistré car il est assez significatif pour permettre une identification en comparaison avec les données de la littérature et avec les spectres obtenus pour les autres coumarines.

Le spectre du proton ^1H nous montre la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,43$ ppm, 3H et $\delta_{\text{H}}=7,31$ ppm, 2H). Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont trois sont portés par des carbones quaternaires (singulets, $\delta_{\text{H}}=0,99$ ppm, 6H et $\delta_{\text{H}}=1,97$ ppm, 3H, éthylénique) et dont le quatrième est porté par un carbone tertiaire éthylénique ($=\text{CH}$, doublet, $\delta_{\text{H}}=1,91$ ppm, $J=6,9$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=5,99$ ppm ; deux doublets à $\delta_{\text{H}}=5,60$ ppm ($J=9,9$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,49$ ppm ($J=10,0$ Hz) ; un quadruplet à $\delta_{\text{H}}=6,61$ ppm ($J=6,9$ Hz).

On reconnaît donc bien la structure des coumarines avec le groupement phényle greffé en C-4, et avec le cycle diméthyl-chromène greffé en C-4b et C-8a. Par contre les signaux caractéristiques du cycle chromanone ou chromanol sont absents, et remplacés par des signaux qui mettent en évidence la présence de la chaîne carbonée $-\text{CO}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_3$ greffée en C-12a et un groupement méthoxy en C-8b. La RMN ^1H du proton est donc en accord avec la structure proposée du calophyllolide (Cf [Tableau 25](#) et [Spectre 39](#)).

Le spectre 2D de couplage proton / proton COSY nous permet de confirmer les hypothèses posées à la vue du simple spectre du proton ^1H :

- Tout d'abord, les protons H-3, H-19 et H-20 et H-22 ne sont pas couplés avec d'autres protons : les carbones voisins de celui qui porte ces protons sont quaternaires.
- Le proton H-7 est couplé au proton H-8, avec une constante de couplage valant 10 Hz.
- Le proton H-8 est couplé au proton H-7, avec une constante de couplage valant 10 Hz.
- Le proton H-10 est couplé aux protons H-21, avec une constante de couplage valant 6,9 Hz.
- Les protons H-21 sont couplés au proton H-10 avec une constante de couplage valant 6,9 Hz.
- Les protons aromatiques H-14 à H-18 sont couplés entre eux.

(Cf. [Tableau 25](#) et [Spectres 40 et 41](#))

Calophyllolide (22)		
Position n°	^1H (δ , ppm)	COSY*
2	—	—
3	5.99, s	—
4	—	—
4a	—	—
4b	—	—
6	—	—
7	5.60, d, $J=10.0$ Hz	H-8
8	6.49, d, $J=10.0$ Hz	H-7
8a	—	—
8b	—	—
10	6.61, q, $J=6.9$ Hz	H-21
11	—	—
12	—	—
12a	—	—
12b	—	—
13	—	—
14, 18	7.43, m	H-15, H-17
15, 17	7.31, m	H-14, H-16, H-18
16	7.43, m	H-15, H-17
19	0.99, s	—
20	0.99, s	—
21	1.91, d, $J=6.9$ Hz	H-10
22	1.97, s	—
23	3.73, s	—

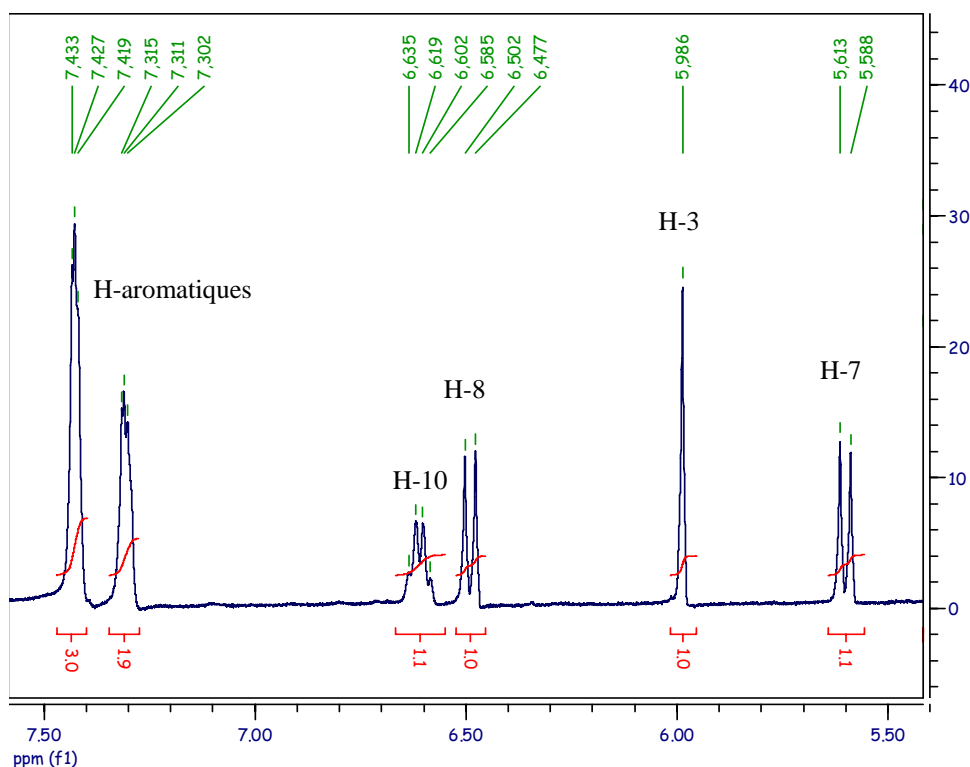
(*) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

[Tableau 25](#) : Attribution des signaux ^1H et couplages COSY observés pour **22**

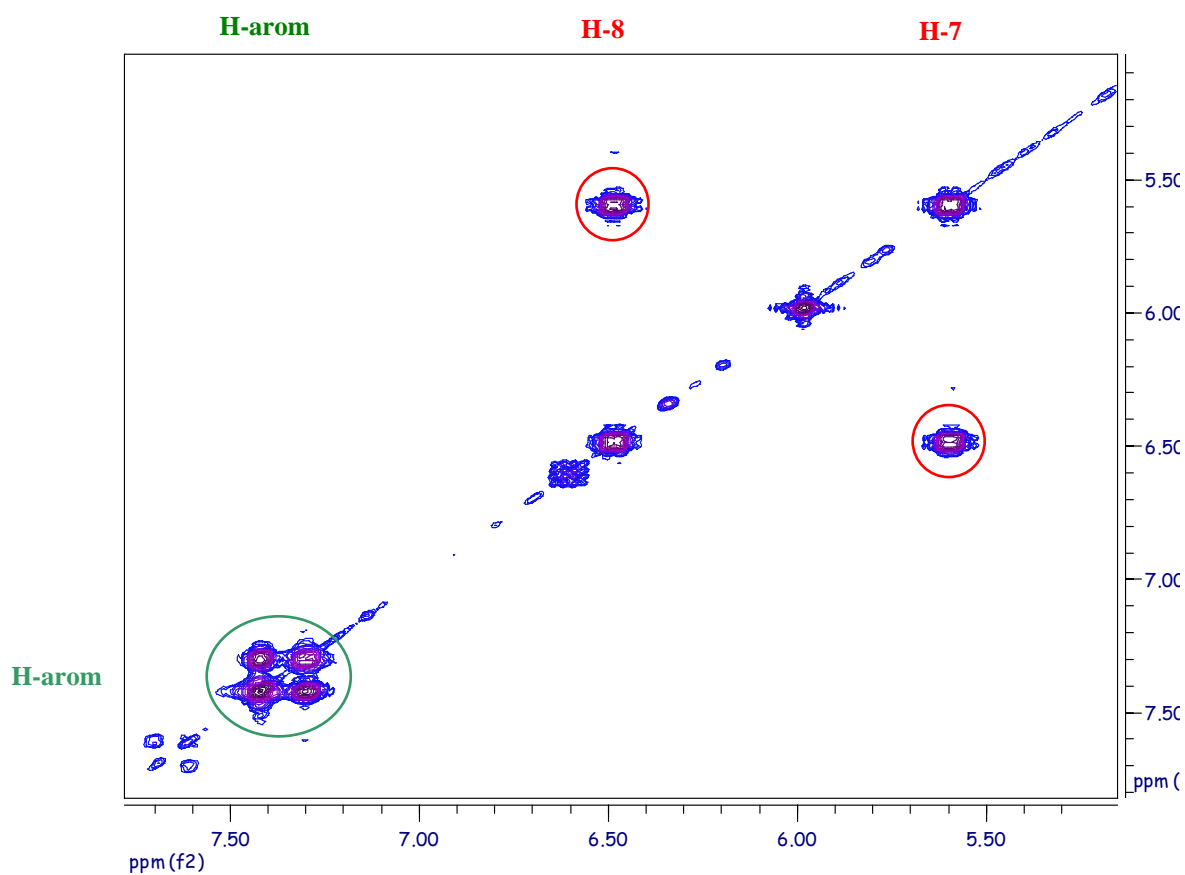
Cette structure déterminée par RMN ^1H et 2D est enfin confirmée par la comparaison des signaux ^1H obtenus à ceux de l'acide calophyllique décrits dans la littérature (Nigam, 1967 : Cf. [Tableau 26](#)).

Position n°	Calophyllolide (22)	
	^1H (δ , ppm)	^1H littérature (δ , ppm)
2	—	—
3	5.99, s	5.89, s
4	—	—
4a	—	—
4b	—	—
6	—	—
7	5.60, d, J=9.9 Hz	5.38, d, J=10.0 Hz
8	6.49, d, J=10.0 Hz	6.42, d, J=10.0 Hz
8a	—	—
8b	—	—
10	6.61, q, J=6.9 Hz	6.50, m
11	—	—
12	—	—
12a	—	—
12b	—	—
13	—	—
14, 18	7.43, m	
15, 17	7.31, m	
16	7.43, m	
19	0.99, s	0.94, s
20	0.99, s	0.94, s
21	1.91, d, J=6.9 Hz	1.92, d, J=7.0 Hz
22	1.97, s	1.95, s

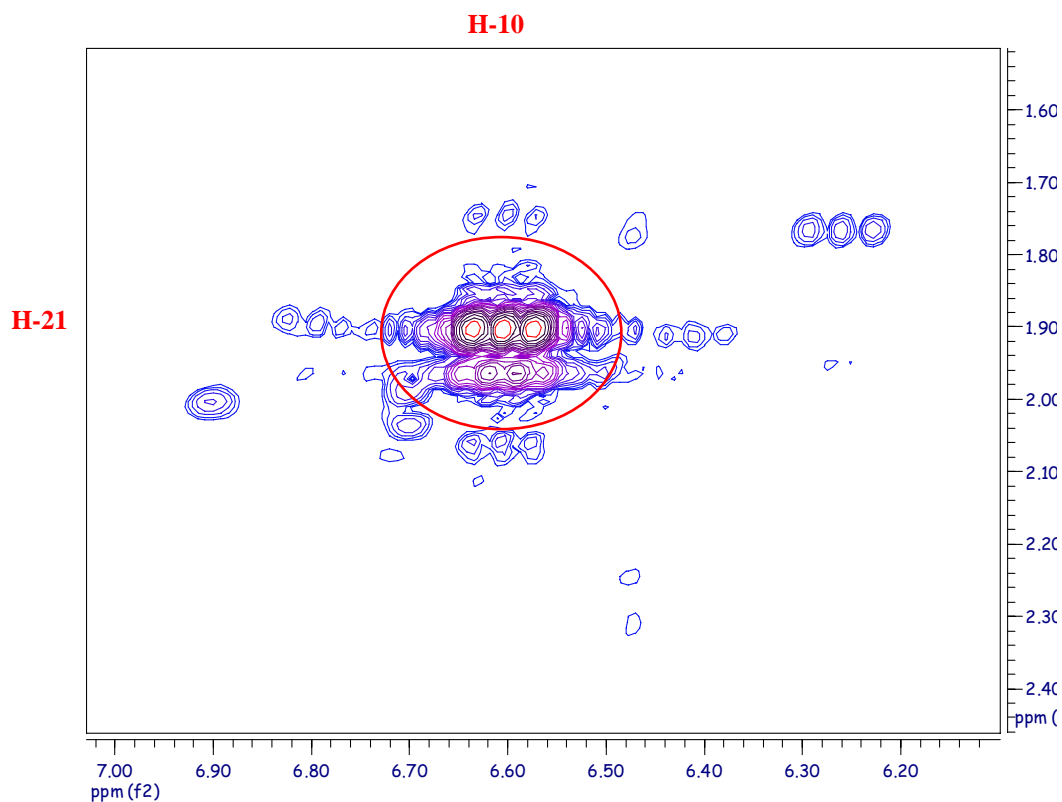
Tableau 26 : Comparaison des signaux ^1H de **22** à la littérature³



Spectre 39 : RMN ^1H du calophyllolide (**22**) entre 5,5 et 7,5 ppm



Spectre 40 : RMN 2D COSY du calophyllolide (**22**) entre 5,5 et 7,5 ppm



Spectre 41 : RMN 2D COSY du calophyllolide (**22**) (zoom)

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une autre méthode spectrale. Ces analyses ont été effectuées par couplage CLHP-ESI-SM-SM, en mode positif. Un échantillon contenant entre autres coumarines du calophyllolide (échantillon brut) est chromatographié en CLHP sur une colonne de silice, et le flux sortant du détecteur UV-DAD est envoyé à la source électrospray, où les molécules sont ionisées par la méthode du « sheath liquid interface » décrite précédemment. L'ion pseudo-moléculaire formé est $[M+H]^+$, le rapport m/z pour le calophyllolide vaut 417. Cet ion est sélectionné par le premier quadripôle, puis fragmenté. La fragmentation majeure consiste en la perte d'un fragment but-2-ène (-56) pour former un ion m/z 361. Cet ion est sélectionné par le second quadripôle, et le signal ainsi enregistré permet d'obtenir un chromatogramme spécifique de la fragmentation m/z 417 \rightarrow m/z 361.

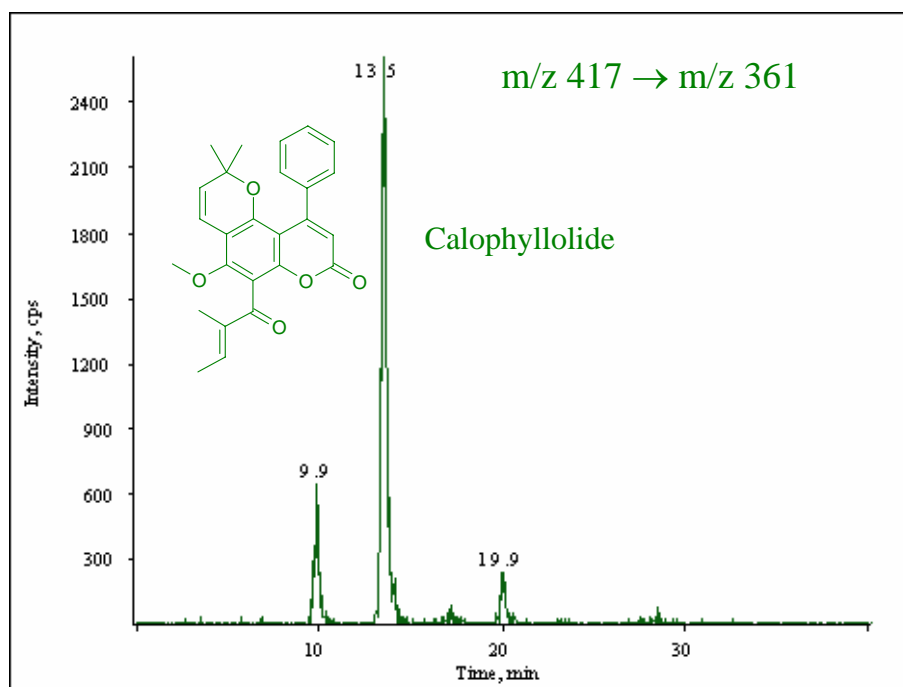
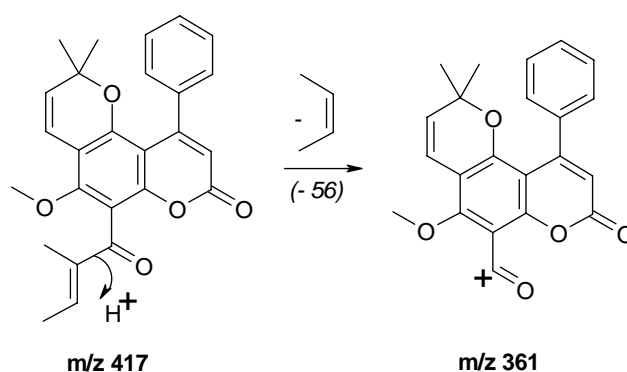


Figure 56 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (417 \rightarrow 361)

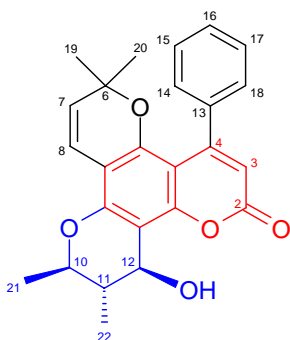
Le temps de rétention du pic principal correspond bien au temps de rétention du calophyllolide isolé et identifié en RMN. De plus, le spectre UV enregistré à ce temps de rétention par le détecteur UV-DAD correspond bien au spectre UV du calophyllolide (**22**). Le pic principal correspond donc bien au calophyllolide. Les deux autres pics minoritaires obtenus peuvent correspondre à deux autres molécules de structure très voisine.

Le calophyllolide (**22**) est une coumarine qui a été isolée pour la première fois en 1951 par Potier⁴ à partir d'amandes de *Calophyllum inophyllum*. Depuis, il a été de nouveau isolé à partir d'extraits de feuilles de *Calophyllum inophyllum* par Patil en 1993¹.

Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure de la molécule **22** comme étant le calophyllolide, confirmant ainsi la présence du calophyllolide (**22**) dans le Tamanu polynésien.

a)3. L'inophyllum B (1)

L'inophyllum B (**1**) est une 4-phényl-coumarine possédant un cycle chromanol et un cycle diméthyl-chromène.

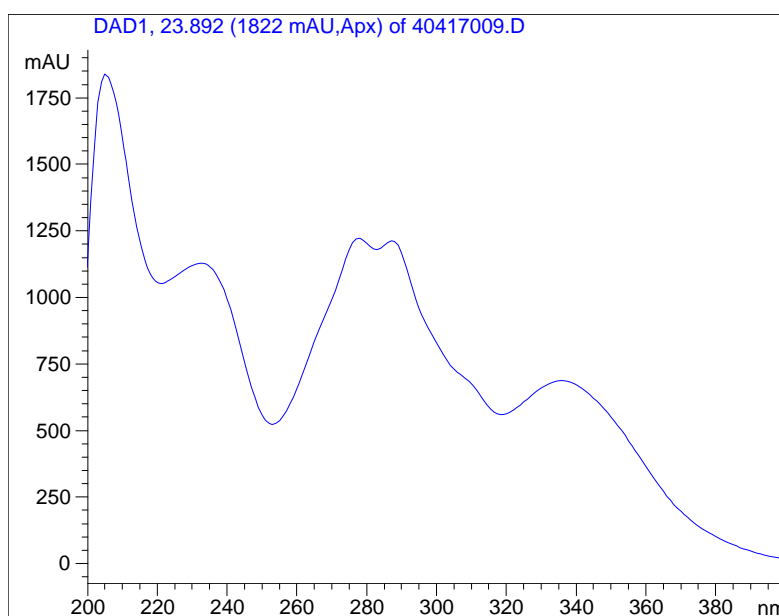


(1) Inophyllum B

Nous avons obtenu l'inophyllum B par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#) (fractions où l'inophyllum B a été identifié : FL4, FL10 (mélange), FL39 et FL52).

Sa formule brute est $C_{25}H_{24}O_5$, et sa masse molaire est de $404 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($m/z [M+H]^+ = 405$ déterminé par spectrométrie de masse ESI-SM/SM, Cf. p. 212).

Le spectre UV a d'abord été enregistré grâce au détecteur UV-DAD du système de CLHP analytique. Les maxima caractéristiques du spectre UV de l'inophyllum B sont observés aux longueurs d'onde $\lambda = 335 \text{ nm}$, $\lambda = 288 \text{ nm}$ et à $\lambda = 278 \text{ nm}$ (le maximum à $\lambda = 235 \text{ nm}$ n'est pas significatif à cause des perturbations dues au solvant dans les longueurs d'onde courtes)



Spectre 42 : Ultra-Violet de l'inophyllum B (**1**)

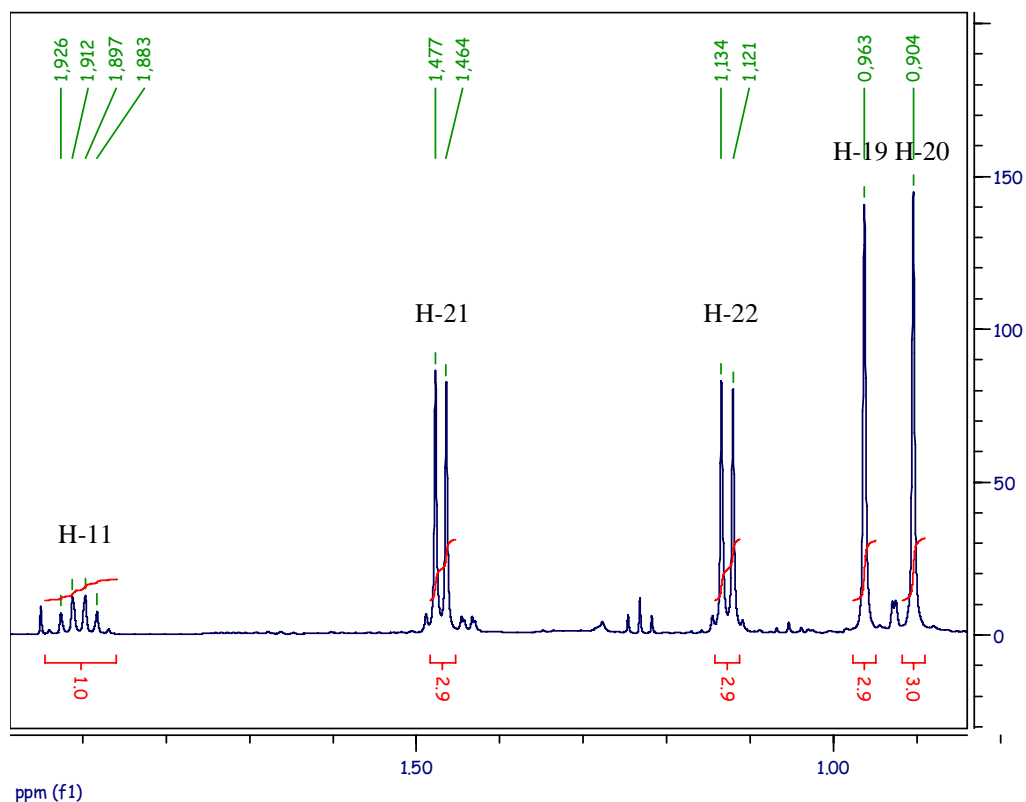
Le spectre du carbone ^{13}C révèle la présence dans la molécule de 25 atomes carbone. De nombreux signaux sont fortement déblindés ce qui tend à prouver que nous sommes en présence d'une fonction ester (pour le carbone C-2, $\delta_{\text{C}}=162,8$ ppm) et de carbones aromatiques ou éthyléniques (pour les carbones C-3, C-4, C-4a, C-4b, C-7, C-8, C-8a, C-8b, C-12a, C-12b, et C-13 à C-18 ; δ_{C} compris entre 104,8 ppm et 158,6 ppm). (Cf. [Tableau 27](#) et [Spectre 46](#))

Le spectre du proton ^1H nous montre quant à lui la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,40$ ppm, 3H et $\delta_{\text{H}}=7,27$ ppm, 2H), qui pourraient être portés par les carbones C-14 à C-18. Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont deux portés par des carbones quaternaires sont sous forme de singulets, ($\delta_{\text{H}}=0,90$ ppm et $\delta_{\text{H}}=0,96$ ppm) les deux autres portés par des carbones tertiaires (CH) étant sous forme de doublets ($\delta_{\text{H}}=1,13$ ppm, $J=6,9$ Hz et $\delta_{\text{H}}=1,47$ ppm, $J=6,5$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=5,92$ ppm ; deux doublets à $\delta_{\text{H}}=5,45$ ppm ($J=10,0$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,52$ ppm ($J=10,0$ Hz) ; un doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=4,07$ ppm ($J=7,9$ et $6,5$ Hz) ; un doublet de doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=1,90$ ppm ($J=7,9$ 6,9 et $6,9$ Hz). On peut donc déjà émettre les hypothèses suivantes : les doublets à 5,45 ppm et 6,52 ppm sont couplés avec une constante de 10.0 Hz ; les signaux à 1,13 ppm et 1,90 ppm sont couplés avec une constante de 6,9 Hz ; les signaux à 1,47 ppm et 4,07 ppm sont couplés avec une constante de 6,5 Hz ; les signaux à 1,90 ppm et 4,07 ppm sont couplés avec une constante de 7,9 Hz ; pour finir les signaux à 1,90 ppm et 4.72 ppm sont couplés avec une constante de 6.9 Hz. (Cf [Tableau 27](#) et [Spectres 43 à 45](#))

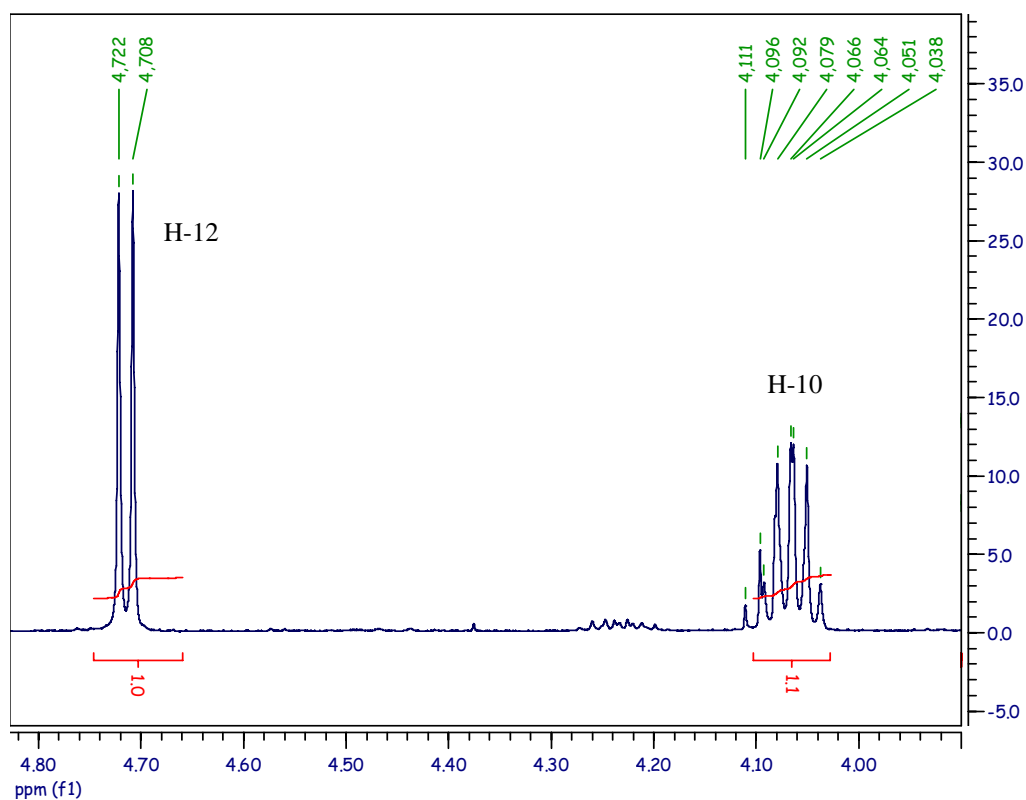
La comparaison des signaux ^1H et ^{13}C obtenus aux signaux décrits dans la littérature permettent finalement de conclure que la structure de la molécule étudiée est bien celle de l'inophyllum B (**1**). (Cf. [Tableau 27](#))

Position n°	Inophyllum B (1)			
	^1H (δ , ppm)	^1H Littérature (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)	^{13}C Littérature (δ , ppm)
2	—	—	162.80	160.6
3	5.92, s	5.96, s	112.22	111.7
4	—	—	158.56	156.3
4a	—	—	104.76	103.1
4b	—	—	152.24	151.1
6	—	—	78.68	76.7
7	5.45, d, $J=10.0$ Hz	5.37, d, $J=10.0$ Hz	128.84	127.1
8	6.52, d, $J=10.0$ Hz	6.53, d, $J=10.0$ Hz	116.80	116.0
8a	—	—	107.17	106.0
8b	—	—	155.57	153.7
10	4.07, dq, $J=7.9, 6.5$ Hz	3.97, dq, $J=8.9, 6.8$ Hz	78.38	73.0
11	1.90, ddq, $J=7.9, 6.9, 6.9$ Hz	2.03, ddq, $J=8.9, 7.4, 7.0$ Hz	42.44	38.2
12	4.72, d, $J=6.9$ Hz	4.79, d, $J=7.4$ Hz	68.16	61.8
12a	—	—	107.75	106.1
12b	—	—	155.25	153.6
13	—	—	141.49	140.0
14, 18	7.27, m	7.3, m	128.84	127.3
15, 17	7.40, m	7.3, m	128.84	127.3
16	7.40, m	7.3, m	128.84	127.6
19	0.96, s	0.97, s	27.35	26.9
20	0.90, s	0.91, s	26.95	26.8
21	1.47, d, $J=6.5$ Hz	1.47, d, $J=6.8$ Hz	19.59	18.8
22	1.13, d, $J=6.9$ Hz	1.17, d, $J=7.0$ Hz	15.67	12.5
23	—	2.03, s(br)	—	—

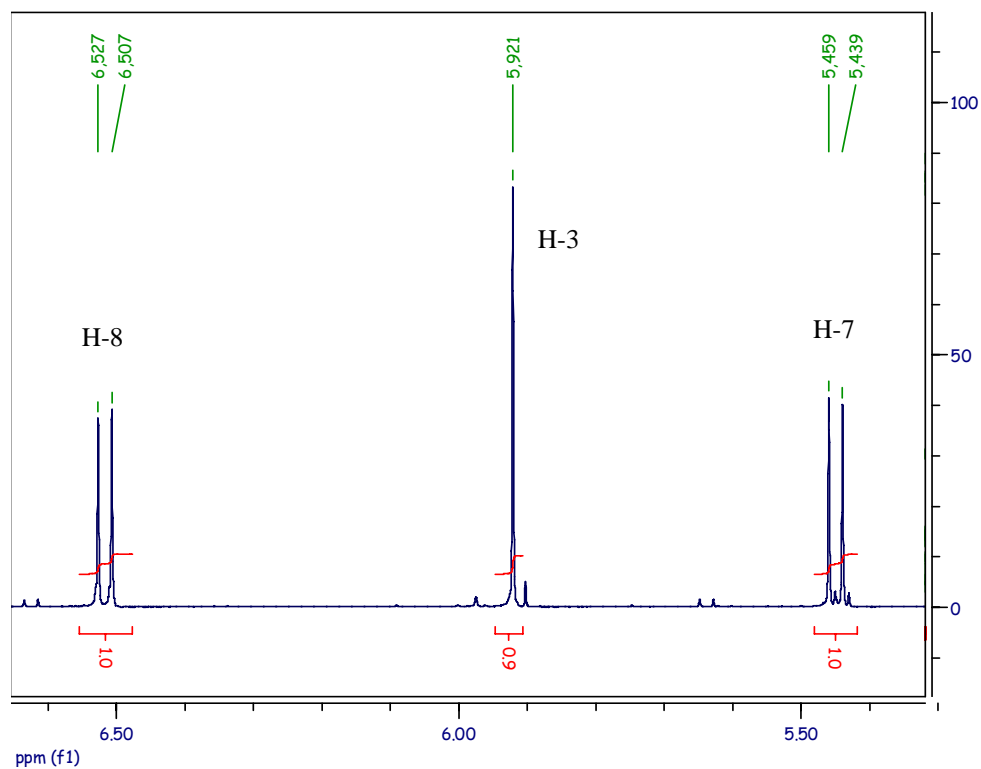
[Tableau 27](#) : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C de **1** et comparaison à la littérature^{1,2}



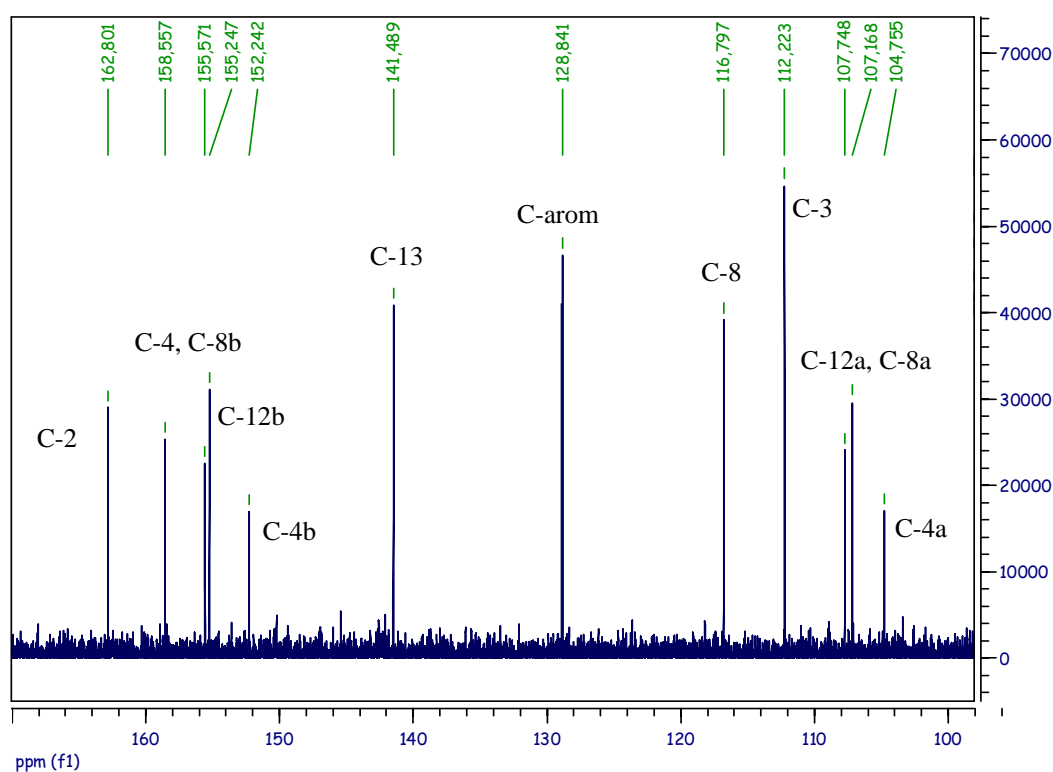
Spectre 43 : RMN ^1H de l'inophyllum B (**1**) entre 0,5 et 2 ppm



Spectre 44 : RMN ^1H de l'inophyllum B (**1**) entre 4 et 5 ppm



Spectre 45 : RMN ^1H de l'inophyllum B (**1**) entre 5 et 7 ppm



Spectre 46 : RMN ^{13}C de l'inophyllum B (**1**) entre 100 et 170 ppm

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une autre méthode spectrale. Ces analyses ont été effectuées par couplage CLHP-ESI-SM-SM, en mode positif. Un échantillon contenant entre autres coumarines de l'inophyllum B (échantillon brut) est chromatographié en CLHP sur une colonne de silice, et le flux sortant du détecteur UV-DAD est envoyé à la source électrospray, où les molécules sont ionisées par la méthode du « sheath liquid interface » décrite précédemment. L'ion pseudo-moléculaire formé est $[M+H]^+$, le rapport m/z pour l'inophyllum B vaut 405. Cet ion est sélectionné par le premier quadripôle, puis fragmenté. La fragmentation majeure consiste en la perte d'une molécule d'eau (-18) pour former un ion m/z 387. Cet ion est sélectionné par le second quadripôle, et le signal ainsi enregistré permet d'obtenir un chromatogramme spécifique de la fragmentation m/z 405 \rightarrow m/z 387.

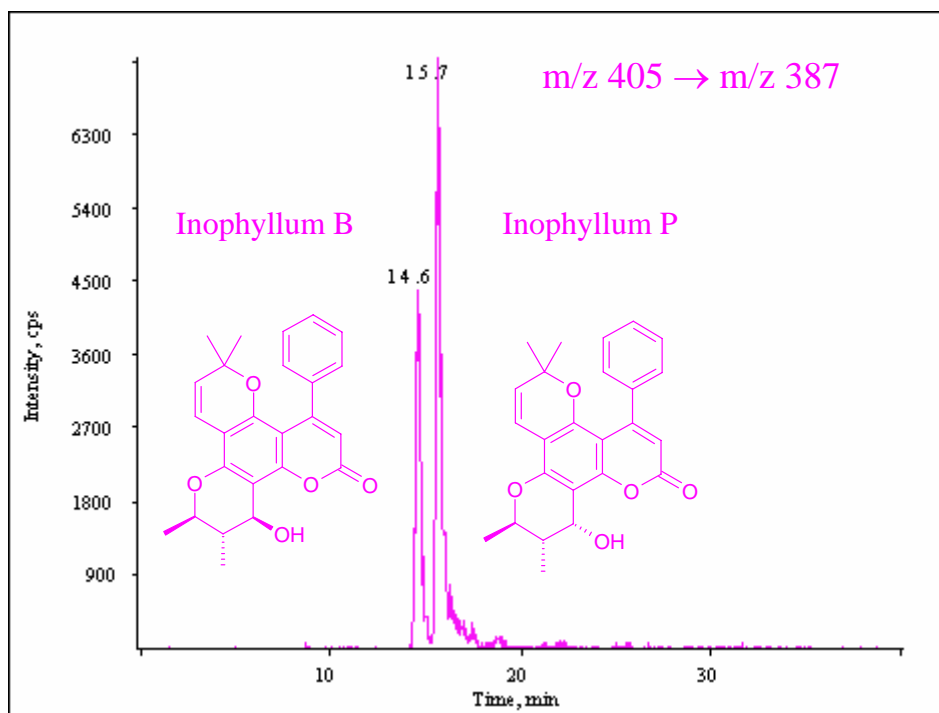
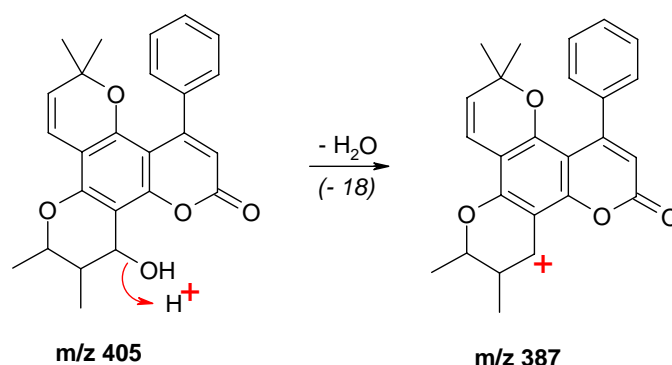


Figure 57 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (405 \rightarrow 387)

Le temps de rétention du premier pic correspond bien au temps de rétention de l'inophyllum B isolé et identifié en RMN. De plus, le spectre UV enregistré à ce temps de rétention par le détecteur UV-DAD correspond bien au spectre UV de l'inophyllum B (**1**). Le second pic correspond à l'inophyllum P (diastéréoisomère) qui subit la même fragmentation.

Par ailleurs, la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ m/z 405 a été étudiée. Outre l'ion m/z 387 formé par la perte d'une molécule d'eau, les ions fils observés sont les suivants : $m/z = 317, 333, 345$ et 359 .

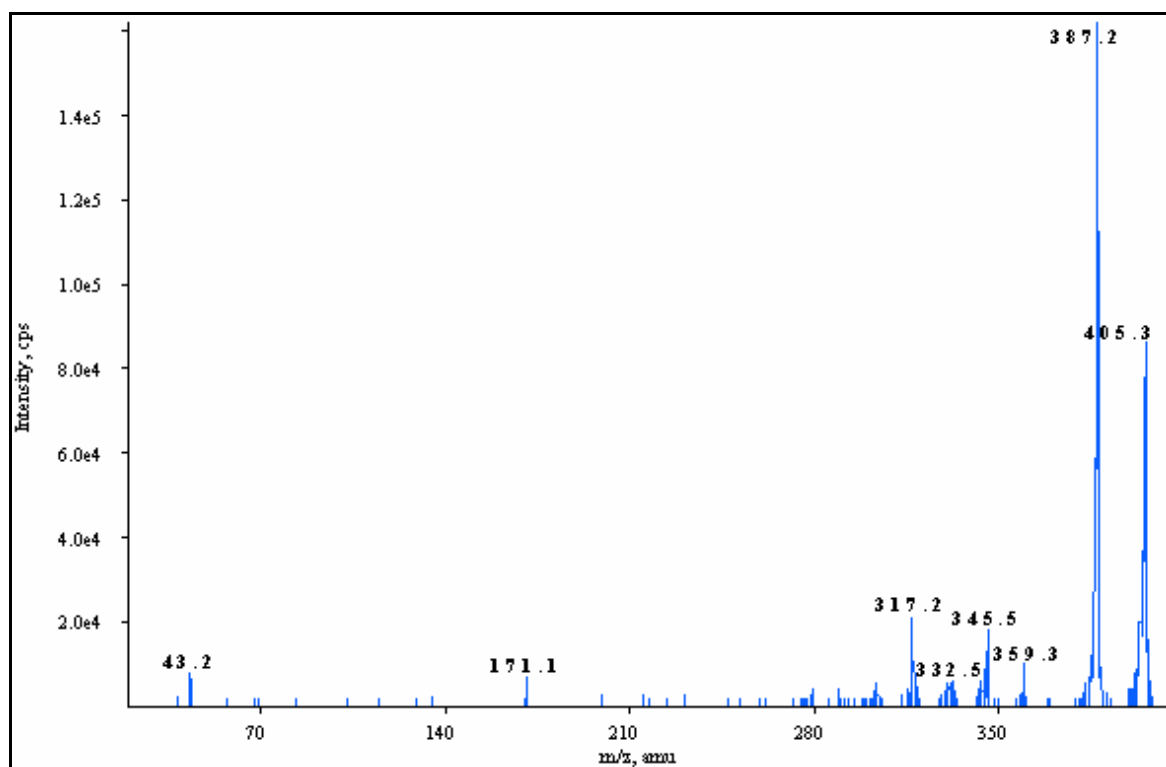
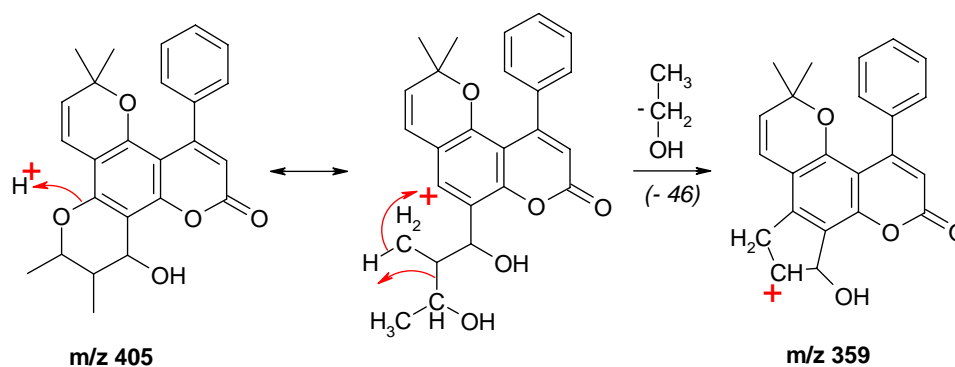


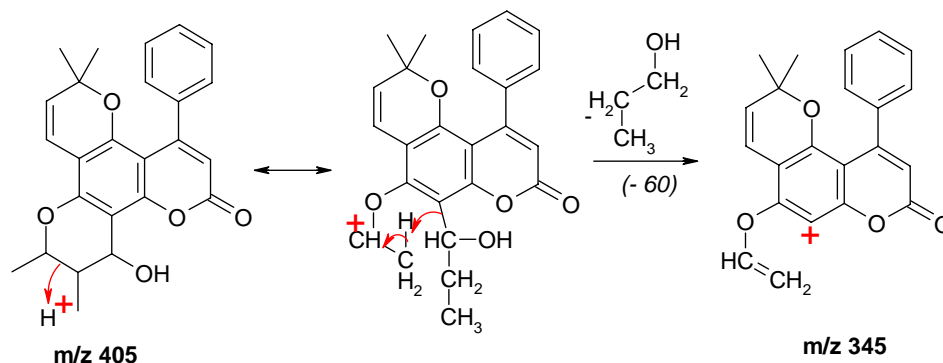
Figure 58 : Spectre des ions fragments de l'ion $[M+H]^+$ m/z 405.

Les fragmentations correspondantes à la formation de ces ions sont détaillées ci-après.

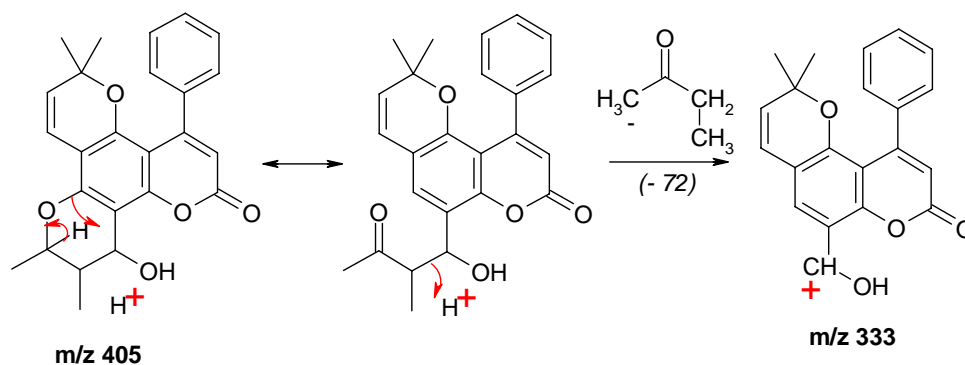
L'ion pseudo-moléculaire m/z 405 peut se réarranger par l'ouverture du cycle chromanol, ce qui conduit à la perte d'une molécule d'éthanol (-46) pour former un ion m/z 359.



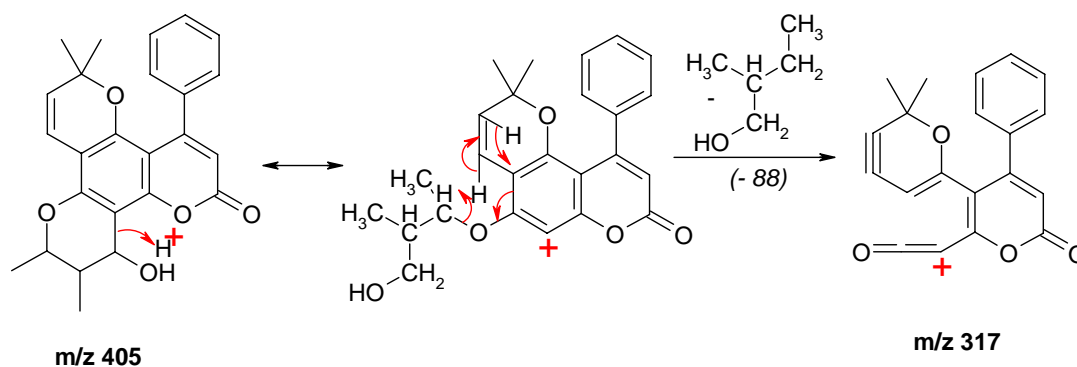
Un autre réarrangement peut se produire via l'ouverture du cycle chromanol, ce qui conduit cette fois à la perte d'une molécule de propan-1-ol (-60) pour former un ion m/z 345.



Concernant toujours l'ouverture du cycle chromanol, un troisième réarrangement est possible pour conduire à la perte d'une molécule de butan-2-one (-72) ce qui engendre un ion m/z 333.



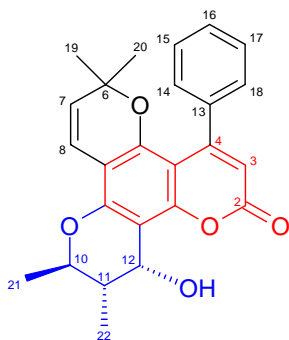
Enfin, le dernier réarrangement possible au niveau du cycle chromanol conduit à la perte d'une molécule de 2-méthyl-butan-1-ol (-88) pour former un ion m/z 317.



L'inophyllum B (**1**) est une coumarine qui a été isolée pour la première fois en 1968 par Kawazu à partir d'amandes de *Calophyllum inophyllum*³. Depuis, il a été isolé à partir d'extraits de feuilles de *Calophyllum inophyllum* par Kawazu en 1972² et par Patil en 1993¹. Toutes ces informations nous permettent d'établir la structure de la molécule **1** comme étant l'inophyllum B, confirmant ainsi la présence de l'inophyllum B (**1**) dans le Tamanu polynésien.

a)4. L'inophyllum P (2)

L'inophyllum P (2) est un diastéréoisomère de l'ionophyllum B (1). Il a été isolé pour la première fois en 1993 des feuilles du *Calophyllum inophyllum* par Patil¹. Cette équipe a ainsi pu déterminer sa structure et sa stéréochimie par RMN et rayons X.



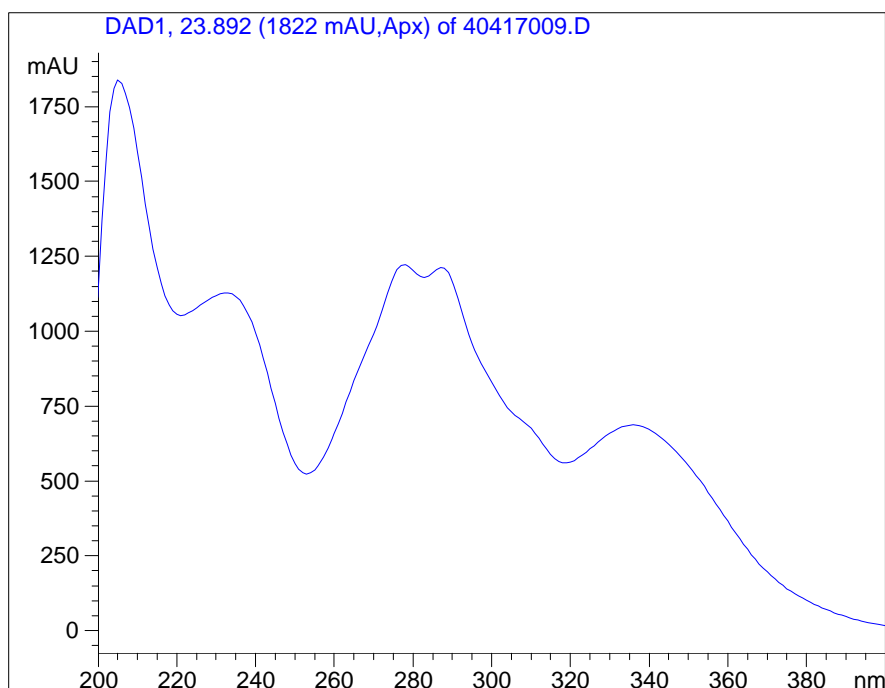
(2) Inophyllum P

Nous avons obtenu l'inophyllum P (2) par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#) (fractions où l'inophyllum P a été identifié : FL6 (mélange avec l'ionophyllum C), FL14, FL30, FL32).

L'inophyllum P se présente sous la forme d'une poudre blanche, et son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{20} = +19,8^\circ$ dans le chloroforme.

Sa formule brute est $C_{25}H_{24}O_5$, et sa masse molaire est de $404 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($m/z [M+H]^+ = 405$ déterminé par spectrométrie de masse ESI-SM/SM, Cf. [p. 212](#)).

Le spectre Ultra-Violet a d'abord été enregistré grâce au détecteur UV-DAD du système de CLHP analytique. Les maxima caractéristiques du spectre UV de l'inophyllum P sont observés aux longueurs d'onde $\lambda = 335 \text{ nm}$, $\lambda = 288 \text{ nm}$ et à $\lambda = 278 \text{ nm}$ (le maximum à $\lambda = 235 \text{ nm}$ n'est pas significatif à cause des perturbations dues au solvant dans les longueurs d'onde courtes)

[Spectre 47](#) : Ultra-Violet de l'inophyllum P (2)

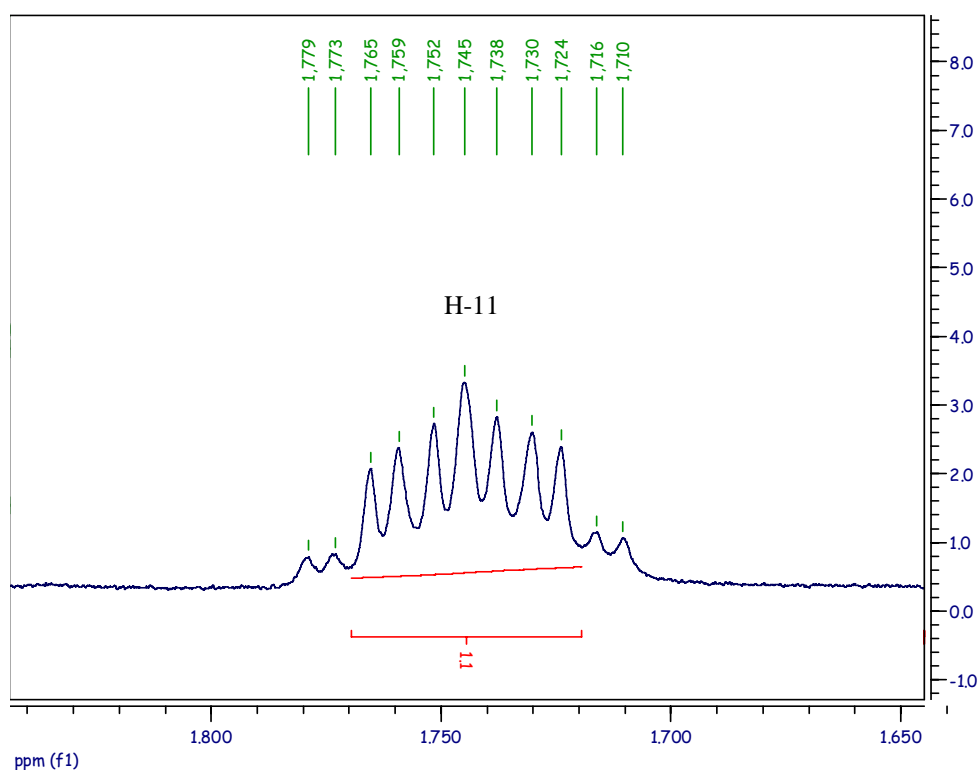
Le spectre du carbone ^{13}C révèle la présence dans la molécule de 25 atomes de carbone. De nombreux signaux sont fortement déblindés ce qui tend à prouver que nous sommes en présence d'une fonction ester (pour le carbone C-2, $\delta_{\text{C}}=162,8$ ppm) et de carbones aromatiques ou éthyléniques (pour les carbones C-3, C-4, C-4a, C-4b, C-7, C-8, C-8a, C-8b, C-12a, C-12b, et C-13 à C-18 ; δ_{C} compris entre 104,8 ppm et 158,6 ppm). (Cf [Tableau 28](#) et [Spectre 51](#))

Le spectre du proton ^1H nous montre quant à lui la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,40$ ppm, 3H et $\delta_{\text{H}}=7,27$ ppm, 2H), qui pourraient être portés par les carbones C-14 à C-18. Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont deux portés par des carbones quaternaires sont sous forme de singulets, (déplacement chimique identique : $\delta_{\text{H}}=0,93$ ppm) les deux autres portés par des carbones tertiaires (CH) étant sous forme de doublets ($\delta_{\text{H}}=1,14$ ppm, $J=6,9$ Hz et $\delta_{\text{H}}=1,44$ ppm, $J=6,3$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=5,90$ ppm ; deux doublets à $\delta_{\text{H}}=5,43$ ppm ($J=10,0$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,52$ ppm ($J=10,0$ Hz) ; un doublet à $\delta_{\text{H}}=4,93$ ppm (3,0 Hz) ; un doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=4,25$ ppm ($J=10,8$ et 6,3 Hz) ; un doublet de doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=1,73$ ppm ($J=10,8$ 6,9 et 3,0 Hz). On peut donc déjà émettre les hypothèses suivantes : les doublets à 5,43 ppm et 6,52 ppm sont couplés avec une constante de 10.0 Hz ; les signaux à 1,14 ppm et 1,73 ppm sont couplés avec une constante de 6,9 Hz ; les signaux à 1,44 ppm et 4,25 ppm sont couplés avec une constante de 6,3 Hz ; les signaux à 1,73 ppm et 4,25 ppm sont couplés avec une constante de 10,8 Hz ; pour finir, les signaux à 1,73 ppm et 4,92 ppm sont couplés avec une constante de 3,0 Hz. (Cf. [Tableau 28](#) et [Spectres 48 à 50](#))

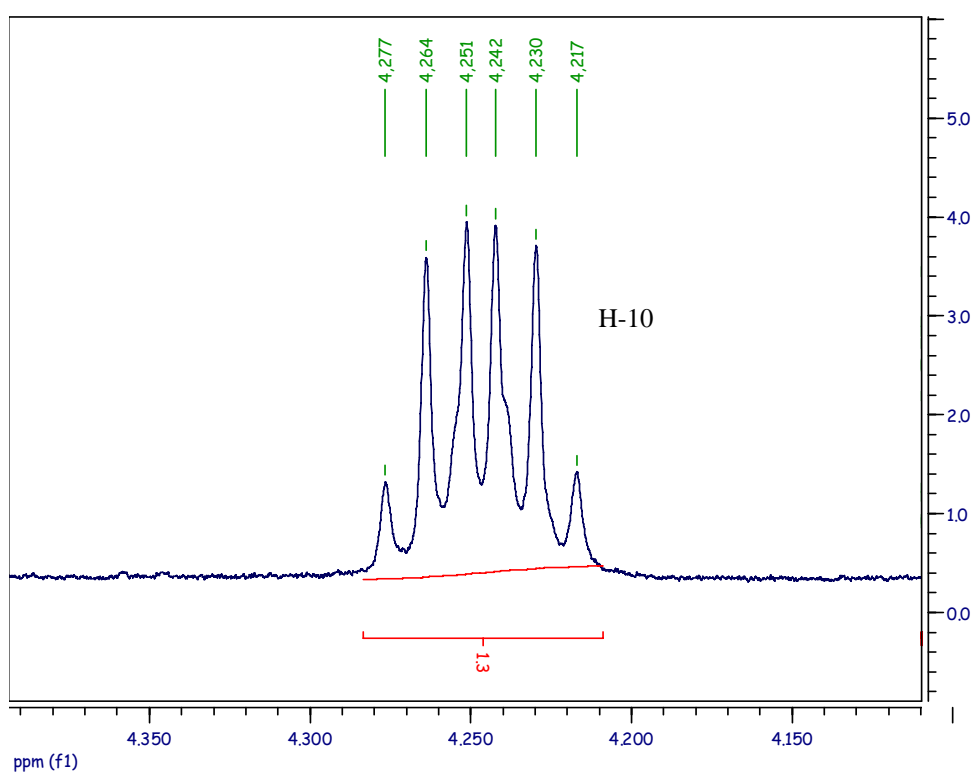
La comparaison des signaux ^1H et ^{13}C obtenus aux signaux décrits dans la littérature permettent finalement de conclure que la structure de la molécule étudiée est bien celle de l'inophyllum P (2). (Cf. [Tableau 28](#))

Position n°	Inophyllum P (2)			
	^1H (δ , ppm)	^1H Littérature (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)	^{13}C Littérature (δ , ppm)
2	—	—	161.77	160.1
3	5.90, s	5.97, s	112.24	111.5
4	—	—	156.13	156.4
4a	—	—	104.19	103.6
4b	—	—	152.39	150.9
6	—	—	78.35	77.2
7	5.43, d, $J=10.0$ Hz	5.37, d, $J=10.0$ Hz	128.75	127.6
8	6.52, d, $J=10.0$ Hz	6.54, d, $J=10.0$ Hz	116.82	115.9
8a	—	—	107.49	106.3
8b	—	—	154.80	153.7
10	4.25, dq, $J=10.8, 6.3$ Hz	4.29, dq, $J=10.6, 6.3$ Hz	74.46	76.9
11	1.73, ddq, $J=10.8, 6.9, 3.0$ Hz	1.79, ddq, $J=10.6, 7.0, 3.3$ Hz	40.00	40.4
12	4.92, d, $J=3.0$ Hz	5.04, d, $J=3.3$ Hz	62.44	67.1
12a	—	—	107.26	106.1
12b	—	—	155.20	154.1
13	—	—	141.47	139.9
14, 18	7.27, m	7.31, m	128.88	127.3
15, 17	7.40, m	7.41, m	128.88	127.3
16	7.40, m	7.41, m	128.88	127.4
19	0.93, s	0.93, s	27.17	26.5
20	0.93, s	0.93, s	27.07	26.9
21	1.44, d, $J=6.3$ Hz	1.44, d, $J=6.3$ Hz	19.31	18.9
22	1.14, d, $J=6.9$ Hz	1.17, d, $J=7.0$ Hz	13.21	15.0

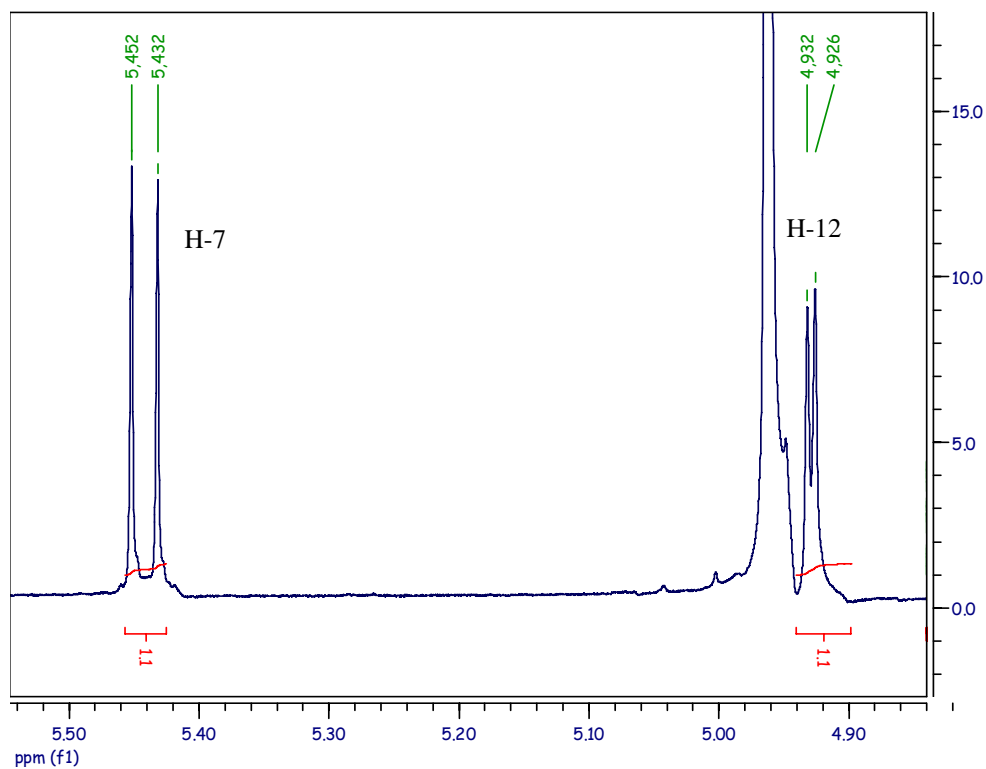
[Tableau 28](#) : Attribution des signaux ^1H et ^{13}C de **2** et comparaison à la littérature¹



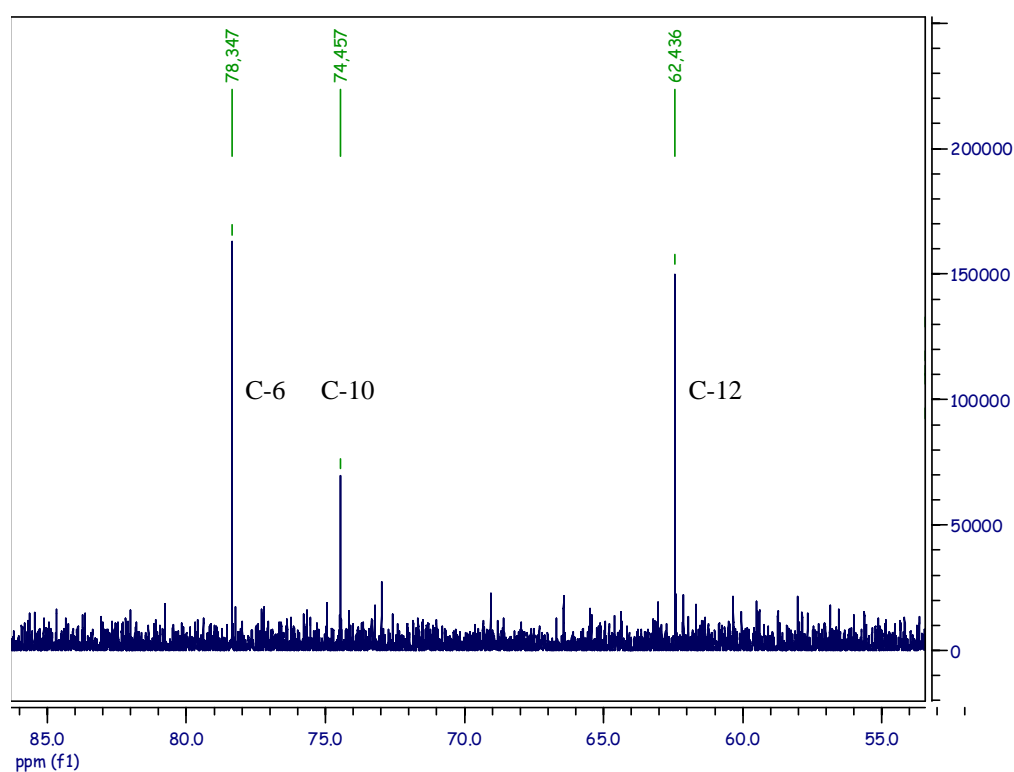
Spectre 48 : RMN ^1H de l'inophyllum P (**2**) entre 1,6 et 1,9 ppm



Spectre 49 : RMN ^1H de l'inophyllum P (**2**) entre 4,1 et 4,4 ppm

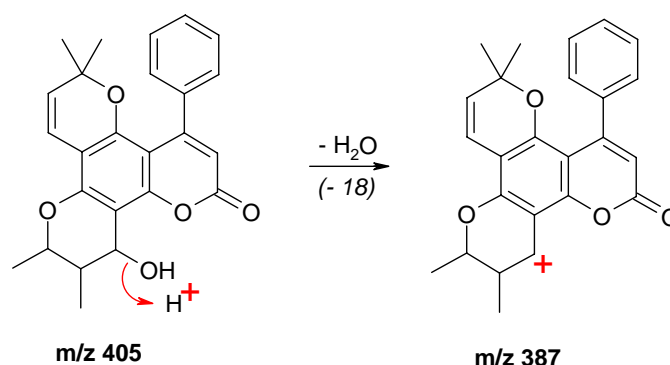


Spectre 50 : RMN ^1H de l'inophyllum P (**2**) entre 4,8 et 5,6 ppm



Spectre 51 : RMN ^{13}C de l'inophyllum P (**2**) entre 55 et 85 ppm

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une autre méthode spectrale. Ces analyses ont été effectuées par couplage CLHP-ESI-SM-SM, en mode positif. Un échantillon contenant entre autres coumarines de l'inophyllum P (échantillon brut) est chromatographié en CLHP sur une colonne de silice, et le flux sortant du détecteur UV-DAD est envoyé à la source électrospray, où les molécules sont ionisées par la méthode du « sheath liquid interface » décrite précédemment. L'ion pseudo-moléculaire formé est $[M+H]^+$, le rapport m/z pour l'inophyllum B vaut 405. Cet ion est sélectionné par le premier quadripôle, puis fragmenté. La fragmentation majeure consiste en la perte d'une molécule d'eau (-18) pour former un ion m/z 387. Cet ion est sélectionné par le second quadripôle, et le signal ainsi enregistré permet d'obtenir un chromatogramme spécifique de la fragmentation m/z 405 \rightarrow m/z 387.



(Cf. [Figure 57](#) pour le chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM spécifique (405 \rightarrow 387) qui montre deux pics principaux correspondant aux inophyllum B et P)

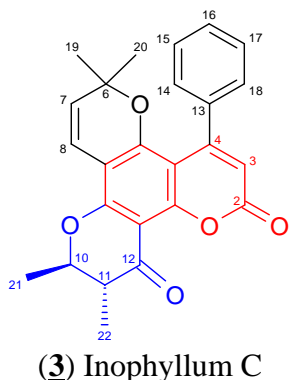
Le temps de rétention du premier pic correspond au temps de rétention de l'inophyllum B (**1**), nous l'avons déjà vu. Le temps de rétention du second pic correspond bien quant à lui au temps de rétention de l'inophyllum P (**2**) isolé et identifié en RMN. De plus, le spectre UV enregistré à ce temps de rétention par le détecteur UV-DAD correspond bien au spectre UV de l'inophyllum P (**2**). La fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ m/z 405 est la même que celle observée pour l'inophyllum B (**1**). (Cf. § précédent)

L'inophyllum P (**2**) est une coumarine qui a été isolée pour la première fois à partir d'extraits de feuilles de *Calophyllum inophyllum* par Patil en 1993¹.

Toutes ces informations nous permettent d'attribuer la structure de l'inophyllum P (**2**) à la molécule analysée, confirmant ainsi la présence de l'inophyllum P (**2**) dans le Tamanu polynésien.

a)5. L'inophyllum C (3)

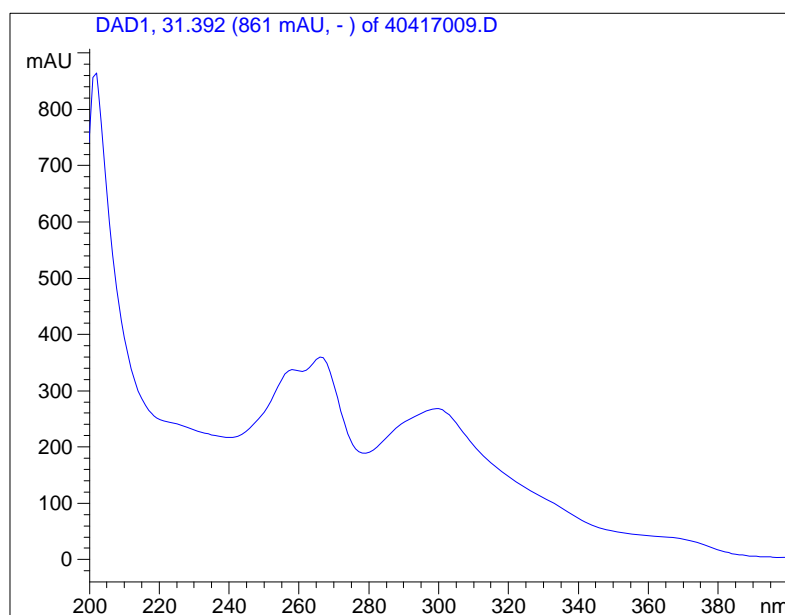
L'inophyllum C (3) est une 4-phényl-coumarine possédant un cycle chromanone et un cycle diméthyl-chromène.



Nous avons obtenu l'inophyllum C (3) par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où l'inophyllum C a été identifié : FL3, FL6 (mélange avec l'inophyllum P), FL44, FL55, FL67, FL68, FL267 et FL281)

Sa formule brute est $C_{25}H_{22}O_5$, et sa masse molaire est de $402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($m/z [M+H]^+ = 403$ déterminé par spectrométrie de masse ESI-SM/SM, Cf. [p. 225](#)).

Le spectre Ultra-Violet a d'abord été enregistré grâce au détecteur UV-DAD du système de CLHP analytique. Les maxima caractéristiques du spectre UV de l'inophyllum C sont observés aux longueurs d'onde $\lambda = 300 \text{ nm}$, $\lambda = 268 \text{ nm}$ et à $\lambda = 258 \text{ nm}$.



Spectre 52 : Ultra-Violet de l'inophyllum C (3)

Le spectre du carbone ^{13}C n'a pas été enregistré pour les fractions contenant de l'inophyllum C ; en effet, le seul spectre du proton ^1H nous permet, par comparaison aux spectres des autres coumarines déjà identifiées, d'attribuer avec certitude les signaux obtenus aux différents protons de la molécule.

Le spectre du proton ^1H nous montre ainsi la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,42$ ppm, 3H et $\delta_{\text{H}}=7,28$ ppm, 2H), qui pourraient être portés par les carbones C-14 à C-18. Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont deux portés par des carbones quaternaires sont sous forme de singulets, ($\delta_{\text{H}}=0,95$ ppm et $\delta_{\text{H}}=0,99$ ppm) les deux autres étant portés par des carbones tertiaires (CH) étant sous forme de doublets ($\delta_{\text{H}}=1,20$ ppm, $J=6,9$ Hz et $\delta_{\text{H}}=1,55$ ppm, $J=6,3$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=6,00$ ppm ; deux doublets à $\delta_{\text{H}}=5,54$ ppm ($J=10,1$ Hz), et $\delta_{\text{H}}=6,57$ ppm ($J=10,1$ Hz) ; un doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=4,41$ ppm ($J=11,2$ et $6,3$ Hz) ; et enfin un doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=2,64$ ppm ($J=11,2$ et $6,9$ Hz). On peut donc déjà émettre les hypothèses suivantes : les doublets à 5,54 ppm et 6,57 ppm sont couplés avec une constante de 10.1 Hz ; les signaux à 1,20 ppm et 2,64 ppm sont couplés avec une constante de 6,9 Hz ; les signaux à 1,55 ppm et 4,41 ppm sont couplés avec une constante de 6,3 Hz ; les signaux à 2,64 ppm et 4,41 ppm sont couplés avec une constante de 11,2 Hz. On note également l'absence du doublet sortant aux alentours de 4,8 ppm pour les coumarines de type chromanol tels les inophyllums B et P, ce qui tend à prouver que nous sommes cette fois en présence d'un cycle chromanone. (Cf. [Tableau 29](#) et [Spectres 53 à 55](#))

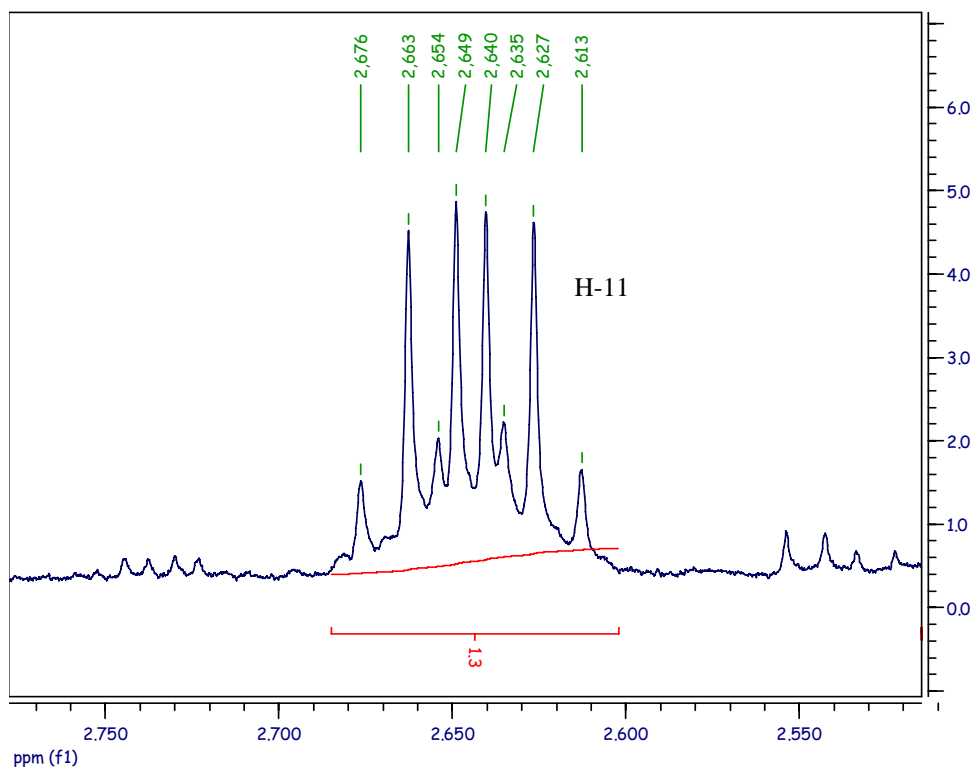
Ces attributions nous permettent de dire qu'une des fractions (FL6) contient un mélange d'inophyllum P (**2**) et d'inophyllum C (**3**). Les intégrations en proton des différents signaux nous montrent que l'inophyllum C (**3**) représente 61 % de l'échantillon, et l'inophyllum P (**2**) 39 %. (par exemple, le signal du proton H-3 intègre pour 1,7 pour l'inophyllum C et pour 1,1 pour l'inophyllum P, Cf. [Spectre 56](#))

Le spectre RMN ^{13}C de cette fraction a quant à lui été enregistré. Nous y retrouvons les signaux dus à l'inophyllum P, attribués précédemment, ainsi que les signaux dus à l'inophyllum C, que nous pouvons donc facilement attribuer à leur tour. Cette attribution est confirmée par comparaison à la littérature, mais aussi grâce aux RMN 2D enregistrées en complément à partir de cette même fraction (FL6) : COSY, HMQC et HMBC.

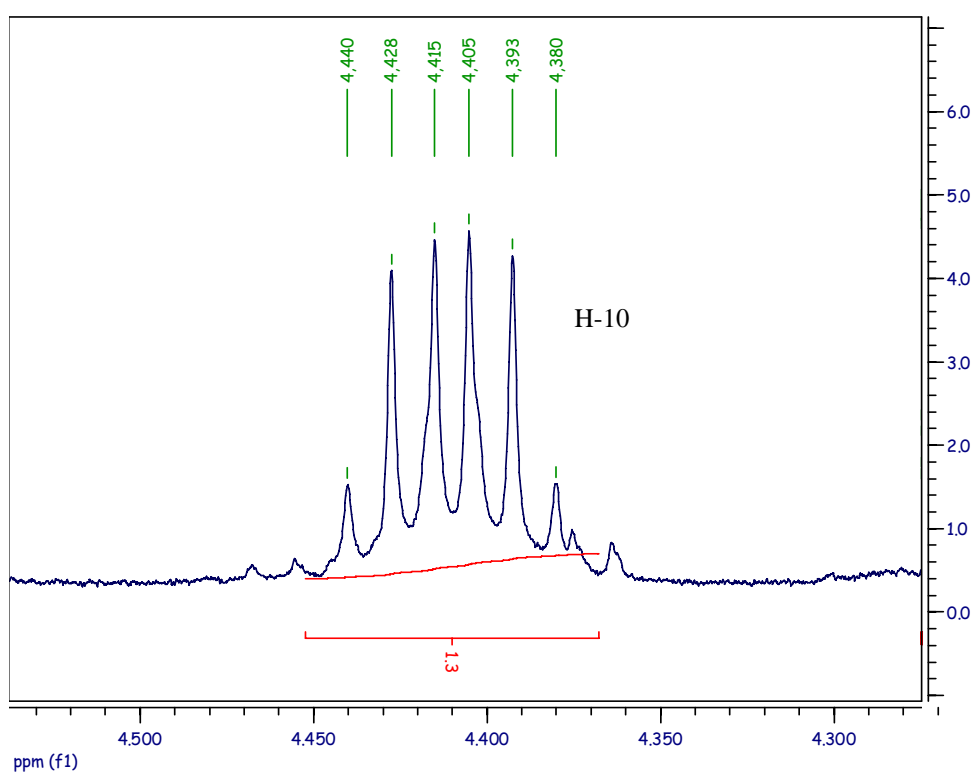
(Cf. [Tableau 29](#) et [Spectres 57 à 59](#))

Position n°	Inophyllum C (3)			
	^1H (δ , ppm)	^1H Littérature (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)	^{13}C Littérature (δ , ppm)
2	—	—	162.67	159.6
3	6.00, s	6.04, s	113.91	113.5
4	—	—	161.32	159.4
4a	—	—	104.00	103.4
4b	—	—	158.49	155.6
6	—	—	80.19	78.6
7	5.54, d, $J=10.1$ Hz	5.42, d, $J=10.0$ Hz	128.64	127.2
8	6.57, d, $J=10.1$ Hz	6.56, d, $J=10.0$ Hz	115.99	115.2
8a	—	—	105.09	105.4
8b	—	—	157.42	155.1
10	4.41, dq, $J=11.2, 6.3$ Hz	4.32, dq, $J=6.6, 11.5$ Hz	81.05	79.7
11	2.64, dq, $J=11.2, 6.9$ Hz	2.59, dq, $J=7.2, 11.5$ Hz	48.41	47.3
12	—	—	192.40	190.0
12a	—	—	104.34	103.9
12b	—	—	157.18	154.9
13	—	—	141.34	139.9
14, 18	7.28, m	7.3, m	128.97	127.5
15, 17	7.42, m	7.3, m	128.97	127.5
16	7.42, m	7.3, m	129.12	127.7
19	0.99, s	0.98, s	27.47	27.2
20	0.95, s	0.95, s	27.72	27.4
21	1.55, d, $J=6.3$ Hz	1.56, d, $J=6.6$ Hz	19.83	19.6
22	1.20, d, $J=6.9$ Hz	1.24, d, $J=7.2$ Hz	10.68	10.6

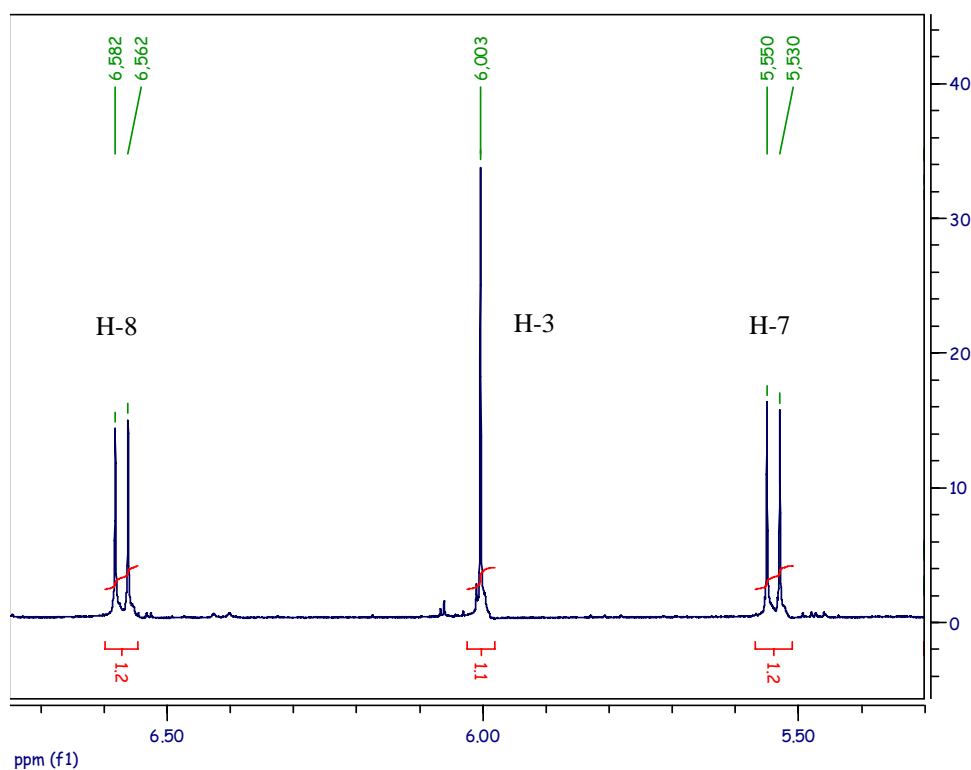
[Tableau 29](#) : Comparaison des signaux ^1H et ^{13}C de **3** à la littérature^{1,2}



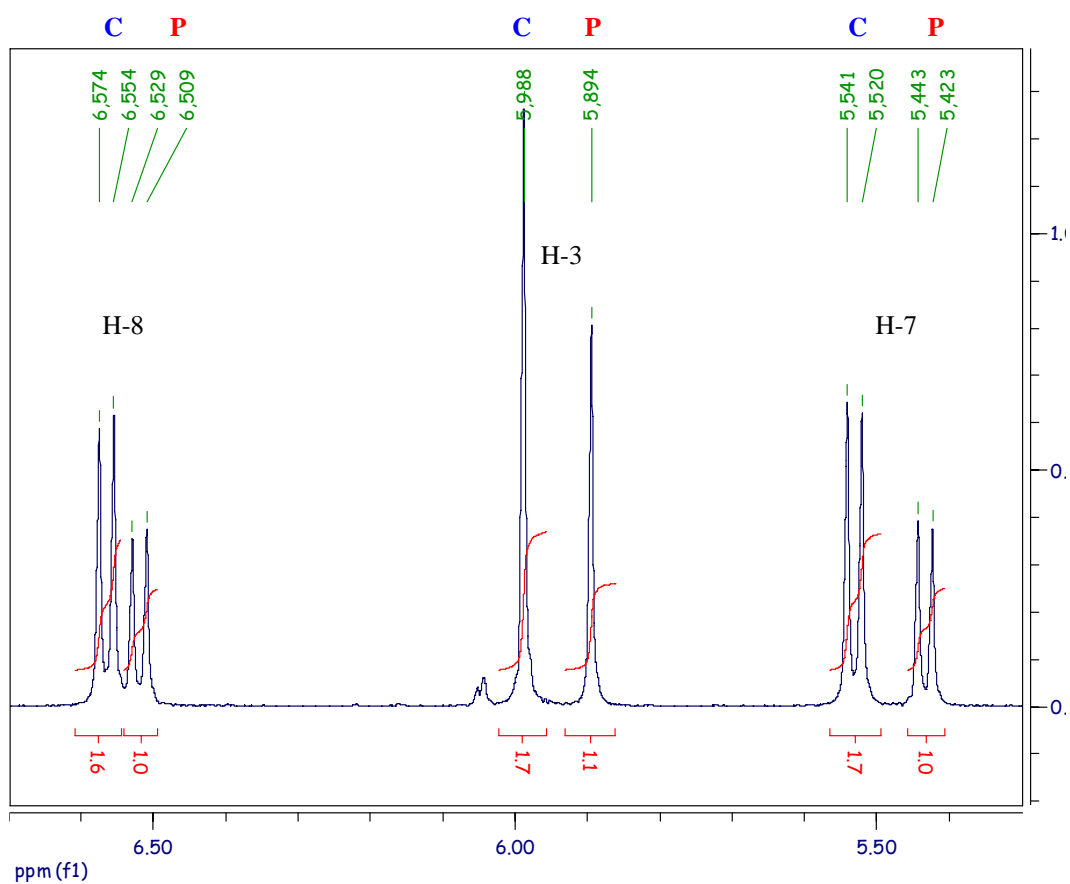
Spectre 53 : RMN ^1H de l'inophyllum C (**3**) entre 2,5 et 2,8 ppm



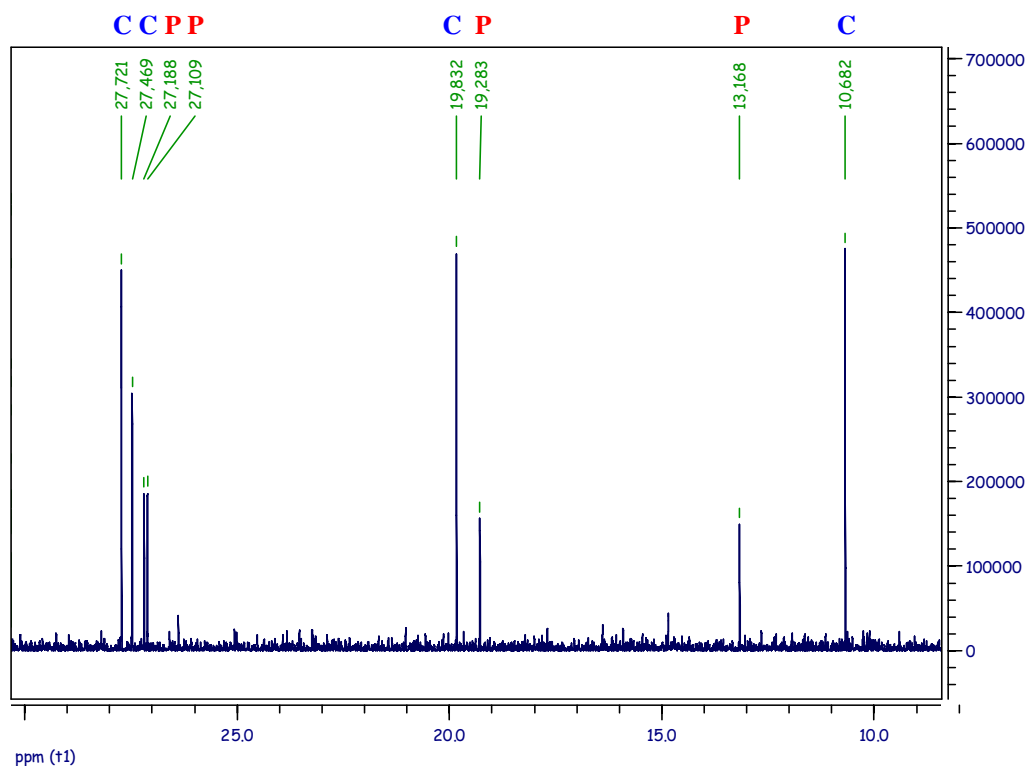
Spectre 54 : RMN ^1H de l'inophyllum C (**3**) entre 4,3 et 4,5 ppm



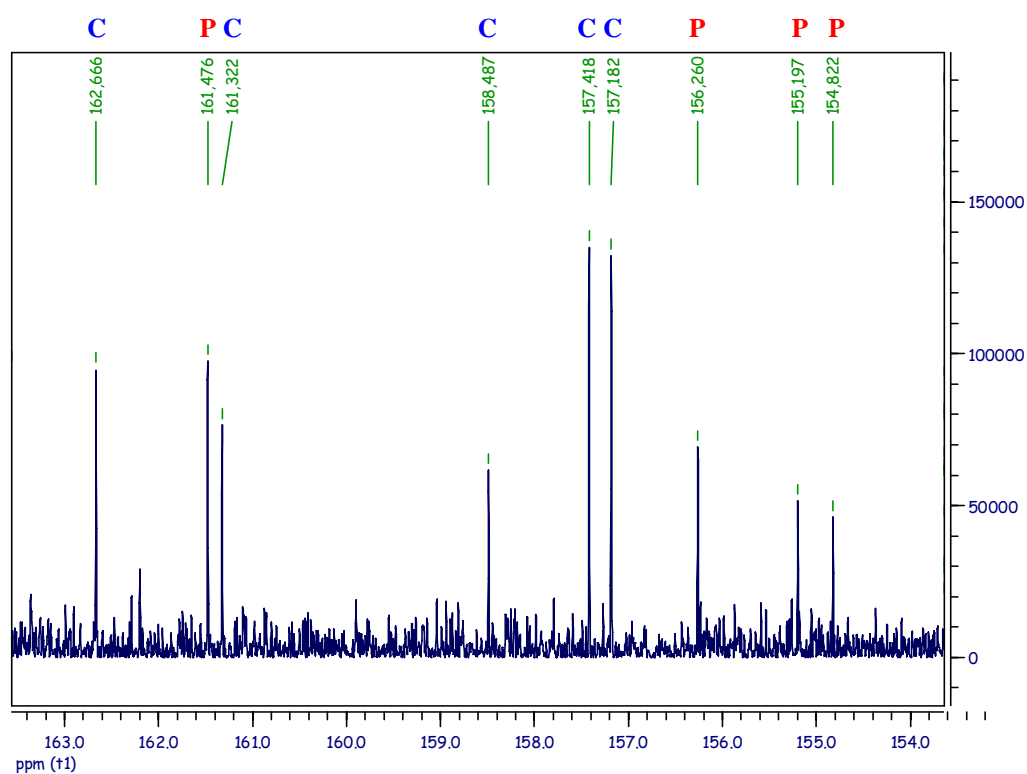
Spectre 55 : RMN ^1H de l'inophyllum C (**3**) entre 5,4 et 6,7 ppm



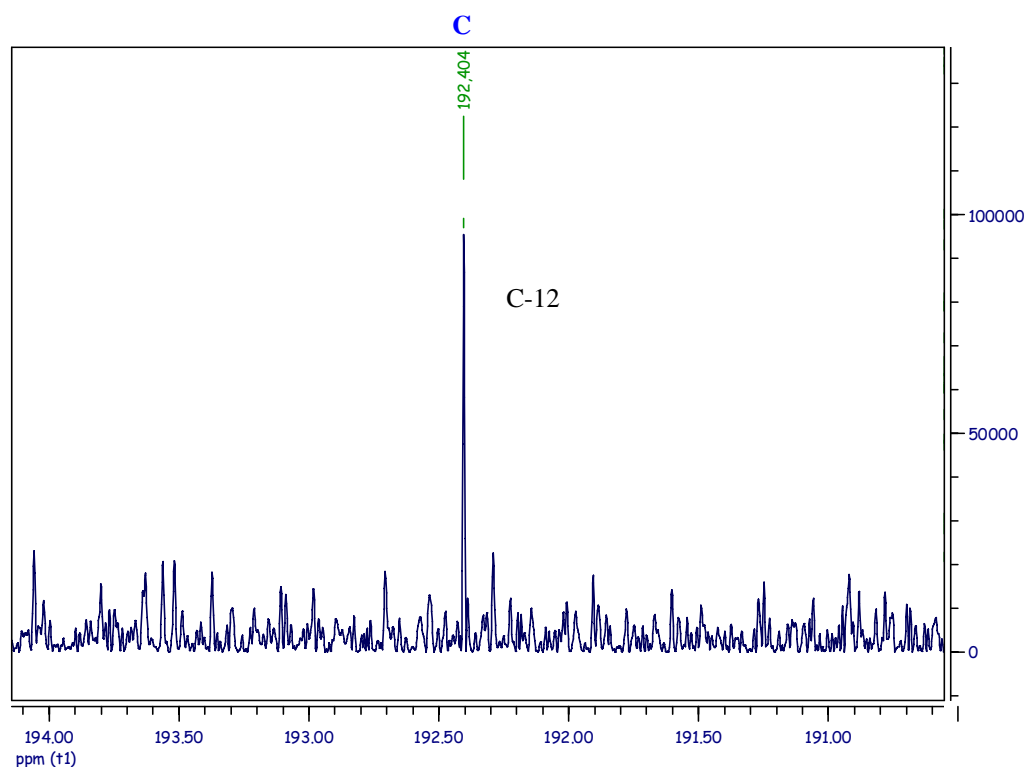
Spectre 56 : RMN ^1H d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 5 et 7 ppm



Spectre 57 : RMN ^{13}C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 10 et 30 ppm

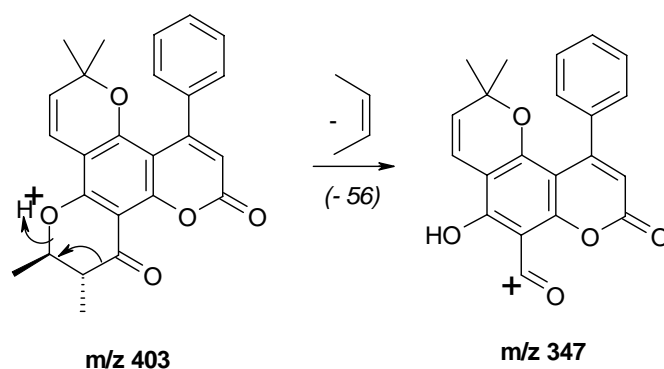


Spectre 58 : RMN ^{13}C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 154 et 164 ppm



Spectre 59 : RMN ^{13}C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 191 et 194 ppm

Des investigations ont également été menées en spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) afin de confirmer la structure par une autre méthode spectrale. Ces analyses ont été effectuées par couplage CLHP-ESI-SM-SM, en mode positif. Un échantillon contenant entre autres coumarines de l'inophyllum C (échantillon brut) est chromatographié en CLHP sur une colonne de silice, et le flux sortant du détecteur UV-DAD est envoyé à la source électrospray, où les molécules sont ionisées par la méthode du « sheath liquid interface » décrite précédemment. L'ion pseudo-moléculaire formé est $[\text{M}+\text{H}]^+$, le rapport m/z pour l'inophyllum C (**3**) vaut 403. Cet ion est sélectionné par le premier quadripôle, puis fragmenté. La fragmentation majeure consiste en la perte d'une molécule de but-2-ène (-56) pour former un ion m/z 347. Cet ion est sélectionné par le second quadripôle, et le signal ainsi enregistré permet d'obtenir un chromatogramme spécifique de la fragmentation m/z 403 \rightarrow m/z 347.



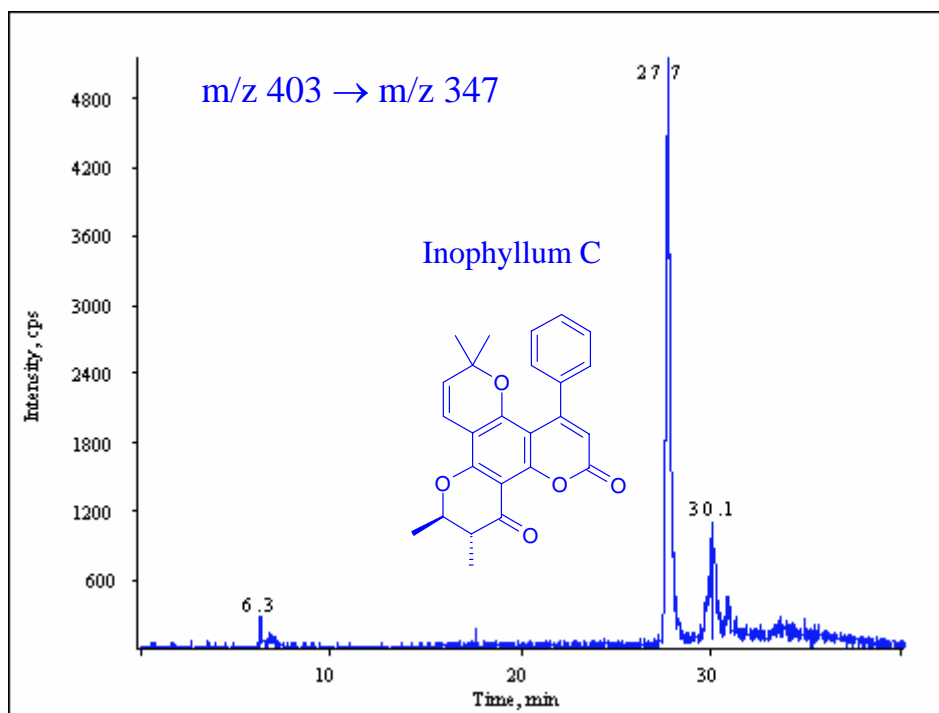
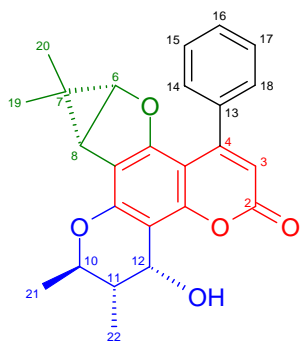
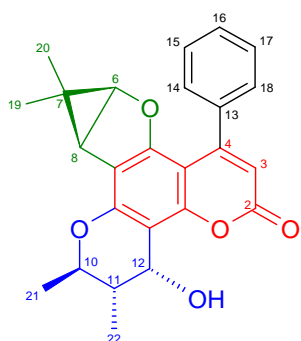


Figure 59 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (403→347)

Le temps de rétention du premier pic correspond bien au temps de rétention de l'inophyllum C isolé et identifié en RMN. De plus, le spectre UV enregistré à ce temps de rétention par le détecteur UV-DAD correspond bien au spectre UV de l'inophyllum C (**3**). Le second pic peut correspondre à une autre molécule de structure très voisine, par exemple l'inophyllum E (**20**).

L'inophyllum C (**3**) est une coumarine qui a été isolée pour la première fois par Polonsky en 1956 à partir des amandes du *Calophyllum inophyllum*⁵. Il a ensuite été isolé à partir des feuilles du *C. inophyllum*, notamment par Patil en 1993¹.

Toutes ces informations nous permettent d'attribuer la structure de l'inophyllum C (**3**) à la molécule analysée, confirmant ainsi la présence de l'inophyllum C (**3**) dans le Tamanu polynésien.

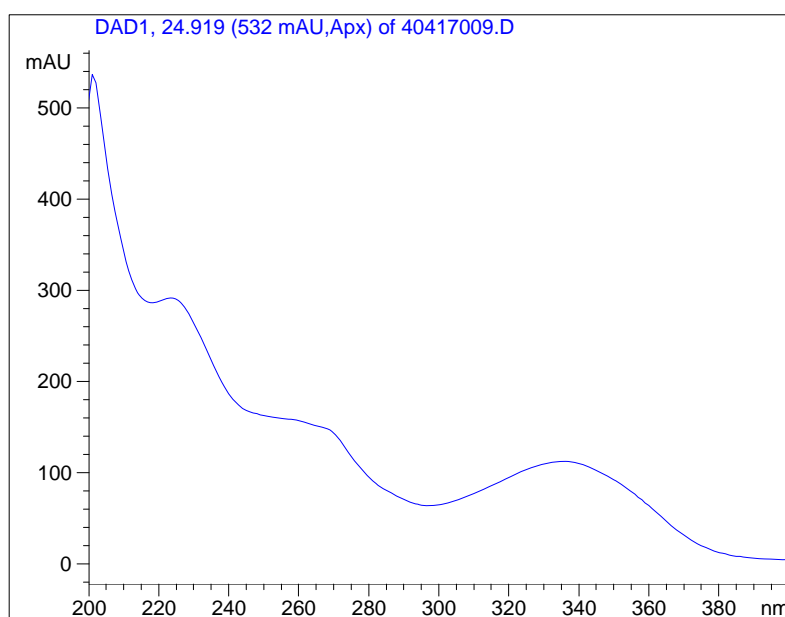
b) Nouvelles coumarines : l'inophyllum F1 (90) et l'inophyllum F2 (91)**(90)** Inophyllum F1 (6 α , 8 α)**(91)** Inophyllum F2 (6 β , 8 β)

L'inophyllum F1 (**90**) et l'inophyllum F2 (**91**) sont des molécules dont la structure n'avait jamais été décrite jusqu'à présent. Elle ont la même structure que les inophyllum G1 (**33**) et inophyllum G2 (**34**) décrits par Patil en 1993, mais avec une configuration absolue différente au niveau du cycle chromanol [(10*R*, 11*S*, 12*R*) au lieu de (10*R*, 11*R*, 12*S*)].

Nous avons obtenu les inophyllums F1 et F2 par une succession de séparations chromatographiques, comme indiqué dans le [Tableau 9](#). (fractions où les inophyllums F1 et F2 ont été identifiés : FL45, FL69, FL78, FL80, FL86, FL241, FL250)

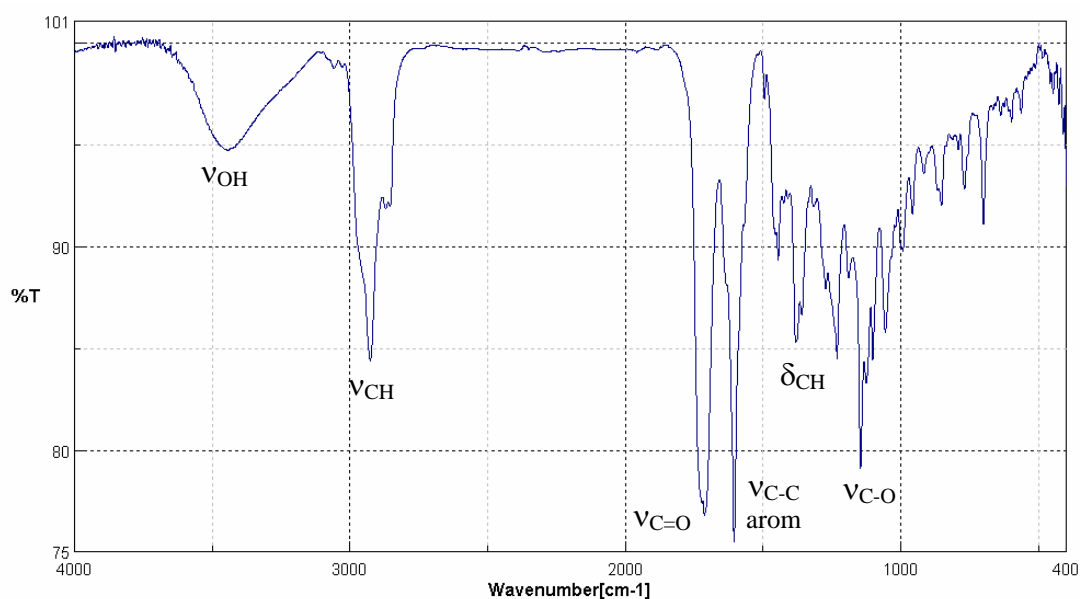
Leur formule brute est C₂₅H₂₄O₅, et leur masse molaire est 404 g.mol⁻¹ (m/z [M+H]⁺ = 405 et m/z [M+NH₄]⁺ = 422 déterminés par spectrométrie de masse ESI-SM, Cf. [p. 234](#))

Le spectre UV a d'abord été enregistré grâce au détecteur UV-DAD du système de CLHP analytique. Les maxima caractéristiques du spectre UV des inophyllums F1 et F2 sont observés aux longueurs d'onde $\lambda = 335$ nm et à $\lambda = 270$ nm (le maximum à $\lambda = 225$ nm n'est pas significatif à cause des perturbations dues au solvant dans les longueurs d'onde courtes)

**Spectre 60** : Ultra-Violet des inophyllums F1 (**90**) et F2 (**91**)

Le spectre Infra-Rouge de la molécule nous donne une première série d'informations concernant sa structure. Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence d'un squelette carboné comportant des groupes CH et CH₃, d'un cycle carboné aromatique, d'un groupe carbonyle C=O, et d'une fonction alcool C-OH. Ces bandes d'absorption sont les suivantes :

3444 cm⁻¹ : Elongation des liaisons O-H de la fonction alcool ; 2926 et 2871 cm⁻¹ : Elongation des liaisons C-H ; 1713 cm⁻¹ : Elongation de la liaison C=O ; 1605 cm⁻¹ : Elongation des liaisons C-C aromatiques ; 1445 et 1381 cm⁻¹ : Déformation des liaisons C-H symétriques et asymétriques ; 1231 et 1057 cm⁻¹ : Elongation des liaisons C-O des fonctions alcool et éther ; 1146 cm⁻¹ : Elongation et déformation de l'enchaînement C-C-C du groupe carbonyle (C=O sur le carbone central).



Spectre 61 : Infra-Rouge des inophyllums F1 (**90**) et F2 (**91**)

Les inophyllums F1 et F2 sont deux composés diastéréoisomères qui ne peuvent pas être différenciés en spectrométrie de masse. En RMN, on arrive à les différencier, mais la séquence NOESY de couplage spatial des protons ne nous permet pas de déterminer l'orientation du groupement diméthyl-cyclopropane par rapport au reste de la structure : on est incapable d'attribuer l'une des deux structures à un spectre, et réciproquement. Nous nous contenterons donc ici de donner les déterminations structurales pour l'une des deux structures, par exemple pour F2 (structure attribuée arbitrairement à l'un des deux spectres RMN obtenus).

Le spectre RMN du carbone ¹³C n'a pas été enregistré directement car la masse de l'échantillon isolé est trop faible. Les valeurs des déplacements chimiques du carbone ¹³C ont cependant pu être déterminés en « reverse » grâce à la 2D de couplage proton-carbone (HMOC et HMBC), le spectre étant acquis en proton.

On distingue ainsi la présence dans la molécule de 25 carbones. Nombreux sont ceux qui sont fortement déblindés ce qui tend à prouver que nous sommes en présence de carbonyles (pour le carbone C-2, δ_C=163,0 ppm) ou de carbones aromatiques (pour les carbones C-3, C-4, C-4a, C-4b, C-8a, C-8b, C-12a, C-12b, et C-13 à C-18 ; δ_C compris entre 99,8 ppm et 159,6 ppm). (Cf. [Tableau 30](#))

Le spectre du proton ^1H nous montre quant à lui la présence de 5 protons aromatiques ($\delta_{\text{H}}=7,40$ ppm, 3H et $\delta_{\text{H}}=7,34$ ppm, 2H), qui pourraient être portés par les carbones C-14 à C-18. Par ailleurs on voit nettement apparaître quatre signaux correspondant à des groupements méthyle, dont deux portés par des carbones quaternaires sont sous forme de singulets, ($\delta_{\text{H}}=0,68$ ppm et $\delta_{\text{H}}=1,03$ ppm) les deux autres portés par des carbones acétyléniques étant sous forme de doublets ($\delta_{\text{H}}=1,15$ ppm, $J=6,8$ Hz et $\delta_{\text{H}}=1,45$ ppm, $J=6,2$ Hz). Les autres signaux caractéristiques en proton ^1H sont : un singulet à $\delta_{\text{H}}=5,97$ ppm ; trois doublets à $\delta_{\text{H}}=2,48$ ppm, à $\delta_{\text{H}}=4,26$ ppm, et $\delta_{\text{H}}=4,94$ ppm ; un doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=4,26$ ppm ; et enfin un doublet de doublet de quadruplet à $\delta_{\text{H}}=1,76$ ppm. On peut donc déjà émettre les hypothèses suivantes : les doublets à 4,26 ppm et 2,48 ppm sont couplés avec une constante de 5,7 Hz ; les signaux à 4,26 ppm et 1,76 ppm sont couplés avec une constante de 10,8 Hz ; les signaux à 4,26 ppm et 1,45 ppm sont couplés avec une constante de 6,2 Hz ; les signaux à 1,76 ppm et 1,15 ppm sont couplés avec une constante de 6,8 Hz ; les signaux à 1,76 ppm et 4,94 ppm sont couplés avec une constante de 3,0 Hz. (Cf. [Tableau 30](#))

Le spectre 2D de couplage proton / proton COSY nous permet de confirmer les hypothèses posées à la vue du simple spectre du proton ^1H :

- Tout d'abord, les protons H-3, H-19 et H-20 ne sont pas couplés avec d'autres protons : les carbones voisins de celui qui porte ces protons sont quaternaires.
- Le proton H-6 est couplé au proton H-8, avec une constante de couplage valant 5,7 Hz.
- Le proton H-8 est couplé au proton H-6, avec une constante de couplage valant 5,7 Hz.
- Le proton H-10 est couplé à deux types de protons : le proton H-11 et les protons H-21, avec comme constantes de couplage 10,8 et 6,2 Hz.
- Le proton H-11 est couplé à trois types de protons : le proton H-10, le proton H-12, et les protons H-22, avec comme constantes de couplage 10,8 , 3,0 et 6,8 Hz.
- Le proton H-12 est couplé au proton H-11 avec une constante de couplage valant 3,0 Hz.
- Les protons H-21 sont couplés au proton H-10 avec une constante de couplage valant 6,2 Hz.
- Les protons H-22 sont couplés au proton H-11 avec une constante de couplage valant 6,8 Hz.

Le spectre 2D HMQC de couplage direct entre protons et carbones nous permet de connaître les signaux obtenus en RMN ^1H qui correspondent aux signaux obtenus en RMN ^{13}C .

Le spectre 2D HMBC de couplage indirect entre protons et carbones nous permet d'achever la détermination structurale : en partant des carbones C-2, C-6 et C-12, on peut de proche en proche reconstituer les structures des trois parties de la molécule concernées. Les couplages COSY, HMQC et HMBC sont présentés dans le [Tableau 30](#) ci-après. (Cf. [Spectres 62 à 67](#))

Enfin, une comparaison des déplacements chimiques et des couplages obtenus à ceux décrits dans la littérature concernant les inophyllum G1 et G2 permet de valider la structure déduite des analyses RMN effectuées. De plus, la comparaison des constantes de couplages des hydrogènes portés par le cycle chromanol des inophyllums F1 et F2 aux constantes de couplages des protons correspondant de l'inophyllum P permet de donner la configuration absolue de ce cycle chromanol : (10R, 11S, 12R). (Cf. [Tableau 31](#))

Toutes ces informations nous permettent d'attribuer la structure de l'inophyllum F2 ([91](#)) à la molécule analysée.

Position n°	¹³ C (ppm)	Type de carbone	HMQC*	COSY#	HMBC ^S
2	163.0	COOH	—	—	H-3
3	111.9	-CH=	5.97, s	—	—
4	156.9	-C=	—	—	H-3, H-14, H-18
4a	99.8	-C=	—	—	H-3
4b	159.6	-C=	—	—	H-6, H-8
6	74.0	-C-	4.26, d, J=5.7 Hz	H-8	H-8, H-19, H-20
7	13.6	-C-	—	—	H-6, H-8, H-19, H-20
8	30.6	-C-	2.48, d, J=5.7 Hz	H-6	H-6, H-19, H-20
8a	112.5	-C=	—	—	H-6, H-8
8b	156.3	-C=	—	—	H-8, H-10, H-12
10	74.2	-CH-	4.26, dq, J=10.8, 6.2 Hz	H-11, H-21	H-11, H-12, H-21, H-22
11	40.0	-CH-	1.76, ddq, J=10.8, 6.8, 3.0 Hz	H-10, H-12, H-22	H-10, H-12, H-21, H-22
12	62.7	-CH-OH	4.94, d, J=3.0 Hz	H-11	H-10, H-11, H-22
12a	107.7	-C=	—	—	H-11, H-12
12b	153.8	-C=	—	—	H-12
13	138.9	-C=	—	—	H-14, H-15, H-17, H-18
14, 18	128.8	-CH=	7.34, m	H-15, H-17	H-15, H-16, H-17
15, 17	130.0	-CH=	7.40, m	H-14, H-16, H-18	H-14, H-16, H-18
16	128.8	-CH=	7.40, m	H-15, H-17	H-14, H-15, H-17, H-18
19	22.6	-CH ₃	1.03, s	—	H-6, H-8, H-20
20	12.9	-CH ₃	0.68, s	—	H-6, H-8, H-19
21	19.4	-CH ₃	1.45, d, J=6.2 Hz	H-10	H-10, H-11
22	13.4	-CH ₃	1.15, d, J=6.8 Hz	H-11	H-10, H-11, H-12

(*) HMQC : Couplage direct avec ¹H (δ, ppm)

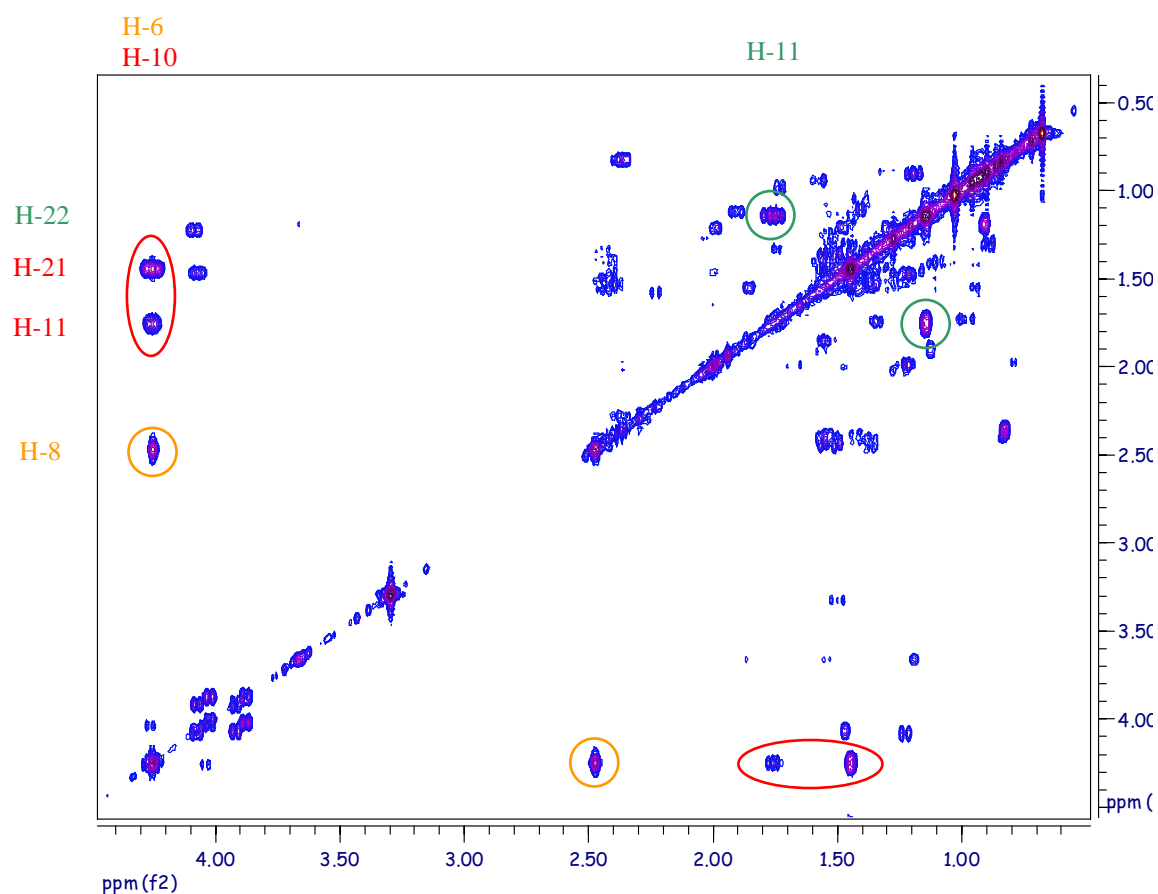
(#) COSY : Couplage ¹H / ¹H

(S) HMBC : Couplage indirect avec ¹H

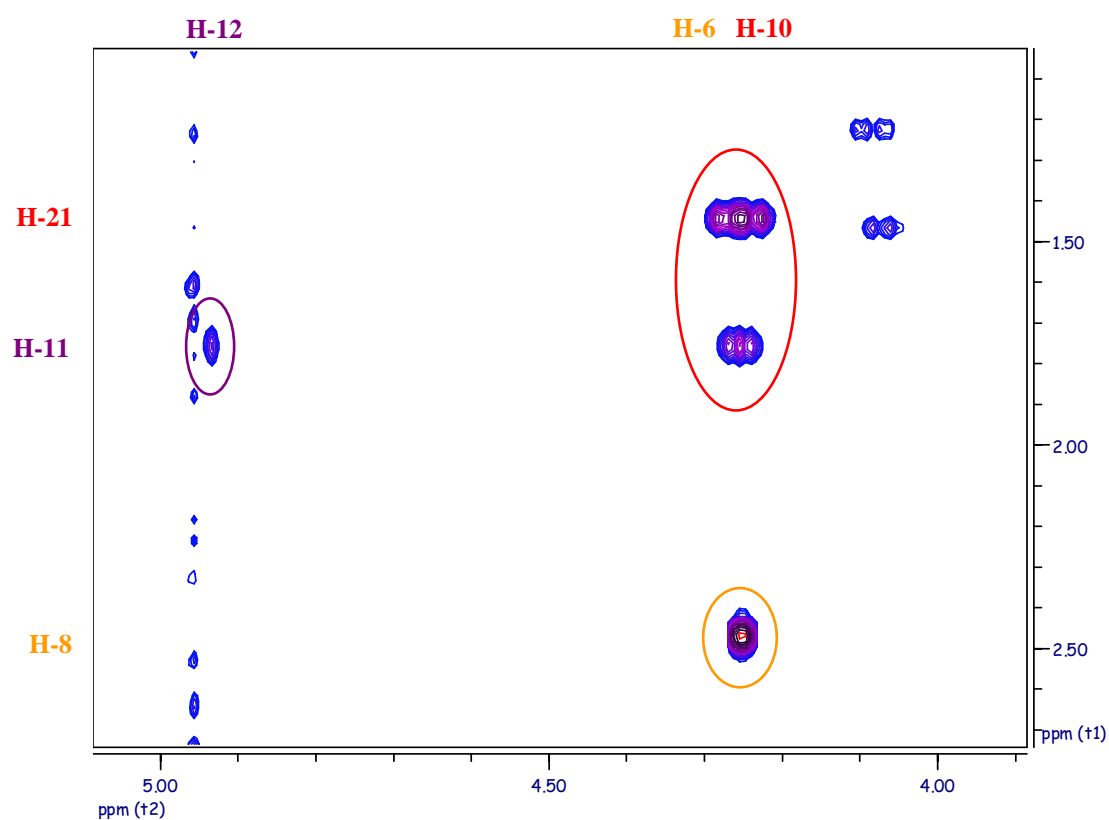
Tableau 30 : Attribution des signaux ¹H et ¹³C et couplages observés pour **91**

Position n°	Inophyllum F2 (91)		Inophyllum G2 (34)		Inophyllum P (2)
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H littérature (δ, ppm)	¹³ C litt (δ, ppm)	¹ H littérature (δ, ppm)
2	—	163.0	—	160.5	—
3	5.97, s	111.9	6.02, s	111.2	5.97, s
4	—	156.9	—	154.9	—
4a	—	99.8	—	98.9	—
4b	—	159.6	—	158.4	—
6	4.26, d, J=5.7 Hz	74.0	4.21, d, J=5.7 Hz	72.8	—
7	—	13.6	—	13.0	5.37, d, J=10.0 Hz
8	2.48, d, J=5.7 Hz	30.6	2.42, d, J=5.7 Hz	29.3	6.54, d, J=10.0 Hz
8a	—	112.5	—	111.9	—
8b	—	156.3	—	153.8	—
10	4.26, dq, J=6.2, 10.8 Hz	74.2	4.40, ddq, J=0.8, 3.3, 6.8 Hz	75.7	4.29, dq, J=6.3, 10.6 Hz
11	1.76, ddq, J=3.0, 6.8, 10.8 Hz	40.0	2.33, ddq, J=3.3, 5.3, 7.1 Hz	35.8	1.79, ddq, J=3.3, 7.0, 10.6 Hz
12	4.94, d, J=3.0 Hz	62.7	5.18, dd, J=5.3, 0.8 Hz	63.4	5.04, d, J=3.3 Hz
12a	—	107.7	—	106.0	—
12b	—	153.8	—	153.2	—
13	—	138.9	—	137.6	—
14, 18	7.34, m	128.8	7.32, m	127.7	7.30, m
15, 17	7.40, m	130.0	7.42, m	127.7	7.42, m
16	7.40, m	128.8	7.42, m	128.8	7.42, m
19	1.03, s	22.6	1.05, s	22.6	0.93, s
20	0.68, s	12.9	0.73, s	12.6	0.93, s
21	1.45, d, J=6.2 Hz	19.4	1.45, d, J=6.8 Hz	16.0	1.44, d, J=6.3 Hz
22	1.15, d, J=6.8 Hz	13.4	1.18, d, J=7.1 Hz	9.6	1.17, d, J=7.0 Hz

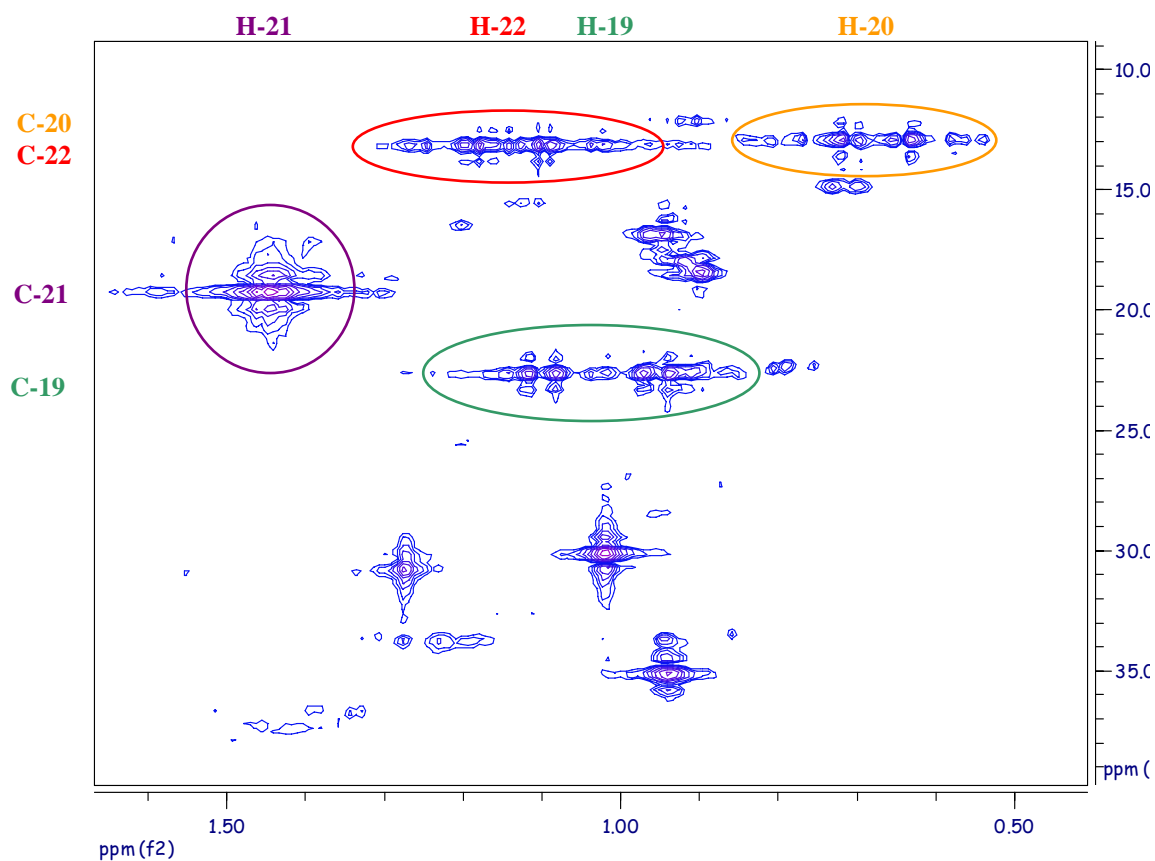
Tableau 31 : Comparaison des signaux ¹H et ¹³C de **91** aux signaux de **34** et **2**¹



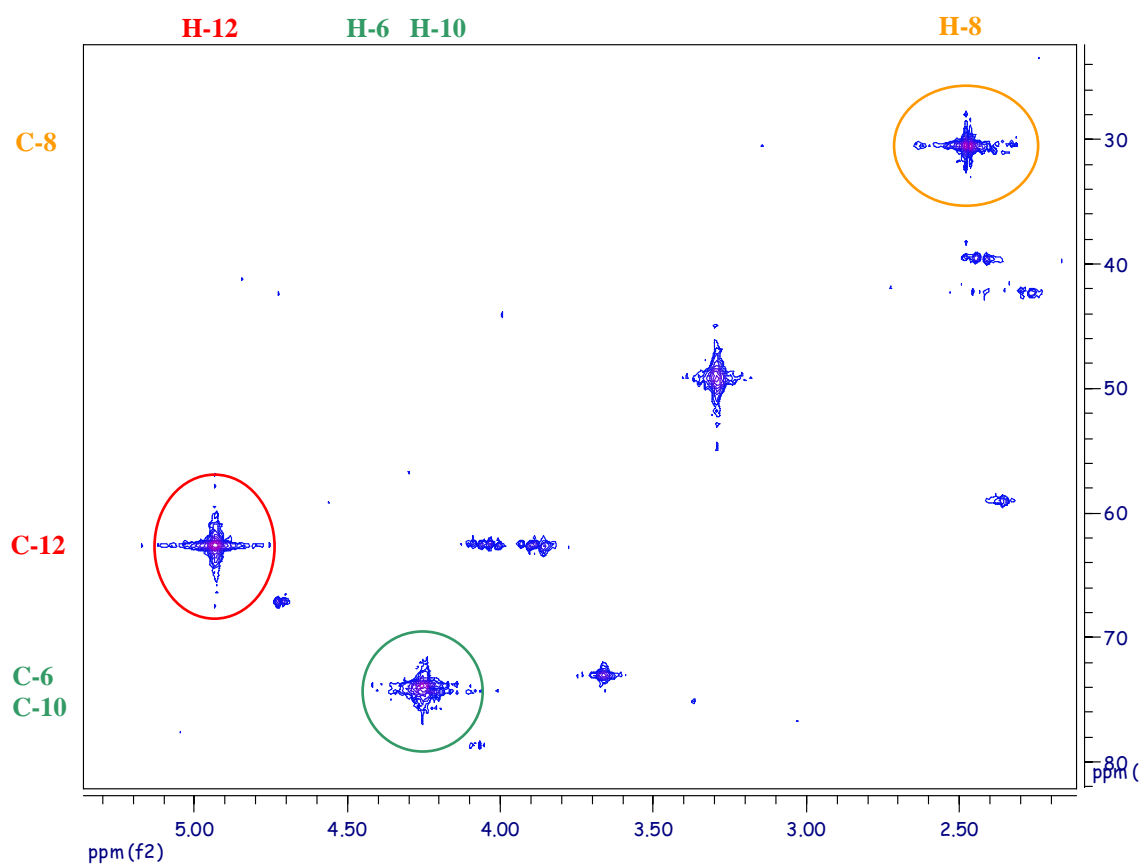
Spectre 62 : RMN 2D COSY de l'inophyllum F2 (**91**) entre 0,5 et 4,5 ppm



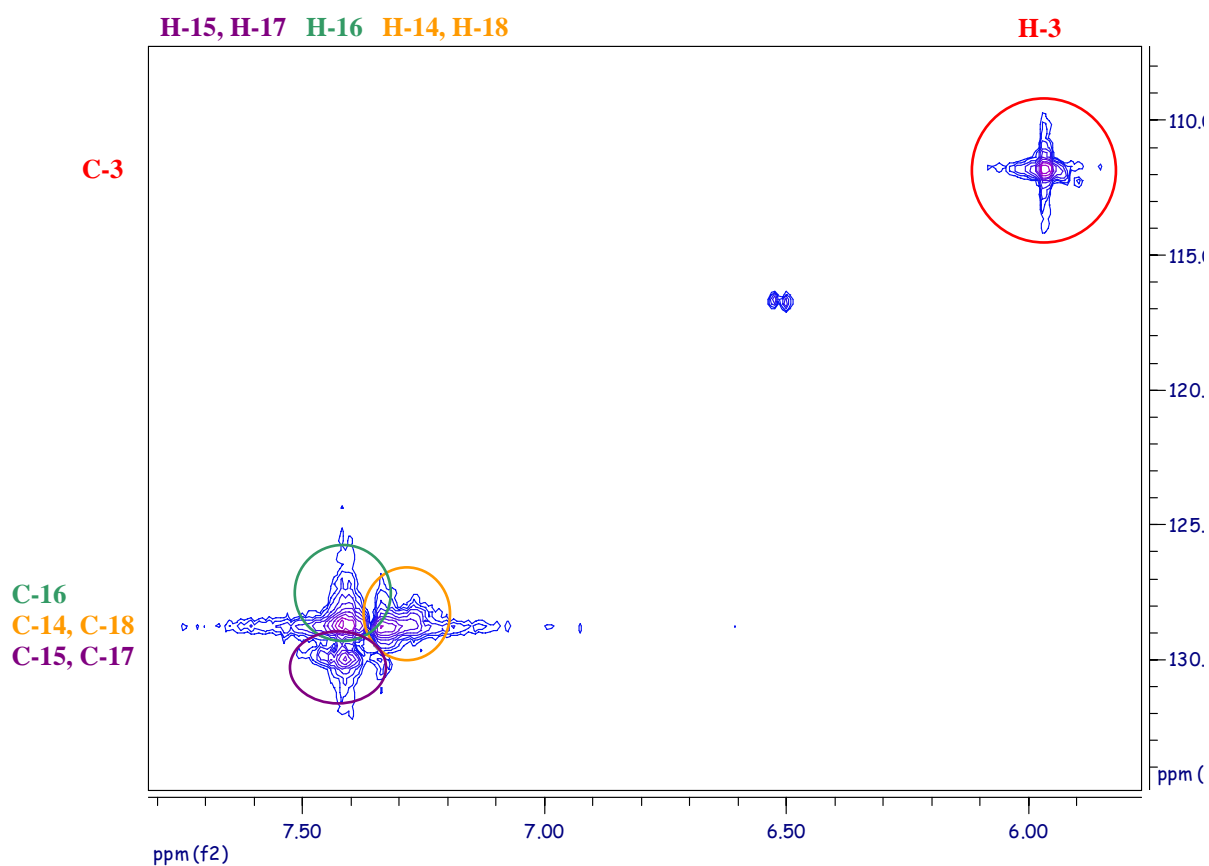
Spectre 63 : RMN 2D COSY de l'inophyllum F2 (**91**) : protons H-6, 10 et 12



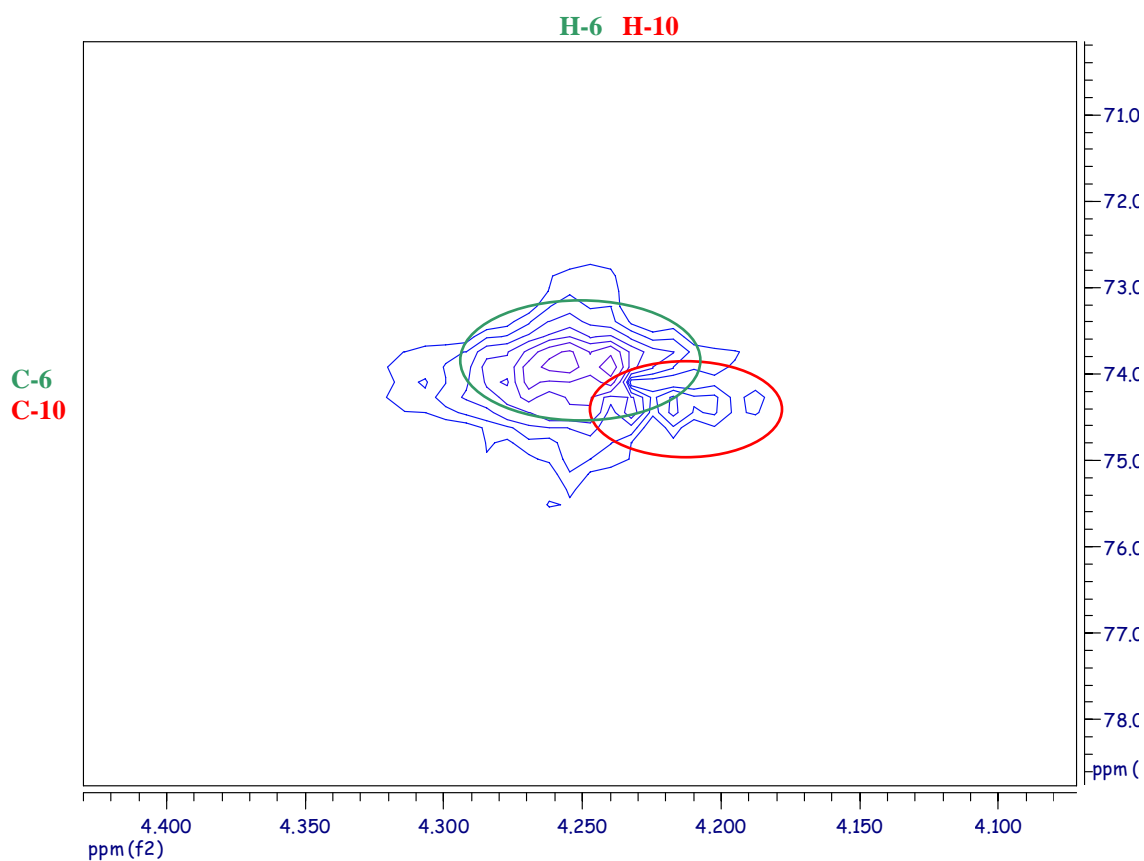
Spectre 64 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (**91**) : les 4 groupes méthyle



Spectre 65 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (**91**) : protons entre 2 et 5ppm



Spectre 66 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (**91**) : protons aromatiques



Spectre 67 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (**91**) : résolution des H-6/10

Pour confirmer la structure moléculaire déterminée par RMN ^1H , ^{13}C et 2D, nous procédons à des analyses approfondies en spectrométrie de masse en tandem avec ionisation électrospray (ESI-SM-SM). Nous obtenons ainsi la masse moléculaire du composé introduit, ainsi que sa fragmentation détaillée d'ordre 2 (les fragments d'ordre 1 sont sélectionnés puis fragmentés de nouveau).

- SM (ordre 1)

Le spectre de masse de l'échantillon, acquis en mode positif sur la gamme de m/z 380-480 ([Figure 60](#)), montre la présence d'ions caractéristiques pouvant être attribués au composé recherché :

- l'ion pseudo-moléculaire, $[\text{M}+\text{H}]^+$, à m/z 405
- l'adduit ammonium, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, à m/z 422
- l'adduit sodium, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, à m/z 427
- l'adduit potassium, $[\text{M}+\text{K}]^+$, à m/z 443
- l'adduit ammonium solvaté, $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{CH}_3\text{OH}]^+$, à m/z 454
- l'adduit sodium solvaté, $[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$, à m/z 459

Les ions Na^+ et K^+ permettant la formation des adduits sodium et potassium proviennent probablement de la verrerie de stockage des solvants.

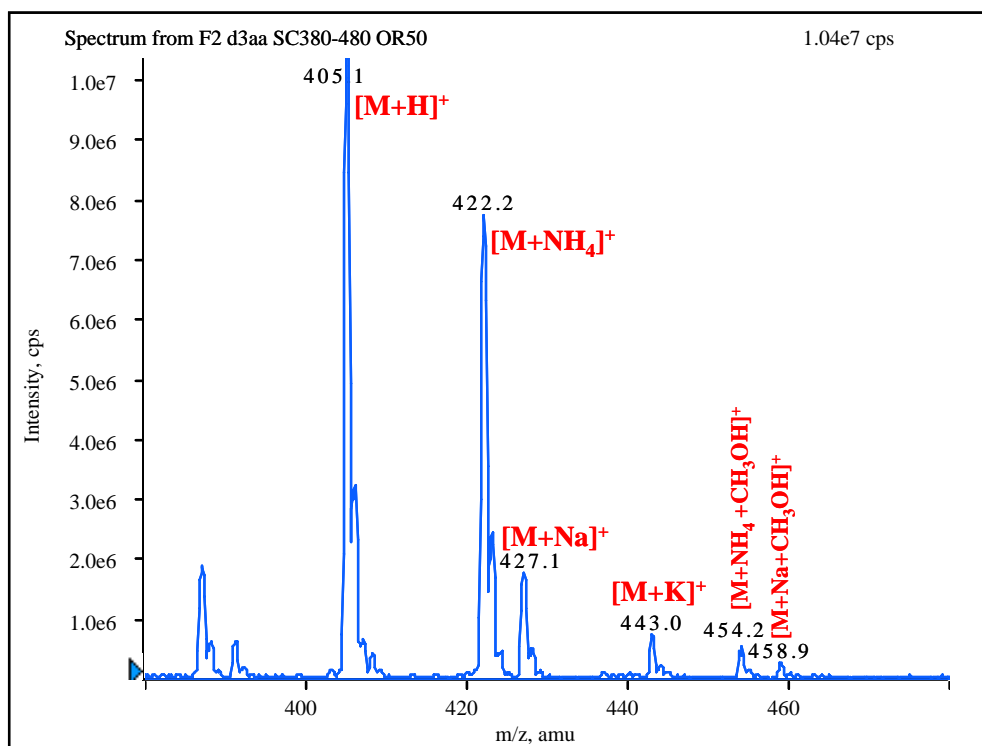
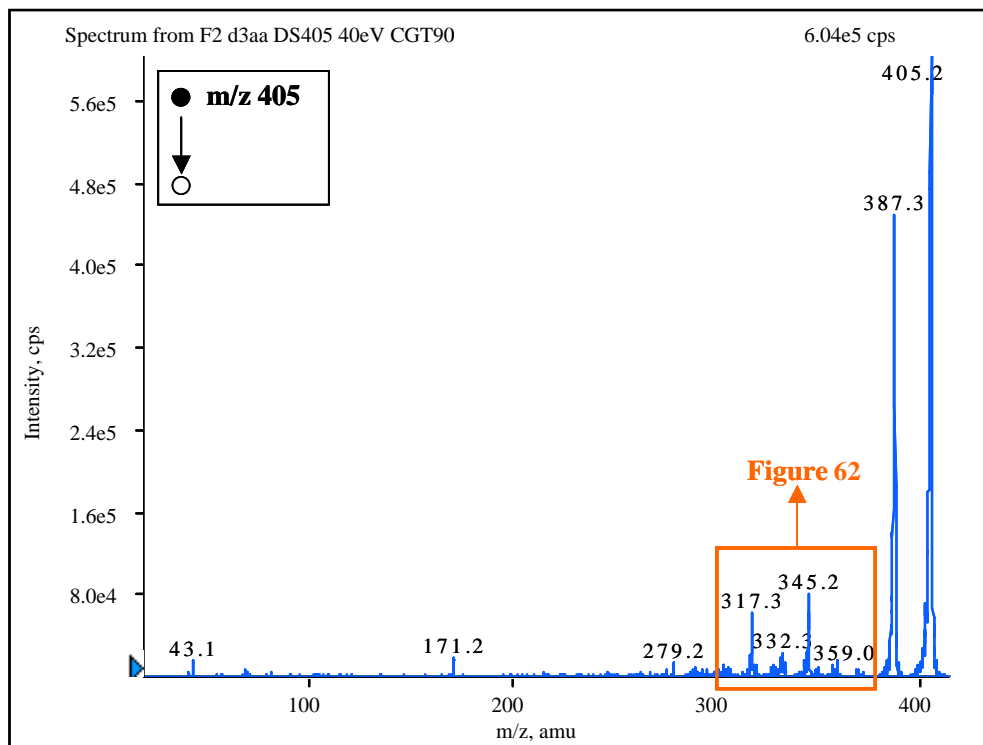


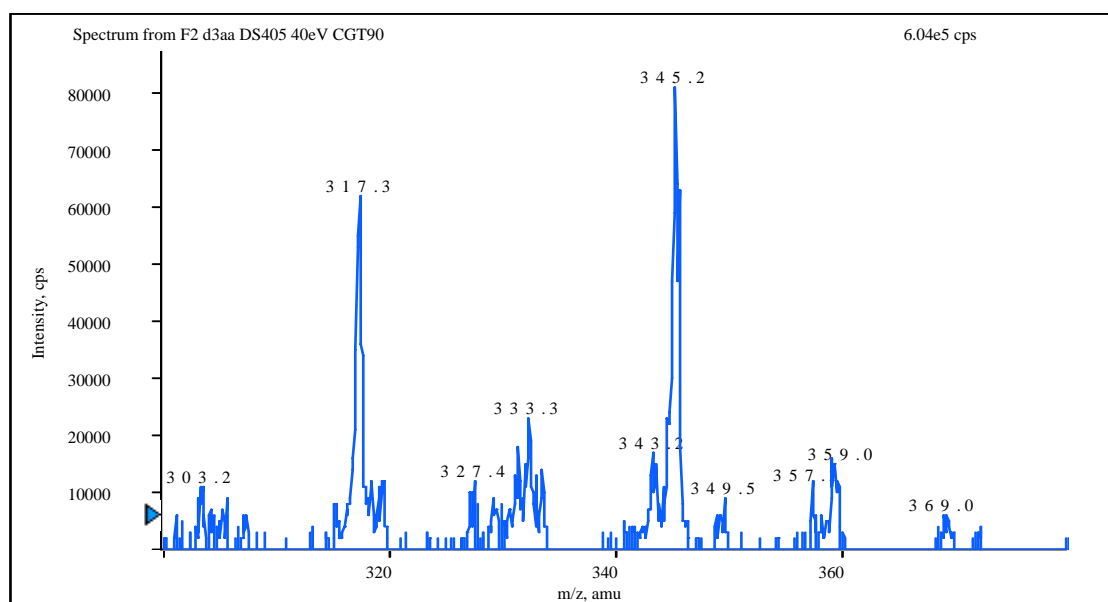
Figure 60 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif de l'inophyllum F2 (**91**)

- SM/SM (ordre 2)

La structure de l'ion m/z 405 est étudiée en SM/SM et les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ du composé F2 sont confrontées au spectre des ions fragments obtenu ([Figure 61](#) et [Figure 62](#)).



[Figure 61](#) : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 405 (E_{coll} : 30eV ; CGT 90)

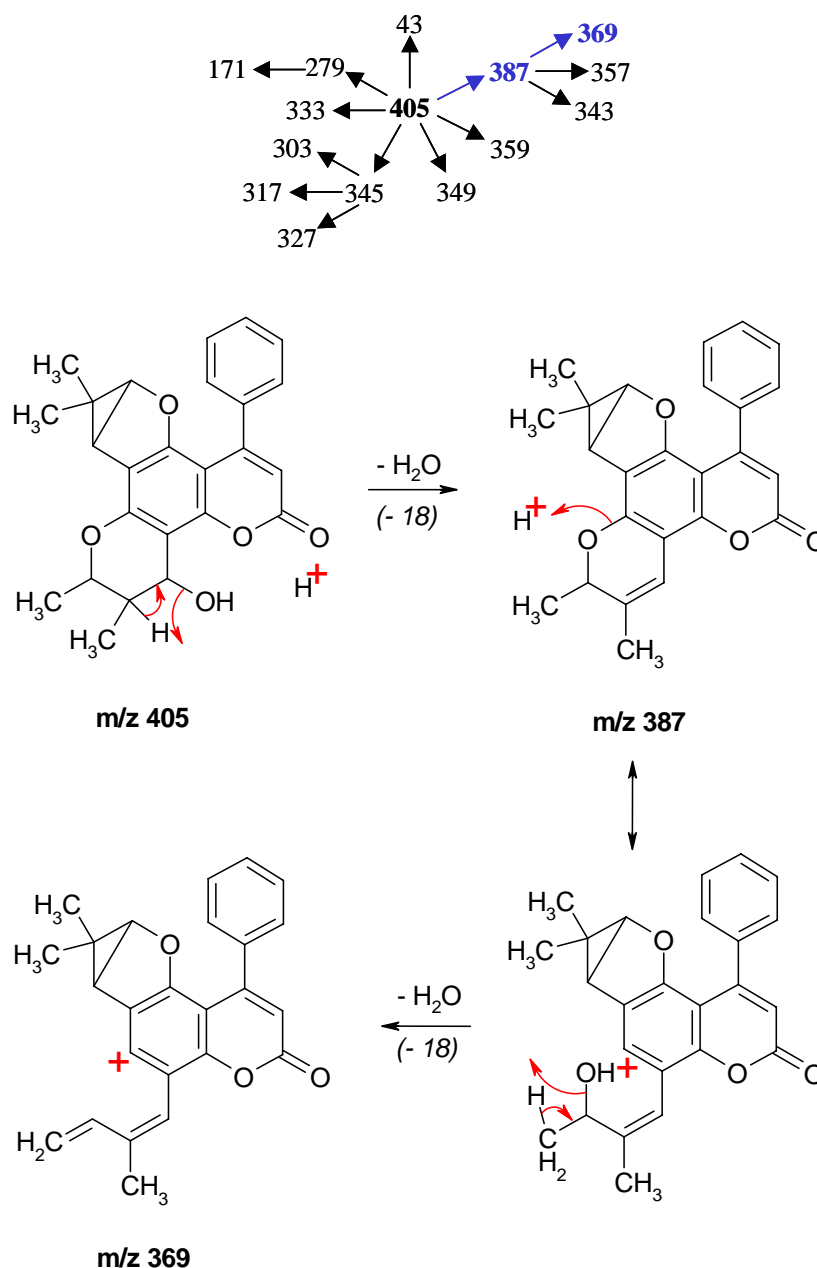


[Figure 62](#) : Agrandissement du spectre SM/SM sur la gamme m/z 300-380

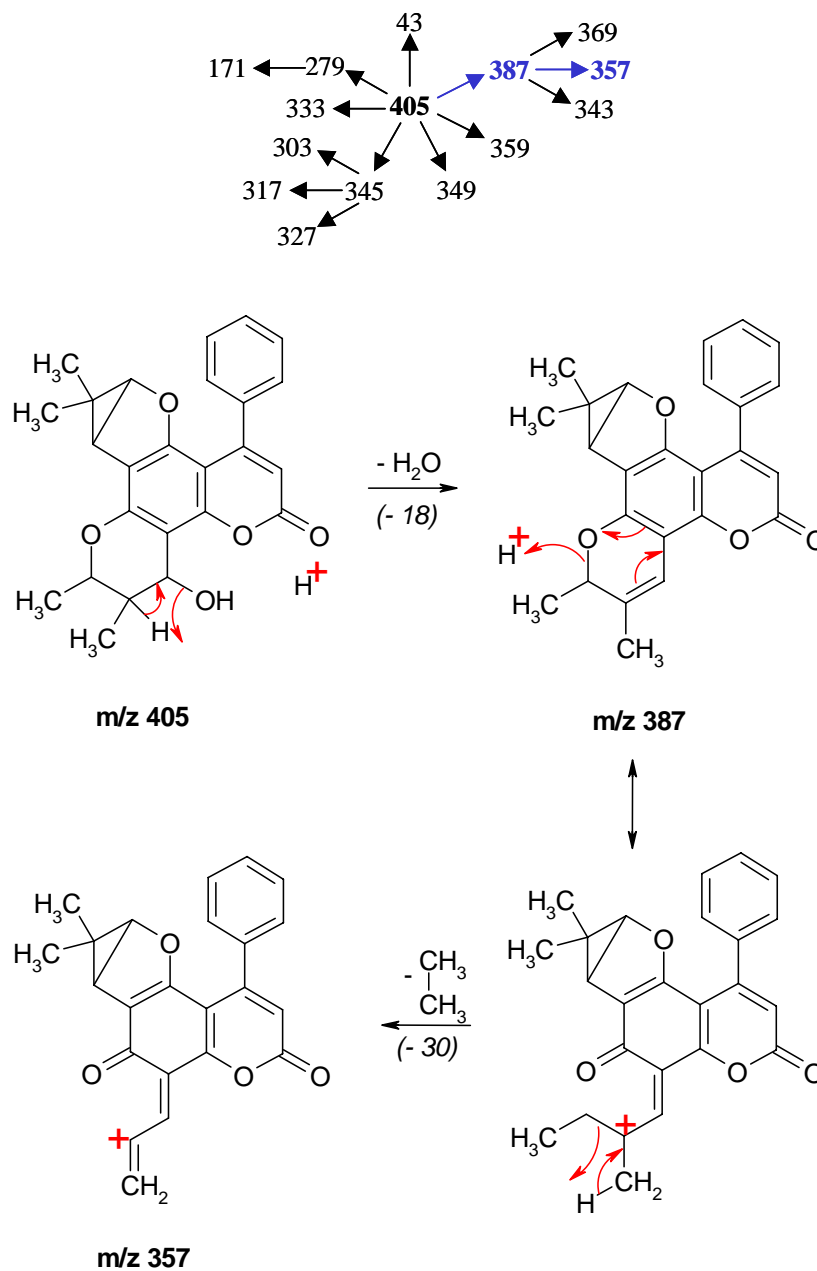
Les ions observés après les différentes fragmentations de l'ion m/z 405 sont les suivants : m/z = 43, 171, 279, 303, 317, 327, 333, 343, 345, 349, 357, 359, 369, 387 et 405, qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire non fragmenté.

Un schéma de filiation de ces différents ions fragments a pu être établi. Tous les ions fragments sont ainsi issus de l'ion m/z 405.

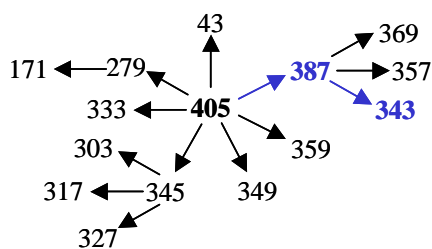
L'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ m/z 405 peut tout d'abord perdre une molécule d'eau (-18) provenant du cycle chromanol. L'ion formé (m/z 387) peut alors perdre une nouvelle molécule d'eau (-18) par ouverture du cycle chromanol pour donner l'ion m/z 369 :

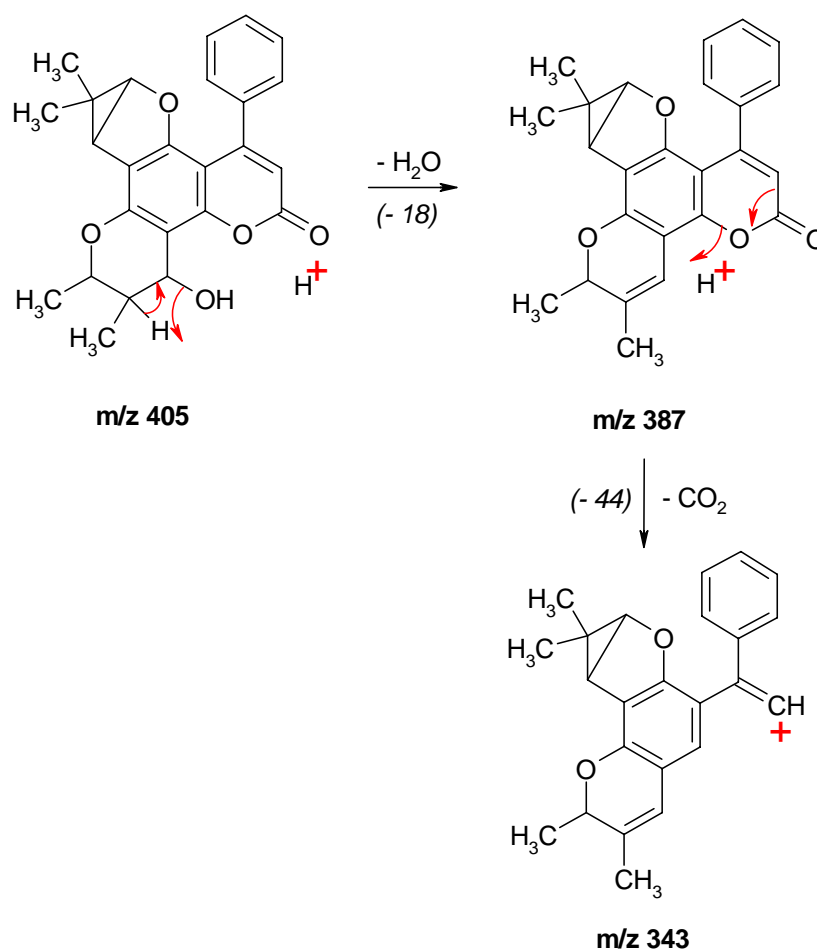


L'ion m/z 387 formé à partir de l'ion pseudo-moléculaire par perte d'eau (-18) peut également perdre une molécule d'éthane (-30), toujours lors de l'ouverture du cycle chromanol, pour donner un ion m/z 357 :

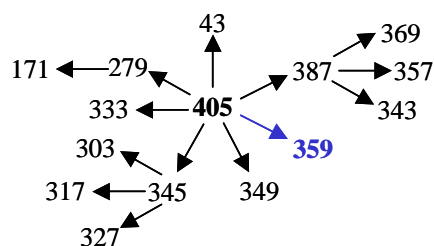


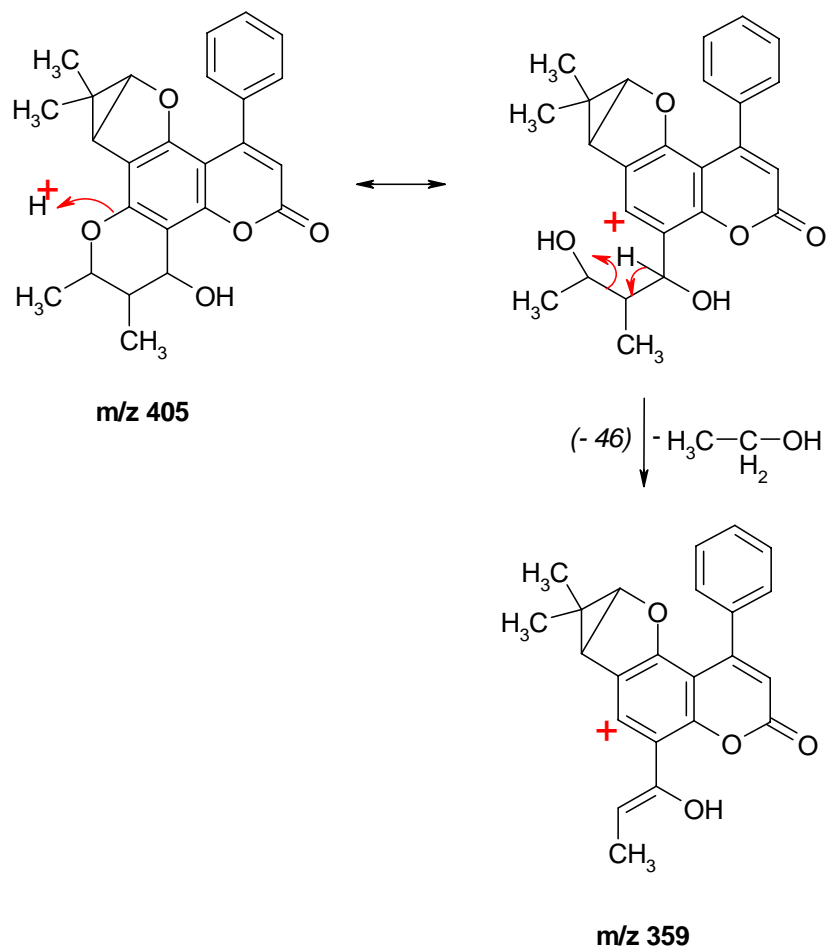
Enfin, l'ion m/z 387 peut perdre une molécule de dioxyde de carbone (-44) par ouverture du cycle portant la lactone, pour donner un ion m/z 343 :



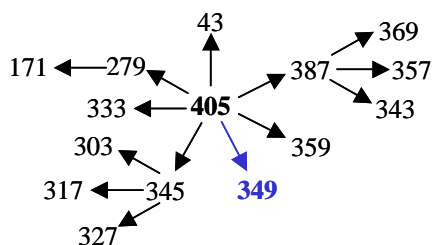


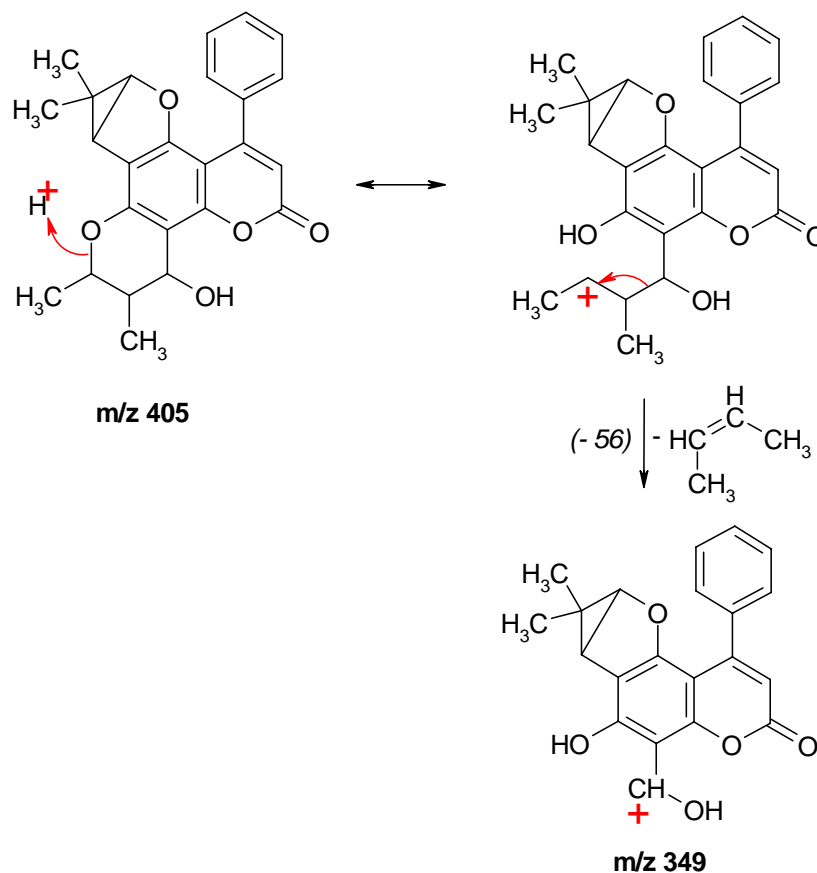
L'ion pseudo-moléculaire m/z 405 peut ensuite perdre une molécule d'éthanol (-46) par ouverture du cycle chromanol, pour donner un ion m/z 359 :



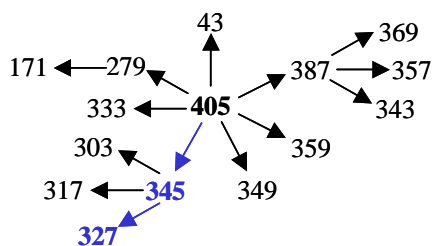


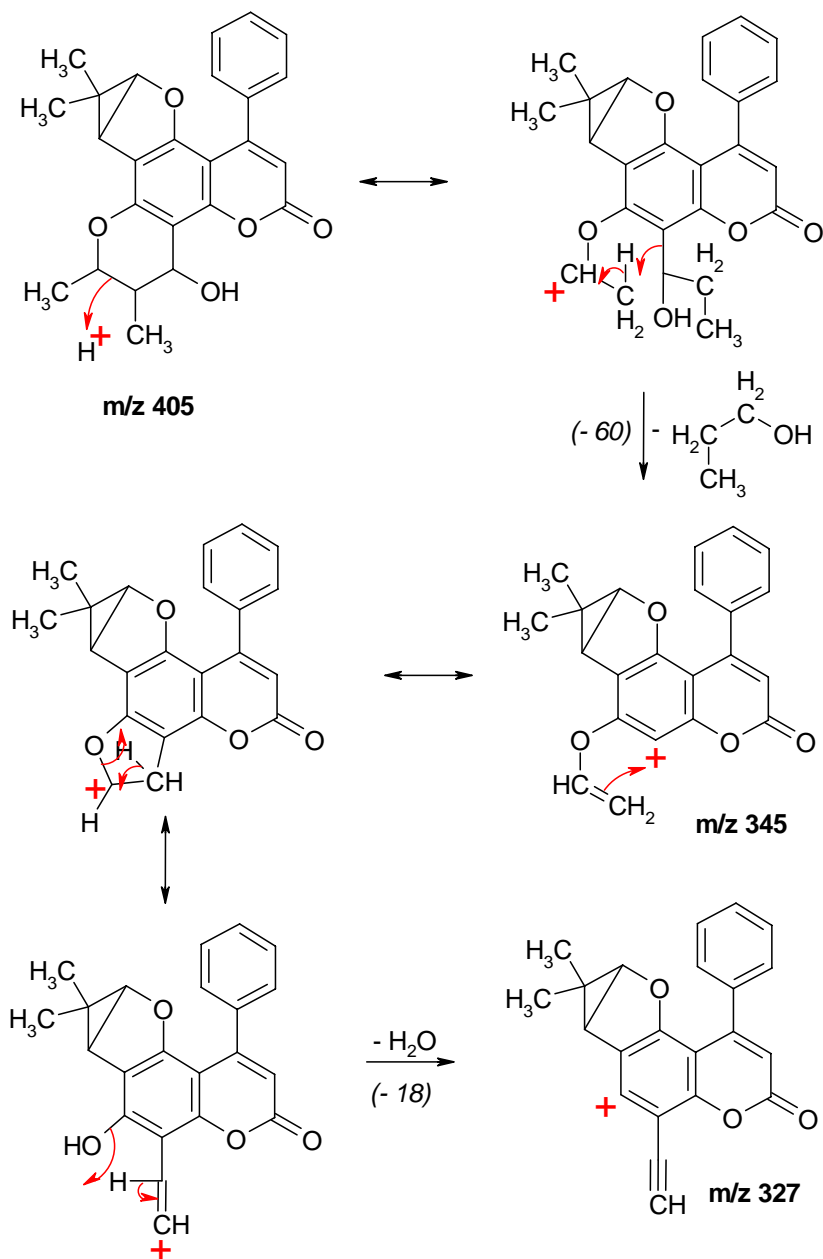
Toujours lors de l'ouverture du cycle chromanol, l'ion pseudo-moléculaire m/z 405 peut perdre une molécule de but-2-ène (-56) selon le mécanisme suivant pour donner un ion m/z 349 :



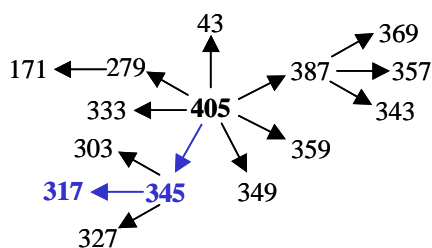


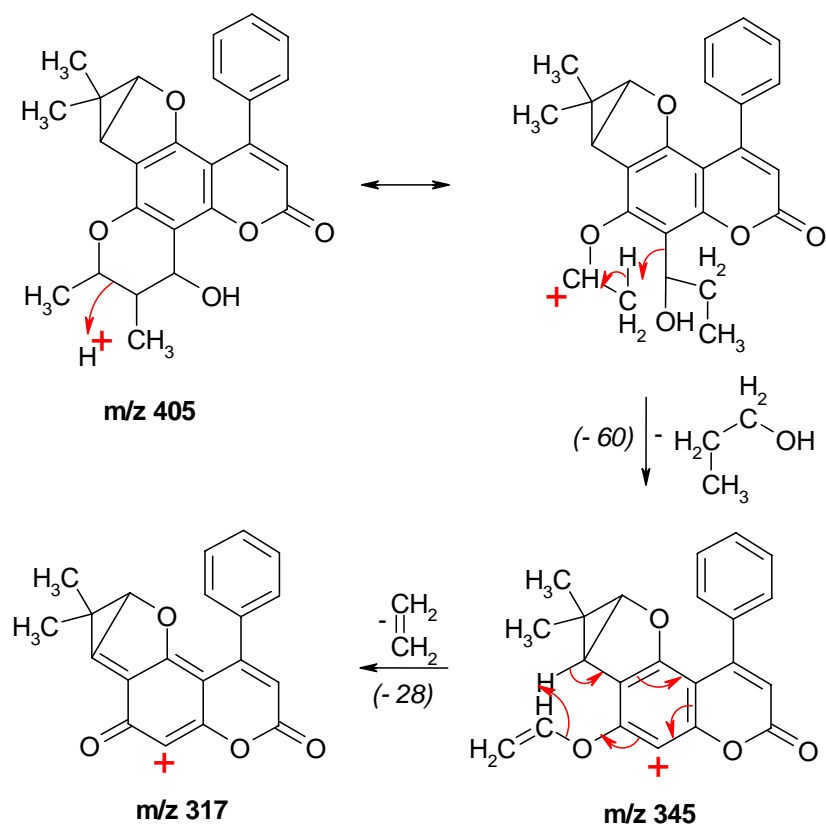
L'ouverture du cycle chromanol de l'ion pseudo-moléculaire m/z 405 peut aussi libérer une molécule de propan-1-ol (-60), pour former un ion m/z 345. Cet ion peut se réarranger en perdant une molécule d'eau (-18) pour donner un ion m/z 327, selon le mécanisme présenté ci-dessous :



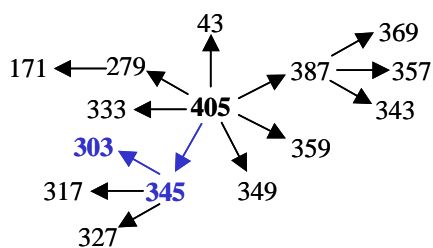


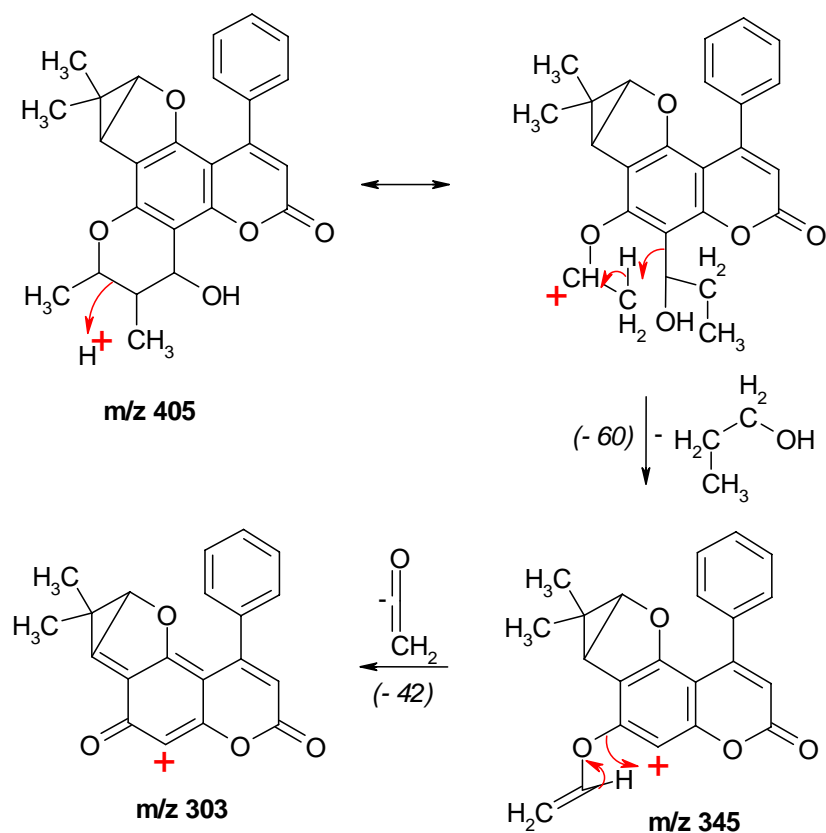
L'ion intermédiaire m/z 345 peut aussi se réarranger par perte d'une molécule d'éthylène (-28) pour former un ion m/z 317 comme suit :



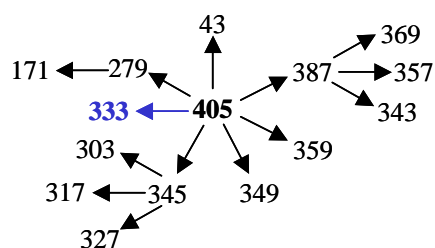


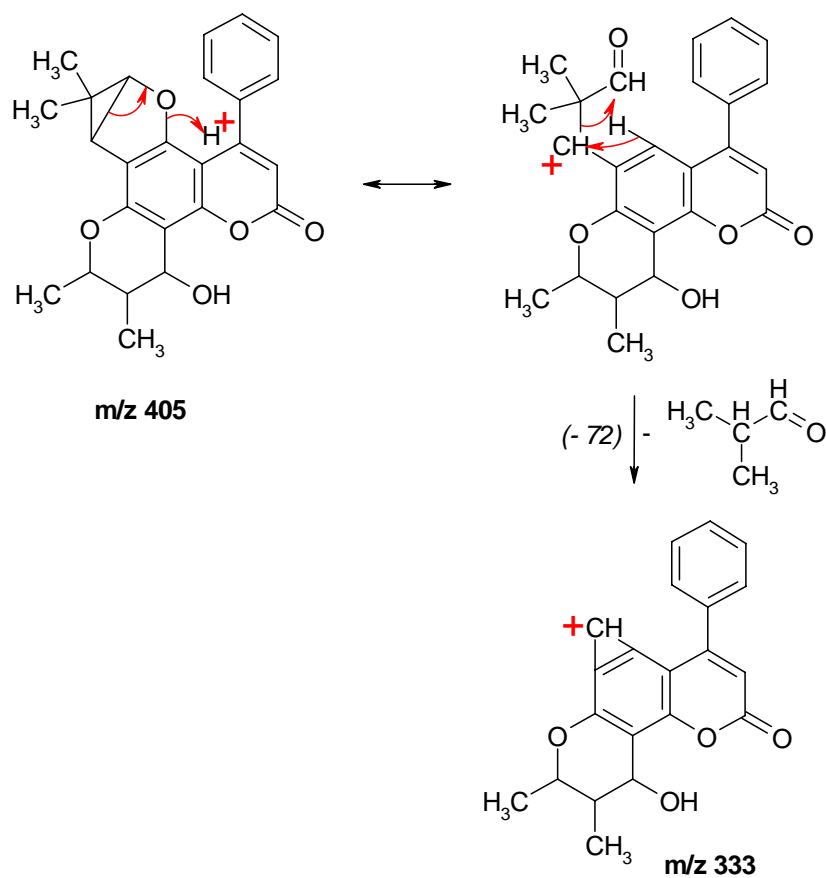
Enfin, l'ion m/z 345 peut perdre un cétène $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ (-42) pour donner un ion m/z 303 :



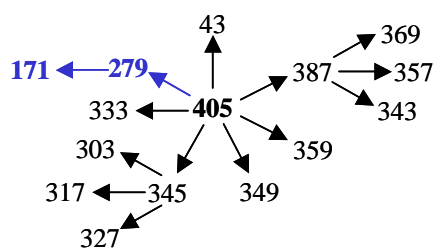


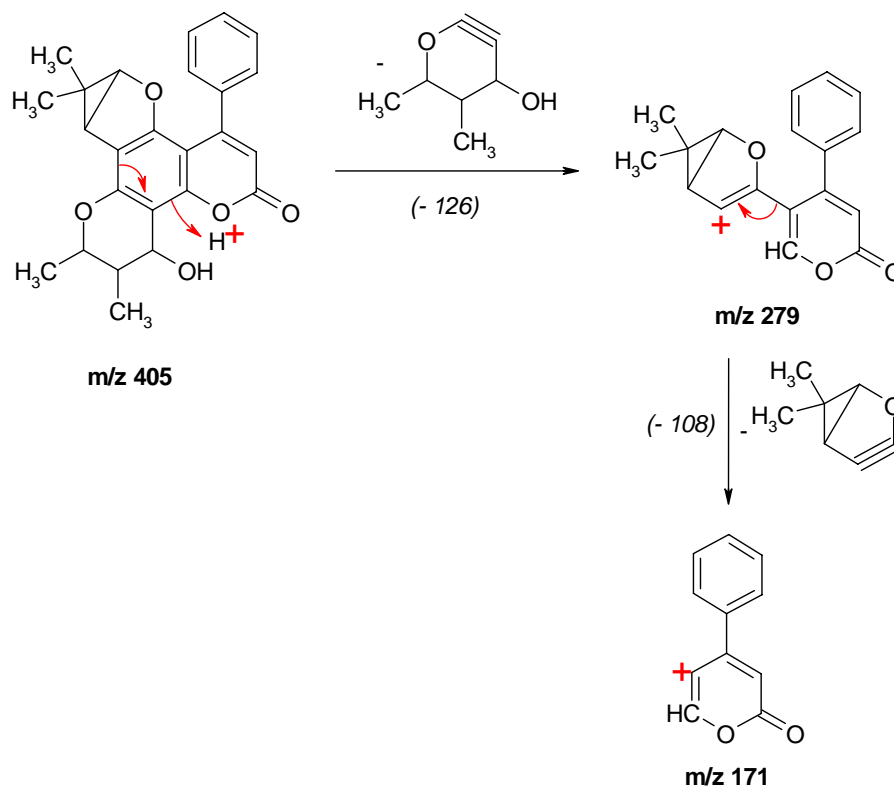
Le cycle diméthyl-cyclopropano-furanne peut aussi s'ouvrir et conduire à la perte d'une molécule de 2-méthyl-propan-1-one (-72) pour former un ion m/z 333 possédant un cycle cyclopropène :



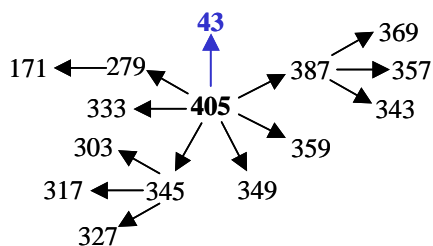


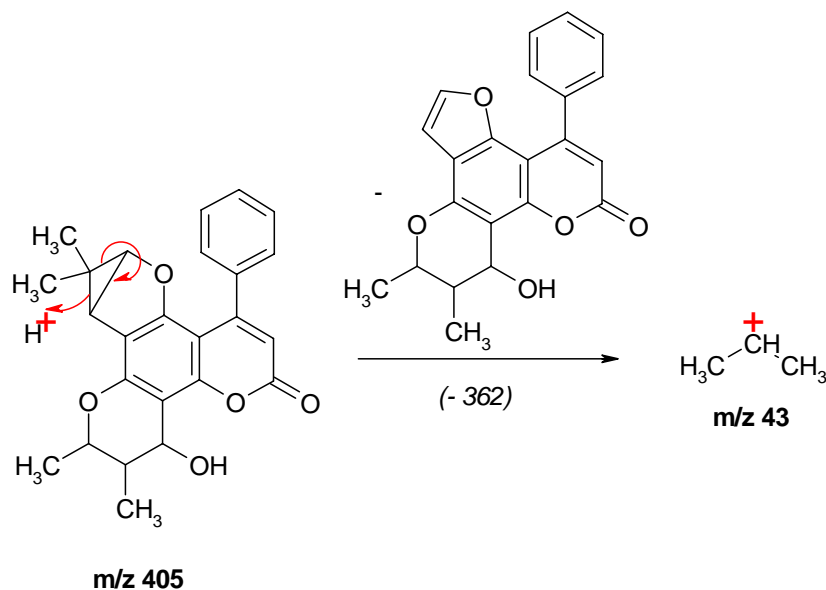
La perte complète du cycle chromanol sous la forme d'une molécule de 5,6-diméthyl-pyrr-2-yn-4-ol (-126) conduit à un ion m/z 279, qui, par perte du cycle diméthyl-cyclopropano-fur-2-ène sous forme d'une molécule de diméthyl-cyclopropano-fur-2-yne (-108), conduit à son tour à un ion m/z 171 :





Pour finir, le groupe cyclopropane peut s'ouvrir pour libérer une molécule de masse moléculaire 362 non chargée, l'ion résultant étant du type propane avec m/z 43 :





- Conclusion

Les nombreux adduits observés lors de l'ionisation électrospray en mode positif de l'échantillon permettent de conclure que le poids moléculaire du composé présent en solution est 404 Da.

Les hypothèses de décomposition de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ sont cohérentes avec le spectre SM/SM de l'ion m/z 405 observé en spectrométrie de masse après ionisation électrospray en mode positif.

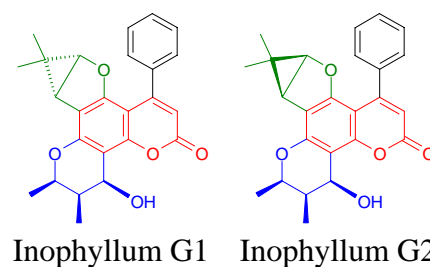
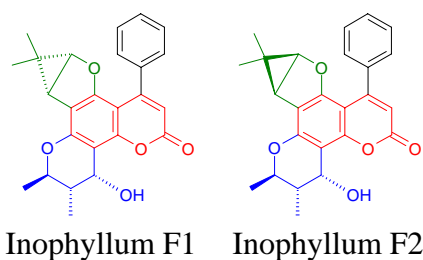
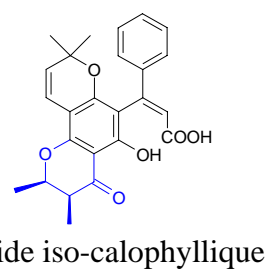
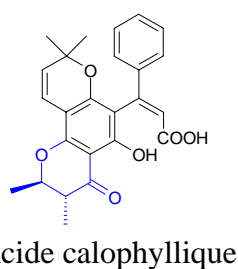
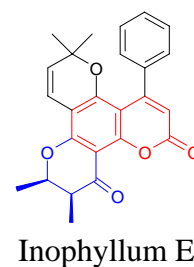
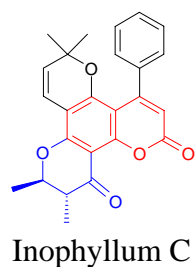
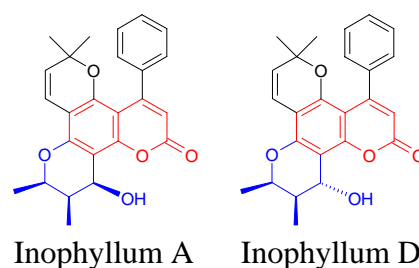
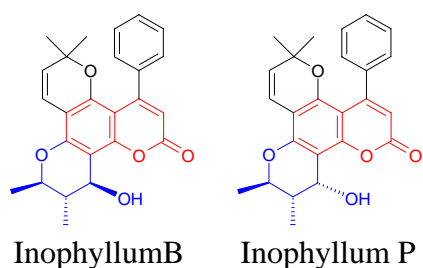
Tous ces résultats nous permettent de confirmer qu'il s'agit bien de l'inophyllum F2 (**91**) dont la structure a été proposée après analyse des spectres RMN.

Références

- 1) A.D. Patil, A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C. Haltiwanger, M.F. Bean, et al., "The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn.", J. Med. Chem., 1993, vol 36, n° 26, pp 4131-4138.
- 2) K. Kawazu, H. Ohigashi, N. Takahashi et T. Mitsui, "Piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum*", Bull. Inst. Chem. Res. , Kyoto Univ., 1972, vol 50, n° 3, pp 160-167.
- 3) K. Kawazu, H. Ohigashi et T. Mitsui, "The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn.", Tetrahedron Lett., 1968, n° 19, pp 2383-2385.
- 4) A. Potier-O., A. Buzas et E. Lederer, "Sur le calophyllolide et l'acide calophyllique isolés des graines de *Calophyllum inophyllum*", Bull. Soc. Chim. Fr., 1951, n° 146, pp 577-580.
- 5) J. Polonsky et R. Toubiana, "Sur les constituants des noix de *Calophyllum inophyllum* : isolement d'une nouvelle lactone, l'inophyllolide", Compt. Rend., 1956, vol 242, pp 2877-2880.

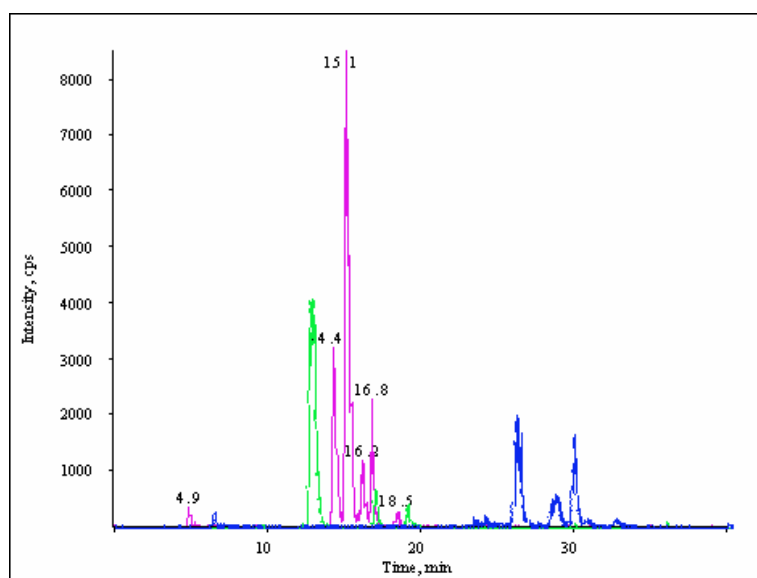
III.3.5. Conclusion

Les investigations que nous avons menées sur les extraits massifs de feuilles de Tamanu de Polynésie française nous ont permis de confirmer la présence de néo-flavonoïdes déjà connus, à savoir le calophyllolide (**22**), l'inophyllum B (**1**), l'inophyllum P (**2**), l'inophyllum C (**3**), et l'acide calophyllique (**21**). Nous avons également réussi à identifier deux nouvelles molécules que sont l'inophyllum F1 (**90**) et l'inophyllum F2 (**91**). Ces sept molécules sont les coumarines présentes majoritairement dans le Tamanu de Polynésie. Par contre, nous n'avons pas isolé les autres néo-flavonoïdes décrits par Patil en 1993 : l'inophyllum A (**30**), l'inophyllum D (**31**), l'inophyllum E (**20**), l'acide iso-calophyllique (**29**), l'inophyllum G1 (**33**) et l'inophyllum G2 (**34**). Ainsi, lorsqu'on compare les configurations des cycles chromanol et chromanone de toutes ces molécules (pour (**22**), le cycle est ouvert), on s'aperçoit que celles que nous avons identifiées possèdent toutes un arrangement 10,11-trans en ce qui concerne les deux groupements méthyle :

**Configurations 10,11-trans****Configurations 10,11-cis**

Le *Calophyllum inophyllum* de Polynésie française pourrait ainsi posséder des voies de biosynthèses stéréospécifiques, conduisant à des isomères particuliers du type 10,11-trans, connus pour être particulièrement actifs dans la lutte contre le HIV.

Toutefois, nous nous sommes aperçu par la suite en travaillant sur les analyses CLHP-UV/DAD de nombreux échantillons de feuilles de Tamanu (Cf. § IV.2.) que certains extraits bruts analysés avaient des chromatogrammes présentant des pics minoritaires dont le spectre UV pourrait correspondre à des coumarines du même type que celles présentes majoritairement (inophyllum B (**1**), inophyllum P (**2**), inophyllum C (**3**), acide calophyllique (**21**)). La spectrométrie de masse nous apporte alors des informations supplémentaires. En effet, la spectrométrie de masse en tandem couplée à la CLHP (CLHP-SM/SM) nous permet de sélectionner les pics chromatographiques qui correspondent à une transition ion parent → ion fils de rapports m/z bien précis. On peut ainsi obtenir des chromatogrammes d'échantillons bruts ayant l'allure suivante, où chaque couleur représente une fragmentation particulière ion parent → ion fils :



$m/z = 417/361$ caractérisant le calophyllolide

$m/z = 405/387$ caractérisant les inophyllums B, P, F1 et F2

$m/z = 403/347$ caractérisant l'inophyllum C

Figure 63 : Chromatogramme CLHP-SM/SM d'un échantillon brut de Tamanu

Considérons les exemples suivants :

En ce qui concerne la fragmentation $m/z=417/361$, on sait qu'elle caractérise le calophyllolide, mais on voit qu'il existe deux petits pics entre les temps de rétention 16 et 20 minutes, qui correspondent aussi à cette fragmentation. La structure des molécules correspondant à ces deux pics doit donc être proche de celle du calophyllolide, comme par exemple l'apetalolide (**23**) et la calocoumarine B (**37**).

La fragmentation $m/z=405/387$ caractérise les inophyllums B (**1**), P (**2**), F1 (**90**) et F2 (**91**). Nous retrouvons bien ces 4 pics sur le chromatogramme, entre les temps de rétention 14 et 17 minutes, mais on en trouve aussi deux autres, minoritaires, à 4,9 et à 18,5 minutes. Celui à 18,5 minutes pourrait correspondre à un inophyllum G (**33** ou **34**).

La fragmentation $m/z=403/347$ qui caractérise l'inophyllum C (**3**) donne trois pics chromatographiques entre les temps de rétention 26 et 32 minutes : le premier est celui correspondant à l'inophyllum C (**3**), et on peut penser que l'un des deux autres correspond à l'inophyllum E (**20**).

III.4. Conclusion

En ce qui concerne les triterpènes, les molécules classiques ont été retrouvées dans les feuilles du Tamanu, mais nous avons aussi isolé trois molécules inédites (l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**), l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**), et l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**)). Pour les coumarines et les néo-flavonoïdes, les molécules majoritaires ont été isolées, dont deux molécules nouvelles (l'inophyllum F1 (**90**) et l'inophyllum F2 (**91**)). Toutes ces coumarines majoritaires possèdent un cycle chromanol de configuration 10,11-trans qui semble déterminante dans l'activité anti-HIV de ces molécules. Certaines coumarines seront utilisées comme marqueurs chimiques dans l'étude de la biodiversité du Tamanu de Polynésie française.

Globalement, toutes les molécules isolées des feuilles du Tamanu de Polynésie française sont intéressantes du point de vue de leur bioactivité. Ainsi des tests de bioactivité sur les molécules nouvelles pourraient être envisagés.

Il serait par ailleurs intéressant de rechercher les molécules entrant dans la composition des écorces, des amandes et des résines de l'huile de Tamanu.

IV. ETUDE DE LA BIODIVERSITE DU *C. INOPHYLLUM* EN POLYNESIE

Le but de cette étude de la biodiversité du Tamanu de Polynésie française est double. Tout d'abord, nous nous proposons de rechercher des liens entre les différents individus échantillonnés, liens basés sur la composition chimique déterminée chez chaque individu. Ceci de façon à faire apparaître des groupes d'individus, les individus d'un groupe étant chimiquement proches, et chaque groupe étant significativement différent de tous les autres d'un point de vue chimique. Nous pourrions ensuite essayer d'expliquer ces regroupements par des facteurs géographiques, écologiques, climatiques, etc...

L'échantillonnage réalisé permettra également de repérer les individus chimiquement plus intéressants que les autres. C'est à dire des individus qui seraient plus riches en certaines molécules d'intérêt pharmaceutique par exemple. On pourrait ainsi sélectionner et multiplier les individus intéressants en vue de l'extraction de molécules biologiquement actives à partir de ces arbres sélectionnés.

Pour parvenir à ces objectifs, un vaste échantillonnage de matériel végétal (feuilles et fruits, Cf. § II.2.) sur l'ensemble des cinq archipels de Polynésie française est nécessaire. Une méthode analytique sera mise au point pour déterminer la composition en coumarines des feuilles, ainsi que pour déterminer la composition en acides gras de l'huile issue des amandes du fruit. Les données recueillies seront traitées statistiquement selon les méthodes d'Analyse en Composantes Principales (ACP) et d'Analyse Factorielle Discriminante (AFD), via l'utilisation du logiciel ©Addinsoft XL-Stat 6.1 pour ©Microsoft Excel 2000.

IV.1. Principes des outils statistiques utilisés¹

IV.1.1. L'Analyse en Composantes Principales (ACP)

Du point de vue des analystes de données, il s'agit d'une technique de représentation des données, ayant un caractère optimal selon certains critères algébriques et géométriques et que l'on utilise en général sans référence à des hypothèses de nature statistique ni à un modèle particulier.

L'analyse en composantes principales présente de nombreuses variantes selon les transformations apportées au tableau des données : le nuage des points-individus peut être centré ou non, réduit ou non. Parmi ces variantes, l'analyse en composantes principales normées (nuage centré-réduit) est certainement la plus utilisée, et c'est celle-ci que nous utiliserons ici pour le traitement de nos données.

Les représentations géométriques entre les lignes et entre les colonnes du tableau de données permettent de représenter visuellement les proximités entre les individus et entre les variables.

IV.1.2. L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD)

On désigne sous le nom d'analyse discriminante une famille de techniques destinées à classer (affecter à des classes préexistantes) des individus caractérisés par un certain nombre de variables numériques ou nominales.

L'analyse factorielle discriminante ou analyse linéaire discriminante, est une méthode à la fois descriptive et prédictive, qui donne lieu à des calculs d'axes principaux. Elle peut être considérée comme une extension de la régression multiple dans le cas où la variable à expliquer est nominale et constitue la variable de partition.

L'analyse factorielle discriminante se propose dans un premier temps de séparer au mieux les q classes à l'aide des p variables explicatives. Dans un deuxième temps, elle cherche à résoudre le problème de l'affectation d'individus nouveaux, caractérisés par les p variables, à certaines classes déjà identifiées sur l'échantillon des n individus (appelé échantillon d'apprentissage).

On distingue par conséquent deux démarches successives, d'ordre descriptif puis décisionnel :

- Chercher des fonctions linéaires discriminantes sur l'échantillon d'apprentissage de taille n qui sont les combinaisons linéaires des variables explicatives dont les valeurs séparent le mieux les q classes.
- Connaître la classe d'affectation de n' nouveaux individus décrits par les variables explicatives. Il s'agit ici d'un problème de classement dans des classes préexistantes, par opposition au problème de classification qui consiste à construire des classes les plus homogènes possibles dans un échantillon.

IV.2. Etude des échantillons de feuilles

IV.2.1. CLHP analytiques des extraits de feuilles obtenus

Pour mettre au point cette méthode de séparation, plusieurs essais ont été réalisés. On a opté pour la phase normale silice, qui donnait les meilleurs résultats en ce qui concerne la résolution des différents pics. Plusieurs gradients de solvants dans l'iso-octane ou l'hexane ont été envisagés, et les deux modérateurs retenus ont été l'acétate d'éthyle et l'iso-propanol. L'iso-propanol a été préféré pour plusieurs raisons : tout d'abord, il permet une meilleure séparation entre les deux pics les plus proches sur le chromatogramme que sont l'inophyllum B et l'inophyllum P (séparation toutefois toujours difficile) ; ensuite, le pourcentage d'iso-propanol à utiliser est beaucoup plus faible que celui d'acétate d'éthyle nécessaire (fin du gradient à 20 % d'iso-propanol ou à 100 % d'acétate d'éthyle pour des temps de rétention similaires) ; enfin, l'iso-propanol absorbe moins dans l'ultra-violet que l'acétate d'éthyle, et notamment aux longueurs d'ondes comprises entre 200 et 260 nm, ce qui n'est pas négligeable car on a ainsi des spectres UV correspondant aux pics chromatographiques qui sont plus facilement interprétables. Par ailleurs, le solvant principal de polarité faible utilisé est l'iso-octane, il a été préféré à l'hexane, plus toxique, et plus agressif vis à vis de la pompe quaternaire.

La méthode mise au point sur une seule colonne chromatographique a été améliorée en mettant en série 3 colonnes identiques, et en modifiant quelque peu le gradient pour éviter des temps de rétention trop importants. Il s'en suit inévitablement une augmentation de la pression du système, dans des proportions malgré tout acceptables, puisque la pression maximale atteinte avec 20 % d'iso-propanol reste toujours en dessous des 200 bars.

La concentration des solutions injectées n'est fixée qu'approximativement, puisque ce qui nous intéresse est en définitive le pourcentage relatif des différents pics chromatographiques obtenus, et non leur aire absolue. Cependant, il nous a semblé nécessaire de pouvoir quantifier chaque pic chromatographique obtenu. Nous avons ainsi injecté (sur une seule colonne cette fois) des solutions de concentrations connues des molécules pures isolées et identifiées. On a ainsi pu déterminer la masse de chaque produit par Unité d'Aire ($1 \text{ UA} = 1 \text{ mAU} \times \text{s}$) du pic chromatographique enregistré à 360 nm. Nous avons retenu les valeurs suivantes : 1,5 ng/UA pour les inophyllums B et P ; 2,5 ng/UA pour les inophyllums F1 et F2 ; 9,5 ng/UA pour l'inophyllum C ; 15 ng /UA pour le calophyllolide.

On donne un exemple d'application sur l'échantillon n°40 (Moorea 4) :

- 10,262 g de feuilles sèches ont été extraites avec 100 mL d'acétate d'éthyle ;
- 626 mg d'extrait brut ont été recueillis (rendement 6,1%) ;
- 470 µg d'extrait purifié sur sep-pak silice ont été injectés (15 µL).
- on a ainsi injecté 1/1333^{ième} de l'extrait brut.

Les résultats obtenus après analyse CLHP-UV/DAD sont les suivants : ([Tableau 32](#))

Molécule	Pourcentage relatif du pic	Aire (mAU x s)	Masse pour une analyse (µg)	Masse pour l'extrait brut total (mg)	Rendement en masse / feuilles
Echantillon n°40	100 %	13312	470	626	6,1 %
Calophyllolide	2,85 %	379	5,69	7,58	0,074 %
Inophyllum B	18,78 %	2500	3,75	5,00	0,049 %
Inophyllum P	5,69 %	746	1,12	1,49	0,015 %
Inophyllum F1	2,67 %	355	0,89	1,19	0,012 %
Inophyllum F2	2,95 %	393	0,98	1,31	0,013 %
Inophyllum C	2,18 %	290	2,76	3,68	0,036 %

Tableau 32 : Quantification des coumarines dans l'échantillon de feuilles n°40

Ces résultats sont sans doute quelque peu optimistes du fait de la précision assez faible des pesées et de la pureté relative des étalons. Ils constituent cependant une première évaluation quantitative des coumarines dans les extraits de feuilles de Tamanu.

Les chromatogrammes obtenus comportent un grand nombre de pics, dont beaucoup n'ont pas été identifiés par leur spectre UV, par la RMN et par la SM. Certains de ces pics peuvent toutefois contribuer aux analyses statistiques sur la biodiversité, à la condition qu'ils soient bien identifiables (temps de rétention et spectre UV reproductibles). Nous avons ainsi sélectionné 6 pics correspondant à des coumarines connues, et 5 autres pics indéterminés :

- le calophyllolide ($T_R = 21,3$ min)
- l'inophyllum B ($T_R = 23,9$ min)
- l'inophyllum P ($T_R = 24,5$ min)
- l'inophyllum F1 ($T_R = 24,9$ min)
- le pic n° 5 ($T_R = 25,6$ min)
- l'inophyllum F2 ($T_R = 26,1$ min)
- le pic n° 7 ($T_R = 26,7$ min)
- le pic n° 8 ($T_R = 29,2$ min)
- l'inophyllum C ($T_R = 31,4$ min)
- le pic n° 10 ($T_R = 34,2$ min)
- le pic n° 11 ($T_R = 39,7$ min)

L'attribution des coumarines connues aux différents pics chromatographiques obtenus s'est effectuée en deux temps. Tout d'abord les étalons isolés et identifiés par RMN et SM ont été injectés sur la colonne chromatographique, afin d'obtenir leurs temps de rétention et leurs spectres UV. Ces données permettent une première identification assez facile des pics chromatographiques obtenus à partir des échantillons bruts. Pour confirmer cette première identification, un mélange des étalons a été chromatographié avec une détection par spectrométrie de masse (CLHP-SM), puis quelques échantillons bruts ont été chromatographiés avec une détection par spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM).

Un mélange des étalons suivants a donc été réalisé : le calophyllolide, l'inophyllum B, l'inophyllum P et l'inophyllum C. Les inophyllums F1 et F2 n'étaient alors plus disponibles, mais étaient présents minoritairement avec l'inophyllum B et avec l'inophyllum P. On pourra donc les retrouver sur les chromatogrammes.

Le système de spectrométrie de masse permet d'enregistrer plusieurs chromatogrammes simultanément (méthode SIM : Selected Ion Monitoring) : nous avons ainsi pu enregistrer trois chromatogrammes différents pendant l'analyse du mélange : un ciblé sur l'ion m/z 417, un sur l'ion m/z 405 et un sur l'ion m/z 403.

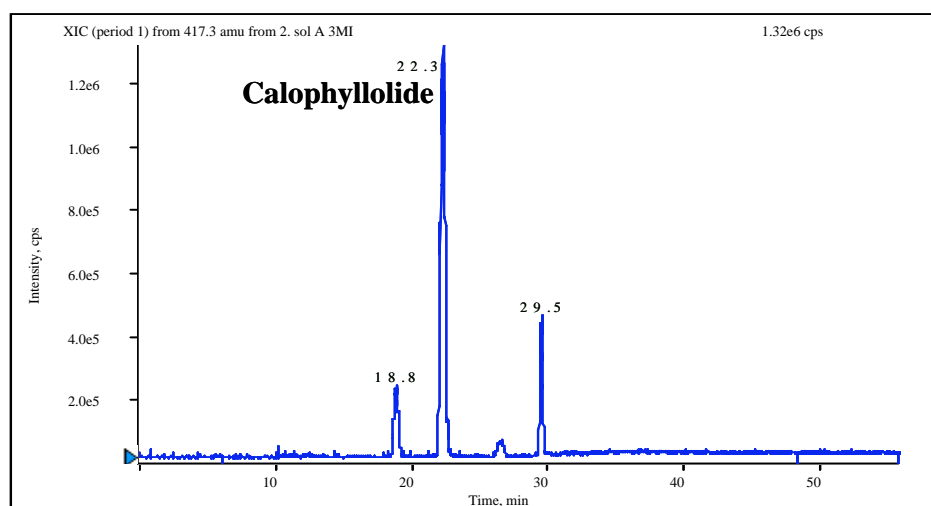


Figure 64 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 417

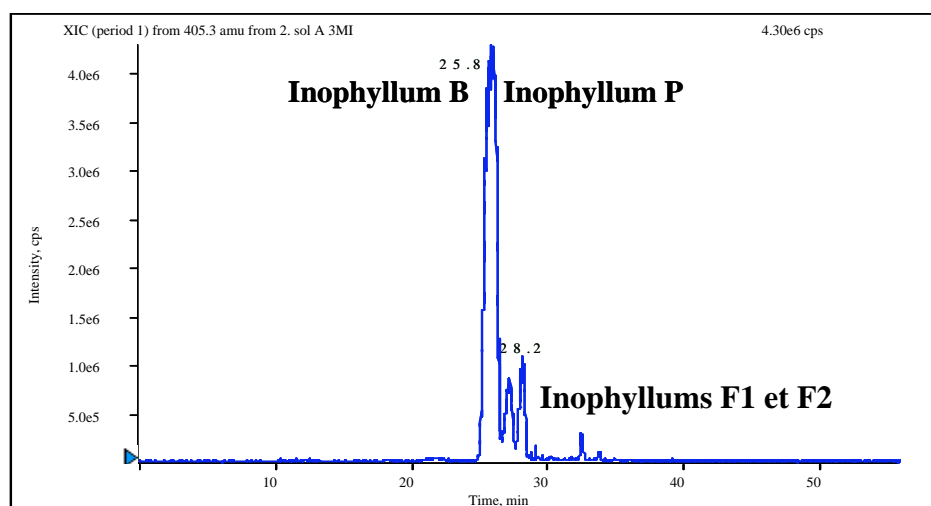


Figure 65 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 405

Le chromatogramme ciblé sur l'ion m/z 417 nous permet de repérer le calophyllolide, puisque cet ion correspond à l'ion pseudo-moléculaire de cette molécule, en mode positif (**Figure 64**). On remarque deux pics mineurs qui correspondent à des impuretés donnant elles aussi un ion m/z 417.

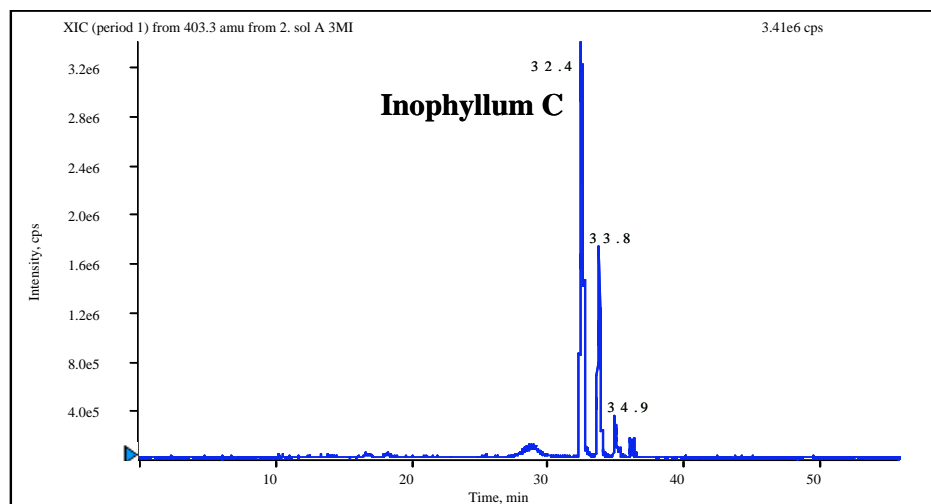


Figure 66 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 403

Le chromatogramme ciblé sur l'ion m/z 405 nous permet de repérer l'inophyllum B, l'inophyllum P, et les inophyllums F1 et F2, qui ont tous un ion pseudo-moléculaire m/z 405 en mode positif. Les attributions spécifiques sont ensuite effectuées grâce à l'ordre de sortie des produits, que nous connaissons, et grâce à l'examen des spectres UV ([Figure 65](#)).

Enfin le chromatogramme ciblé sur l'ion m/z 403 nous permet de repérer l'inophyllum C, puisque cet ion correspond à l'ion pseudo-moléculaire de cette molécule, en mode positif ([Figure 66](#)). Deux pics minoritaires suivent le pic correspondant à l'inophyllum C. Ces molécules minoritaires forment elles aussi un ion m/z 403, il pourrait s'agir par exemple de l'inophyllum E.

En ce qui concerne les CLHP-SM/SM effectuées sur quelques échantillons bruts, ils ont permis de confirmer la présence des six coumarines étalons, à savoir le calophyllolide, l'inophyllum B, l'inophyllum P, les inophyllums F1 et F2, et l'inophyllum C. Les fragmentations spécifiques de chaque molécule ont été enregistrées simultanément par le spectromètre de masse en mode tandem. On a ainsi obtenu trois chromatogrammes spécifiques des fragmentations m/z 417 \rightarrow m/z 361 (calophyllolide, [Figure 67](#)), m/z 405 \rightarrow m/z 387 (inophyllums B, P, F1 et F2, [Figure 68](#)) et m/z 403 \rightarrow m/z 347 (inophyllum C, [Figure 69](#)). Les signaux sont moins nets qu'avec les étalons, ce qui est sans doute la conséquence des nombreuses autres molécules présentes dans les échantillons bruts. On retrouve cependant clairement les six coumarines étalons sur ces chromatogrammes. Les temps de rétention correspondent bien, ainsi que les spectres UV.

Toutes ces analyses nous ont donc permis d'attribuer 6 des 11 pics sélectionnés pour l'étude de la biodiversité du Tamanu à six coumarines préalablement isolées et identifiées par RMN et SM.

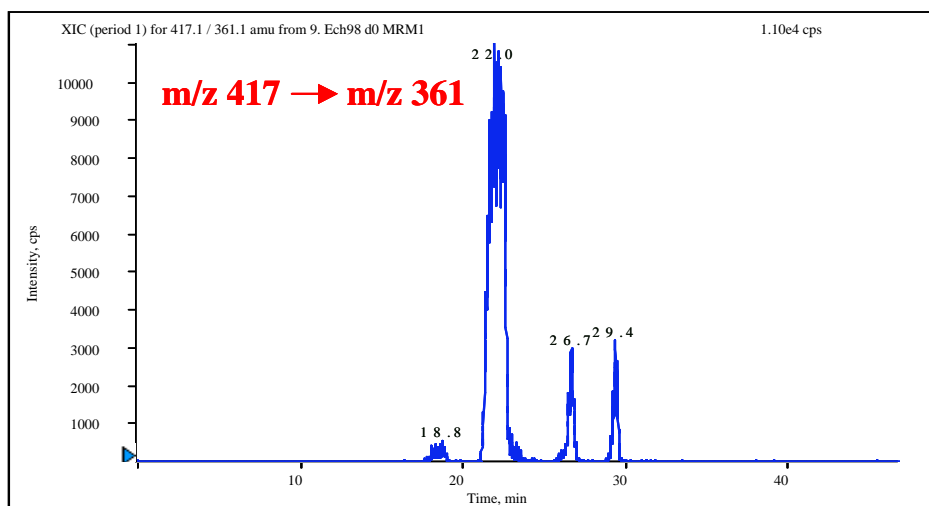


Figure 67 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 417 → m/z 361

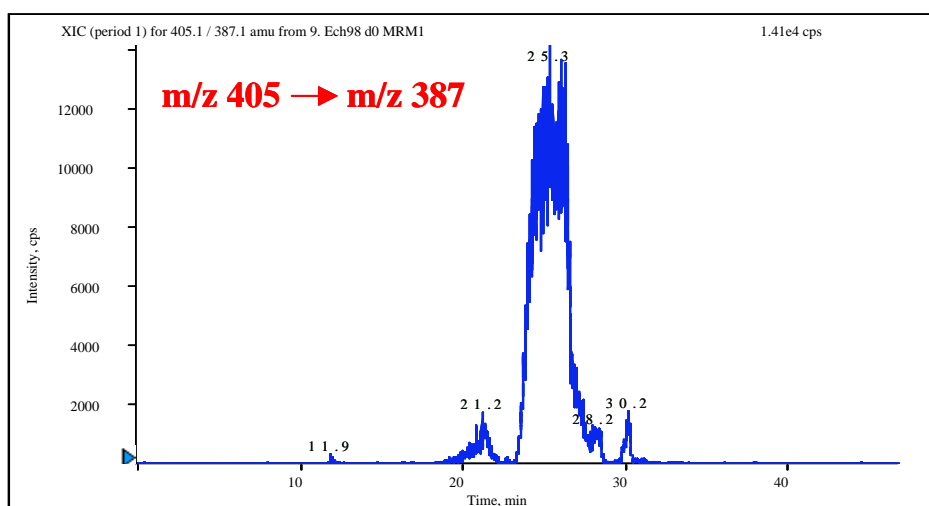


Figure 68 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 405 → m/z 387

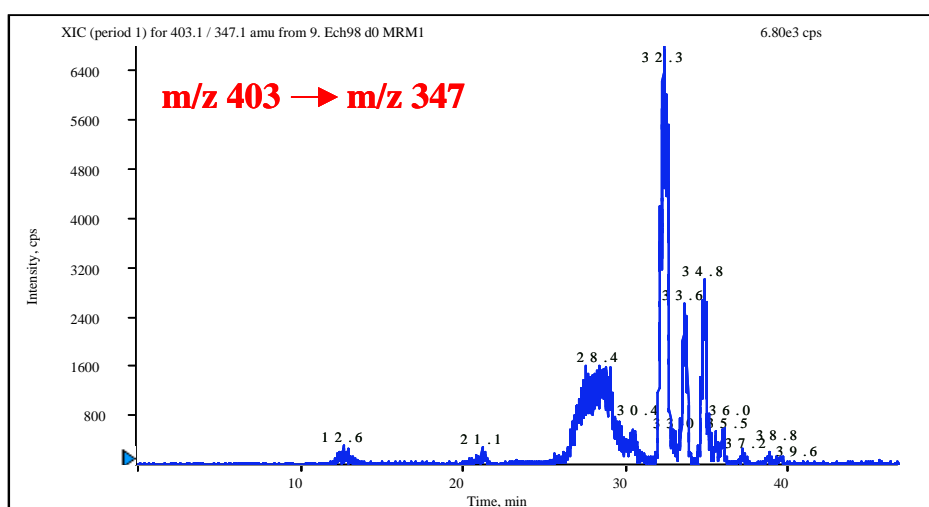


Figure 69 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 403 → m/z 347

Le profil chromatographique des 143 échantillons passés en CLHP-UV a l'allure suivante :

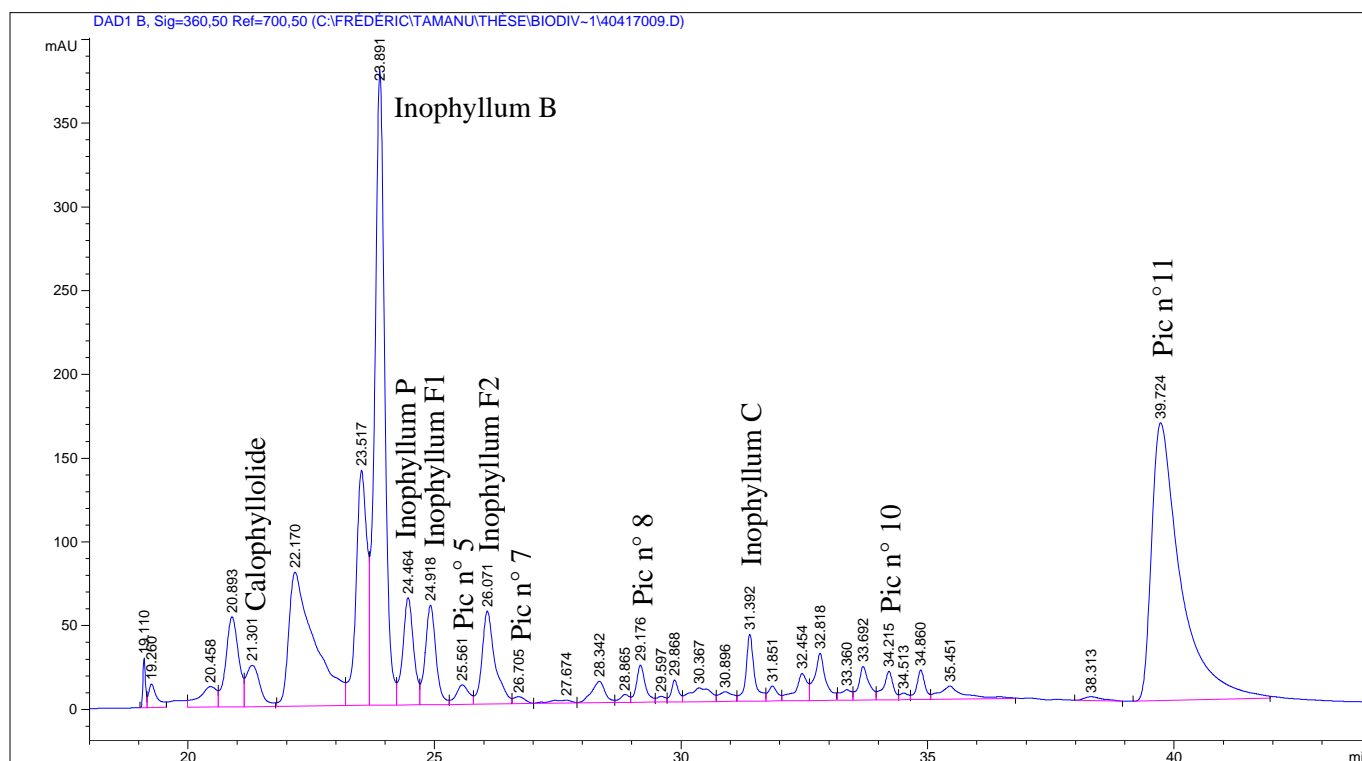
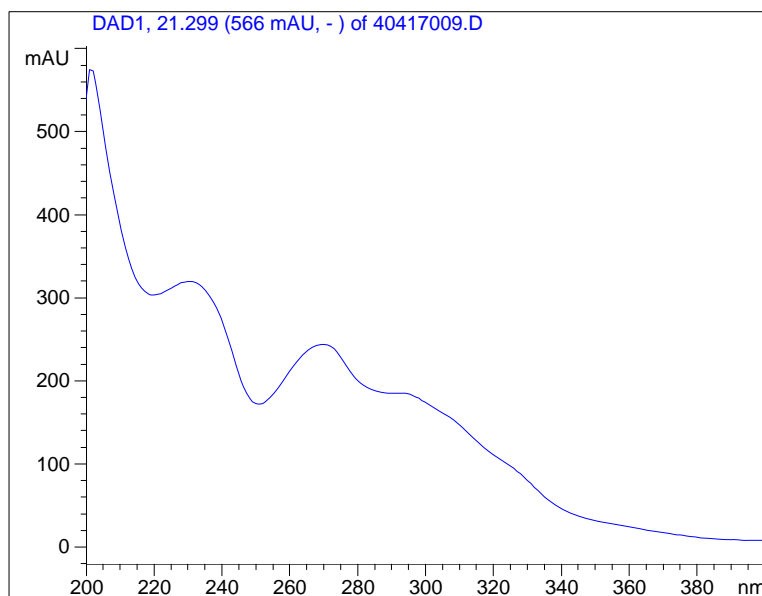


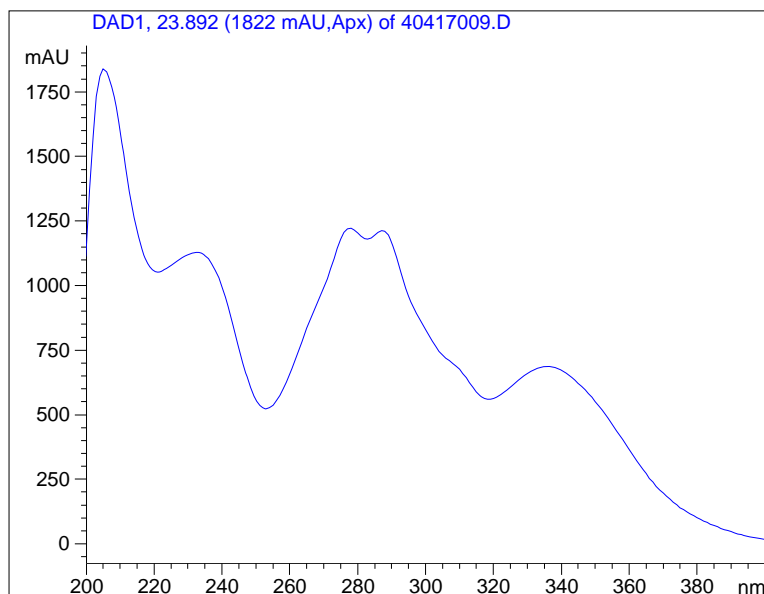
Figure 70 : Chromatogramme CLHP-UV de l'échantillon de feuilles 'Tetiaroa 3'

Le calophyllolide est la première coumarine à sortir de la colonne, elle est en effet la moins polaire de celles qui ont été identifiées dans le *Calophyllum inophyllum* de Polynésie. Il est aisément identifiable grâce à son spectre UV très caractéristique :



Spectre 68 : Ultra-Violet du calophyllolide ($T_R = 21,3$ min)

Sortent ensuite l'inophyllum B et l'inophyllum P, deux diastéréoisomères qui ont donc le même spectre UV, et dont les temps de rétention sont proches. Tout comme le calophyllolide, leur spectre UV est très facilement reconnaissable :

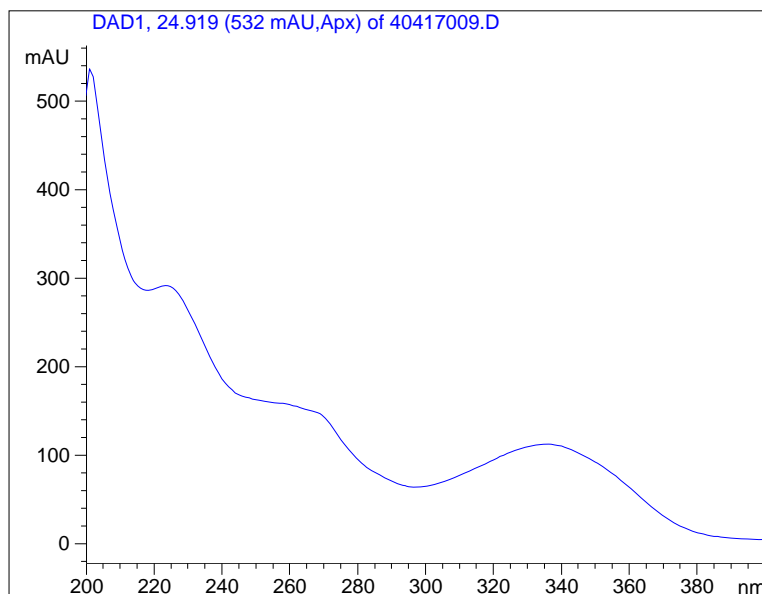


Spectre 69 : Ultra-Violet de l'inophyllum B ($T_R=23,9$ min)

Le seul problème que l'on peut rencontrer avec ces deux pics, est de les confondre lorsque l'un des deux est absent, du fait de leur temps de rétention très proche et de leur spectre UV identique. Il faut alors soit faire une co-injection avec la molécule pure absente de l'échantillon brut analysé, ou encore analyser avant et après l'échantillon en question un autre échantillon contenant, lui, les deux pics, de manière à être sûr que le temps de rétention n'a pas fluctué d'une analyse à l'autre (en quelque sorte un étalonnage externe).

Remarque : l'inophyllum B sort toujours avant l'inophyllum P.

En ce qui concerne les inophyllums F1 et F2, ce sont tous deux des diastéréoisomères. Leur spectre UV est donc identique, et a l'allure suivante, qui permet de les reconnaître :

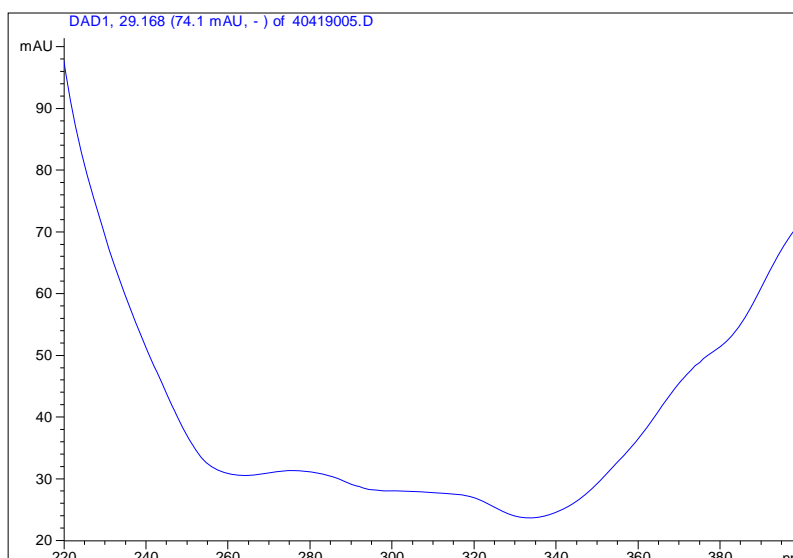


Spectre 70 : Ultra-Violet de l'inophyllums F1 ($T_R = 24,9$ min)

Les composés F1 et F2 sont de nouvelles molécules que nous avons identifiées pour la première fois à partir d'un échantillon massif de feuilles de Tamanu de Polynésie. Nous avons donc pu facilement les localiser et trouver leur temps de rétention grâce aux molécules pures isolées et analysées dans les mêmes conditions. Il n'en va pas de même pour les composés G1 et G2 isolés des feuilles d'un *Calophyllum inophyllum* par Patil en 1993², et qui sont des diastéréoisomères de F1 et F2. Nous avons cependant repéré sur certains chromatogrammes deux autres pics (autres que F1 et F2) plus petits et ayant le même spectre UV que celui de F1 et F2. Ces pics notés dans notre étude 'pic n° 5' et 'pic n° 7' pourraient correspondre à G1 et G2, G1 ayant un temps de rétention plus petit que G2, comme l'indique Patil². (de la même façon F1 sort avant F2)

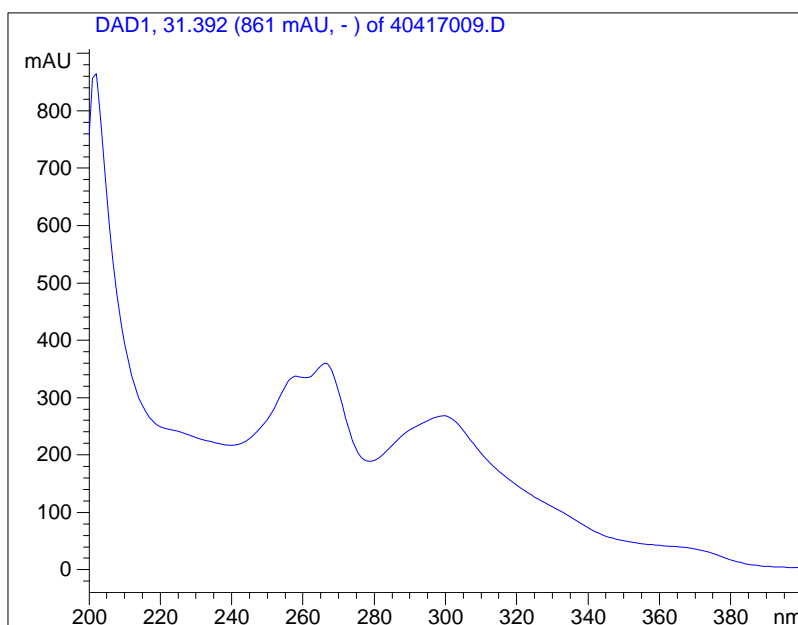
De la même manière que pour l'inophyllum B et l'inophyllum P, il faut prendre un certain nombre de précautions avant d'attribuer les signaux UV à ces molécules lorsque les quatre pics ne sont pas tous présents.

Le pic n°8 qui sort à un temps de rétention de 29,2 min a un spectre UV facilement identifiable et sera donc une variable utilisée dans l'analyse statistique sur la biodiversité, même si l'on ne connaît pas la molécule qui lui correspond.



Spectre 71 : Ultra-Violet du pic n° 8 ($T_R = 29,2$ min)

L'inophyllum C sort a un temps de rétention de 31,4 min et a un spectre UV qui est également très caractéristique.

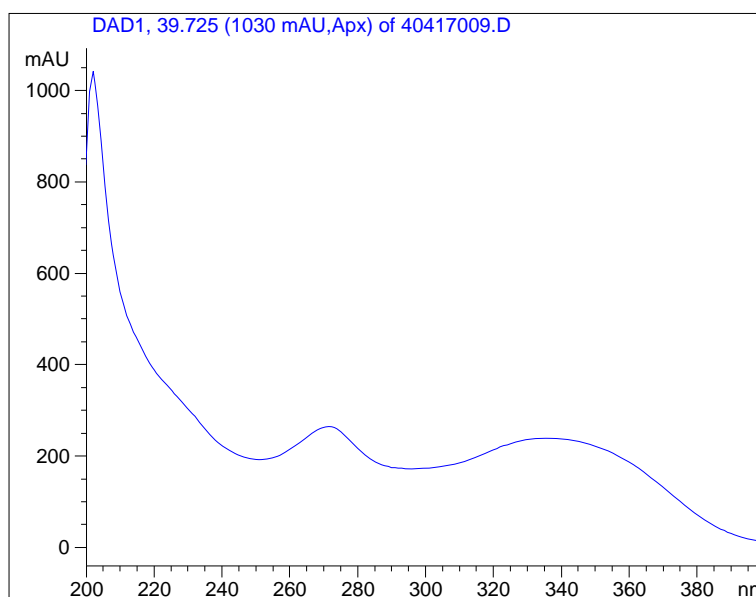


Spectre 72 : Ultra-Violet de l'inophyllum C ($T_R = 31,4$ min)

Le pic n° 10 qui suit le pic de l'inophyllum C a un spectre UV très voisin. Ce pic en général moins abondant pourrait correspondre à l'inophyllum E isolé par Patil du *C. inophyllum*², et qui est un diastéréoisomère de l'inophyllum C.

Remarque : ces deux pics ont un spectre UV très proche, mais leurs temps de rétention sont suffisamment éloignés pour qu'on ne puisse pas les confondre.

Le pic n° 11 est, comme le pic n° 8, facilement identifiable grâce à son spectre UV caractéristique, qui présente deux maxima (272 et 338 nm) avec le profil suivant :



Spectre 73 : UV du pic n°11 ($T_R = 39,7$ min)

Par ailleurs, la molécule qui lui correspond (qui est indéterminée) est la dernière à sortir de la colonne (la plus polaire) ce qui la rend encore plus facile à identifier. C'est pourquoi nous l'utiliserons comme variable dans l'analyse statistique de la biodiversité du Tamanu de Polynésie française.

Les 143 échantillons de feuilles de Tamanu ont tous été analysés selon la méthode CLHP décrite ci-dessus. Après intégration du chromatogramme, on relève les pourcentages relatifs des 11 pics sélectionnés. On obtient un tableau de données de 143 lignes (les échantillons) et 11 colonnes (les variables à savoir les différents pics CLHP) qui nous servira à faire une étude assez significative de la biodiversité du Tamanu en Polynésie française grâce aux outils statistiques présentés ci-dessus (§ IV.1.).

Ces données sont présentées ci-après dans le **Tableau 33**, où sont également donnés les moyennes et les écarts types de chaque variable. D'autre part, on signale directement dans le tableau la valeur la plus faible obtenue (en rouge) et la valeur la plus forte obtenue (en vert).

Réf	Nom échantillon	Caloph	InB	InP	InF1	Pic 5	InF2	Pic 7	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
1	Bora Bora 1	2,10	4,10	1,03	0,00	0,00	0,00	0,00	1,80	1,53	0,00	27,86
2	Bora Bora 2	0,96	3,10	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	0,43	0,00	32,00
3	Bora Bora 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,78	0,00	0,00	37,55
31	Maupiti 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	42,42
32	Maupiti 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14	0,00	0,00	26,36
33	Maupiti 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45	0,00	0,00	42,92
34	Maupiti 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	0,00	0,00	50,09
35	Maupiti 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	0,00	0,00	53,14
36	Maupiti 6	2,79	12,54	2,23	0,85	0,00	1,23	0,00	0,72	2,26	0,81	16,56
37	Moorea 1	1,15	16,07	6,82	2,62	1,39	3,58	0,00	0,00	1,64	0,75	15,97
38	Moorea 2	2,74	17,82	6,23	2,71	1,28	3,39	0,00	0,00	2,65	1,03	4,59
39	Moorea 3	3,21	19,60	5,79	2,31	0,94	2,64	0,00	0,00	2,07	0,86	4,07
40	Moorea 4	2,85	18,78	5,69	2,67	1,13	2,95	0,00	0,00	2,18	0,98	9,75
41	Moorea 5	2,37	15,44	4,96	1,77	0,79	1,99	0,00	0,00	1,89	0,72	10,48
42	Moorea 6	2,00	9,36	3,37	0,48	0,35	1,15	0,00	1,19	1,52	0,91	9,80
43	Moorea 7	2,89	25,30	4,94	0,65	0,00	0,63	0,00	0,00	1,86	1,05	3,41
44	Moorea 8	1,69	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	24,13
45	Moorea 9	0,36	1,17	0,00	0,28	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	53,17
46	Moorea 10	2,52	17,02	8,51	0,71	0,34	0,00	0,00	1,12	1,57	0,74	8,00
47	Moorea 11	2,38	22,01	5,08	1,51	1,02	2,19	0,00	0,93	1,65	0,73	4,61
48	Moorea 12	0,10	19,41	6,47	1,35	0,86	1,86	0,00	4,85	2,49	1,13	5,70
68	Raiatea 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,17	0,00	0,00	25,95
69	Raiatea 2	1,70	9,40	3,13	0,43	0,00	1,44	0,00	3,16	1,08	0,50	27,36
70	Raiatea 3	2,20	31,27	9,01	0,76	0,00	2,35	0,00	2,31	3,27	1,49	9,48
71	Raiatea 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,73	0,00	0,00	13,15
72	Raiatea 5	0,00	20,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,09	1,30	0,57	8,56
73	Raiatea 8	0,00	0,00	2,72	0,00	0,00	0,00	0,00	3,72	0,95	0,39	15,41
74	Raiatea 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,79	0,00	0,00	28,19
100	Tahaa 1	1,84	29,89	6,19	1,88	0,64	0,66	0,00	0,00	2,90	1,07	6,94
101	Tahaa 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	16,24
102	Tahaa 3	1,17	14,61	2,51	1,39	0,30	1,69	0,00	1,49	1,89	0,80	11,60
103	Tahaa 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,37	0,00	0,00	26,90
104	Tahaa 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,54	0,00	0,00	14,96
105	Tahaa 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00	0,00	22,18
106	Tahaa 7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,74	0,00	0,00	7,61
107	Tahiti 1	1,62	14,15	1,47	1,39	0,60	0,12	0,00	0,00	1,88	1,15	21,87
108	Tahiti 2	0,74	11,21	0,71	3,10	1,13	3,50	0,00	0,00	1,11	0,63	32,51
109	Tahiti 3	2,25	14,71	2,62	0,83	0,00	0,70	0,00	0,00	3,00	1,53	4,69
110	Tahiti 4	3,65	8,46	2,82	0,50	0,80	0,72	0,00	0,00	7,23	3,36	1,84
111	Tahiti 5	2,53	15,42	3,04	1,22	0,43	1,15	0,00	0,00	3,05	2,21	2,15
112	Tahiti 6	2,24	13,85	3,39	1,15	0,50	0,93	0,00	0,00	3,22	2,01	3,54
113	Tahiti 7	2,54	29,94	9,47	1,55	0,38	0,47	0,00	0,00	3,06	1,23	3,90
114	Tahiti 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,74
115	Tahiti 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,73	0,00	0,00	11,51
126	Tetiaroa 1	2,30	27,38	3,38	3,00	2,21	5,39	1,57	0,00	2,41	1,03	6,70
127	Tetiaroa 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,76
128	Tetiaroa 3	1,48	17,95	3,44	3,17	0,86	3,02	0,65	0,76	1,61	0,77	24,94
129	Tetiaroa 4	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,51	0,00	0,00	38,47
130	Tetiaroa 5	0,00	7,83	3,17	3,11	0,95	3,97	0,00	0,79	1,00	0,00	23,97
131	Tetiaroa 6	1,14	7,29	0,73	3,01	1,22	2,89	0,00	0,00	1,17	0,00	26,21
132	Tetiaroa 7	1,80	15,52	3,05	2,80	1,30	4,20	0,00	0,00	2,09	1,32	13,85
133	Tetiaroa 8	1,91	24,17	0,00	3,78	1,53	3,25	0,00	0,00	1,81	0,85	19,23
134	Tetiaroa 9	0,85	8,28	2,30	2,19	0,58	2,23	0,00	2,47	0,87	0,00	20,83
135	Tetiaroa 10	0,91	7,15	0,40	0,55	0,00	3,18	0,00	0,64	1,01	0,00	37,47
136	Tetiaroa 11	2,27	23,02	6,07	0,78	0,00	0,40	0,00	0,98	1,99	1,10	9,24
5	Hao 1	0,73	16,75	2,30	1,28	0,00	1,16	0,00	0,00	1,39	0,73	27,76
6	Hao 2	1,11	24,95	3,91	3,61	0,00	4,22	0,00	0,00	2,13	1,31	27,94
7	Hao 3	1,21	19,74	2,45	2,04	0,00	3,24	0,00	0,00	1,97	1,44	22,94
8	Hao 4	1,98	24,59	3,49	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	2,18	0,00	10,27
29	Manihi 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,68	0,00	0,00	27,27
30	Manihi 2	0,00	9,44	1,85	0,00	0,00	1,41	0,00	1,26	1,28	0,00	28,81
79	Rangiroa 1	2,65	34,48	9,89	0,00	0,00	1,30	0,00	0,00	3,22	1,47	5,09
80	Rangiroa 2	3,00	38,98	8,55	1,62	0,61	0,88	0,00	0,00	3,22	1,47	3,02
81	Rangiroa 3	2,03	28,62	5,12	4,94	0,99	0,00	0,00	0,00	3,43	1,39	7,26
82	Rangiroa 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,95
83	Rangiroa 5	2,08	21,08	4,91	1,81	0,36	0,75	0,00	0,00	2,53	1,12	11,81
84	Rangiroa 6	1,26	18,09	3,02	3,14	0,00	1,03	0,00	0,00	2,12	1,28	23,26
85	Rangiroa 1 b	2,70	26,98	5,64	1,11	0,00	0,00	0,00	5,90	2,25	1,05	2,90
86	Rangiroa 2 b	1,99	25,09	5,42	1,14	0,00	1,42	0,00	1,58	1,66	0,97	3,98
87	Rangiroa 3 b	1,80	28,21	6,91	1,50	0,64	0,61	0,00	2,20	1,72	1,03	1,95
88	Rangiroa 4 b	1,76	22,54	5,22	0,94	0,00	1,55	0,00	3,93	2,16	1,14	3,87
89	Rangiroa 5 b	2,02	23,74	7,36	1,08	0,00	1,79	0,00	1,19	1,67	0,72	2,66

Tableau 33 : Pourcentages relatifs des pics CLHP des échantillons de feuilles

Réf	Nom échantillon	Caloph	InB	InP	InF1	Pic 5	InF2	Pic 7	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
90	Rangiroa 6 b	1,10	10,68	3,39	0,53	0,00	0,17	0,00	6,11	2,01	0,44	11,07
91	Rangiroa 7	1,61	19,04	4,81	1,20	0,51	0,59	0,00	5,70	1,69	0,97	6,46
92	Rangiroa 8	0,98	15,32	4,42	3,26	1,40	2,77	0,00	1,46	1,46	0,96	10,34
93	Rangiroa 9	2,18	25,87	7,09	0,00	0,00	0,24	0,00	6,54	2,07	0,96	5,99
94	Rangiroa 10	1,83	24,26	7,43	1,60	0,00	1,70	0,00	4,11	2,43	1,16	6,92
13	Hiva Oa 1	4,70	5,05	21,54	1,26	0,00	1,46	0,00	0,00	3,83	1,60	10,32
14	Hiva Oa 2	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,39	0,00	0,00	46,59
15	Hiva Oa 3	1,60	0,00	6,49	0,37	0,00	0,00	0,00	1,16	1,02	0,51	50,22
16	Hiva Oa 4	4,70	0,00	4,61	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,00	50,01
17	Hiva Oa 5	2,28	0,00	8,67	0,66	0,00	0,70	0,00	1,34	1,64	0,65	40,62
18	Hiva Oa 6	3,13	0,00	18,16	0,74	0,00	1,29	0,00	2,54	1,99	1,09	23,88
19	Hiva Oa 7	1,69	0,00	5,54	0,47	0,00	0,00	0,00	1,23	0,75	0,51	39,43
20	Hiva Oa 8	2,73	0,00	4,88	0,88	0,00	1,80	0,00	0,96	1,53	0,70	36,15
21	Hiva Oa 9	3,50	1,41	16,68	0,34	0,00	1,13	0,00	2,36	2,26	0,91	2,39
22	Hiva Oa 10	2,00	20,61	5,97	1,17	0,00	0,50	0,00	1,21	1,54	0,84	17,02
23	Hiva Oa 11	3,00	1,37	16,13	0,45	0,00	0,40	0,00	2,57	2,78	1,27	14,43
24	Hiva Oa 12	4,54	1,29	16,77	0,00	0,00	0,00	0,00	3,30	2,43	0,92	6,52
25	Hiva Oa 13	0,98	0,00	3,68	0,00	0,00	0,00	0,00	4,24	0,87	0,00	26,78
26	Hiva Oa 14	4,32	1,18	16,99	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90	2,00	0,75	5,28
49	Motane 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,12	0,00	0,00	42,93
50	Motane 2	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,04	0,00	0,00	32,45
51	Motane 3	5,59	17,79	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	4,35	2,00	0,74	11,24
52	Motane 4	4,04	5,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,14	0,81	0,00	18,82
53	Motane 5	3,24	13,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,69	1,35	0,42	20,75
54	Motane 6	4,76	11,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,30	1,53	0,71	8,31
55	Nuku Hiva 1	3,20	1,66	12,21	1,54	0,00	0,83	0,00	0,00	2,96	0,97	29,68
56	Nuku Hiva 2	6,37	6,74	13,30	1,01	0,00	0,99	0,00	0,00	3,19	1,17	9,36
57	Nuku Hiva 3	5,91	7,21	12,13	0,49	1,10	1,18	0,00	0,00	2,95	1,15	8,92
58	Nuku Hiva 4	1,00	2,32	0,00	0,31	0,00	0,27	0,00	0,00	1,20	0,60	60,15
59	Nuku Hiva 5	3,21	6,14	10,28	0,63	1,28	1,20	0,00	0,00	3,34	1,25	25,63
60	Nuku Hiva 6	2,42	3,76	3,01	1,01	1,32	1,51	0,00	0,00	3,20	1,32	31,73
61	Nuku Hiva 7	2,97	3,92	2,94	0,85	1,06	1,34	0,00	0,00	3,77	1,34	28,41
62	Nuku Hiva 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	69,56
63	Nuku Hiva 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	77,90
64	Nuku Hiva 10	1,94	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32	0,25	42,28
65	Nuku Hiva 11	5,19	0,00	15,35	1,02	0,00	0,77	0,00	0,00	3,49	1,16	12,86
66	Nuku Hiva 12	6,19	0,00	19,65	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00	3,41	1,36	13,12
67	Nuku Hiva 13	5,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,80	1,57	29,22
116	Tahuata 1	2,62	0,60	7,46	0,53	0,00	0,00	0,00	3,24	0,99	0,51	11,03
117	Tahuata 2	1,63	0,52	6,06	1,06	0,00	0,00	0,00	5,18	1,63	0,58	23,49
118	Tahuata 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00	0,00	30,81
119	Tahuata 4	1,09	0,00	2,91	0,00	0,00	0,00	0,00	8,27	0,83	0,25	29,21
120	Tahuata 5	0,64	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	4,89	0,55	0,00	24,99
121	Tahuata 6	1,19	0,21	2,48	0,27	0,00	0,00	0,00	2,66	0,48	0,21	34,20
122	Tahuata 7	0,30	0,00	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00	1,72	0,46	0,00	51,40
123	Tahuata 8	0,10	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	2,99	0,00	0,00	40,50
124	Tahuata 9	0,91	0,10	2,39	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42	0,77	0,00	32,08
125	Tahuata 10	0,94	0,30	2,01	0,00	0,00	0,00	0,00	2,71	0,89	0,00	28,23
140	Ua Huka 1	4,77	5,81	13,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,20	1,09	11,16
141	Ua Huka 2	3,07	4,95	8,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,40	1,27	26,88
142	Ua Huka 3	1,62	1,98	3,62	0,00	0,00	0,00	0,00	1,69	0,81	0,20	40,57
143	Ua Huka 4	4,29	3,89	11,24	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	1,94	0,82	15,30
75	Raivavae 1	2,07	0,00	0,00	1,09	0,00	0,79	0,00	0,00	2,54	1,34	36,82
76	Raivavae 2	1,90	2,33	0,87	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	3,90	0,00	11,70
77	Raivavae 3	1,79	22,88	2,25	1,39	0,00	0,34	0,00	0,00	2,28	1,16	18,23
78	Raivavae 4	2,73	9,24	2,72	0,38	0,00	0,47	0,00	0,00	3,15	1,09	15,50
95	Rurutu 1	2,10	37,44	0,00	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,68	3,28
96	Rurutu 2	1,66	21,15	4,10	0,49	0,10	0,00	0,00	4,64	1,54	0,69	9,75
97	Rurutu 3	1,68	25,70	5,95	0,81	0,33	0,00	0,00	2,08	1,30	0,65	5,28
98	Rurutu 4	1,92	30,46	6,84	1,33	0,00	0,61	0,00	0,49	2,38	0,99	14,20
99	Rurutu 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,83	0,00	0,00	36,83
137	Tubuai 1	1,95	22,63	3,84	1,82	0,47	1,71	0,00	0,00	2,54	1,41	20,01
138	Tubuai 2	7,45	8,76	21,84	0,69	0,35	0,00	0,00	1,57	3,18	1,09	1,66
139	Tubuai 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,00	0,00	0,00	40,86
27	Mangareva 1	6,37	16,31	10,04	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	2,36	0,00	8,43
28	Mangareva 2	4,81	3,41	2,97	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	2,27	0,00	13,12
4	Fiji Viti Levu	2,87	0,93	7,95	0,00	0,00	0,00	0,00	6,14	1,42	0,26	36,75
9	Hawaii Big Island 1	3,28	3,88	27,95	0,99	0,00	0,79	0,00	0,00	4,57	1,99	6,68
10	Hawaii Maui 1	0,00	0,00	4,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,21	0,00	20,22
11	Hawaii Oahu 1	7,37	4,58	21,16	2,97	0,00	2,01	0,00	0,00	4,34	1,70	5,82
12	Hawaii Oahu 2	2,61	0,50	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,20	5,72	17,21
Moyenne		1,93	9,45	4,58	0,81	0,22	0,80	0,02	1,75	1,66	0,69	21,11
Ecart Type		1,70	10,51	5,44	1,02	0,44	1,13	0,14	2,11	1,26	0,74	15,22

Tableau 33 : Pourcentages relatifs des pics CLHP des échantillons de feuilles

ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET DE LA BIODIVERSITE
DU CALOPHYLLUM INOPHYLLUM DE POLYNESIE FRANCAISE

IV.2.2. Analyses statistiques des données obtenues

Remarque : Nous avons dans un premier temps pensé ajouter au tableau des données une colonne regroupant les rendements d'extraction des feuilles de Tamanu (masse d'extrait obtenu divisé par la masse de feuilles sèches extraites). Cependant cette variable ne fournit pas d'information supplémentaire significative. En effet, les ACP sont très voisines avec ou sans cette variable, et les AFD sont tantôt légèrement améliorées, tantôt légèrement moins bonnes lorsqu'on ajoute cette variable aux 11 autres correspondant aux aires des pics de CLHP. Nous avons donc décidé de ne pas incorporer cette variable à nos calculs.

Lors de la première ACP qui est effectuée sur l'ensemble du tableau de données (tous les échantillons, toutes les variables), le logiciel calcule toutes les corrélations qui existent entre les différentes variables que nous avons sélectionnées pour décrire les échantillons bruts de feuilles de Tamanu récoltés. On peut alors s'apercevoir que les 11 variables sont plus ou moins corrélées entre elles ; le coefficient de corrélation le plus élevé (0,759) est observé entre la variable 'Pic 10' et la variable 'InC'. Cependant cette valeur n'est pas assez proche de 1 ou de -1 (cas où deux variables ne sont pas indépendantes) pour que nous éliminions l'une ou l'autre de ces deux variables, chacune apportant une information légèrement différente de l'autre.

Matrice de corrélation :

	Caloph	InB	InP	InF1	Pic 5	InF2	Pic 7	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Calo	1	0,163	0,681	0,125	0,070	0,068	0,008	-0,258	0,688	0,464	-0,444
InB	0,163	1	0,107	0,543	0,352	0,424	0,159	-0,175	0,391	0,363	-0,589
InP	0,681	0,107	1	0,164	0,020	0,106	-0,024	-0,174	0,586	0,390	-0,425
InF1	0,125	0,543	0,164	1	0,681	0,752	0,242	-0,367	0,362	0,335	-0,309
InG1	0,070	0,352	0,020	0,681	1	0,681	0,401	-0,294	0,279	0,236	-0,249
InF2	0,068	0,424	0,106	0,752	0,681	1	0,379	-0,349	0,274	0,235	-0,229
InG2	0,008	0,159	-0,024	0,242	0,401	0,379	1	-0,079	0,045	0,039	-0,065
Pic 8	-0,258	-0,175	-0,174	-0,367	-0,294	-0,349	-0,079	1	-0,404	-0,324	-0,005
InC	0,688	0,391	0,586	0,362	0,279	0,274	0,045	-0,404	1	0,759	-0,561
Pic 10	0,464	0,363	0,390	0,335	0,236	0,235	0,039	-0,324	0,759	1	-0,452
Pic 11	-0,444	-0,589	-0,425	-0,309	-0,249	-0,229	-0,065	-0,005	-0,561	-0,452	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,050$ (test bilatéral)

Tableau 34 : Corrélations entre les variables décrivant les échantillons de feuilles

Dans toute la suite des analyses statistiques que nous mènerons sur ces données relatives aux échantillons de feuilles de Tamanu, nous utiliserons donc toujours ces 11 variables pour décrire les différences et les similitudes qui existent entre les 143 échantillons disponibles.

La première analyse statistique effectuée est donc une analyse en composantes principales (ACP avec rotation Varimax des coordonnées des variables et des individus), qui va nous permettre de savoir s'il existe, sans émettre aucun a priori, certains regroupements possibles entre les 143 échantillons analysés.

Après avoir calculé les coefficients de corrélation entre les variables, le logiciel détermine la meilleure base orthonormée possible pour séparer tous les individus ; Les axes normés et perpendiculaires de la base sont alors les meilleures combinaisons linéaires des 11 variables qui existent pour séparer le plus significativement possible tous les individus. Les coefficients attribués aux différentes variables pour former chaque axe F_x peuvent être placés sur un graphe comme celui-ci :

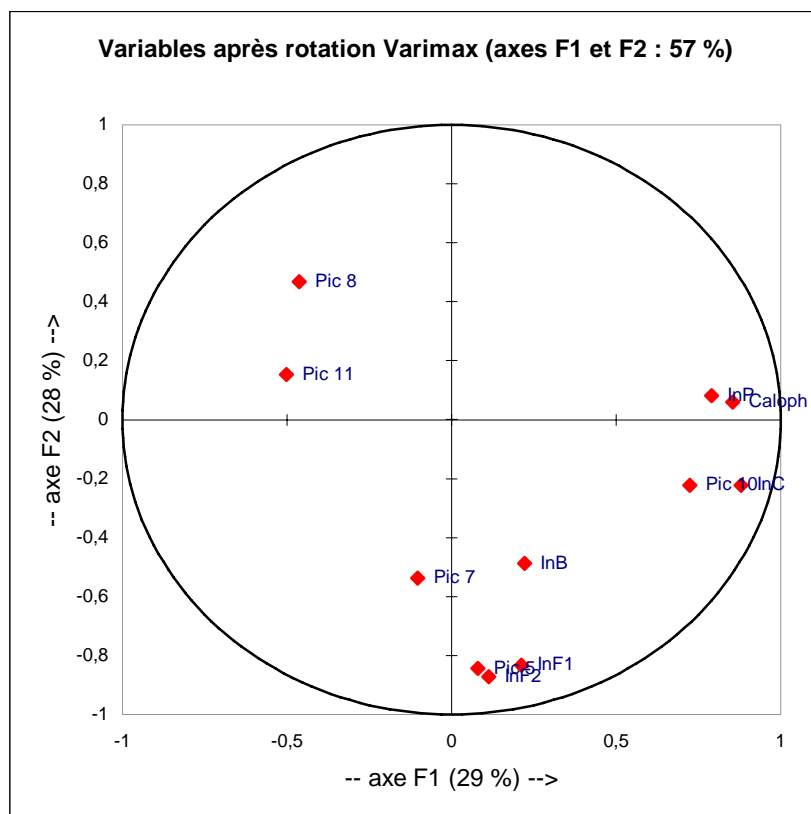


Figure 71 : Répartition des variables des feuilles selon les axes F1 et F2 (ACP)

Cette représentation nous montre quelles sont les variables qui ont le poids le plus important selon l'axe F1 et l'axe F2 : selon F1, les variables 'InP', 'Caloph', 'Pic 10' et 'InC' ont de fortes contributions positives, alors que les variables 'pic 8' et 'pic 11' ont une importante contribution négative ; selon l'axe F2, c'est la variable 'pic 8' qui a la plus forte contribution positive, alors que ce sont les variables 'Pic 5', 'InF1' et 'InF2', et dans une moindre mesure les variables 'Pic 7' et 'InB', qui ont les contributions négatives les plus fortes.

Remarque : ce type de graphique est utile pour savoir quelles sont les variables qui influencent le plus la discrimination des individus. Mais il ne faut pas s'y tromper : un individu qui serait situé dans la même zone du plan que le coefficient d'une variable ne possède pas pour autant une valeur importante pour cette variable.

Pour la représentation des individus, nous faisons l'hypothèse triviale que les échantillons peuvent être classés selon leur appartenance à un archipel de Polynésie (les échantillons « étrangers » constitueront un groupe à part). Nous avons alors placé les individus selon leurs coordonnées sur les 3 axes majeurs déterminés par le logiciel (F1, F2 et F3), et avec pour étiquettes leur archipel de provenance. Les résultats sont présentés ci-après, aux [Figures 72](#), [73](#) et [74](#).

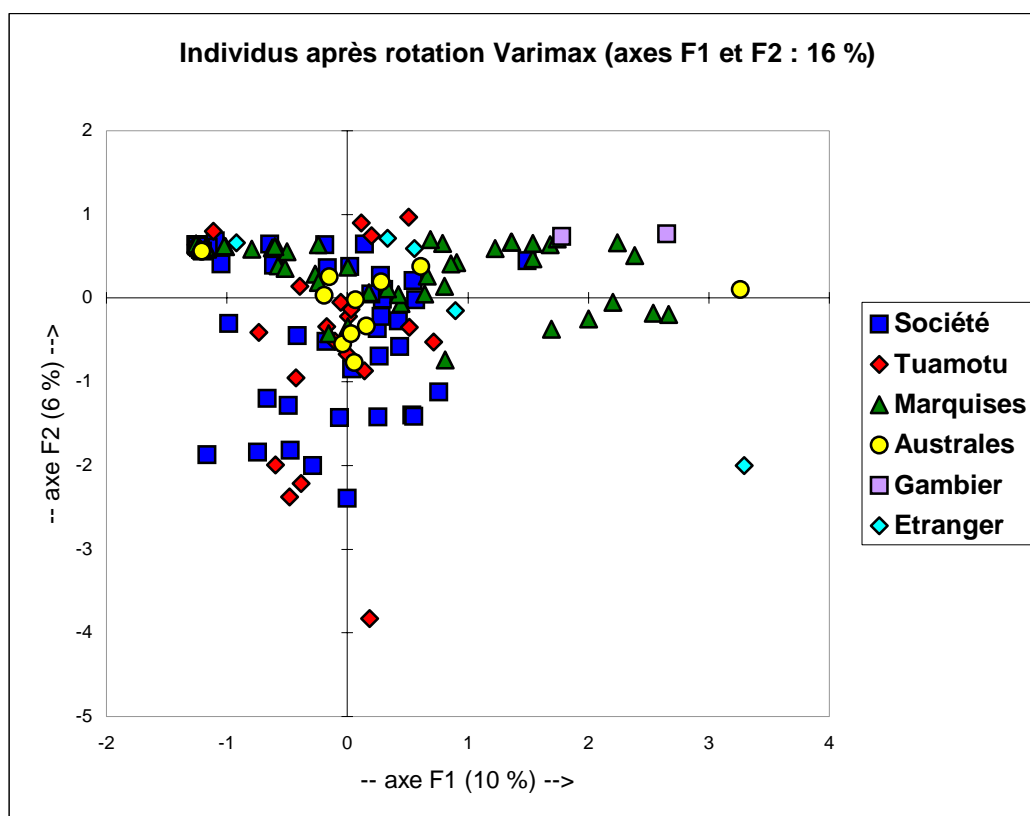


Figure 72 : ACP n°1 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel

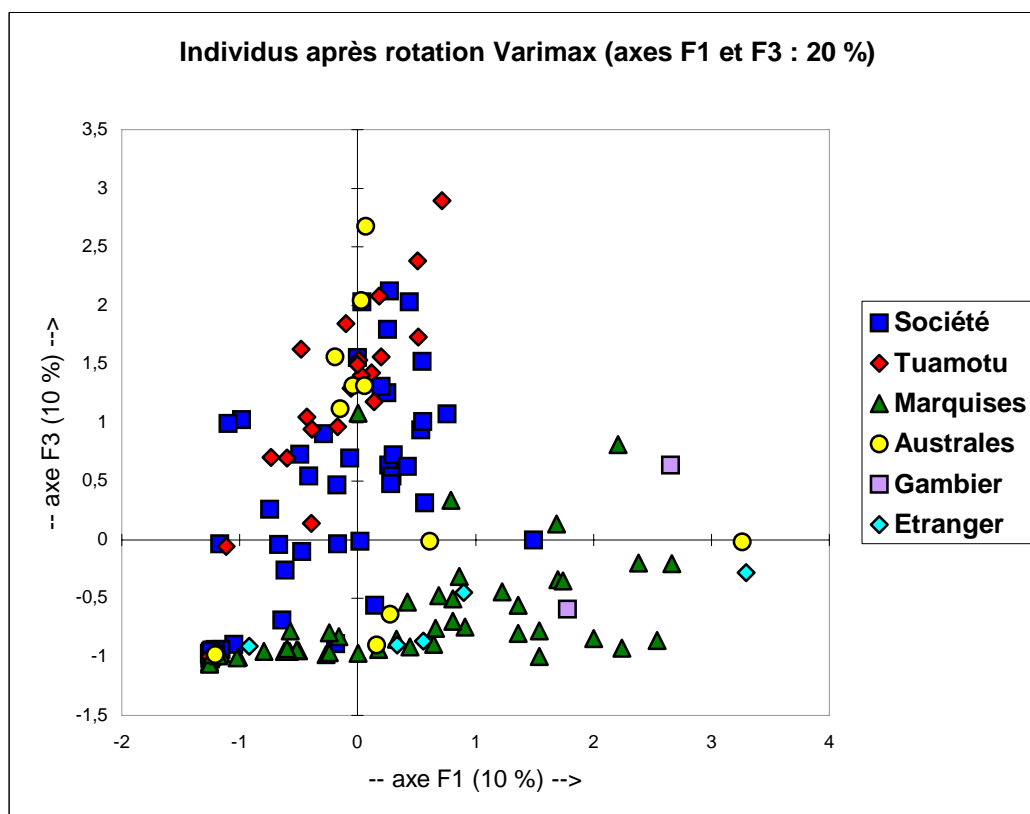


Figure 73 : ACP n°2 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel

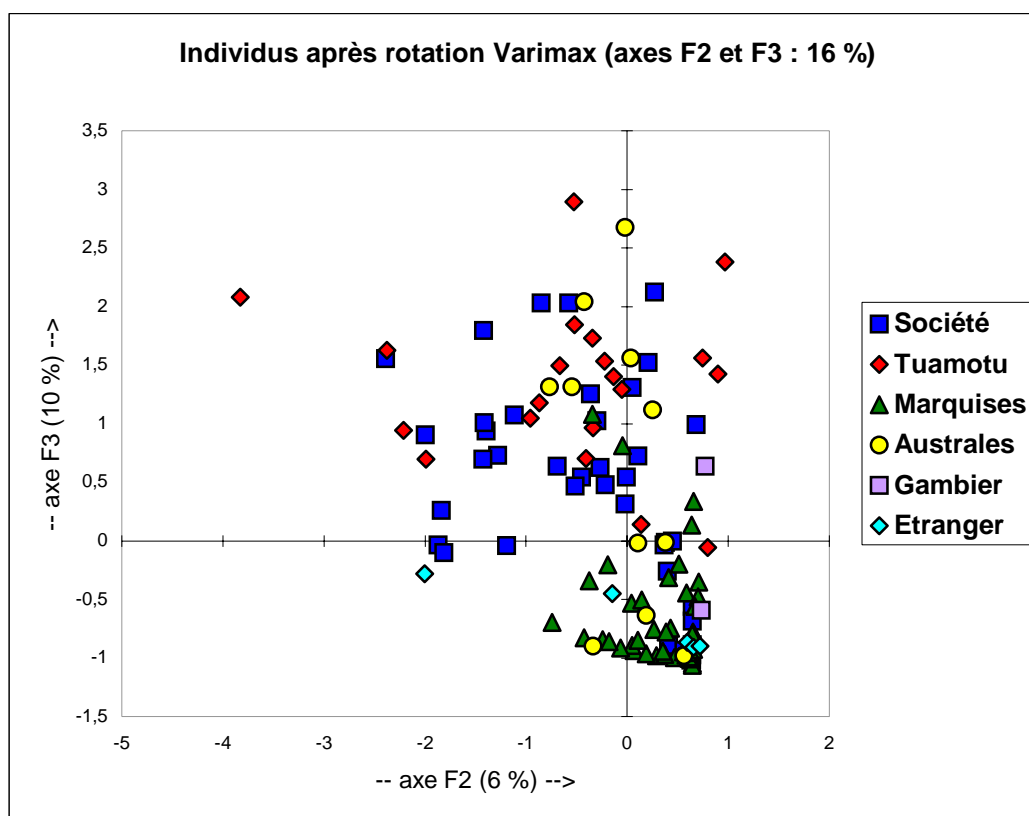


Figure 74 : ACP n°3 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel

La [Figure 72](#) fait clairement apparaître un regroupement des individus provenant de l'archipel des Marquises selon l'axe F1, alors que les autres individus des archipels de la Société, des Tuamotu, des Australes, et « étrangers », sont éparpillés autour du centre du graphique. Les individus des Gambier (seulement 2) sont quant à eux bien groupés, loin du centre. Deux groupes sont donc ici mis en évidence : un groupe avec les individus des Marquises, et un groupe avec les individus des Gambier.

La [Figure 73](#) confirme les deux groupes mis en évidence précédemment, qui sont toujours disposés selon l'axe F1. Par contre, on voit nettement apparaître le groupe constitué des individus des Tuamotu, qui s'étalent le long de l'axe F3, et se séparent ainsi des individus de la Société, restés au centre, et qui constituent alors eux aussi un nouveau groupe. Les choses sont moins évidentes concernant les individus « étrangers » et des Australes, plus dispersés.

La [Figure 74](#) montre un regroupement très serré des individus des Marquises, qui se distinguent vraiment des autres groupes, moins homogènes.

Tout ceci nous montre que, comme nous le supposions, les archipels de Polynésie dont proviennent les échantillons de feuilles de Tamanu constituent bien des groupes d'individus ayant un certain nombre de points communs. Seul l'archipel des Australes semble ne pas constituer un groupe d'individus proches.

Pour les analyses factorielles discriminantes qui suivent, nous avons éliminé du tableau de données les 2 échantillons des Gambier qui ne permettent pas d'obtenir des AFD significatives (minimum de 3 échantillons par groupe) ainsi que les échantillons « étrangers » qui ne constituent pas un groupe homogène, ni par leur provenance ni par les résultats des analyses CLHP. Par contre, le groupe des Australes est conservé pour approfondir l'analyse des individus de Polynésie.

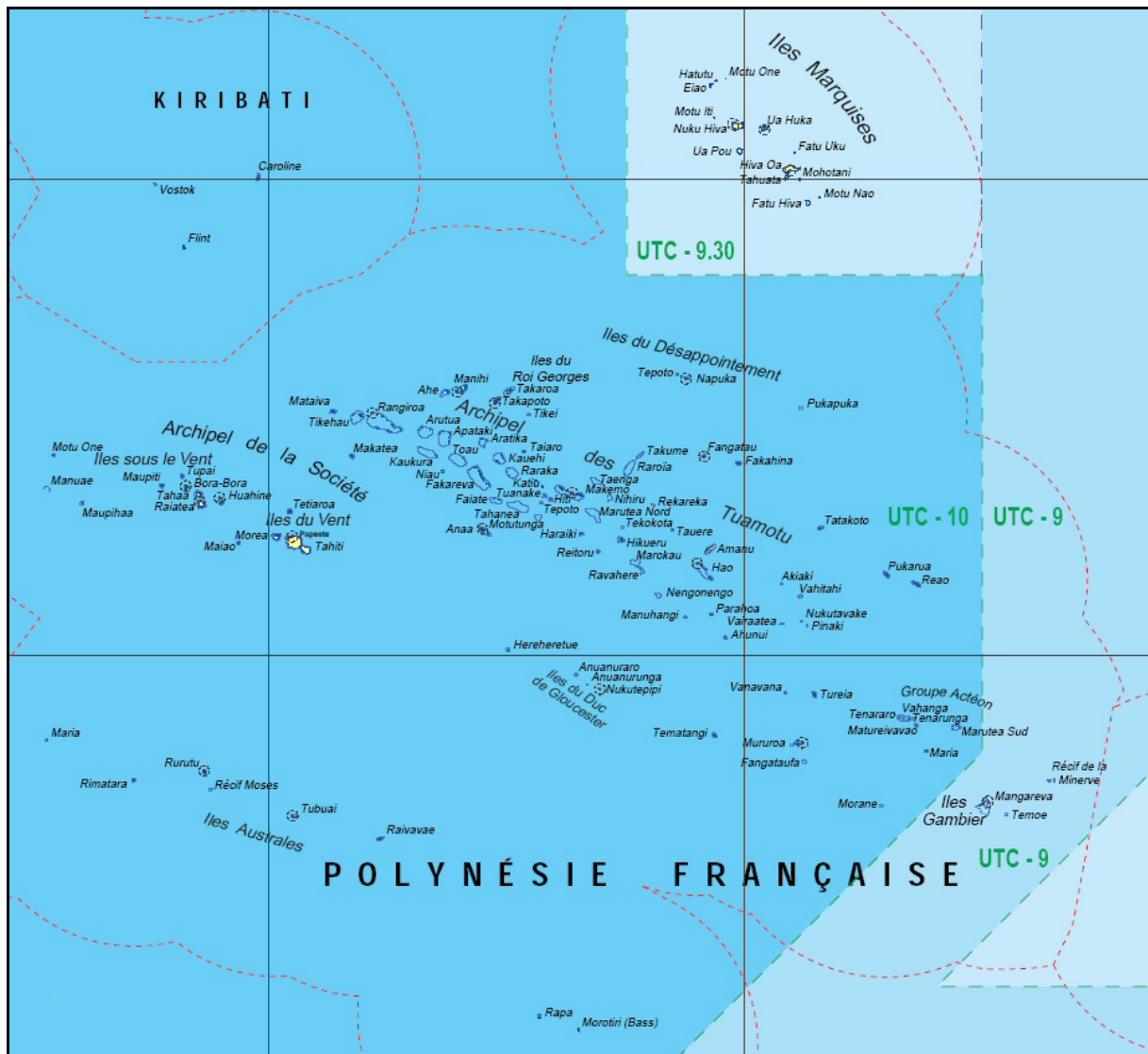


Figure 75 : Carte des 5 archipels de Polynésie française

Nous effectuons donc une AFD sur tous les individus de Polynésie française compris dans un des 4 groupes que constituent les archipels de la Société, des Marquises, des Tuamotu, et des Australes. Ce qui fait une analyse qui porte sur 136 échantillons et 11 variables explicatives.

Seuls 3 axes permettent de discriminer au mieux les 4 groupes formés, et de rassembler au mieux les individus au sein d'un même groupe. F1, F2 et F3 sont les combinaisons linéaires optimales des 11 variables explicatives retenues (leurs contributions sont toutes du même ordre comme le montre la [Figure 76](#)). On affecte alors ses coordonnées dans le système d'axes perpendiculaires de centre O (O, F1, F2, F3) à chaque individu.

Le meilleur résultat est obtenu dans le plan (O, F1, F2) qui explique à lui seul 98 % de la séparation des 4 groupes (75 % selon F1 et 23 % selon F2). Ce plan est représenté [Figure 77](#). Les 3 groupes archipel de la Société, archipel des Marquises et archipel des Tuamotu se séparent de façon très nette, sans ambiguïté aucune. Par contre, le groupe archipel des Australes apparaît encore très hétérogène (comme dans l'ACP précédente), car ses individus sont très dispersés dans ce plan (O, F1, F2), au sein des individus des groupes des Marquises et des Tuamotu. Nous verrons plus loin que nous pourrions trouver une explication à cette hétérogénéité.

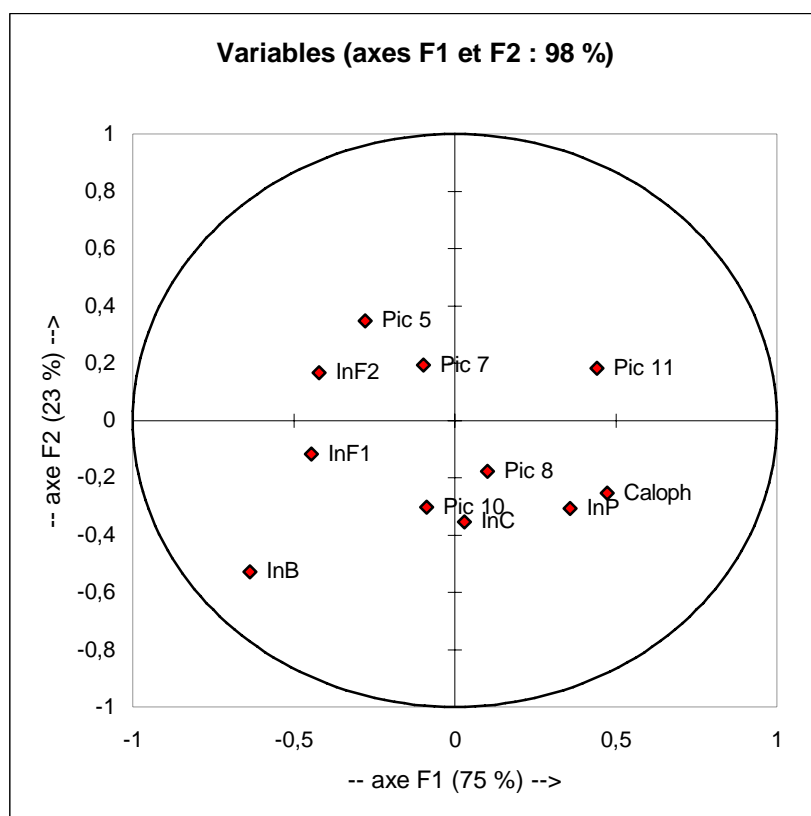


Figure 76 : Répartition des variables des feuilles selon les axes F1 et F2 (AFD)

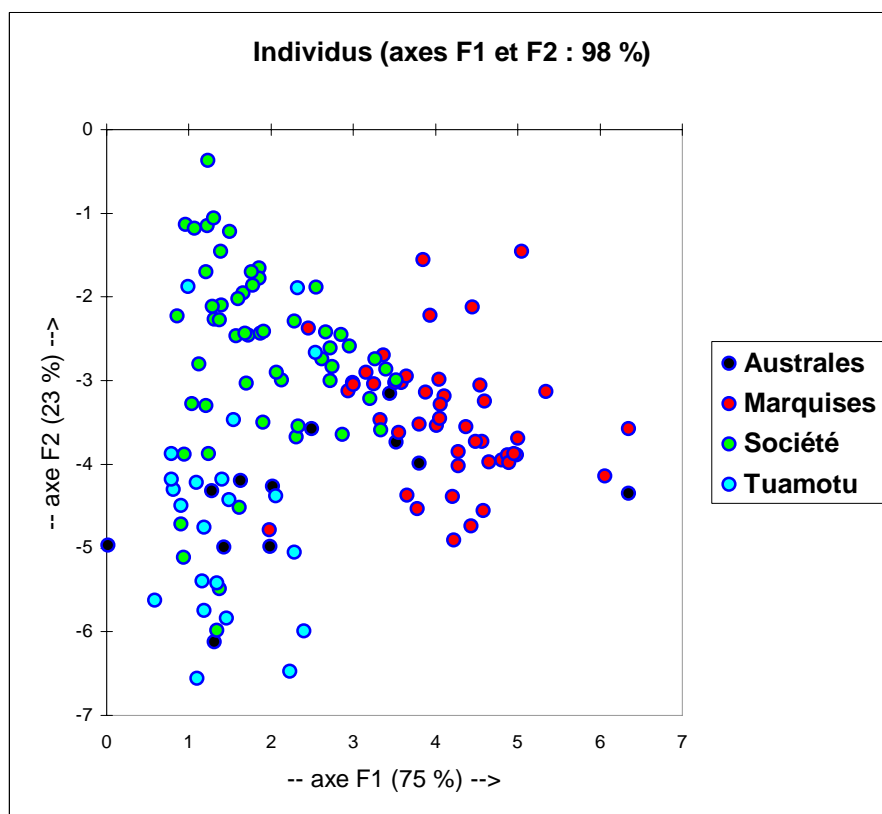


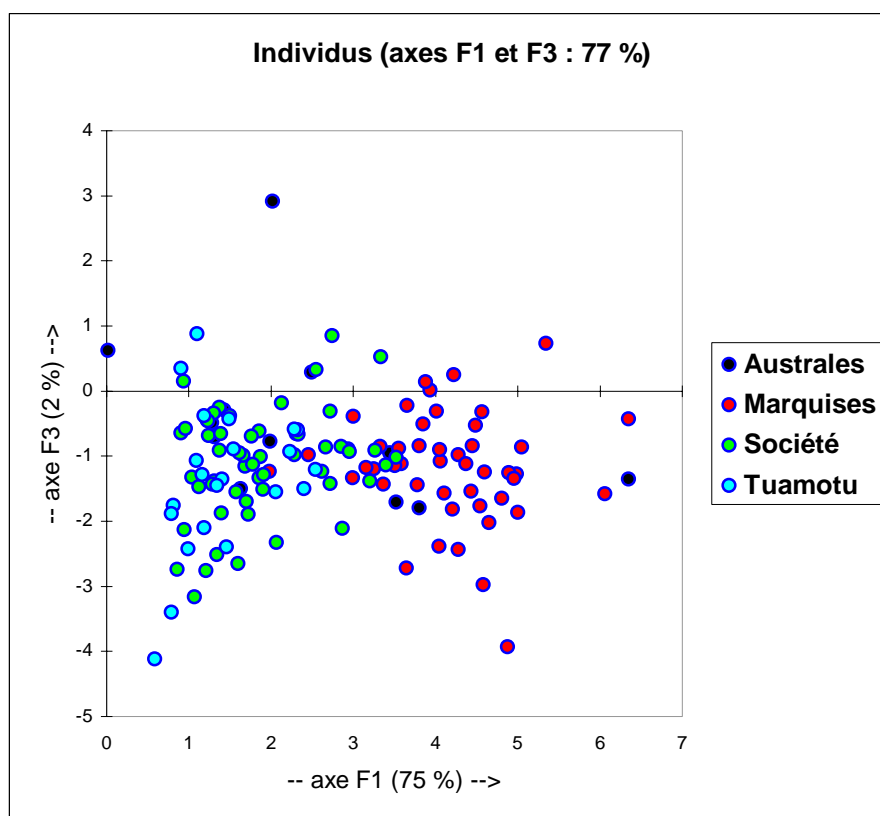
Figure 77 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel

La distribution des individus dans le plan perpendiculaire (O, F1, F3) est représentée à la [Figure 78](#). Ce plan n'apporte que 2 % d'informations supplémentaires selon l'axe F3.

Cette fois, seul le groupe des Marquises est bien séparé des autres individus. Les individus des groupes de la Société et des Tuamotu sont mélangés entre eux, alors que les individus du groupe des Australes sont éparpillés dans tout le plan.

Les représentations de ces deux plans perpendiculaires [(O, F1, F2) \perp (O, F1, F3)] nous permettent de nous imaginer les individus dans l'espace à 3 dimensions défini par les 3 axes F1, F2 et F3. On se rend alors compte que les archipels de la Société, des Marquises et des Tuamotu forment bien 3 groupes « chimiques » distincts d'individus. Ce qui n'est pas le cas pour l'archipel des Australes.

Même si ces 2 plans suffisent pour représenter 100 % des informations fournies par l'analyse, on peut tout de même montrer la position des individus dans le dernier plan (O, F2, F3) qui est représenté [Figure 79](#).



[Figure 78](#) : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel

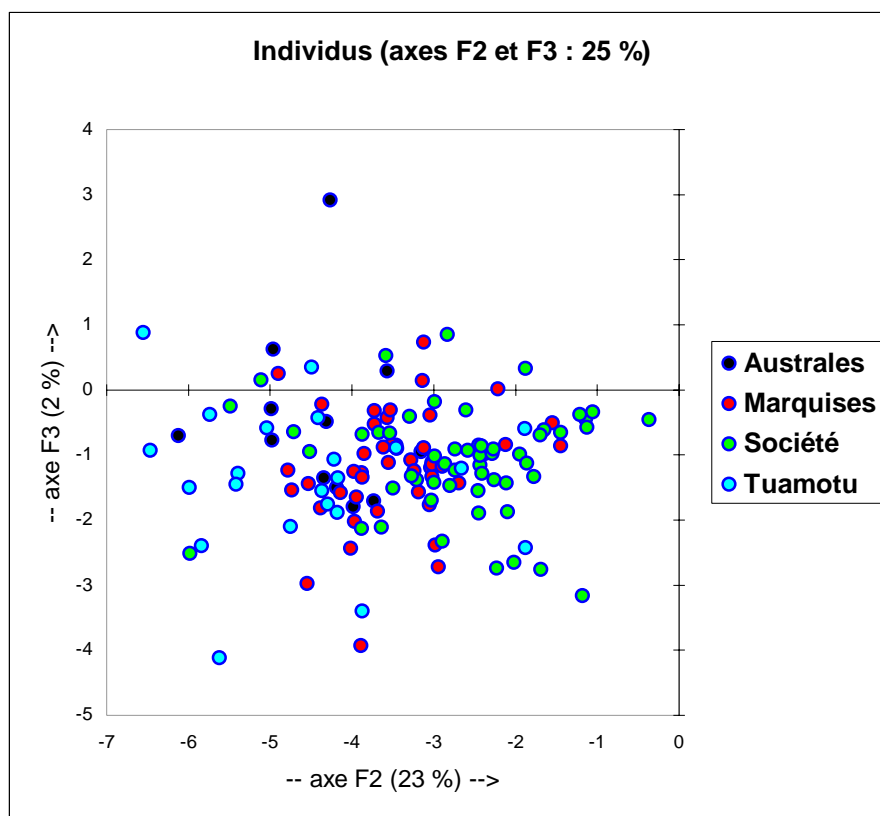


Figure 79 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel

Une fois mis en évidence trois groupes bien distincts d'individus de Tamanu qui correspondent à leur archipel d'origine, on peut se demander si, de la même façon, des différences existent entre des individus provenant d'îles d'un même archipel, et par conséquent s'il existe des similitudes entre des individus d'une même île.

Commençons par l'archipel comptant le plus grand nombre d'individus : celui de la Société, qui en compte 55. On réalise une AFD sur ces 55 individus, avec comme variable dépendante leur île d'origine, et comme variables explicatives les mêmes 11 variables issues de la CLHP.

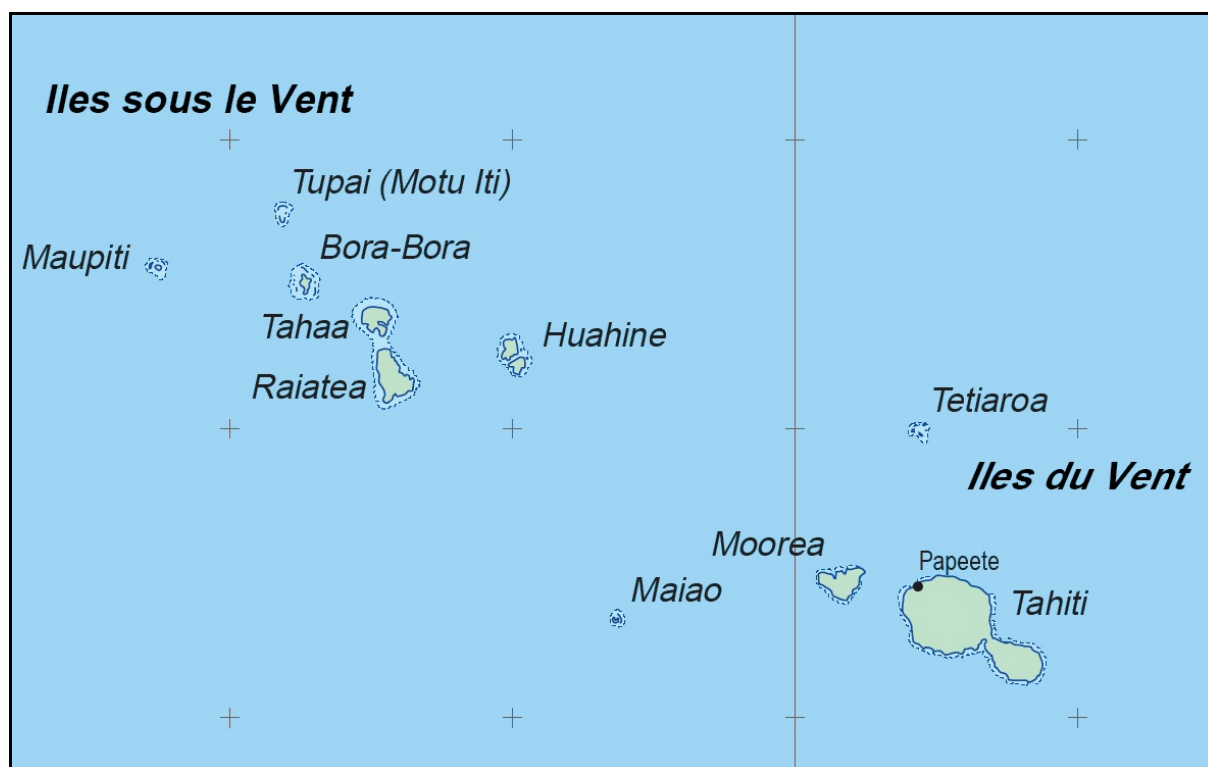


Figure 80 : Carte des îles de l'archipel de la Société

Le nombre d'axes optimaux pour expliquer les regroupements par île et les différences entre les îles est cette fois supérieur à 3, mais nous ne visualiserons que les 3 premiers, qui regroupent à eux seuls 78 % des informations (33 % pour F1, 26 % pour F2 et 19 % pour F3). La **Figure 81** nous montre les 55 individus dans le plan (O, F1, F2).

On remarque que les individus se regroupent assez bien selon leur île d'origine. Mais on remarque aussi une séparation des individus dans deux groupes plus vastes : les îles du vent que sont Tahiti, Moorea et Tetiaroa apparaissent vers le haut du graphique, avec une coordonnée selon F2 proche de zéro, alors que les îles sous le vent apparaissent vers le bas du graphique, avec une coordonnée selon F2 négative. Les individus de Tetiaroa sont plus dispersés que les autres, et semblent se scinder en deux groupes : un proche de Tahiti et un proche de Maupiti. Ceux de Moorea sont également répartis en deux groupes : un qui se rapproche des îles sous le vent, et un bien distinct de toutes les autres îles. Les échantillons de Tahaa sont proches de ceux de Tahiti, alors que les échantillons des autres îles sous le vent sont bien regroupés (Maupiti, Bora Bora, Raiatea).

On peut dire qu'une séparation des individus de l'archipel de la Société en fonction de leur île d'origine semble fondée, mais que cette séparation est moins nette que celle qui existe entre les individus des 4 archipels qui ont fait l'objet de la première AFD. Autrement dit, pour la Société, les différences qui existent entre les individus provenant d'îles différentes ne remettent pas en cause l'unité mise en évidence entre tous les individus de l'archipel au sein de celui-ci.

La **Figure 82** montre les individus de la Société dans le plan (O, F1, F3). Les observations sont à peu près les mêmes que précédemment, mis à part la séparation entre les îles du vent et les îles sous le vent qui ne se fait plus de manière évidente (cette séparation est principalement mise en évidence par l'axe F2). La séparation des individus par île reste significative, même si elle n'est pas exceptionnelle.

Il en est de même dans le plan (O, F2, F3) : **Figure 83**.

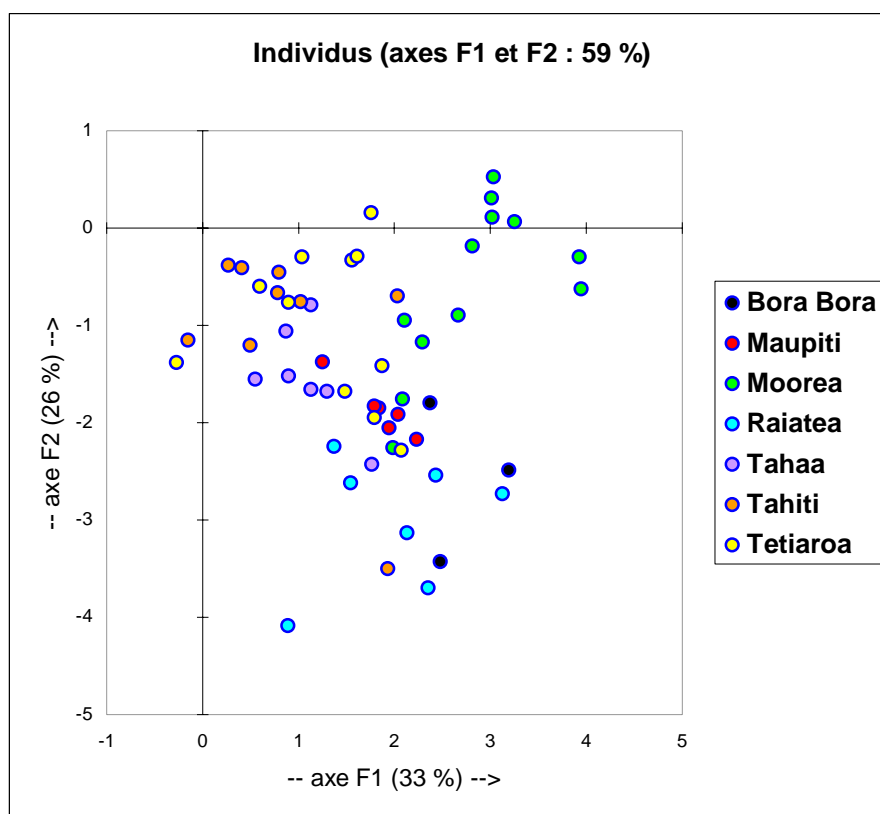


Figure 81 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île

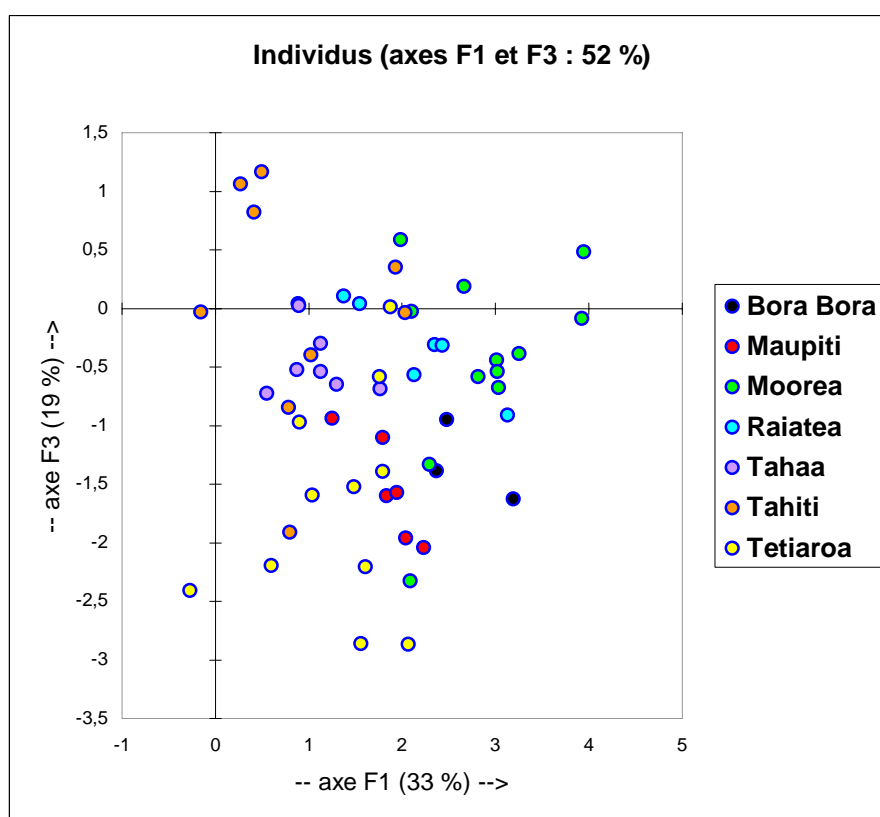


Figure 82 : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île

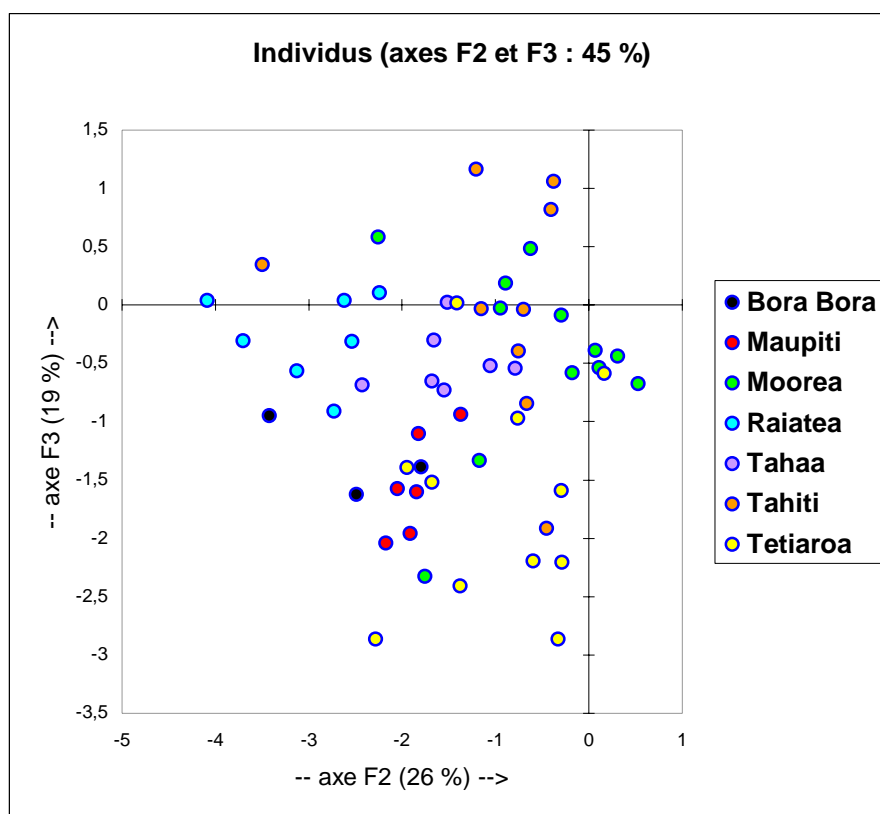


Figure 83 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île

Nous pouvons procéder de la même manière avec les individus des Tuamotu.

Toutefois, nous n'avons que deux échantillons provenant de l'île de Manihi, ce qui n'est pas suffisant pour obtenir des résultats significatifs. Nous ferons donc une AFD avec d'un côté les échantillons de Rangiroa, représentant les Tuamotu du Nord-Ouest, et de l'autre les échantillons de Hao, représentant les Tuamotu du Sud-Est (**Figure 84**).

Les échantillons seront donc répartis sur une droite et non plus un plan, puisque l'analyse ne comprend que deux groupes d'individus.

La séparation est ici très nette, les individus de Rangiroa étant regroupés entre -2 et 0, alors que ceux de Hao le sont entre -6 et -4 (**Figure 85**).

Cette différence très nette entre les individus des deux îles peut s'expliquer par leur éloignement géographique très important au sein d'un archipel très vaste.

La séparation par île semble donc meilleure au sein des Tuamotu qu'au sein de la Société, sans pour autant empêcher une unité importante entre les individus de tout l'archipel des Tuamotu, unité mise en évidence par la première AFD réalisée.

Cependant, pour valider ce résultat, il faudrait échantillonner d'autres arbres dans d'autres îles des Tuamotu, car nous ne pouvons nous satisfaire d'un échantillonnage sur uniquement deux îles ; l'analyse effectuée est malgré tout une première investigation prometteuse.

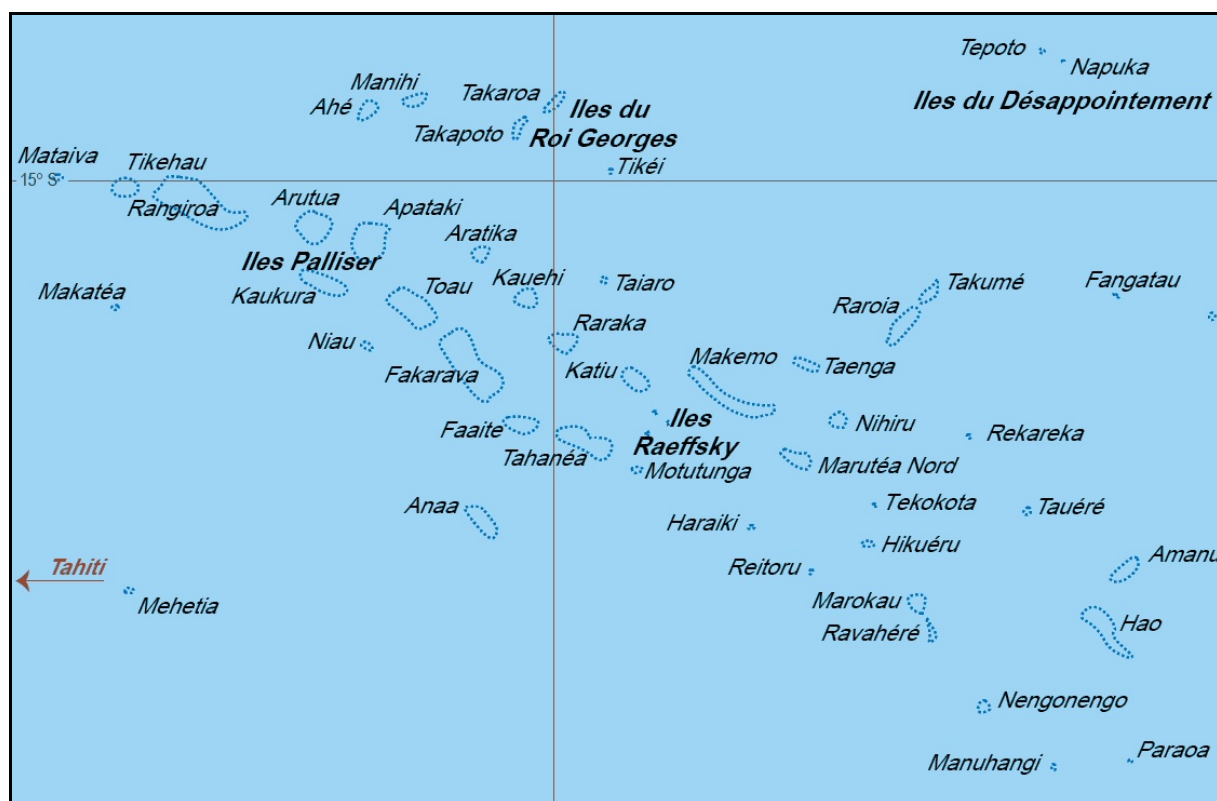


Figure 84 : Carte des îles de l'archipel des Tuamotu

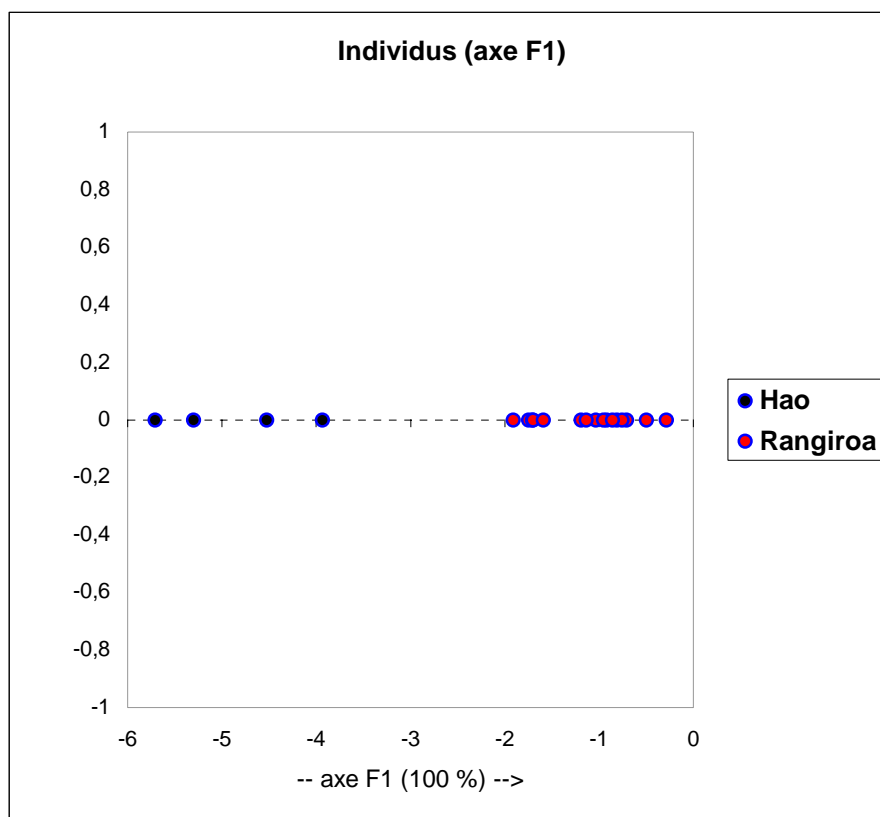


Figure 85 : AFD sur les échantillons de feuilles des Tuamotu classés par île

En ce qui concerne l'archipel des Marquises, il comprend 47 échantillons provenant de 5 îles différentes. Deux de ces îles font partie des Marquises Nord-Ouest (Nuku Hiva et Ua Huka) et trois font partie des Marquises Sud-Est (Hiva Oa, Tahuata, Motane).



Figure 86 : Carte des îles de l'archipel des Marquises

Cette séparation Nord-Ouest / Sud-Est se voit bien à la [Figure 87](#) dans le plan (O, F1, F2), où les individus des Marquises Sud-Est restent au voisinage de zéro selon l'axe F1, alors que les individus des Marquises Nord-Ouest ont une coordonnée selon ce même axe compris entre 2 et 4. Les individus de l'île de Hiva Oa font en quelque sorte la jonction entre les îles du Nord-Ouest et du Sud-Est, puisqu'ils sont situés selon l'axe F1 entre 0 et 4.

Par ailleurs, les échantillons de chaque île sont bien groupés, et montrent donc une certaine spécificité propre qui les caractérise.

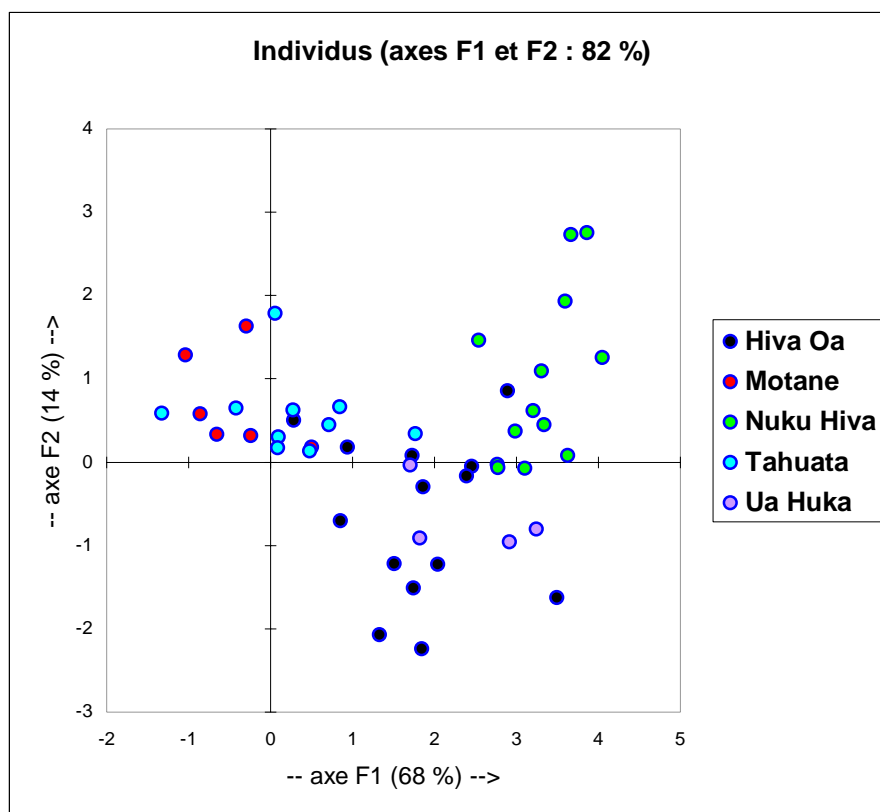


Figure 87 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île

Les **Figures 88** et **89** qui présentent les plans (O, F1, F3) et (O, F2, F3) confirment les observations précédentes, et valident la forte spécificité « chimique » des Tamanu poussant dans chacune des îles échantillonnées. Les similitudes « chimiques » observées sont d'autant plus grandes que les îles sont proches géographiquement, comme on pouvait le supposer a priori.

Ce qui n'empêche pas, encore une fois, qu'il y ait une unité entre tous les individus de l'archipel des Marquises, ce que l'on a montré plus haut.

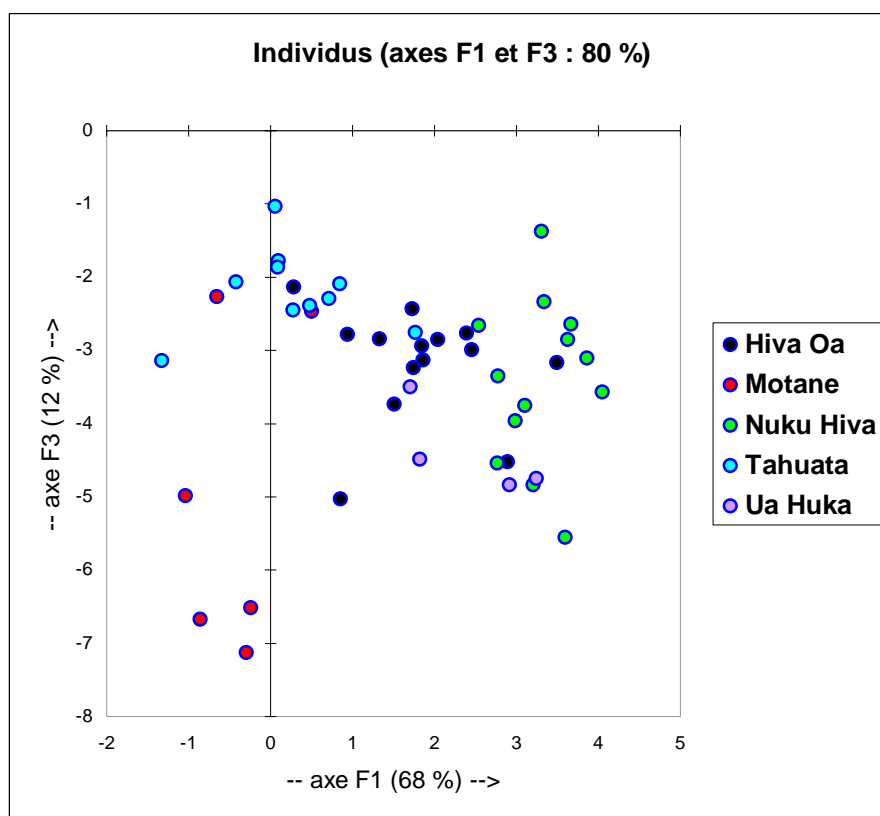


Figure 88 : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île

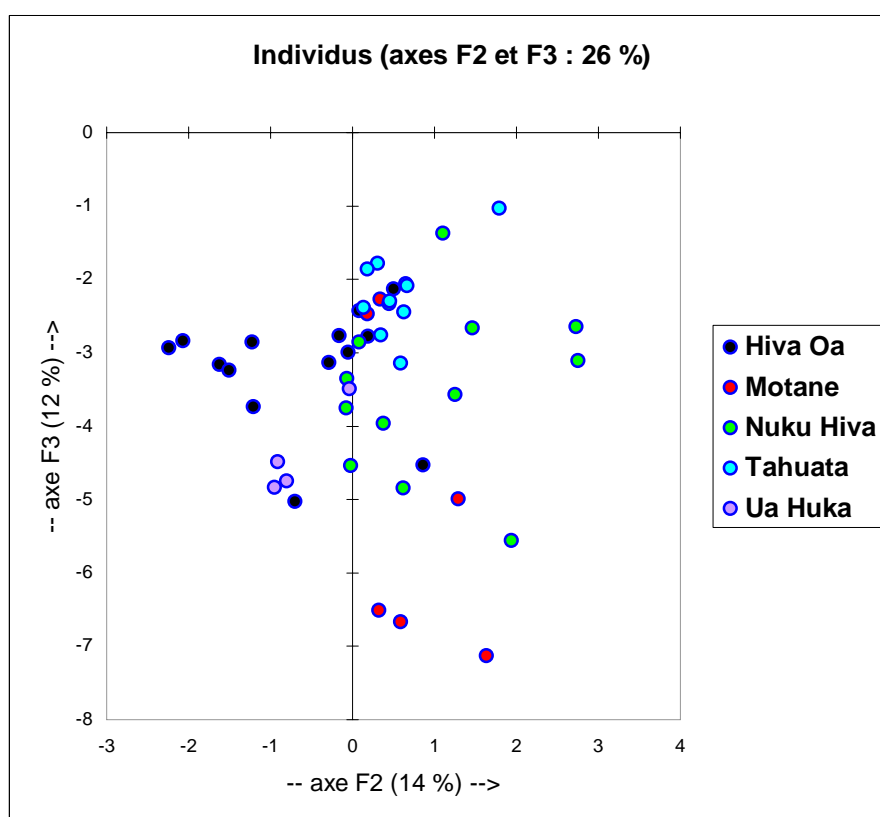


Figure 89 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île

Voyons pour finir le cas des individus des îles Australes, qui, on l'a vu, ne semblaient pas avoir de liens importants les uns avec les autres, comparé aux individus des autres archipels. Nous disposons de 12 échantillons répartis en 3 îles : Rurutu, Tubuai, et Raivavae.

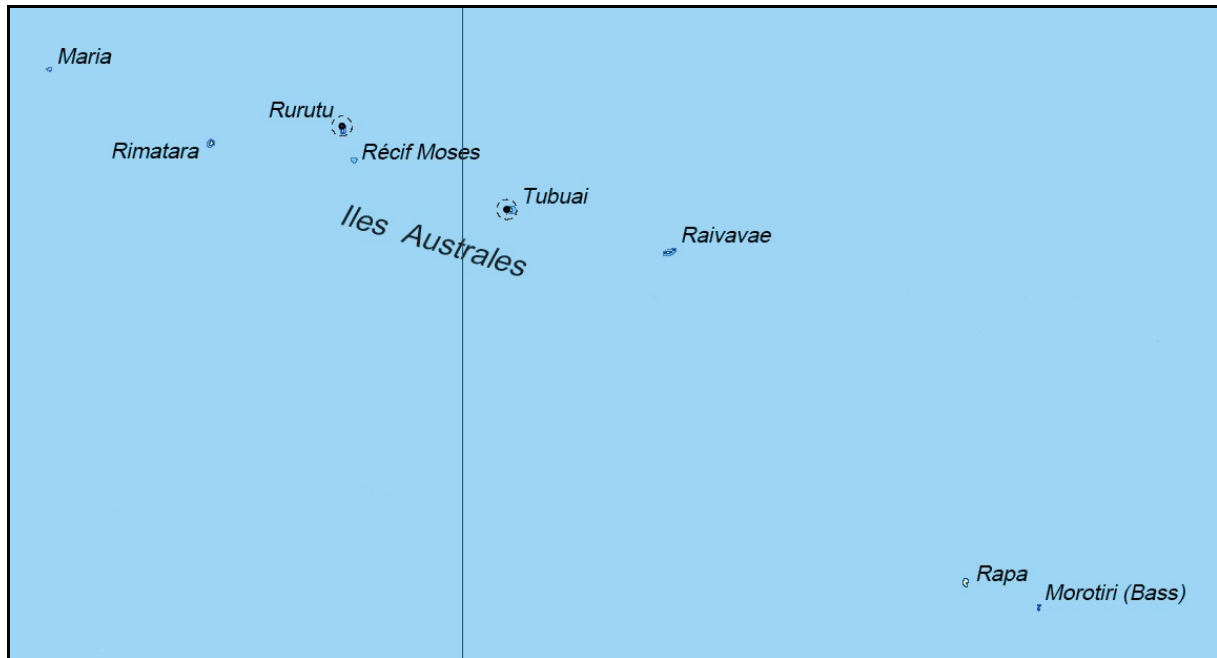


Figure 90 : Carte des îles de l'archipel des Australes

L'AFD effectuée sur ces seuls individus est présenté à la **Figure 91**.

Avec surprise on constate que les îles forment bien des groupes homogènes d'individus ayant des caractéristiques « chimiques » communes. L'axe F2 sépare bien les individus de Rurutu de ceux de Tubuai, alors que l'axe F1 met vraiment à part les individus de Raivavae par rapport à ceux de ces deux dernières îles. Une fois encore, on peut expliquer ces différences par le facteur géographique : Rurutu et Tubuai sont plus proches entre elles, au Nord-Ouest de l'archipel, alors que Raivavae est plus éloignée au Sud-Est. Ceci semble entraîner une plus grande proximité « chimique » entre les *Tamanus* de Rurutu et de Tubuai, qu'entre ceux de Raivavae et ceux de l'une des deux autres îles.

Les différences inter îles semblent donc très importantes au sein de l'archipel des Australes, en tout cas plus importantes que pour les autres archipels. C'est ce qui explique pourquoi tous les individus de l'archipel ne semblent pas former un groupe homogène. Pour les individus des Australes, l'appartenance à une île est un facteur plus important que l'appartenance à l'archipel dans sa globalité, alors que pour les 3 autres archipels étudiés que sont la Société, les Tuamotu et les Marquises, c'est l'appartenance à l'archipel qui prime sur l'appartenance à une île.

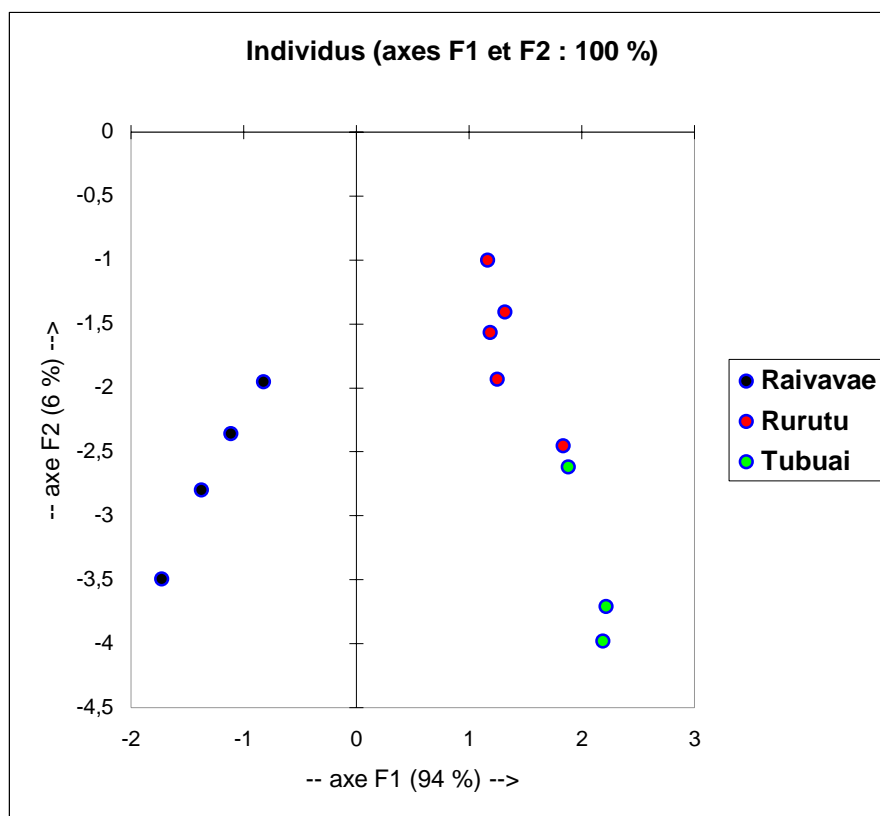


Figure 91 : AFD sur les échantillons de feuilles des Australes classés par île

Par ces calculs statistiques, de type ACP puis de type AFD, nous avons pu nous rendre compte que les variations de la composition chimique des extraits de feuilles de *Tamanu* provenant de toute la Polynésie française peuvent être expliquées de manière assez satisfaisante par le facteur géographique. Ainsi chaque archipel possède des individus spécifiques ayant une composition chimique particulière (sauf les Australes); dans une moindre mesure, chaque île possède elle aussi des individus particuliers du point de vue chimique (surtout aux Australes).

Ceci est bien entendu très intéressant du point de vue de la biodiversité, de sa protection et de son éventuelle 'exploitation'. Mais cette spécificité chimique mise en avant par les calculs statistiques est trop complexe pour pouvoir en tirer des conclusions quant à l'abondance particulière de telle ou telle molécule.

Mais une telle information peut être obtenue plus simplement dans notre tableau de données en faisant les moyennes des valeurs des différentes variables, qui correspondent toutes à l'abondance relative de molécules pures. Nous allons ainsi pouvoir connaître les groupes dont les individus possèdent le plus ou le moins de telle ou telle molécule.

Ceci est essentiel quand on sait que certaines des coumarines contenues dans les feuilles de Tamanu, comme l'inophyllum B (ou P), ont des propriétés thérapeutiques avérées (notamment activité anti HIV). Il pourrait ainsi être envisagé de recueillir les feuilles de Tamanu de tel archipel ou de telle île contenant un maximum de cette molécule, pour l'isoler avec un rendement optimal. Nous déterminerons également quel groupe d'individus est le plus intéressant quant à sa teneur en inophyllum F1 et/ou F2, qui sont des molécules nouvelles isolées malheureusement en faible quantité. En isoler d'avantage permettrait de poursuivre les analyses pour connaître leurs propriétés physico-chimiques détaillées, mais aussi pour effectuer des tests variés de bioactivité.

Nous en sommes donc maintenant à une phase de recherche d'un matériel végétal approprié pour parvenir à une finalité bien précise.

Commençons par le plus général pour aller vers le plus particulier : intéressons nous de nouveau au regroupement de tous les individus de Polynésie par archipel :

Description des groupes :

Groupe	Fréq	Calo	InB	InP	InF1	InG1	InF2	InG2	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Australes	12	2,104	15,049	4,034	0,780	0,104	0,327	0,000	1,884	2,009	0,758	17,843
Marquises	47	2,644	2,733	6,321	0,365	0,101	0,327	0,000	2,047	1,633	0,610	28,570
Société	55	1,186	10,083	2,386	0,991	0,391	1,169	0,040	1,455	1,316	0,577	19,355
Tuamotu	22	1,546	20,839	4,690	1,400	0,205	1,198	0,000	2,030	1,936	0,891	13,115

Tableau 35 : Moyennes des 11 variables dans les 4 archipels de Polynésie française

On remarque immédiatement les archipels les plus intéressants concernant les molécules recherchées :

- Pour l'inophyllum B, les archipels où l'on trouve les Tamanu en contenant le plus sont l'archipel des Tuamotu, puis l'archipel des Australes ;
- Pour l'inophyllum P, l'archipel le plus intéressant est celui des Marquises ;
- Enfin pour les inophyllum F1 et F2, les archipels dont les Tamanu en contiennent le plus sont celui des Tuamotu, et celui de la Société.

On voit bien que selon la molécule ciblée, on ne collectera pas la matière végétale à extraire sur les îles des mêmes archipels.

Nous pouvons aller un peu plus loin en examinant les moyennes des variables dans chaque île de chaque archipel. Commençons par les îles de la Société :

Description des groupes :

Groupe	Fréq	Calo	InB	InP	InF1	InG1	InF2	InG2	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Bora Bora	3	1,020	2,400	0,507	0,000	0,000	0,000	0,000	2,557	0,653	0,000	32,470
Maupiti	6	0,465	2,090	0,372	0,142	0,000	0,205	0,000	1,005	0,377	0,135	38,582
Moorea	12	2,022	15,233	4,822	1,422	0,675	1,732	0,000	0,674	1,689	0,742	12,807
Raiatea	7	0,557	8,681	2,123	0,170	0,000	0,541	0,000	4,424	0,943	0,421	18,300
Tahaa	7	0,430	6,357	1,243	0,467	0,134	0,336	0,000	1,911	0,684	0,267	15,204
Tahiti	9	1,730	11,971	2,613	1,082	0,427	0,843	0,000	0,748	2,506	1,347	11,417
Tetiaroa	11	1,151	12,636	2,049	2,035	0,786	2,594	0,202	0,650	1,269	0,461	22,243

Tableau 36 : Moyennes des 11 variables dans 7 îles de la Société

En ce qui concerne l'inophyllum B, les îles de Moorea, Tetiaroa et Tahiti sont les plus intéressantes. Pour l'inophyllum P, c'est l'île de Moorea qui comporte les meilleurs arbres. Enfin pour les inophyllum F1 et F2, il faudra collecter les feuilles d'arbres de Tetiaroa ou de Moorea. Dans l'ensemble, on voit que l'île de Moorea est chimiquement la plus intéressante.

De la même manière, pour l'archipel des Tuamotu :

Description des groupes :

Groupe	Fréq	Calo	InB	InP	InF1	InG1	InF2	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Hao	4	1,258	21,508	3,038	1,733	0,000	2,535	0,000	1,918	0,870	22,228
Manihi	2	0,000	4,720	0,925	0,000	0,000	0,705	2,970	0,640	0,000	28,040
Rangiroa	16	1,812	22,686	5,574	1,492	0,282	0,925	2,420	2,103	1,008	8,971

Tableau 37 : Moyennes des 11 variables dans 3 îles des Tuamotu

On remarque qu'en dehors de la molécule correspondant au pic 10, les 2 arbres de Manihi ne sont guère intéressants. Par contre Hao et Rangiroa ont des arbres qui contiennent beaucoup d'inophyllum B et d'inophyllum F1. Les arbres de Rangiroa contiennent plus d'inophyllum P, alors que les arbres de Hao contiennent plus d'inophyllum F2.

Concernant l'archipel des Marquises :

Description des groupes :

Groupe	Fréq	Calo	InB	InP	InF1	InG1	InF2	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Hiva Oa	14	2,826	2,208	10,436	0,466	0,000	0,520	1,800	1,676	0,696	26,403
Motane	6	2,955	7,908	0,000	0,125	0,000	0,000	4,773	0,948	0,312	22,417
Nuku Hiva	13	3,371	2,442	6,836	0,618	0,366	0,622	0,000	2,510	0,934	33,755
Tahuata	10	0,942	0,173	2,576	0,186	0,000	0,000	3,903	0,660	0,155	30,594
Ua Huka	4	3,438	4,158	9,093	0,000	0,000	0,000	0,833	2,088	0,845	23,478

Tableau 38 : Moyennes des 11 variables dans 5 îles des Marquises

Concernant l'inophyllum B et les inophyllums F1 et F2, aucune île ne comporte de Tamanu vraiment intéressants, comparés à ceux des autres archipels. Par contre on trouve sur les îles de Hiva Oa et Ua Huka des individus riches en inophyllum P.

Pour finir, l'archipel des Australes :

Description des groupes :

Groupe	Fréq	Calo	InB	InP	InF1	InF2	Pic 8	InC	Pic 10	Pic 11
Raivavae	4	2,123	8,613	1,460	0,835	0,400	0,000	2,968	0,898	20,563
Rurutu	5	1,472	22,950	3,378	0,702	0,122	2,808	1,304	0,602	13,868
Tubuai	3	3,133	10,463	8,560	0,837	0,570	2,857	1,907	0,833	20,843

Tableau 39 : Moyennes des 11 variables dans 3 îles des Australes

Sur l'île de Rurutu poussent des individus qui sont riches en inophyllum B. Pour l'inophyllum P, ce sont les individus de Tubuai qui sont les plus intéressants. Enfin, aucune île des Australes n'est à retenir pour s'approvisionner en inophyllum F1 et F2.

Récapitulons :

- les îles les plus riches en inophyllum B sont Rurutu et Rangiroa ;
- les îles les plus riches en inophyllum P sont Hiva Oa et Ua Huka ;
- les îles les plus riches en inophyllum F1 et F2 sont Tetiaroa et Hao ;
- cependant, l'île qui offre le meilleur compromis du point de vue de ces 4 molécules et qui est la plus accessible pour la collecte du matériel végétal est Moorea.

IV.3. Etude des échantillons d'amandes

Les amandes de Tamanu 'brutes' ne peuvent pas faire directement l'objet d'études chimiques. On doit d'abord extraire l'huile qu'elles contiennent, afin de procéder aux analyses de l'huile obtenue. Pour ce faire, les amandes doivent être séchées au soleil (ou au four) puis pressées 'à froid' en utilisant une presse rotative à vis sans fin. Dans le cadre d'un travail de développement sur la qualité de l'huile de Tamanu produite en Polynésie française (avec les crédits du contrat de développement Etat-Territoire), nous avons été conduits à mettre en œuvre tout une série d'analyses permettant de caractériser cette huile.

Certaines caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées, et en particulier les 4 indices de référence pour les huiles végétales que sont l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice d'iode et l'indice de peroxyde (mesures effectuées selon les normes européennes en vigueur).

Nous nous sommes par ailleurs intéressés aux « résines » qui sont contenues dans cette huile de Tamanu, qui en font une huile végétale très particulière, puisque les huiles végétales classiques comme l'huile d'olive n'en contiennent pas. Selon la définition donnée par Paul Pétard³ nous appelons « résines » la partie de l'huile de Tamanu soluble dans l'éthanol à 75°. Le détail du mode opératoire permettant de séparer l'huile de ses résines est décrit en [Annexe 10](#). Ces résines sont d'un vert très foncé et très aromatiques, alors que l'huile purifiée obtenue est jaune clair et pratiquement inodore.

Ouvrons une parenthèse sur la nature de ces résines : la résine de Tamanu est un mélange complexe qui n'est pas complètement connu. On pourrait admettre a priori qu'il s'agit de toutes les molécules contenues dans l'huile à l'exception évidemment des lipides proprement dits : tri, di, et monoglycérides, acides gras libres, lipides polaires et insaponifiable.

Dans les conditions d'extraction utilisées on peut considérer que la résine contient les molécules polaires, notamment :

- *des molécules qui se polymérisent en devenant collantes ;*
- *des composés coumariniques et autres composés aromatiques polaires ;*
- *des produits colorés ;*
- *des molécules responsables de l'arôme ;*
- *des acides gras libres, éventuellement des monoglycérides et lipides polaires.*

Cette liste ne peut pas être considérée comme exhaustive. Ces molécules sont de polarités diverses, et leur extraction par le protocole utilisé peut être plus ou moins complète. On peut considérer que les acides gras libres qui sont présents dans toute huile végétale vierge peuvent représenter environ 2 % de l'huile, et que les molécules colorées et aromatiques ne représentent qu'un faible pourcentage. La teneur en résines dépend du protocole retenu, mais les valeurs sont utiles pour effectuer des comparaisons.

Nous avons donc relevé le pourcentage de résines présentes dans tous les échantillons d'huile brute disponibles. Il était alors possible de déterminer la composition en acides gras de l'huile purifiée, et c'est ce que nous avons fait par une méthode analytique de chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Il est à noter que nous aurions pu, pour pousser encore plus loin nos investigations, analyser les résines par la même méthode CLHP qui nous a servi à identifier les coumarines présentes dans les échantillons de feuilles. Nous ne l'avons pas fait faute de temps, mais c'est une direction à ne pas perdre de vue dans l'optique de la poursuite de ce travail.

Finalement, beaucoup de données ont été récoltées sur les échantillons d'huile dont nous disposons, ce qui nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions intéressantes dans le cadre de notre étude de développement sur la qualité de l'huile de Tamanu. Mais ceci n'est pas l'objet de ce mémoire. Cependant, il nous semblait intéressant d'utiliser une partie des données recueillies pour enrichir notre étude de biodiversité du Tamanu, basée principalement sur les échantillons de feuilles. Il nous fallait alors choisir les variables les mieux adaptées pour décrire cette huile de Tamanu à l'aide d'outils statistiques.

Nous avons immédiatement pensé aux acides gras de l'huile, faciles à analyser en grande série et en un temps assez court. Le pourcentage de résines a également été retenu, puisque les analyses des acides gras nécessitent la séparation de celles-ci. Les autres données ont été laissées de côté car leur reproductibilité s'est avérée moins fiable, qu'elles sont moins accessibles, et que toutes les huiles n'avaient pas été traitées.

IV.3.1. CPG des esters méthyliques des Acides Gras des échantillons d'huile obtenus

L'huile à analyser doit d'abord être débarrassée des résines acides qu'elle contient par la méthode de détermination de la teneur en résines décrite en [Annexe 10](#). Les résines obtenues sont pesées afin de connaître leur abondance dans chaque échantillon. Les résultats obtenus (en %) sont listés dans le [Tableau 40](#).

Il est ensuite nécessaire de préparer les esters méthyliques des acides gras présents dans l'huile de Tamanu. La méthode utilisée reprend la norme NF T 60-233 (05/1977), dont une synthèse est fournie en [Annexe 9](#). Toutefois, le protocole a été quelque peu modifié afin de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons en série :

- la prise d'essai correspond à une goutte d'huile de Tamanu (à la pipette pasteur) ;
- on ajoute 1mL de méthanolate de sodium environ molaire (Na dans MeOH)°;
- on chauffe à 60°C pendant 30 minutes à l'étuve (flacon bouché) ;
- on extrait une fois avec 1 mL d'iso-octane ;
- on injecte directement en CPG l'extrait dilué quatre fois avec de l'iso-octane.

Ces esters méthyliques sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse, selon la norme NF ISO 5508 (06/1995). (Cf. détails en [Annexe 9](#))

On obtient des chromatogrammes ayant l'allure suivante :

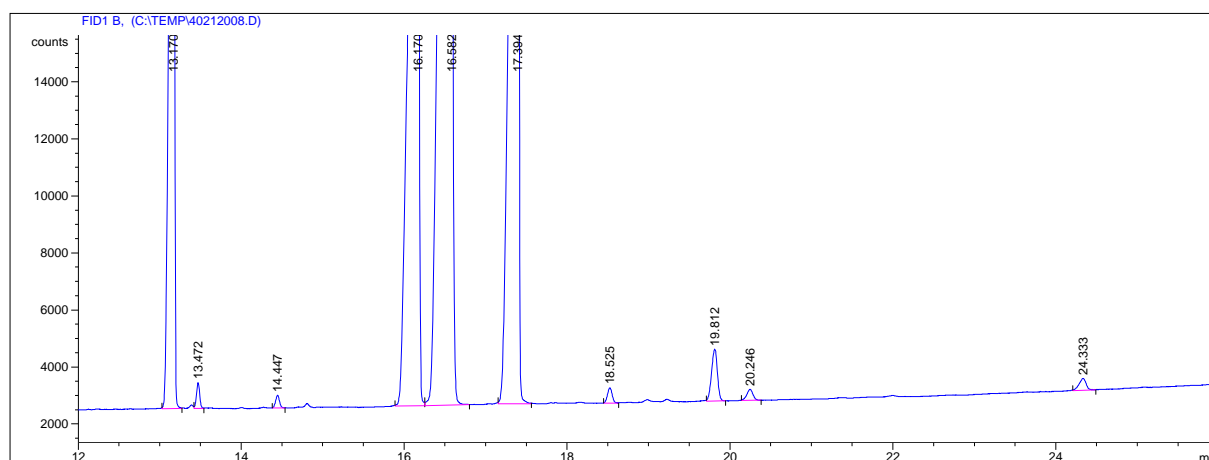


Figure 92 : CPG des esters méthyliques d'AG d'un échantillon d'huile de Tamanu

Les pics considérés sont au nombre de dix. Il s'agit, dans l'ordre croissant des temps de rétention :

- de l'acide palmitique (hexadécanoïque, C16:0),
- de l'acide palmitoléique (hexadécénoïque, C16:1),
- de l'acide margarique (heptadécanoïque, C17:0),
- de l'acide stéarique (octadécanoïque, C18:0),
- de l'acide oléique (octadécénoïque, C18:1),
- de l'acide linoléique (octadécadiénoïque, C18:2),
- de l'acide linoléique (octadécatriénoïque, C18:3),
- de l'acide arachidique (eicosanoïque, C20:0),
- de l'acide eicosénoïque (C20:1)
- de l'acide behénique (docosanoïque, C22:0).

L'identification des pics a été rendue possible grâce à la méthode dite de Longueur de Chaîne Equivalente (LCE)^{6, 7}. Cette méthode consiste à tracer le logarithme du temps de rétention corrigé des acides gras d'une série homologue (même degré d'insaturation) en fonction du nombre d'atomes de carbone qu'ils comportent. Lorsque l'analyse est effectuée en isotherme, les points correspondant aux acides gras de la série homologue sont alignés.

Nous avons appliqué cette méthode par l'analyse en isotherme à 170°C de l'huile d'olive et de l'huile de soja, dont les compositions en acides gras sont bien connues. Nous avons tracé ([Figures 93](#) et [94](#)) le logarithme du temps de rétention corrigé de chaque pic en fonction du nombre d'atomes de carbone de l'acide gras correspondant. Les points correspondant aux acides gras de même insaturation se trouvent alors bien alignés, et les droites correspondant à des insaturations différentes sont bien parallèles, ce qui est en accord avec la théorie LCE.

La comparaison qualitative des chromatogrammes de l'huile d'olive et de l'huile de soja obtenus en isotherme d'une part, et de ces mêmes chromatogrammes obtenus en gradient de température d'autre part, nous permet d'identifier avec certitude les pics obtenus pour l'huile de Tamanu en gradient de température. (Il n'y a pas d'inversions de pics entre l'analyse en isotherme et l'analyse en gradient de température)

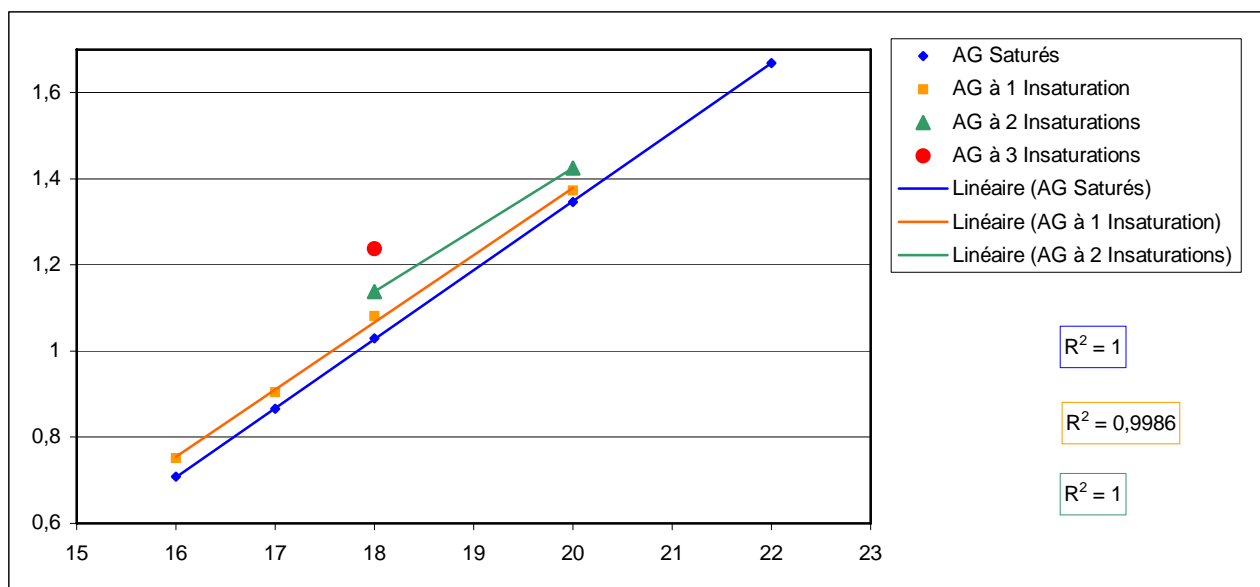


Figure 93 : Diagramme d'identification des acides gras pour l'huile d'olive

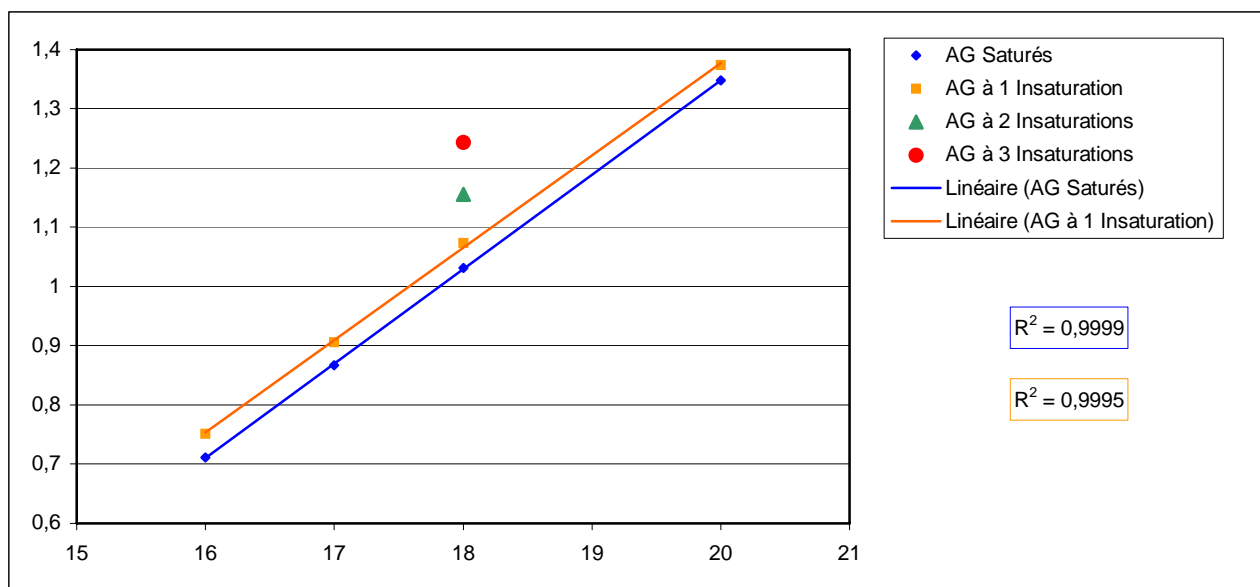


Figure 94 : Diagramme d'identification des acides gras pour l'huile de soja

L'ensemble des résultats est donné dans le [Tableau 40](#), à la page suivante. On retrouve dans ce tableau les pourcentages relatifs des dix pics chromatographiques identifiés dans l'huile dépourvue de résines, ainsi que le pourcentage de résines contenues dans l'huile brute, pour chacun des 69 échantillons analysés. La moyenne et l'écart type des huiles produites en Polynésie française ont également été calculés. Par ailleurs, on a indiqué directement dans le tableau la valeur la plus faible obtenue (en rouge) et la valeur la plus forte obtenue (en vert).

Réf.	Nom échantillon	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	Résines
45	Labo - Tahiti 1	14,76	0,18	0,12	13,88	39,02	30,54	0,22	0,79	0,23	0,24	10,5
46	Labo - Tahiti 2	15,00	0,21	0,14	15,16	42,04	25,89	0,20	0,88	0,19	0,28	10,6
47	Labo - Raiatea 1	13,76	0,16	0,10	18,08	37,76	28,69	0,22	0,78	0,22	0,23	8,5
48	Labo - Raiatea 3	12,52	0,15	0,10	16,69	38,81	30,26	0,25	0,78	0,21	0,23	9,9
49	Labo - Raiatea 5	13,92	0,18	0,14	15,23	41,89	27,06	0,23	0,88	0,20	0,26	11,7
50	Labo - Raiatea 6	13,98	0,18	0,10	16,56	41,03	26,80	0,19	0,71	0,22	0,21	8,8
51	Labo - Raiatea 7	14,31	0,21	0,13	16,67	42,88	24,39	0,18	0,80	0,21	0,22	10,2
52	Labo - Tahaa 2	15,05	0,20	0,11	14,93	38,50	29,84	0,22	0,75	0,19	0,21	10,6
53	Labo - Tahaa 5	13,32	0,17	0,10	17,24	38,81	28,96	0,22	0,79	0,18	0,22	8,9
54	Labo - Tahaa 7	13,47	0,16	0,09	16,39	37,32	31,14	0,24	0,78	0,18	0,22	9,9
55	Labo - Rangiroa 1	15,17	0,23	0,12	14,12	45,40	23,48	0,19	0,85	0,19	0,24	10,4
56	Labo - Rangiroa 2	15,26	0,24	0,11	14,94	44,37	23,59	0,18	0,89	0,19	0,25	9,8
57	Labo - Rangiroa 3	15,10	0,24	0,15	15,85	47,35	19,65	0,18	1,00	0,19	0,29	10,9
58	Labo - Rangiroa 4	15,05	0,23	0,15	16,04	46,58	20,32	0,17	0,99	0,19	0,28	10,5
59	Labo - Rangiroa 5	14,80	0,26	0,12	15,06	42,55	25,61	0,19	0,94	0,19	0,28	10,4
60	Labo - Rangiroa 7	15,16	0,24	0,12	15,80	41,95	25,16	0,21	0,94	0,18	0,26	10,5
61	Labo - Manihi 1	14,80	0,25	0,13	14,91	44,17	24,11	0,23	0,93	0,20	0,28	11,6
62	Labo - Manihi 2	15,09	0,24	0,14	15,47	46,24	21,33	0,18	0,89	0,18	0,24	10,8
63	Labo - Tubuai	12,98	0,14	0,12	14,61	35,40	35,21	0,29	0,80	0,22	0,23	8,2
4	Labo - Nuku Hiva	14,16	0,17	0,09	14,57	27,40	41,92	0,22	0,88	0,20	0,25	15,6
64	Labo - Tahuata 1	14,07	0,34	0,14	16,63	30,86	36,26	0,19	0,95	0,22	0,13	13,6
65	Labo - Hiva Oa	13,49	0,37	0,24	19,01	34,12	32,06	0	0,71	0	0	13
66	Labo - Tahuata 2	13,78	0,27	0,15	16,37	33,75	33,35	0,26	0,93	0,35	0,19	15,6
67	Labo - Tahuata 3	15,11	0,34	0,14	13,65	30,34	38,55	0,29	0,73	0,18	0,12	16,3
68	Labo - Tahuata 4	14,97	0,37	0,14	13,36	31,95	37,8	0,23	0,80	0,13	0,16	19,6
69	Labo - Rurutu	12,67	0,39	0,18	14,01	37,36	33,71	0,30	0,74	0,16	0,17	12,3
37	IAA 1	15,07	0,21	0,09	16,35	40,02	26,72	0,22	0,89	0,18	0,24	11,3
38	IAA 2	14,96	0,20	0,09	16,75	40,28	26,11	0,21	0,95	0,18	0,26	10,8
39	IAA 3	15,18	0,21	0,11	16,10	40,35	26,42	0,23	0,89	0,21	0,27	12,6
40	IAA 4	15,60	0,22	0,09	16,14	40,23	26,24	0,20	0,87	0,18	0,23	14,7
41	IAA 5	15,33	0,21	0,09	16,17	40,61	26,04	0,21	0,90	0,20	0,25	10,7
42	IAA 6	14,91	0,20	0,10	16,20	40,62	26,33	0,22	0,97	0,19	0,29	12,1
43	IAA 7	15,18	0,21	0,10	16,20	40,18	26,54	0,21	0,93	0,18	0,27	10,8
44	IAA 8	15,19	0,20	0,10	16,09	40,35	26,46	0,21	0,93	0,18	0,27	10,8
1	Producteur 1 - 1	14,46	0,24	0,11	15,06	39,99	28,62	0,21	0,81	0,26	0,23	11,3
21	Producteur 1 - 2	14,02	0,21	0,15	17,03	44,66	22,39	0,19	0,90	0,22	0,24	10,2
8	Producteur 1 - 3	14,25	0,18	0,11	18,70	43,61	21,32	0,19	1,11	0,24	0,30	11,7
9	Producteur 1 - 4	14,59	0,21	0,17	15,85	38,90	28,73	0,20	0,84	0,26	0,27	10,1
5	Producteur 1 - 5	14,22	0,18	0,11	18,37	42,56	22,76	0,20	1,05	0,25	0,29	12,2
7	Producteur 1 - 6	14,87	0,27	0,14	16,49	46,62	19,92	0,16	1,00	0,23	0,30	11,1
6	Producteur 1 - 7	14,48	0,20	0,13	17,73	44,96	20,71	0,18	1,05	0,24	0,32	11,9
11	Producteur 1 - 8	15,43	0,25	0,14	15,98	42,31	24,23	0,18	0,93	0,26	0,28	9,8
10	Producteur 1 - 9	13,81	0,22	0,14	14,59	43,16	26,62	0,16	0,85	0,24	0,21	10,8
22	Producteur 1 - 10	14,33	0,21	0,12	15,74	40,59	27,49	0,19	0,86	0,24	0,23	14
16	Producteur 2 - 1	14,10	0,19	0,13	16,41	41,59	26,00	0,25	0,87	0,23	0,24	9,8
17	Producteur 2 - 2	13,91	0,26	0,13	16,78	43,94	23,48	0,16	0,85	0,26	0,24	12,9
19	Producteur 2 - 3	14,00	0,20	0,13	17,25	43,42	23,49	0,18	0,87	0,21	0,23	13,9
34	Producteur 2 - 4	13,85	0,17	0,15	17,16	41,22	25,74	0,19	1,05	0,20	0,28	10,5
35	Producteur 2 - 5	14,32	0,22	0,12	16,64	45,12	22,02	0,17	0,92	0,19	0,28	12,1
2	Producteur 3 - 1	14,90	0,22	0,13	15,62	40,25	27,25	0,18	0,89	0,28	0,28	11,4
24	Producteur 3 - 2	14,72	0,20	0,12	15,05	39,25	29,16	0,21	0,84	0,23	0,23	10,3
25	Producteur 3 - 3	14,34	0,19	0,12	15,90	39,12	28,72	0,21	0,91	0,22	0,26	12,9
26	Producteur 3 - 4	14,56	0,19	0,11	14,59	38,61	30,46	0,21	0,81	0,23	0,23	12,2
28	Producteur 3 - 5	14,64	0,22	0,16	18,05	44,05	21,27	0,18	0,97	0,21	0,26	11,1
27	Producteur 3 - 6	14,66	0,22	0,13	17,22	45,90	20,22	0,18	0,99	0,20	0,27	11,3
12	Producteur 4 - 1	14,56	0,21	0,20	15,30	41,57	26,55	0,18	0,87	0,27	0,28	11,3
18	Producteur 4 - 2	14,60	0,19	0,13	15,94	41,54	26,00	0,27	0,86	0,23	0,24	10,2
14	Producteur 5	15,08	0,23	0,15	15,47	44,33	23,16	0,18	0,89	0,24	0,27	10,4
13	Producteur 6	14,48	0,20	0,17	15,57	42,03	25,86	0,17	0,98	0,28	0,28	9,9
3	Commerciale 1 - 1	14,60	0,20	0,12	15,51	40,65	27,35	0,19	0,86	0,26	0,26	12
33	Commerciale 1 - 2	14,17	0,21	0,12	16,25	42,43	25,32	0,20	0,85	0,19	0,26	11,8
29	Commerciale 2	14,42	0,21	0,13	16,64	44,53	22,53	0,19	0,90	0,21	0,25	10,4
30	Commerciale 3	14,61	0,21	0,13	18,45	43,13	21,93	0,17	0,96	0,19	0,24	16,2
31	Commerciale 4	14,45	0,20	0,12	15,84	42,07	25,73	0,19	0,92	0,19	0,28	11
32	Commerciale 5	14,40	0,20	0,12	16,09	40,48	27,09	0,18	0,94	0,21	0,28	11,5
	Moyenne en Polynésie	14,48	0,22	0,13	16,04	40,82	26,75	0,20	0,89	0,21	0,24	11,52
	Ecart type en Polynésie	0,64	0,05	0,03	1,19	3,95	4,58	0,04	0,08	0,04	0,05	1,98
23	Madagascar	13,87	0,24	0,11	14,39	39,52	30,64	0,19	0,65	0,23	0,17	13
15	Vanuatu 1	14,79	0,26	0,13	15,29	45,47	22,50	0,15	0,89	0,28	0,25	12,4
20	Vanuatu 2	13,98	0,19	0,11	14,51	47,57	22,14	0,15	0,86	0,26	0,23	14,1
36	Indonésie	14,33	0,22	0,10	15,35	41,03	27,56	0,20	0,78	0,19	0,24	12,6
	Littérature 1 (5)	18,00	/	/	8,00	47,00	27,00	/	/	/	/	/
	Littérature 2 (4)	16,00	/	/	16,00	30,00	38,00	/	/	/	/	/
	Huile d'Olive	11,09	0,47	0,05	2,87	75,89	7,78	0,65	0,45	0,43	0,13	/
	Huile de Soja	11,61	0,11	0,10	4,33	26,78	49,91	5,34	0,44	0,35	0,53	/

Tableau 40 : Teneurs en acides gras et en résines des échantillons d'huile de Tamanu

IV.3.2. Analyses statistiques des données obtenues

De la même façon qu'avec les données des échantillons de feuilles, lors de la première ACP qui est effectuée sur l'ensemble du tableau de données relatives aux échantillons d'huile, le logiciel calcule toutes les corrélations qui existent entre les différentes variables que nous avons sélectionnées. On peut alors s'apercevoir que les 11 variables sont plus ou moins corrélées entre elles ; mais cette fois, un des coefficients de corrélation calculés est très proche de -1 ; il s'agit de la corrélation observée entre la variable C18 :1 et la variable C18 :2. Ce qui veut dire que ces deux variables sont presque dépendantes l'une de l'autre, c'est à dire qu'elles apportent la même information pour décrire les échantillons d'huile. On éliminera donc l'une d'entre elle, par exemple la variable C18:2, dans toutes les autres analyses statistiques que nous effectuerons.

Matrice de corrélation :

	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	Résines
C16:0	1	0,098	-0,146	-0,186	0,266	-0,329	-0,128	0,343	-0,007	0,354	0,084
C16:1	0,098	1	0,527	-0,213	-0,246	0,246	-0,165	-0,166	-0,328	-0,576	0,491
C17:0	-0,146	0,527	1	0,071	0,028	-0,031	-0,393	0,014	-0,111	-0,309	0,073
C18:0	-0,186	-0,213	0,071	1	0,211	-0,420	-0,389	0,420	-0,105	0,090	-0,151
C18:1	0,266	-0,246	0,028	0,211	1	-0,965	-0,364	0,435	0,186	0,597	-0,387
C18:2	-0,329	0,246	-0,031	-0,420	-0,965	1	0,424	-0,561	-0,154	-0,605	0,355
C18:3	-0,128	-0,165	-0,393	-0,389	-0,364	0,424	1	-0,160	0,215	0,113	-0,020
C20:0	0,343	-0,166	0,014	0,420	0,435	-0,561	-0,160	1	0,229	0,670	-0,028
C20:1	-0,007	-0,328	-0,111	-0,105	0,186	-0,154	0,215	0,229	1	0,446	-0,090
C22:0	0,354	-0,576	-0,309	0,090	0,597	-0,605	0,113	0,670	0,446	1	-0,357
Résines	0,084	0,491	0,073	-0,151	-0,387	0,355	-0,020	-0,028	-0,090	-0,357	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,050$ (test bilatéral)

Tableau 41 : Corrélations entre les variables décrivant les échantillons de feuilles

La **Figure 95** suivante présente les résultats de cette première ACP réalisée.

Parmi tous les échantillons, les 8 échantillons d'huile de l'IAA sont particuliers car ils proviennent tous du même échantillon de graines ; seules les opérations de séchage et de pressage ont été réalisées selon des procédés différents pour chacun de ces 8 échantillons. On voit nettement sur l'ACP précédente que ces 8 échantillons sont très similaires, ce qui valide en quelque sorte l'analyse statistique effectuée, puisque plusieurs huiles issues d'un même échantillon de graines fournissent des résultats dont la variance est très faible. Ceci montre aussi que les opérations de séchage et de pressage n'ont pas une grande influence sur la composition de l'huile en termes d'acides gras et de résines. Par la suite, on ne fera donc intervenir dans les calculs qu'un seul échantillon de l'IAA, par exemple l'échantillon IAA 1.

Par ailleurs, les échantillons étrangers sont assez dispersés, ce qui est assez logique puisqu'ils ne forment pas clairement une entité géographique à part entière ; nous n'avons en plus aucune information concernant les méthodes de production de ces huiles. En conclusion, ils n'apportent pas d'information supplémentaire à cette étude ciblée sur la Polynésie française. Ils seront donc eux aussi retirés des calculs.

De plus, comme nous ne connaissons ni la provenance des graines ni la manière dont les échantillons commerciaux d'huile de Tamanu ont été produits en Polynésie française, ils ne seront pas incorporés aux calculs de statistiques destinés à montrer les différences entre des huiles provenant d'archipels, d'îles, ou encore de producteurs différents.

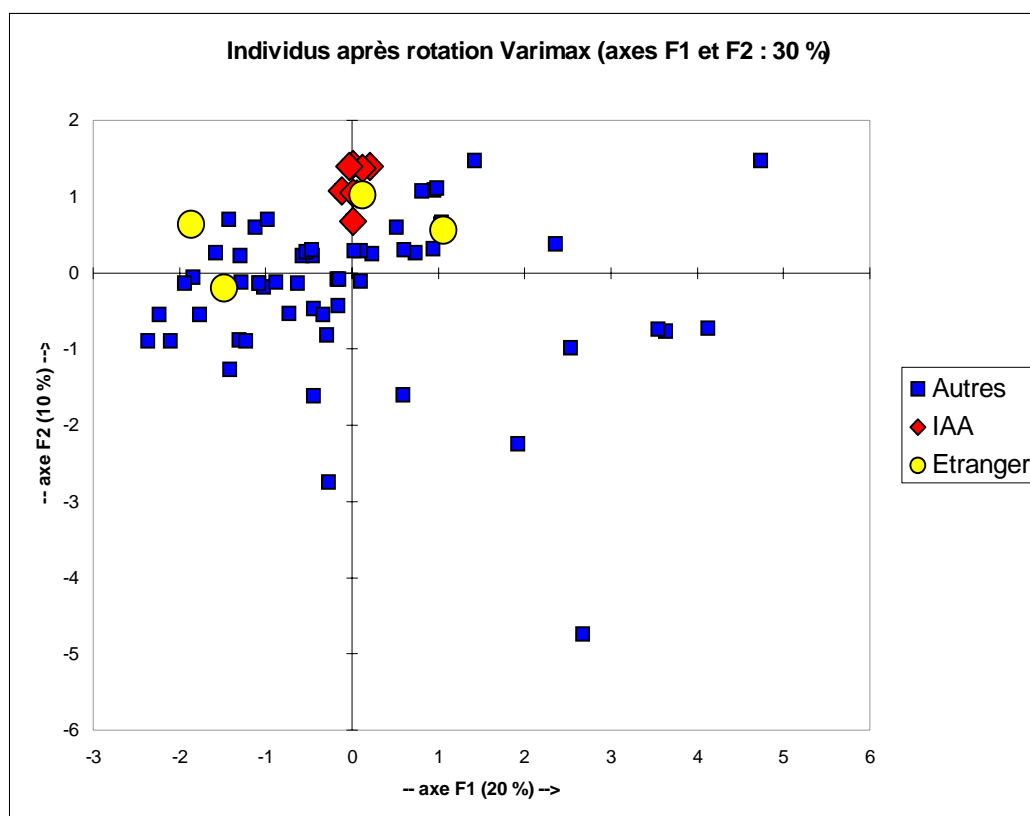


Figure 95 : ACP sur tous les échantillons d'huile analysés

Nous avons ensuite poursuivi sur une ACP dont le but est de voir, comme avec les échantillons de feuilles, si des groupes d'échantillons d'huile apparaissent a priori, sans faire intervenir dans les calculs des regroupements d'échantillons hypothétiques. Cependant, nous faisons dans la présentation des résultats deux hypothèses : les individus étudiés doivent soit se répartir par entité géographique (île ou archipel), soit se répartir par entité de production (producteur).

L'ACP que nous présentons ci-dessous ont été réalisées avec toutes les variables sauf le pourcentage de résines, ce qui donne de meilleurs résultats quant à la séparation des individus par groupe géographique. Ceci n'est pas très important car les ACP ne nous servent qu'à nous donner une idée sur les regroupements d'individus envisageables pour les AFD.

Par contre, les AFD réalisées par la suite ont porté sur toutes les variables y compris les pourcentages de résines, cette variable supplémentaire améliorant les différents regroupements d'individus.

Les Figures 96, 97 et 98 montrent les résultats de l'ACP avec les individus identifiés par producteur, le laboratoire étant considéré comme un producteur, puisque toutes les huiles produites par nos soins l'ont été selon les mêmes procédés.

Nous constatons que les échantillons du laboratoire sont très éparpillés, alors que les échantillons de certains producteurs sont parfois proches, sans vraiment former de groupes bien distincts.

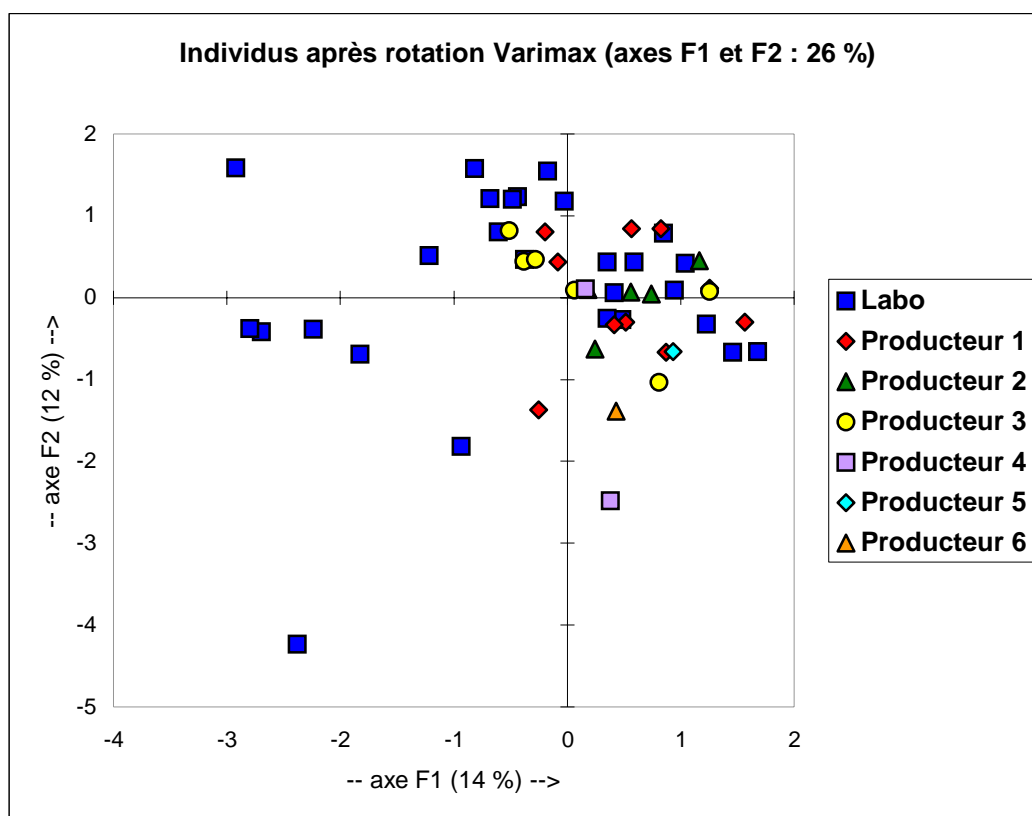


Figure 96 : ACP n°1 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur

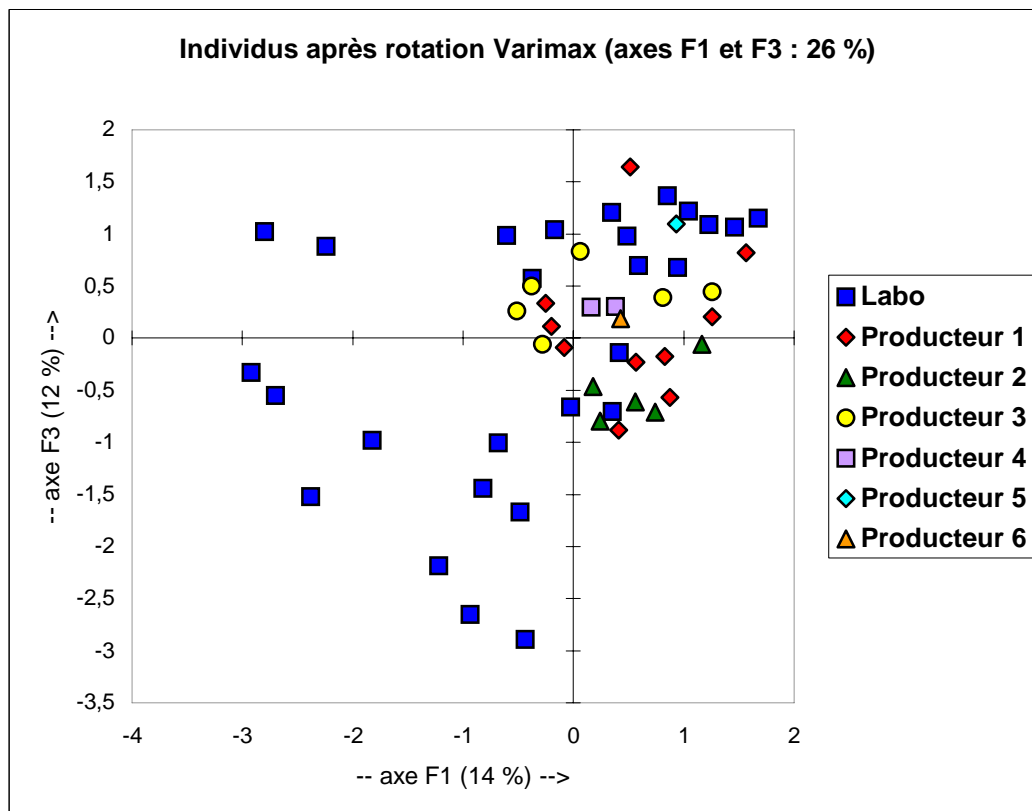


Figure 97 : ACP n°2 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur

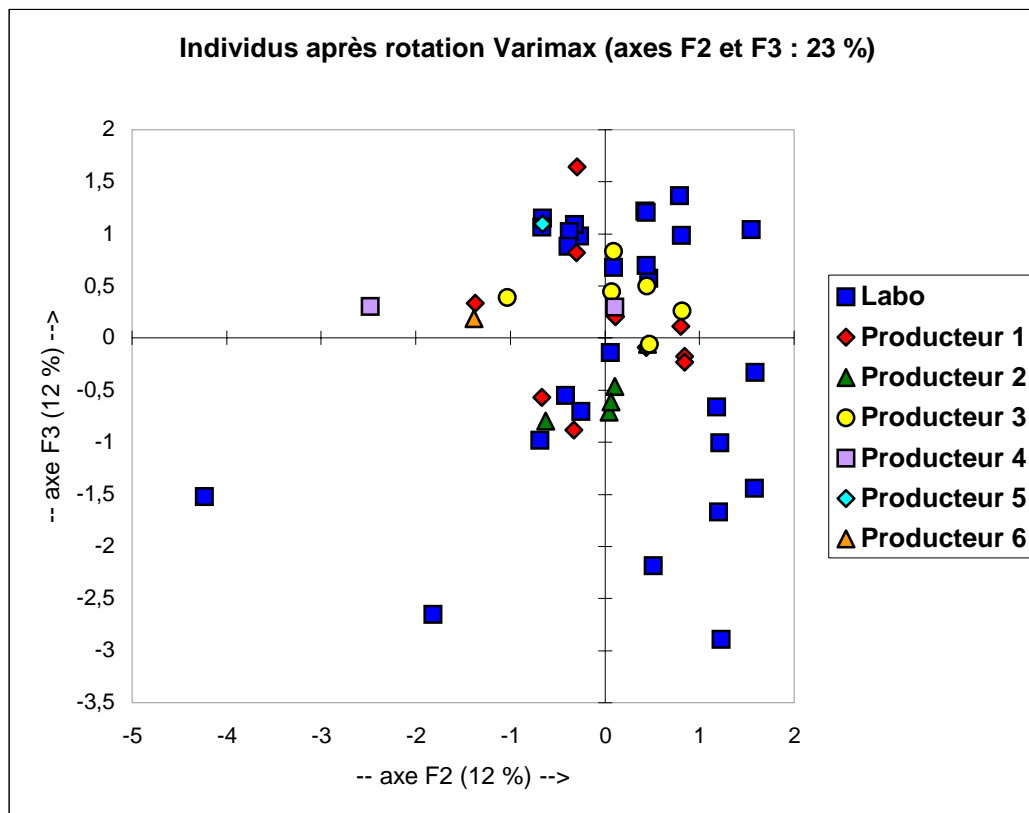


Figure 98 : ACP n°3 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur

Les [Figures 99](#), [100](#) et [101](#) montrent les résultats de la même ACP, mais cette fois avec les individus identifiés par leur provenance (archipels).

On remarque cette fois que les échantillons sont beaucoup mieux regroupés, sauf pour ceux des Australes qui sont un peu dispersés. Cette ACP nous incite donc à mener prioritairement une AFD avec comme lien connu entre les échantillons leur archipel d'origine. Nous irons cependant plus loin avec les AFD en étudiant aussi la répartition des individus par île et par producteur, pour étoffer nos conclusions sur cette étude statistique.

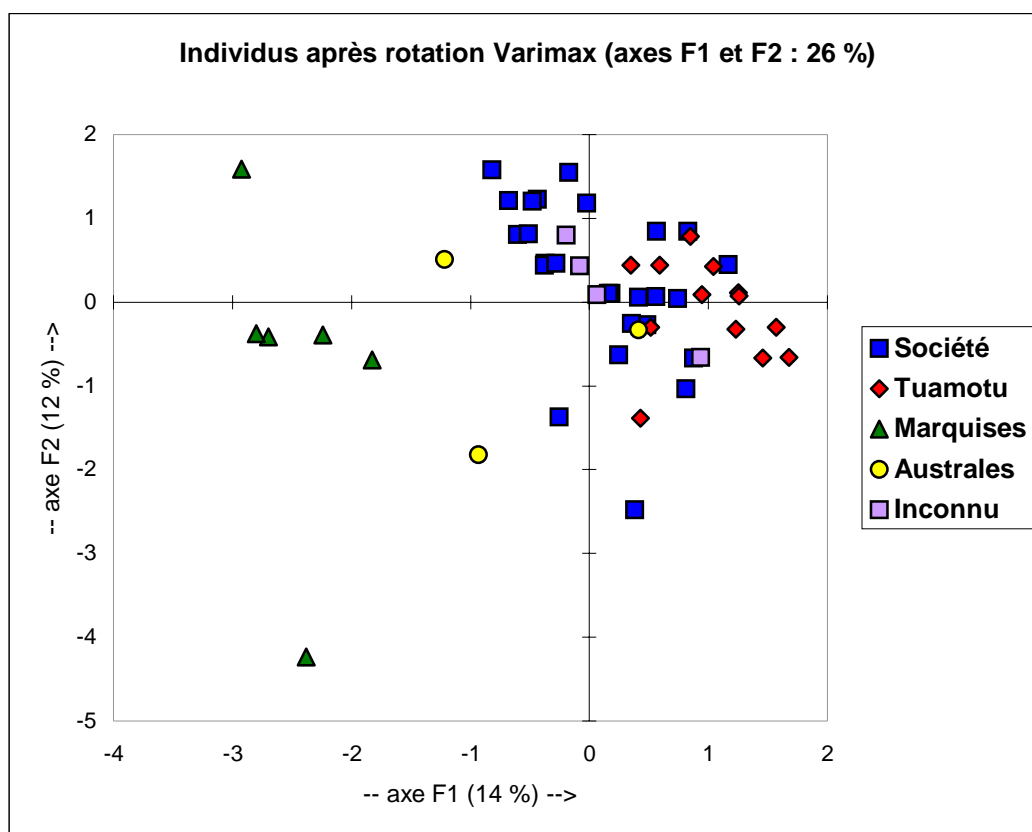


Figure 99 : ACP n°1 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel

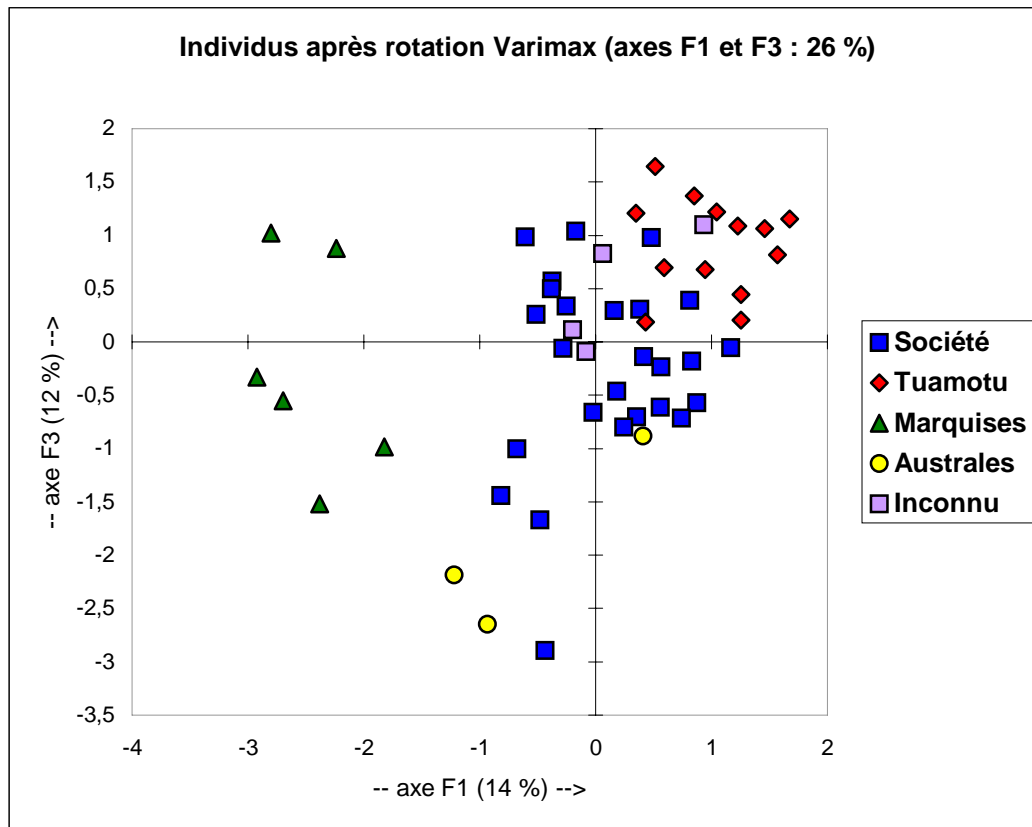


Figure 100 : ACP n°2 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel

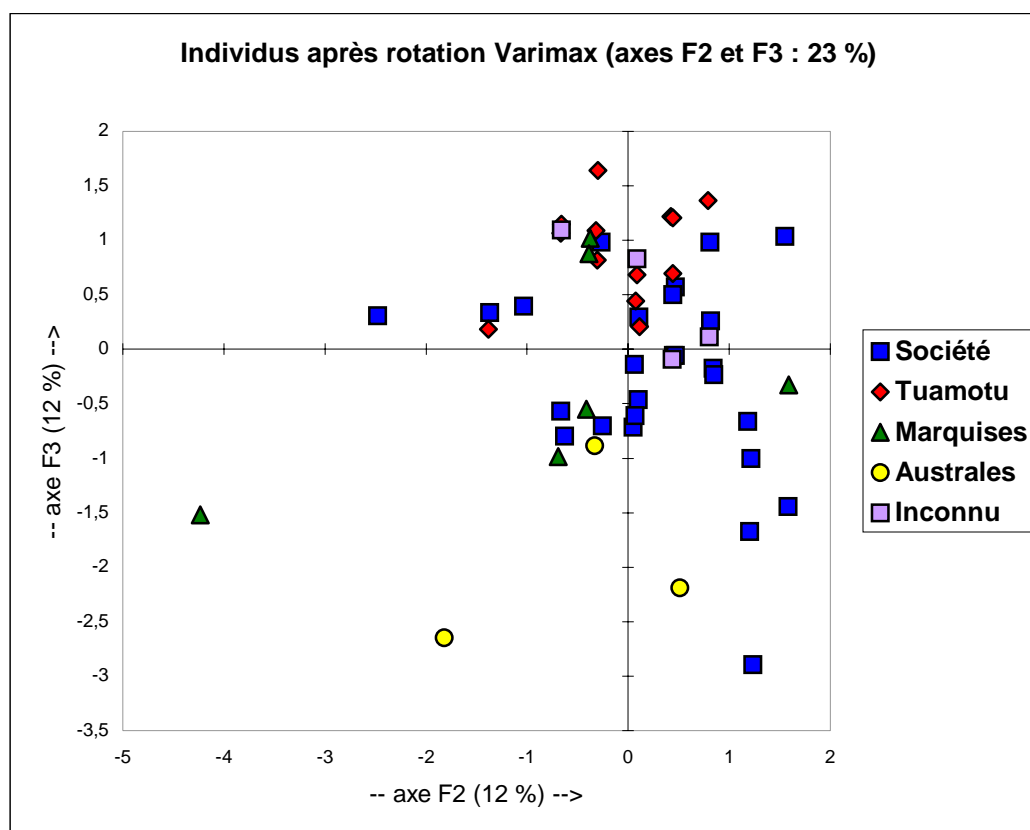


Figure 101 : ACP n°3 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel

Maintenant que nous avons visualisé les ACP et déterminé les groupes d'individus les plus significatifs, nous pouvons utiliser ces groupes pour effectuer des analyses factorielles discriminantes (AFD).

Les groupes d'individus les plus évidents en ACP sont les archipels. Nous commençons donc par faire des AFD avec comme groupes d'individus les archipels de Polynésie.

Première AFD : nous prenons les individus du laboratoire qui sont inclus dans un archipel contenant plus de deux individus (un groupe de deux individus n'est pas significatif). Nous éliminons donc les deux échantillons des Australes. La répartition des individus au sein des trois archipels que sont la Société, les Tuamotu et les Marquises, est représentée dans le plan (O, F1, F2) à la [Figure 102](#). La répartition est excellente, les individus de chaque archipel formant un groupe bien homogène nettement distinct des autres. Les groupes de la Société et des Tuamotu sont discriminés selon l'axe F2, alors que le groupe des Marquises est bien discriminé de ces deux groupes selon l'axe F1.

La conclusion de cette AFD est qu'un échantillon d'huile du laboratoire de provenance inconnue, pourra, s'il appartient à l'un de ces trois archipels, être affecté à l'un d'entre eux avec un risque d'erreur très faible.

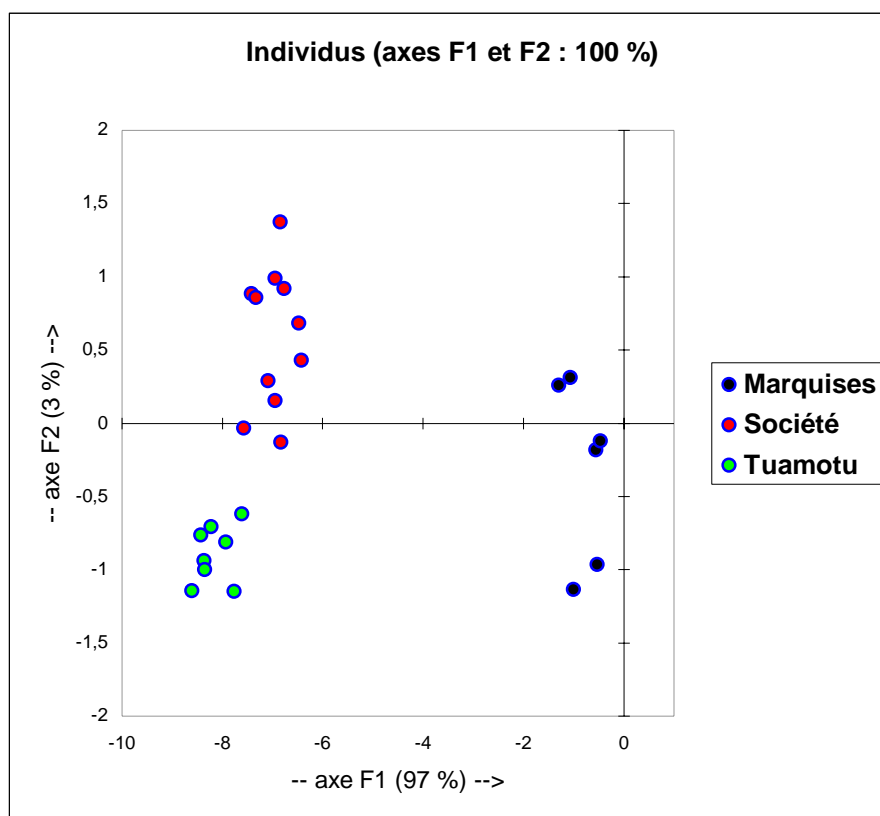


Figure 102 : AFD sur les échantillons d'huile du laboratoire classés par archipel

De la même façon, nous effectuons une AFD sur les échantillons des producteurs, avec comme groupe de plus de deux individus l'archipel de la Société et celui des Tuamotu. Les individus se répartissent sur la droite (O, F1) et on voit très nettement la formation de deux groupes selon cet axe F1 (**Figure 103**).

On pourra donc encore une fois, grâce à l'analyse des acides gras et du pourcentage de résines d'un échantillon d'huile inconnu issu des producteurs de Polynésie, déterminer sa provenance et savoir si les graines proviennent des Tuamotu ou de la Société.

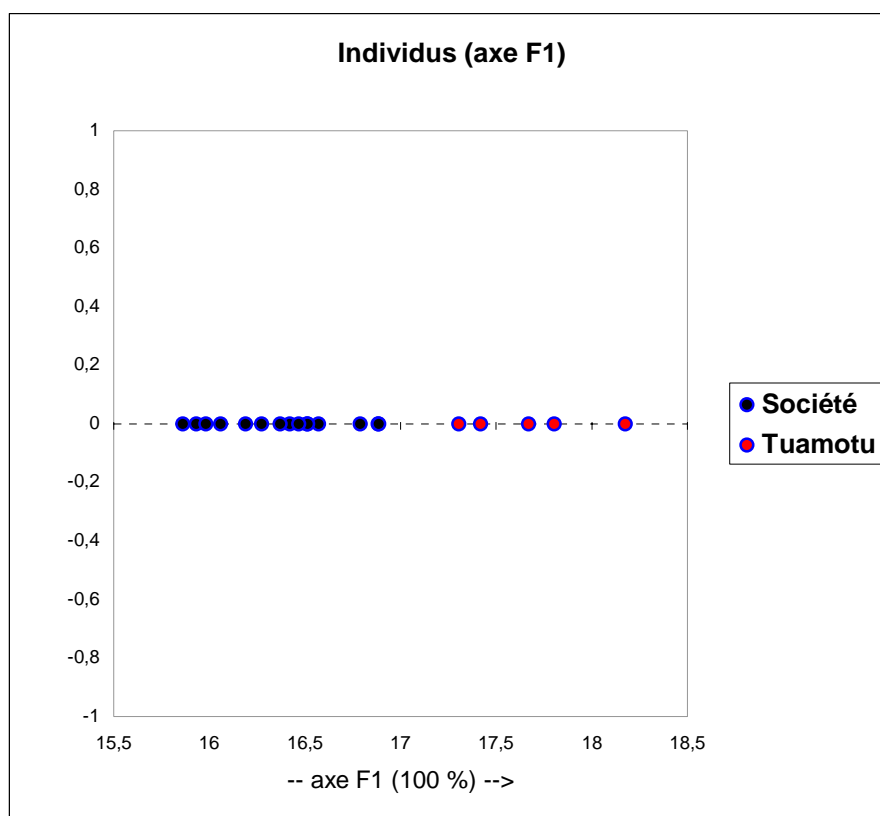


Figure 103 : AFD sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel

Nous pouvons maintenant envisager un cas plus général et faire une AFD sur tous les échantillons, du laboratoire et des producteurs. Nous aurons cette fois 4 groupes correspondant aux 4 archipels principaux de Polynésie (nous n'avons pas réussi à obtenir d'échantillons d'huile de l'archipel des Gambier), le groupe archipel des Australes contenant dorénavant 3 échantillons.

Les résultats de cette AFD généralisée apparaissent dans les [Figures 104](#), [105](#) et [106](#) qui suivent.

L'archipel qui se distingue le plus des trois autres est très nettement celui des Marquises (qui est séparé des autres principalement selon l'axe F1), et ensuite celui des Australes, même si les 3 individus de cet archipel sont parfois moins bien groupés (éloignement des autres archipels selon l'axe F2). L'archipel de la Société et celui des Tuamotu sont plus proches l'un de l'autre, tout en formant chacun un groupe unitaire très clair. Ces deux derniers archipels sont discriminés à la fois par l'axe F1 et par l'axe F3.

Globalement, on peut dire que les Tamanu de chaque archipel de Polynésie forment chacun une entité caractéristique au sens de la composition de l'huile contenue dans leurs amandes, chaque entité se distinguant des autres de manière très significative.

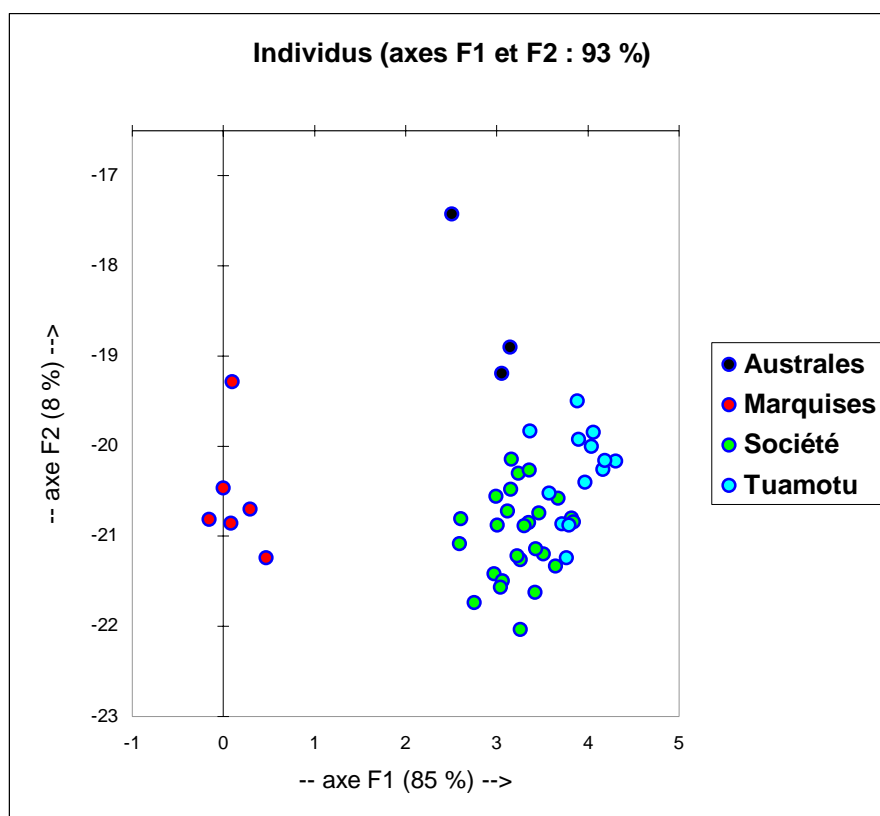


Figure 104 : AFD n°1 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel

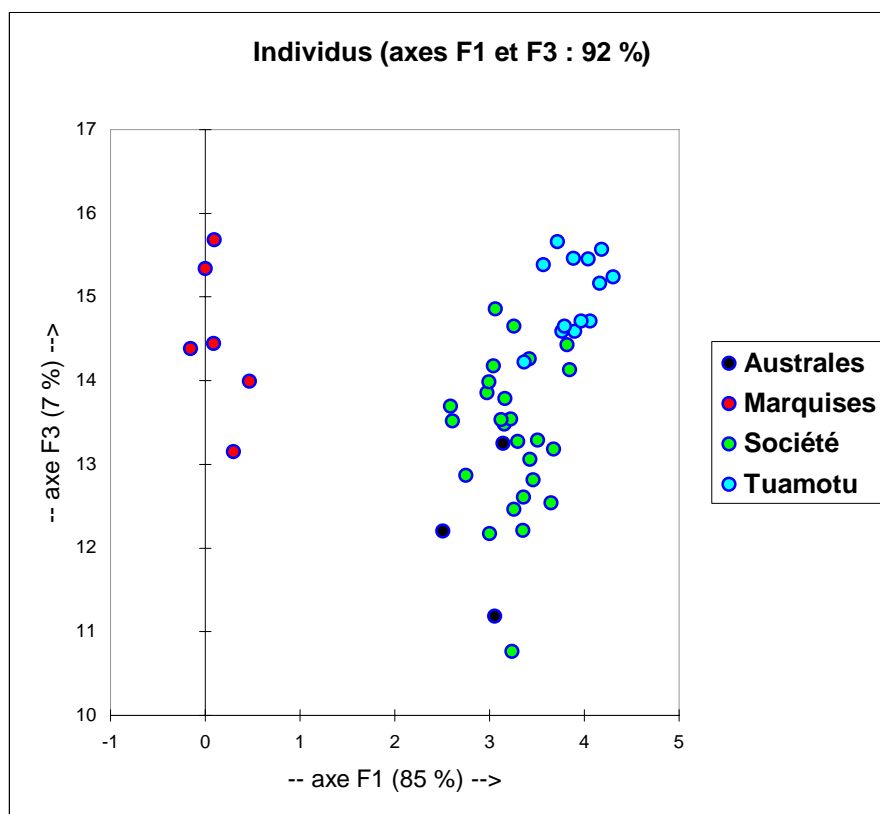


Figure 105 : AFD n°2 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel

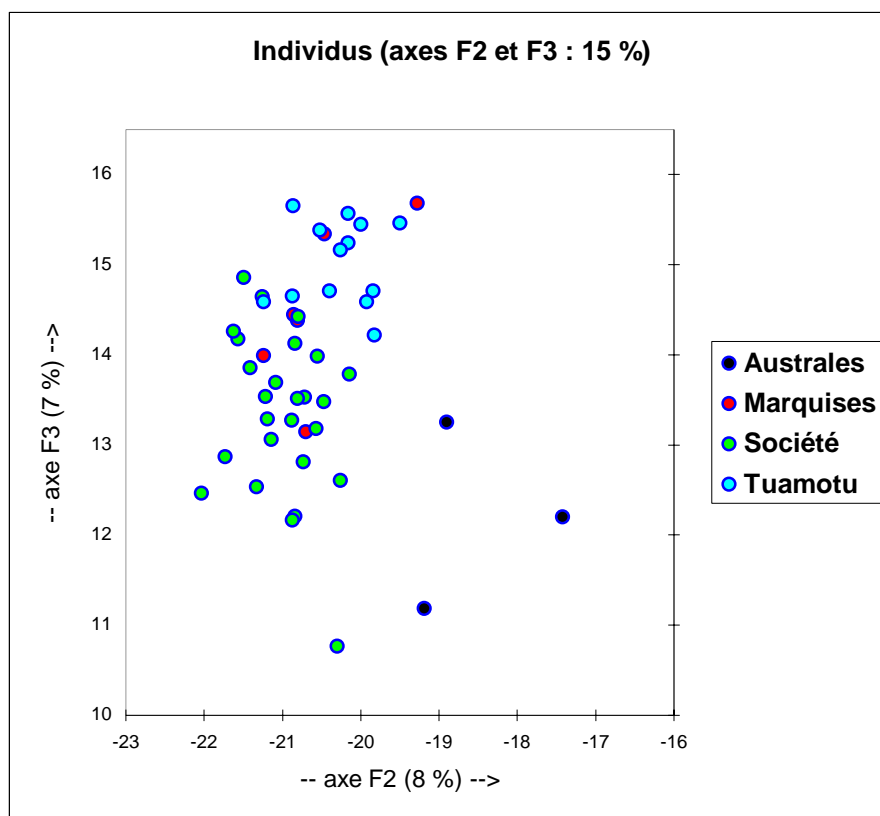


Figure 106 : AFD n°3 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel

Forts de ces résultats très probants, nous pouvons approfondir cette étude statistique en nous préoccupant de l'archipel pour lequel nous avons le plus d'échantillons, de provenances les plus diverses (d'îles différentes). Il s'agit bien entendu de l'archipel de la Société.

L'AFD sera alors menée avec comme regroupement choisi a priori l'appartenance des individus à une île. Nous avons alors 4 groupes d'individus qui proviennent respectivement des îles de Moorea, Maupiti, Raiatea et Tahaa (les autres îles de la Société échantillonnées comportent moins de 3 individus).

Les regroupements obtenus sont moins nets que dans le cas des regroupements par archipels, mais ceux-ci existent quand même. Les échantillons de Raiatea (les plus nombreux) sont les plus dispersés, mais ils sont tous au centre du graphique et aucun individu intrus n'est mêlé à ce groupe (**Figure 107**). Les trois autres groupes, de Maupiti, de Moorea et de Tahaa sont mieux regroupés (mais ils ne comprennent que 3 individus chacun) et se situent à la périphérie de celui de Raiatea. On voit toutefois que les groupes ne sont pas d'une homogénéité parfaite en regardant les **Figures 108** et **109**.

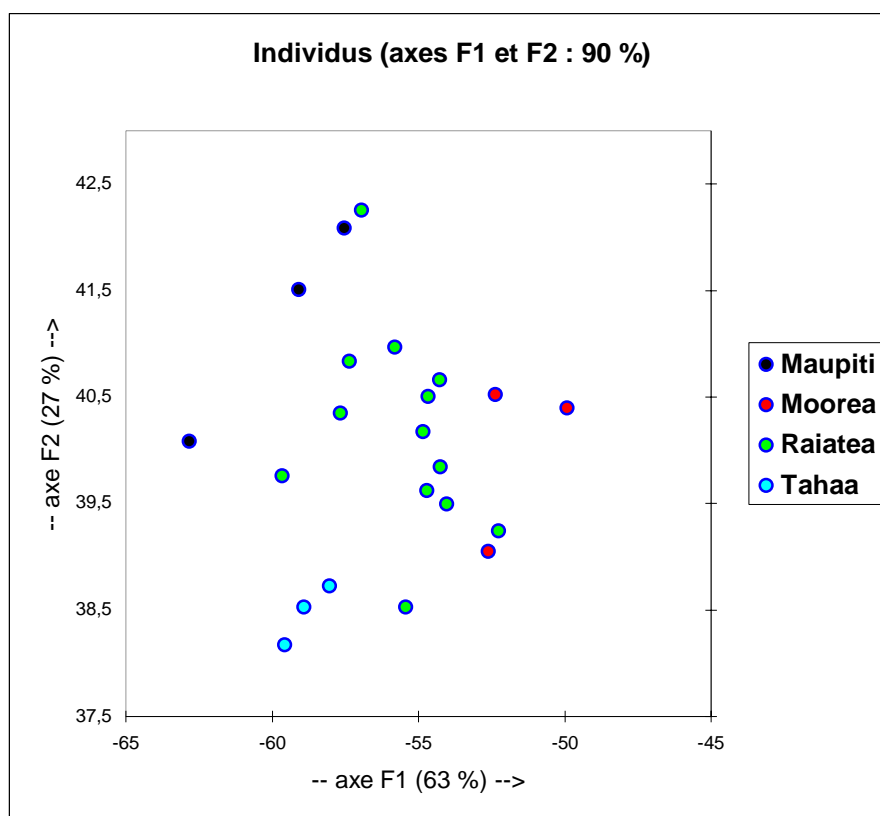


Figure 107 : AFD n°1 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île

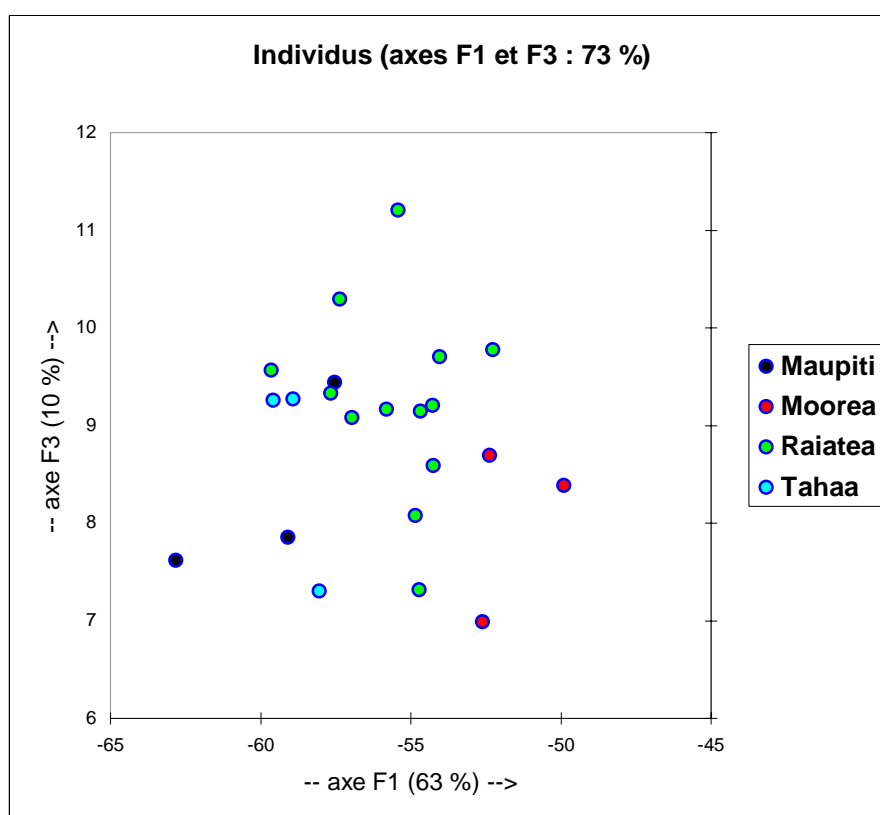


Figure 108 : AFD n°2 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île

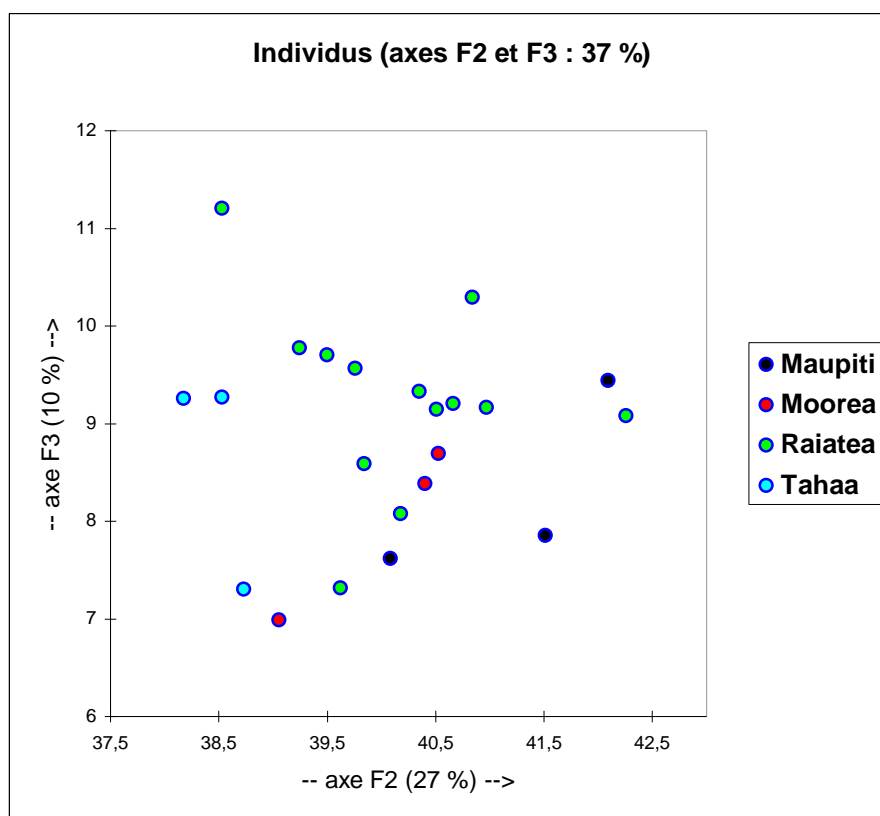


Figure 109 : AFD n°3 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île

On peut donc en conclure que comme pour les analyses portant sur les échantillons de feuilles, les individus sont caractérisés de manière plus significative par leur appartenance à un archipel que par leur appartenance à une île. Ceci peut s'expliquer par un éloignement géographique important entre les différents archipels, alors que les îles d'un même archipel sont bien sûr plus proches les une des autres. Ainsi, les graines de Tamanu pourraient voyager via les courants marins plus facilement d'une île à l'autre d'un même archipel en restant viable, et plus difficilement entre deux îles de deux archipels différents. Des caractéristiques génétiques communes importantes pourraient donc exister au sein d'un archipel, induisant des caractéristiques chimiques communes.

A la différence des extraits de feuilles, tous obtenus selon le même protocole, les huiles ont été produites par différentes personnes, avec différents appareillages, et selon différents modes opératoires. Il est donc également intéressant de savoir si une méthode statistique ne permettrait pas de regrouper les individus issus d'une même fabrication, afin de savoir si le processus de production a une influence sur la composition de cette huile de Tamanu, du moins en ce qui concerne les acides gras et la quantité de résine qu'elle contient.

Faisons donc une étude statistique (AFD), dans un premier temps, sur les échantillons qui nous ont été gracieusement fournis par différents producteurs d'huile de Tamanu du territoire, en essayant de les regrouper par producteur. Trois producteurs nous ont fourni plus de 2 échantillons. Nous avons donc 3 groupes d'individus, que l'on situe dans le plan (O, F1, F2) à la [Figure 110](#) :

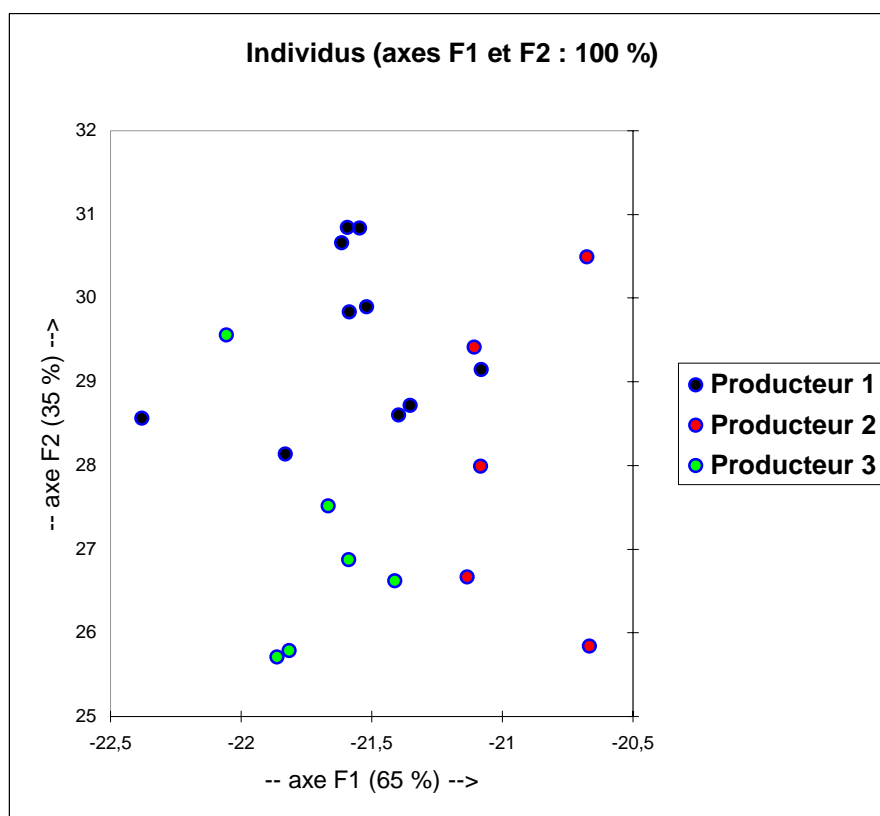


Figure 110 : AFD sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur

Malgré quelques individus isolés, nous remarquons que la majorité d'entre eux se regroupent assez bien, notamment ceux des producteurs 1 et 3. Les individus du producteur 2 sont plus éparpillés, et pourtant ils proviennent tous de la même île, ce qui n'est pas le cas de ceux des deux autres producteurs... On en conclut donc que la manière de produire cette huile doit avoir une certaine influence sur la composition de celle-ci, mais que cette influence ne peut pas être définie de manière claire et précise, et que de toutes façons elle semble être beaucoup moins importante que celle de la provenance des graines.

Même si cette étude sur l'influence des producteurs n'est pas très satisfaisante, généralisons la quand même en ajoutant au tableau de données les échantillons d'huile produits par le laboratoire. Les résultats sont présentés sur les [Figures 111](#), [112](#) et [113](#).

Comme précédemment, des ébauches de regroupements sont bien visibles ; on remarque notamment une séparation entre les échantillons du laboratoire et ceux des autres producteurs (selon l'axe F1). Mais rien n'est très significatif, ce qui nous conduit à conclure encore une fois que l'influence de la production de l'huile est très faible par rapport à l'influence de la provenance des graines dont l'huile est issue.

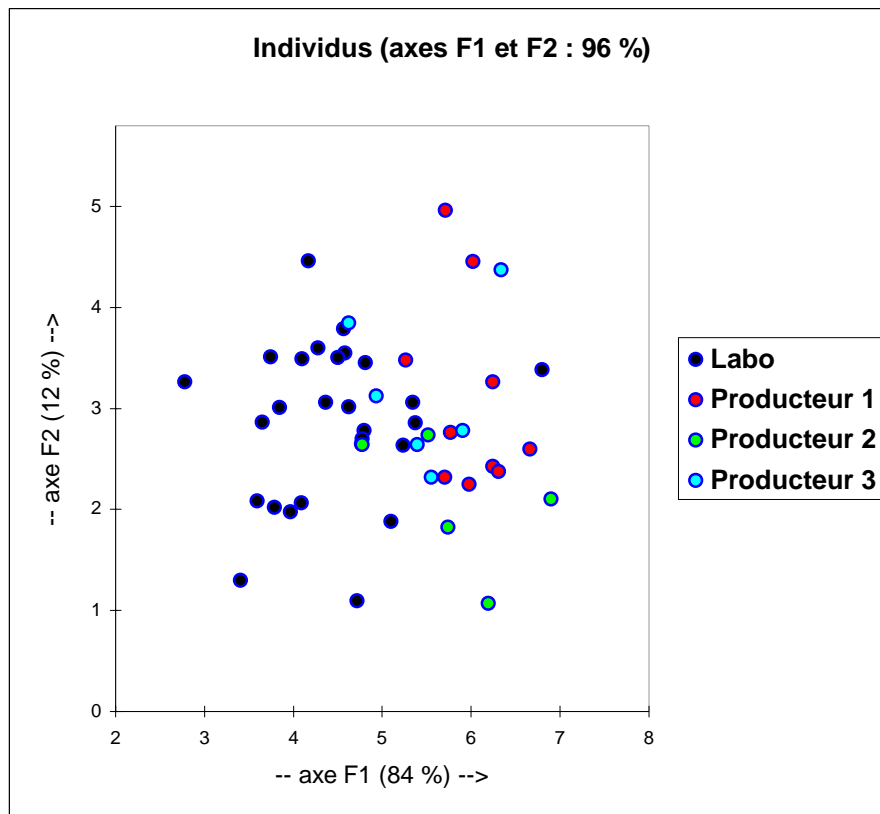


Figure 111 : AFD n°1 sur tous les échantillons d'huile classés par producteur

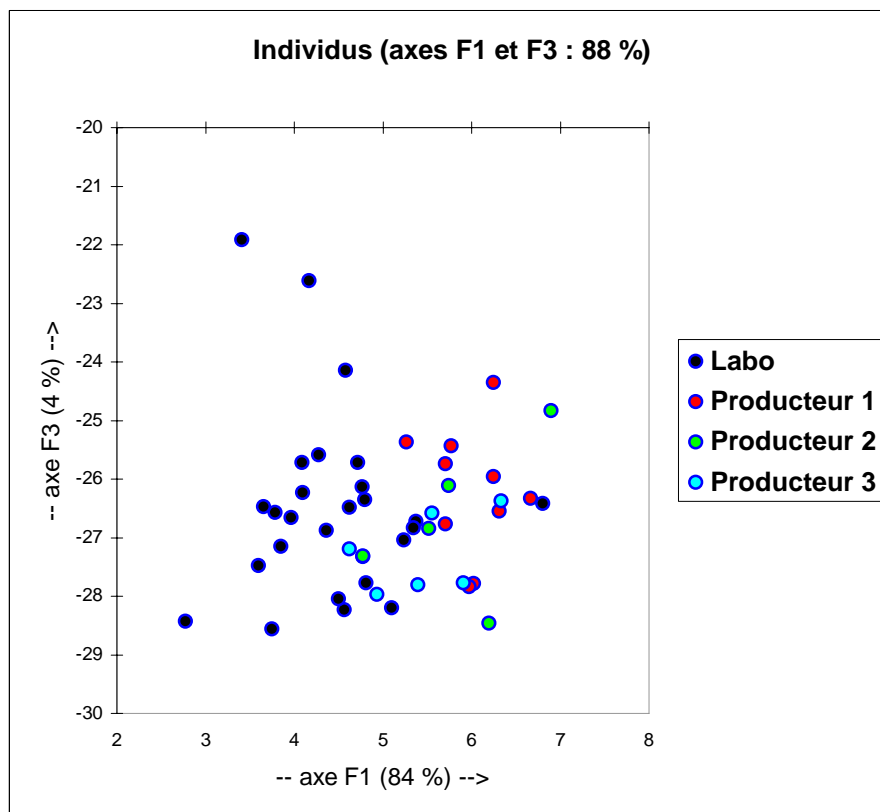


Figure 112 : AFD n°2 sur tous les échantillons d'huile classés par producteur

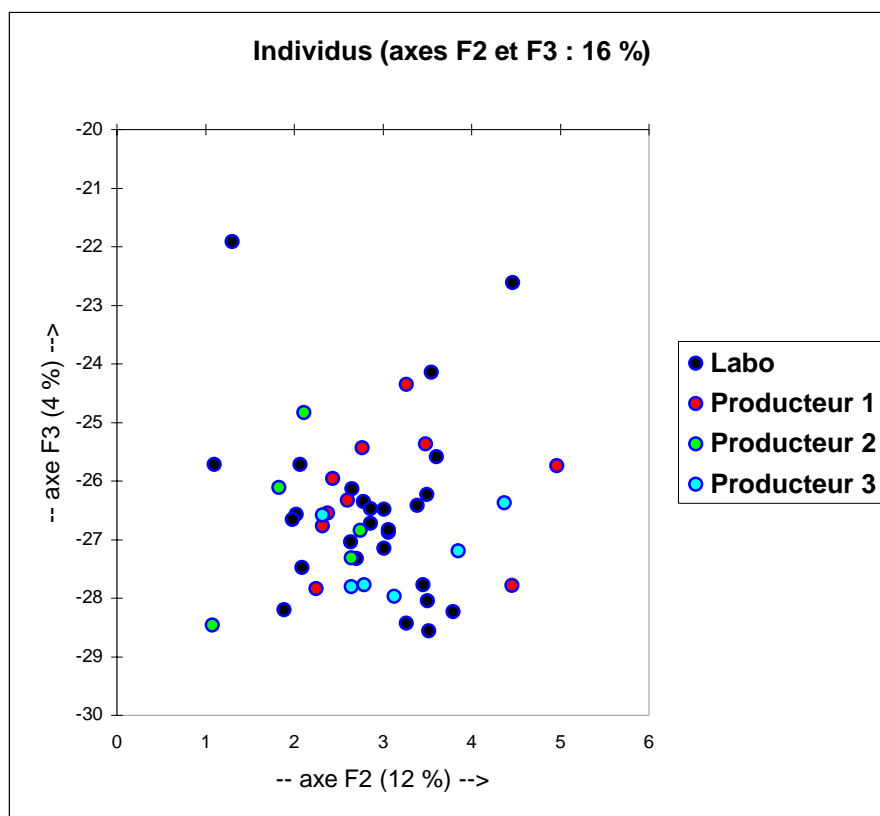


Figure 113 : AFD n°3 sur tous les échantillons d'huile classés par producteurs

Références :

- 1) L. Lebart, A. Morineau et M. Piron, "Statistique exploratoire multidimensionnelle", 3^e édition, Editions Dunod, Paris, 2000.
- 2) A.D. Patil, A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C. Haltiwanger, M.F. Bean, et al., "The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn.", J. Med. Chem., 1993, vol 36, n° 26, pp 4131-4138.
- 3) P. Pétard, "Plantes utiles de la Polynésie française", édition Haere po no Tahiti, réédition 1986.
- 4) A. Adeyeye, "Studies on seed oils of *Garcinia kola* and *Calophyllum inophyllum*", J. Sci. Food Agric., 1991, vol 57, pp 441-442.
- 5) J. Hemavathy et J.V. Prabhakar, "Lipid composition of *Calophyllum inophyllum* kernel", JAOCS, 1990, vol 67, n° 12, pp 955-957.
- 6) J.R.E. Rasoarahona, "Valorisation annuelle de la composition en acides gras des lipides de poissons d'eau douce de Madagascar : *Cyprinus*, *Carassius*, *Arius* et *Tilapia*. Application à la différenciation du genre *Tilapia*", Thèse de l'Université d'Aix-Marseille III, 1992.
- 7) M.J. Vacheron, G. Michel et R. Guilluy, Bull. Soc. Chim. Fr., 1969, vol 51, p 171.

IV.4. Discussion - Conclusions

Les données recueillies après diverses analyses des extraits de feuilles de Tamanu nous ont permis de déterminer quels sont les archipels et les îles où les arbres échantillonnés sont les plus riches en certaines coumarines, intéressantes pour leurs propriétés thérapeutiques. Certains individus sont même très particuliers et intéressants du point de vue de la teneur en coumarines de leurs feuilles ; mais on ne peut malheureusement pas ramasser une grande quantité de feuilles d'un même individu sans mettre sa survie en danger (les feuilles, une fois cueillies, ne repoussent plus ; seuls les nouveaux rameaux portent de nouvelles feuilles). On préférera donc faire une récolte importante de feuilles répartie sur plusieurs individus d'un même peuplement, d'une même île ou d'un même archipel. En ce qui concerne les huiles, les analyses menées sur les acides gras et sur la quantité de résines sont moins intéressantes du point de vue chimique et pharmacologique. Toutefois, une différenciation des huiles provenant des Marquises et des Australes a pu être observée suivant leur composition en acides gras. Il serait par contre très intéressant de faire une analyse des résines de l'huile semblable à celle effectuée sur les échantillons de feuilles, afin de connaître les coumarines qu'elles contiennent. D'autant plus que l'huile, contrairement aux feuilles, serait une ressource durable de ces coumarines.

Pour autant que sont intéressantes ces études 'classiques' sur les données obtenues, elles ne permettent pas de se faire une idée précise de la biodiversité du Tamanu en Polynésie française. Ainsi, les outils statistiques utilisés nous ont permis d'analyser les données recueillies de manière plus rationnelle. De ce fait les conclusions que nous tirons du point de vue de la biodiversité n'en sont que plus précises, plus développées, et surtout plus justes.

Concernant les données relatives aux extraits de feuilles ou aux échantillons d'huile, nous avons pu mettre en évidence la forte influence que représente pour la composition chimique la provenance du matériel végétal. Les Tamanu sont ainsi chimiquement différents lorsqu'ils proviennent d'archipels différents, ou, dans une moindre mesure, d'îles différentes. On peut ainsi parler d'un groupe caractéristique de Tamanu pour chacun de 3 archipels de Polynésie française : un groupe pour la Société, un pour les Tuamotu et un pour les Marquises. La même affirmation est à prendre avec prudence et à vérifier pour les Australes, et à établir pour les Gambier, en procédant à un échantillonnage plus conséquent. Il est à noter que ces groupes ne sont pas rigides, qu'ils ne peuvent se décrire par une composition chimique figée, mais par les caractéristiques détaillées des groupes statistiques établis dans ce paragraphe, à partir de données chimiques.

Une explication de l'existence de ces groupes, qui correspondent clairement à une localisation géographique des arbres, est sans doute l'évolution du patrimoine génétique de ces arbres. On peut effectivement très aisément concevoir qu'il y ait un lien entre les gènes des arbres, et la composition chimique de ceux-ci. L'explication géographique est alors plus facile à appréhender, puisqu'un brassage des gènes est forcément plus important entre des colonies d'arbres poussant sur des îles voisines. En effet les graines de Tamanu flottent et sont transportées d'île en île par les courants marins ; leur étanchéité leur permet de rester viables longtemps dans l'eau de mer ; d'autre part une graine a plus de chances d'aborder sur une île proche de son point de départ, que sur une île très éloignée et minuscule à l'échelle du Pacifique Sud. Ainsi se forment des colonies d'arbres isolées des autres situées sur d'autres archipels, et leurs patrimoines génétiques évoluent parallèlement, en ne se mélangeant que très rarement voir même jamais.

V. CONCLUSION

La mise en œuvre de tous les outils chromatographiques à notre disposition (CLBP, CLHP-RI, CLHP-DDL, CLHP-UV) a permis d'effectuer des séparations sur les échantillons massifs de feuilles de Tamanu. Ces méthodes ont permis d'isoler les molécules pures majoritaires qui entrent la composition des feuilles. Les triterpènes les plus classiques ont été retrouvés, accompagnés de trois molécules inédites : l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**), l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**), et l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**). Pour les coumarines et les néo-flavonoïdes, des molécules déjà décrites ont été isolées, ainsi que deux molécules nouvelles : l'inophyllum F1 (**90**) et l'inophyllum F2 (**91**). Ces coumarines majoritaires possèdent toutes une configuration 10,11-trans pour leur cycle chromanol, qui semble induire une forte activité anti-HIV. Toutes les molécules isolées à partir des feuilles du Tamanu de Polynésie française sont intéressantes du point de vue de leur bioactivité qui est très variée. Des tests biologiques sur ces molécules nouvelles se révéleraient sans doute positifs.

Par ailleurs, des méthodes chromatographiques analytiques (CLHP-UV/DAD et CPG) ont été mises au point afin d'analyser la composition de nombreux échantillons de feuilles (coumarines) et d'huiles (acides gras) de Tamanu. Les données obtenues ont été analysées par des outils statistiques afin d'étudier la biodiversité de la plante en Polynésie française. On a ainsi mis en évidence l'existence de trois groupes de Tamanu « chimiquement » bien distincts qui correspondent à trois archipels de Polynésie : la Société, les Tuamotu et les Marquises. Cependant la différenciation est moins nette à partir des résultats des analyses des acides gras.

Il est ainsi évident que des études génétiques sur des Tamanus de différentes îles et de différents archipels seraient ainsi très intéressantes à mener pour corroborer ces résultats et montrer plus précisément les filiations entre les différents groupes d'individus déterminés ici par l'étude statistique de données chimiques.

Du point de vue de la biodiversité des Tamanu, cette étude est très importante car elle montre bien que cette biodiversité est bien réelle. Elle existe et il est important de la préserver. Ainsi, pour les producteurs d'huile de Tamanu de Polynésie française, qui sont les principaux exploitants de cet arbre, mais aussi pour le Territoire qui semble s'engager dans le développement du Tamanu pour son bois, il s'agira de protéger du mieux possible le patrimoine génétique des Tamanu de chaque île, en ne plantant sur une île que des graines provenant d'arbres poussant déjà sur cette île.

En ce qui concerne des arbres qui seraient plantés en vue de leur exploitation pharmaceutique, par l'extraction des molécules contenues dans leur écorce, leurs feuilles ou leurs graines, ils pourront être sélectionnés et reproduits en fonction de leur composition chimique. Mais là encore il faut faire attention à ne pas nuire à la biodiversité, en procédant de manière simple et logique, c'est à dire en développant les colonies de ces arbres intéressants, là où elles se trouvent déjà, et ne pas tenter d'en implanter ailleurs. Une ressource naturelle intelligemment gérée n'en est que plus durablement exploitable.

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

Le Tamanu est un arbre d'une importance majeure dans la culture et la pharmacopée traditionnelle polynésiennes. Outre son rôle fortement symbolique, il est utilisé pour ses propriétés médicinales depuis des siècles. Ces vertus empiriques ont été confirmées par des études cliniques, puis expliquées par la découverte de nombreuses molécules bioactives et de leur mode d'action. Ces molécules appartiennent principalement à trois grandes familles : les coumarines et les néo-flavonoïdes, les triterpènes, et les xanthones. Les activités biologiques les plus importantes qui ont été démontrées sont sans aucun doute les activités anti-cancéreuse avec la calocoumarine A (**35**) et surtout anti-virale (HIV) avec l'inophyllum B (**1**), qui est actuellement en phase de tests cliniques.

Cette étude constitue la première investigation d'ordre chimique portant sur le Tamanu de Polynésie française. Pour mener à bien l'isolement de molécules pures, il nous a fallu mettre en œuvre un grand nombre de méthodes chromatographiques modernes (CLBP, CLHP-UV/DAD, CLHP-DDL), du fait de la complexité des mélanges de molécules contenues dans les extraits. Par ailleurs, les méthodes spectroscopiques modernes (IR, UV, RMN, SM/SM) ont été utilisées pour déterminer la structure moléculaire des molécules isolées. Des triterpènes, des coumarines et des néo-flavonoïdes déjà décrits dans la littérature ont été retrouvés dans les extraits de feuilles, à côté de trois nouveaux triterpènes et de deux nouvelles coumarines : l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**), l'acide 27-acétoxy-canophyllique (**89**), l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (**85**), l'inophyllum F1 (**90**) et l'inophyllum F2 (**91**).

Un large échantillonnage de feuilles et d'huiles de Tamanu en provenance de diverses îles de tous les archipels de Polynésie a été réalisé. Des méthodes analytiques ont ensuite été mises au point pour analyser les échantillons de feuilles et d'huiles récoltés. Pour les feuilles, les extraits bruts ont été analysés sur CLHP-UV, les pics retenus étant entre autres des coumarines. Pour les échantillons d'huiles, les acides gras ont été analysés par CPG. Les données obtenues ont ensuite été traitées par des outils statistiques (ACP, AFD) afin d'étudier la biodiversité du Tamanu en Polynésie française. Les résultats de cette étude de la biodiversité montrent clairement l'existence de trois groupes de Tamanu bien distincts, qui correspondent aux archipels de la Société, des Tuamotu, et des Marquises. La disparité géographique de ces îles pourrait expliquer ces variabilités. En effet, l'isolement géographique des colonies de Tamanu les unes par rapport aux autres peut induire des évolutions différentes dans leurs patrimoines génétiques.

A l'issue de la présente étude, les perspectives suivantes peuvent être dégagées :

Des tests biologiques seraient à effectuer sur les nouvelles molécules que nous avons isolées, en vue de leur valorisation dans le domaine pharmaco-médical.

Il serait intéressant de continuer la détermination de la composition chimique du Tamanu en se focalisant sur les extraits d'écorces en vue d'isoler des xanthones et sur les résines des huiles en vue d'isoler des coumarines et peut être des molécules appartenant à d'autres familles chimiques.

En ce qui concerne la biodiversité, cette première étude pourrait être complétée en réalisant d'autres échantillonnages plus ciblés permettant l'étude de l'influence de l'altitude, de l'exposition, etc... des arbres sur leur composition chimique. D'autres marqueurs chimiques pourraient aussi être utilisés dans l'étude de la biodiversité du Tamanu, comme par exemple la composition en xanthones des écorces, la composition en coumarines des résines de l'huile, etc... Des études phylogéniques pourraient apporter des réponses à la variabilité observée.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

I. BOTANIQUE ET ETHNOBOTANIQUE

- 2004, J. Florence, "Flore de la Polynésie française, Volume 2", Collection Faune et Flore tropicales 41, IRD Editions, Publications Scientifiques du Muséum, pp 113-115.
- 2003, J.-F. Butaud, "Le *Calophyllum inophyllum* et la filière Tamanu en Polynésie française", communication personnelle, Département FOGER du SDR.
- 2003, A.-E. Hay, "Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique", Thèse de l'Université d'Angers, France.
- 2002, A.C. Dweck, T. Meadows, "Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – The African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea", Int. J. Cosmet. Sci., vol 24, n° 6 pp 341-348.
- 2001, J.-L. Guignard, "Systématique moléculaire", Ed. Masson, 12^e édition, Paris.
- 2000, D. Guilet, "Etude Phytochimique d'une Clusiaceae Malaise, le *Calophyllum dispar*", Thèse de l'Université d'Angers, France.
- 2000, T. Henry, "Tahiti aux temps anciens", Publications de la Société des Océanistes, n° I, Musée de l'Homme, Paris.
- 2000, R.-E. Spichiger, V.V. Savolainen et M. Figeat, "Botanique systématique des plantes à fleurs", Ed. des presses polytechniques et universitaires romandes, 2^e édition, Lausanne.
- 2000, J. Mugnier, "De la graine à la fleur", Pour la Science, Paris.
- 1992, W.A. Whistler, "Flowers of the Pacific Islands Seashore", Ed. Isle Botanica, Honolulu.
- 1986, P. Pétard, "Plantes utiles de la Polynésie française", édition Haere po no Tahiti, réédition.
- 1984, F. Grépin et M. Grépin, "La médecine Tahitienne traditionnelle, *raau tahiti*", Société Nouvelle des Editions du Pacifique.
- 1980, P.F. Stevens, "A revision of the old world species of the *Calophyllum* (Guttiferae)", J. Arnold Arbor. Harv. Univ., vol 61, pp 117-424.
- Date ?, L. Chabouis et F. Chabouis, "Petite histoire naturelle de la Polynésie française", Société Polynésienne d'Édition.

II. CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROSCOPIES

1. Divers

- 2003, D.C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", Sixième Edition, Editions W.H. Freeman and Company, New York.
- 1998, R.M. Silverstein, F.X. Webster, "Spectrometric identification of organic compounds", Ed. J. Wiley & Sons Inc., 6^e édition, New York.
- 1982, R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, "Manuel pratique de chromatographie en phase liquide", Ed. Masson, 2^e édition, Paris.

2. Résonance Magnétique Nucléaire

- 2005, <http://web.chem.queensu.ca/FACILITIES/NMR/nmr/webcourse/>, site web consulté le 1^{er} mars 2005.
- 1993, J.K.M. Sanders et B.K. Hunter, "Modern NMR spectroscopy, a guide for chemists", Ed. Oxford University Press, 2nd Ed., Oxford.
- 1984, G.A. Morris, "Topics in ¹³C NMR spectroscopy", vol 4, ed G.C. Levy, pp 179-196, Ed. J. Wiley & Sons, New York.

- 1982, M.R. Bendall, D.M. Doddrell, D.T. Pegg, et W.E. Hull, "DEPT", Bruker Analytische Messtechnik, Karlsruhe.
- 1984, A. Bax, "Topics in ^{13}C NMR spectroscopy", vol 4, ed G.C. Levy, pp 197-238, Ed. J. Wiley & Sons, New York.
- 1986, G.A. Morris, Magn. reson. chem., vol 24, pp 371-403.
- 1990, J. Keeler, Chem. Soc. rev., vol 19, pp 381-406.
- 1988, H. Kessler, M. Gehrke et C. Griesinger, Angew. chem. intl. edn. engl., vol 27, pp 490-536.
- 1986, R.R. Ernst, G. Bodenhausen et A. Wokaun, "Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions", Clarendon Press, Oxford.
- 1987, N. Chandrakumar et S. Subramanian, "Modern techniques in high resolution FT NMR", Springer, New York.
- 1988, J. Cavanagh, C.A. Hunter, D.N.M. Jones, J. Keeler et J.K.M. Sanders, Magn. reson. chem., vol 26, pp 867-875.
- 1985, J. Keeler et D. Neuhaus, J. magn. reson., vol 63, pp 454-472.

3. Spectrométrie de Masse

- 2005, L. Charles, F. Laure, P. Raharivelomanana et J.-P. Bianchini, "Sheath liquid interface for the normal-phase liquid chromatography / electrospray mass spectrometry combination and its application to the analysis of neoflavonoids", J. Mass Spectrom., vol 40, n° 1, pp 75-82.
- 1999, E. De Hoffmann, J. Charrette et V. Stroobant, "Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés", Ed. Dunod, 2^e édition, Paris.
- 1994, E. De Hoffmann, J. Charrette et V. Stroobant, "Spectrométrie de masse", Ed. Masson, Paris.
- 1994, R.E. Finnigan, Anal. Chem., vol 66, p 969A.
- 1993, P. Kebarle et L. Tang, Anal. Chem., vol 65, pp 972A-986A.
- 1992, J.D. Henion, Proceeding of the 40th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC, mai 1992, p. 465.
- 1991, R. Libert, D. Hermans, J.P. Draye, F. Van Hoof, E. Sokal, et al., Clin. Chem., vol 37, p 2102.
- 1990, M.G. Ikonomu, A.T. Blades et P. Kebarle, Anal. Chem., vol 62, p 957.
- 1990, M. Mann, Org. Mass Spectrom., vol 25, p 575.
- 1990, R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, C.J. Barinaga et H.R. Udseth, Anal. Chem., vol 62, p 882.
- 1989, J.A. Loo, H.R. Udseth et R.D. Smith, Anal. Biochem., vol 179, p 404.
- 1989, R.E. March et R.I. Hughes, "Quadrupole Storage Mass Spectrometry", Wiley, New York.
- 1988, M. Yamashita et J.B. Fenn, Phys. Chem., vol 88, p 4451.
- 1988, M. Yamashita et J.B. Fenn, Phys. Chem., vol 88, p 4671.
- 1987, A.P. Bruins, T.R. Covery et J.D. Henion, Anal. Chem., vol 59, p 2647.
- 1985, Md.A. Mabud, M.J. DeKrey et R.G. Cooks, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, vol 75, p 285.
- 1982, B.A. Thomsom, J.V. Iribane et P.J. Dziedzic, Anal. Chem., vol 54, p 2219.
- 1979, R.B. Cody et B.S. Freiser, Anal. Chem., vol 51, p 547.
- 1968, H. Kienitz, "Massenspektrometrie", Verlag Chemie, Weinheim.
- 1965, R.E. Ferguson, K.E. McKulloch et H.M. Rosenstock, J. Chem. Phys., vol 42, p 100.
- 1953, W. Paul et H.S. Steinwedel, Z. Naturforsch., vol 8a, p 448.
- 1952, R.N. Schwartz, Z.I. Slawsky et K.F. Herzfeld, J. Chem. Phys., vol 20, p 1591.

III. STRUCTURES MOLECULAIRES

Classement par type de molécules et par dates. *En bleu l'espèce de Calophyllum concernée.*

1. Les coumarines et les néo-flavonoïdes

- 2004, F. Cottiglia, B. Dhanapal, O. Sticher et J. Heilmann, "New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*", J. Nat. Prod., vol 67, n° 4, pp 537-541. *C. brasiliense*
- 2004, R. Reyes-Chilpa, E. Estrada-Muniz, T. Ramirez Apan, B. Amekraz, A. Aumelas, et al., "Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*", Life Sci. (1973), vol 75, n° 13, pp 1635-1647. *C. brasiliense*
- 2004, E. Sekino, T. Kumamoto, T. Tanaka, T. Ikeda et T. Ishikawa, "Concise synthesis of anti-HIV-1 active (+)-inophyllum B and (+)-calanolide A by application of (-). Quinine-catalyzed intramolecular oxo-michael addition", J. Org. Chem., vol 69, n° 8, pp 2760-2767.
- 2004, Y.-C. Shen, L.-T. Wang, A.T. Khalil et Y.-H. Kuo, "Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*", Chem. Pharm. Bull., vol 52, n° 4, pp 402-405. *C. blancoi*
- 2003, C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V.C. Filho, F. Enjo, et al., "Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins", J. Nat. Prod., vol 66, n° 3, pp 368-371. *C. brasiliense*
- 2003, Y.-C. Shen, M.-C. Hung, L.-T. Wang et C.-Y. Chen, "Inocalophyllins A, B and their methyl esters from the seeds of *Calophyllum inophyllum*", Chem. Pharm. Bull., vol 51, n° 7, pp 802-806. *C. inophyllum*
- 2002, H.R.W. Dharmaratne, G.T. Tan, G.P.K. Marasinghe et J.M. Pezzuto, "Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes", Planta Med., vol 68, n° 1, pp 86-87.
- 2001, T. Creagh, J.L. Ruckle, D.T. Tolbert, J. Giltner, D.A. Eiznhamer, et al., "Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects", Antimicrob. Agents Chemother., vol 45, n° 5, pp 1379-1386.
- 2001, D. Guilet, J.J. Hélesbeux, D. Séraphin, T. Sévenet, P. Richomme, et al., "Novel cytotoxic 4-phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*", J. Nat. Prod., vol 64, n° 5, pp 563-568. *C. dispar*
- 2001, D. Guilet, D. Séraphin, D. Rondeau, P. Richomme et J. Bruneton, "Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*", Phytochemistry, vol 58, n° 4, pp 571-575. *C. dispar*
- 2001, M. Itoigawa, C. Ito, H.T.W. Tan, M. Kuchide, H. Tokuda, et al., "Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*", Cancer Lett., vol 169, n° 1, pp 15-19. *C. inophyllum*
- 2000, E. De Clercq, "Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection", Med. Res. Rev., vol 20, n° 5, pp 323-349.
- 2000, T. Ishikawa, "Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins : distribution, chemistry, and activity", Heterocycles, vol 53, n° 2, pp 453-474.
- 2000, S.P. Joshi, V.B. Deodhar et U.D. Phalgunie, "A new coumarin from the seeds of *Calophyllum inophyllum* Linn.", Indian J. Chem. Sect. B, vol 39, n° 7, pp 560-561. *C. inophyllum*
- 1999, M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, V.U. Ahmad et G.H. Rizwani, "Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*", Phytochemistry, vol 50, n° 8, pp 1385-1389. *C. inophyllum*

- 1999, D. Guilet, C. Morel, N. Noyer, M. Cornec, D. Séraphin, et al., "Four new 4-phenylcoumarins from *Calophyllum dispar* : isolation and hemisynthesis", *Heterocycles*, vol 51, n° 1, pp 67-76. *C. dispar*
- 1999, T. Ishikawa, Y. Oku, T. Tanaka et T. Kumamoto, "An approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarin synthesis : an enantioselective construction of 2,3-dimethyl-4-chromanone ring by quinine-assisted intramolecular Michael-type addition", *Tetrahedron Lett.*, vol 40, n° 19, pp 3777-3780.
- 1999, C. Ito, Y. Mishina, M. Ohta, H. Furukawa, H. Tan, et al., "Studies on anti-tumor promoter from tropical medicinal plants (8). Isolation and structure elucidation of new coumarins from *Calophyllum* species (Guttiferae)", The 119th Annual Meetings of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokushima, March 1999, Abstract II, p 156.
- 1999, Y.M. Lin, H.M. Anderson, T.R. Jenta, M.J. Williams, M.T. Flavin, et al., "An efficient and scalable method for the isolation of costatolide, a naturally-occurring anti-HIV agent, from the latex of *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*", *Pharm. Biol.*, vol 37, n° 1, pp 71-76. *C. teysmannii*
- 1999, G. Matthée, A.D. Wright et G.M. König, "HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin", *Planta Med.*, vol 65, n° 6, pp 493-506.
- 1999, C. Morel, D. Guilet, J.M. Oger, D. Séraphin, T. Sévenet, et al., "6-acylcoumarins from *Mesua racemosa*", *Phytochemistry*, vol 50, pp 1243-1247.
- 1999, Z.Q. Xu, M.G. Hollingshead, S. Borgel, C. Elder, A. Khilevich, et al., "In vivo anti-HIV activity of (+)-calanolide A in the hollow fiber mouse model", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol 9, pp 133-138.
- 1998, S.G. Cao, K.L. Chong, J.J. Vittal, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Isocalanone, a new pyranocoumarin from *Calophyllum teysmannii* (Guttiferae)", *Nat. Prod. Lett.*, vol 11, pp 233-236. *C. teysmannii*
- 1998, S.G. Cao, K.Y. Sim, J. Pereira et S.H. Goh, "Coumarins from *Calophyllum teysmannii*", *Phytochemistry*, vol 47, n° 5, pp 773-777. *C. teysmannii*
- 1998, S.G. Cao, K.Y. Sim, J. Pereira et S.H. Goh, "Coumarins from *Calophyllum teysmannii* (Guttiferae)", *Phytochemistry*, vol 47, n° 6, pp 1051-1056. *C. teysmannii*
- 1998, S.G. Cao, X.H. Wu, K.Y. Sim, B.H.K. Tan, J.J. Vittal, et al., "Minor coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* and synthesis of cytotoxic calanone derivatives", *Helv. Chim. Acta*, vol 81, n° 8, pp 1404-1416. *C. teysmannii*
- 1998, H.R.W. Dharmaratne, C.S. Wickramasinghe et G.P.K. Marasinghe, "Distribution of pyranocoumarins in *Calophyllum moonii*", *ACGC Chem. Res. Commun.*, vol 8, pp 41-44. *C. moonii*
- 1998, H.R.W. Dharmaratne, J.R.D.M. Sajeevani, G.P.K. Marasinghe et E.M.H.G.S. Ekanayake, "Distribution of pyranocoumarins in *Calophyllum cordato-oblongum*", *Phytochemistry*, vol 49, n° 4, pp 995-998. *C. cordato-oblongum*
- 1998, H.R.W. Dharmaratne, W.M.A.P. Wanigasekera, E. Mata-Greenwood et J.M. Pezzuto, "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity by cordatolides isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*", *Planta Med.*, vol 64, n° 5, pp 460-461. *C. cordato-oblongum*
- 1998, T. Ishikawa, "Chemistry of anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins" (EN JAPONAIS), *J. Synth. Org. Chem.*, vol 56, n° 2, pp 116-124.
- 1998, T.C. McKee, C.D. Covington, R.W. Fuller, H.R. Bokesch, S. Young, et al., "Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum* : a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection", *J. Nat. Prod.*, vol 61, n° 10, pp 1252-1256. *C. lanigerum* et *teysmannii*
- 1998, X. Shi, A.B. Attygalle, A. Liwo, M.H. Hao, J. Meinwald, et al., "Absolute stereochemistry of soulattrolide and its analogues", *J. Org. Chem.*, vol 63, pp 1233-1238.

- 1998, C. Spino, M. Dodier et S. Sotheeswaran, "Anti HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil", Bioorg. Med. Chem. Lett., vol 8, n° 24, pp 3475-3478. *C. inophyllum* et *cerasiferum*
- 1998, J.J. Vittal, S.G. Cao, S.H. Goh, G.K. Tan et K.Y. Sim, "Three novel isomeric pyranocoumarins from *Calophyllum teysmannii* : calanone, isocalanone and teysmanone A", Acta Crystallogr. Sect. C : Cryst. Struct. Commun., vol 54, n° 10, pp 1536-1540. *C. teysmannii*
- 1998, A.J. Vlietinck, T. De Bruyne, S. Apers et L.A. Pieters, "Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection", Planta Med., vol 64, pp 97-109.
- 1997, S.G. Cao, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Three new coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* (Guttiferae)", Heterocycles, vol 45, n° 10, pp 2045-2052. *C. teysmannii*
- 1997, T. Ishikawa, Y. Oku et K.I. Kotake, "Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton : a model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins", Tetrahedron, vol 53, n° 44, pp 14915-14928.
- 1997, D.E. Zembower, S. Liao, M.T. Flavin, Z.Q. Xu, T.L. Stup, et al., "Structural analogues of the calanolide anti-HIV agents. Modification of the trans-10,11-dimethyldihydropyran-12-ol ring (ring C)", J. Med. Chem., vol 40, n° 6, pp 1005-1017. *C. lanigerum*
- 1996, M.J. Currens, R.J. Gulakowski, J.M. Mariner, R.A. Moran, R.W. Buckheit, et al., "Antiviral activity and mechanism of action of calanolide A against the human immunodeficiency virus type-1", J. Pharmacol. Exp. Ther., vol 279, n° 2, pp 645-651.
- 1996, M.J. Currens, J.M. Mariner, J.B. McMahon et M.R. Boyd, "Kinetic analysis of inhibition of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase by calanolide A", J. Pharmacol. Exp. Ther., vol 279, n° 2, pp 652-661.
- 1996, M.T. Flavin, J.D. Rizzo, A. Khilevich, A. Kucherenko, A.K. Sheinkman, et al., "Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (+/-)-calanolide A and its enantiomers", J. Med. Chem., vol 39, n° 6, pp 1303-1313.
- 1996, D.L. Galinis, R.W. Fuller, T.C. McKee, J.H. Cardellina, R.J. Gulakowsky, et al., "Structure-activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-calanolide A and (-)-calanolide B", J. Med. Chem., vol 39, n° 22, pp 4507-4510.
- 1996, T. Ishikawa, Y. Oku, K.I. Kotake et H. Ishii, "Cesium fluoride-induced intramolecular Michael addition : highly diastereoselective ring construction of a trans-2,3-dimethylchroman-4-one", J. Org. Chem., vol 61, n° 19, pp 6484-6485.
- 1996, T.C. McKee, R.W. Fuller, C.D. Covington, J.H. Cardellina, I.R.J. Gulakowsky, et al., "New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*", J. Nat. Prod., vol 59, n° 8, pp 754-758. *C. lanigerum* et *teysmannii*
- 1996, T. Pengsuparp, M. Serit, S.H. Hughes, D.D. Soejarto et J.M. Pezzuto, "Specific inhibition of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase mediated by soulattrolide, a coumarin isolated from latex of *Calophyllum teysmannii*", J. Nat. Prod., vol 59, n° 9, pp 839-842. *C. teysmannii*
- 1995, J.H. II Cardellina, H.R. Bokesch, T.C. McKee et M.R. Boyd, "Resolution and comparative anti-HIV evaluation of the enantiomers of calanolides A and B", Bioorg. Med. Chem. Lett., vol 5, n° 9, pp1011-1014. *C. lanigerum*
- 1995, P.P. Deshpande et D.C. Baker, "A simple approach to the synthesis of the chiral substituted chroman ring of *Calophyllum* coumarins", Synthesis, n° 6, pp 630-632.
- 1995, P.P. Deshpande, F. Tagliaferri, S.F. Victory, S. Yan et D.C. Baker, "Synthesis of optically active calanolides A and B", J. Org. Chem., vol 60, n° 10, pp 2964-2965.
- 1995, A. Kucherenko, M.T. Flavin, W.A. Boulanger, A. Khilevich, R.L. Shone, et al., "Novel approach for synthesis of (+/-)-calanolide A and its anti-HIV activity", Tetrahedron Lett., vol 36, n° 31, pp 5475-5478.

- 1995, T.C. McKee, J.H. II Cardellina, G.B. Dreyer et M.R. Boyd, "The pseudocalanolides : structure revision of calanolides C and D", J. Nat. Prod., vol 58, n° 6, pp 916-920.
- 1995, C.J. Palmer et J.L. Josephs, "Synthesis of the *Calophyllum* Coumarins. Part 2", J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, n° 24, pp 3135-3152.
- 1994, R.W. Fuller, H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, T.C. McKee, J.H. II Cardellina, et al., "HIV inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. inophylloide", Bioorg.Med. Chem. Lett., vol 4, n° 16, pp 1961-1964. *C. teysmannii*
- 1994, K.R. Gustafson, H.R. Bokesch, R.W. Fuller, J.H. II Cardellina, M.R. Kadushin, et al., "Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*", Tetrahedron Lett., vol 35, n° 32, pp 5821-5824. *C. teysmannii*
- 1994, A. Mizuno, M. Takata, Y. Okada, T. Okuyama, H. Nishino, et al., "Structures of new coumarins and antitumor-promoting activity of coumarins from *Angelica edulis*", Planta Med., vol 60, n° 4, pp 333-336.
- 1994, C.J. Palmer et J.L. Josephs, "Synthesis of the *Calophyllum* coumarins", Tetrahedron Lett., vol 35, n° 30, pp 5363-5366.
- 1994, A.V.R. Rao, A.S. Gaitonde, K.R.C. Prakash et S.P. Rao, "A concise synthesis of chiral 2-methyl chroman-4-ones : stereo selective build-up of the chromanol moiety of anti-HIV agent, calanolide A", Tetrahedron Lett., vol 35, n° 34, pp 6347-6350.
- 1994, P.B. Taylor, J.S. Culp, C. Debouck, R.K. Johnson, A.D. Patil, et al., "Kinetic and mutational analysis of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase inhibition by inophyllums, a novel class of non-nucleoside inhibitors", J. Biol. Chem., vol 269, n° 9, pp 6325-6331.
- 1993, B. Chenera, M.L. West, J.A. Finkelstein et G.B. Dreyer, "Total synthesis of (+/-)-calanolide A, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase", J. Org. Chem., vol 58, n° 21, pp 5605-5606.
- 1993, Y. Kashman, K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, et al., "Additions and corrections", J. Med. Chem., vol 36, p1110. *C. lanigerum*
- 1993, A.D. Patil, A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C. Haltiwanger, M.F. Bean, et al., "The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn.", J. Med. Chem., vol 36, n° 26, pp 4131-4138. *C. inophyllum*
- 1992, S.H. Goh, I. Jantan et P.G. Waterman, "Neoflavonoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum inophylloide*", J. Nat. Prod., vol 55, n° 10, pp 1415-1420. *C. inophylloide*
- 1992, Y. Kashman, K.R. Gustafson, R.W. Fuller, J.H. Cardellina, J.B. McMahon, et al., "The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*", J. Med. Chem., vol 35, n° 15, pp 2735-2743. *C. lanigerum*
- 1992, B. Ravelonjato, F. Libot, F. Ramiandrasoa, N. Kunesch, P. Gayral, et al., "Molluscicidal constituents of *Calophyllum* from Madagascar : activity of some natural and synthetic neoflavonoids and khellactones", Planta Med., vol 58, n° 1, pp 51-55.
- 1986, B.M.R. Bandara, H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran et S. Balasubramaniam, "Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Lanka", Phytochemistry, vol 25, n° 2, pp 425-428.
- 1985, H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et E.S. Waight, "Triterpenoids and coumarins from the leaves of *Calophyllum cordato-oblongum*", Phytochemistry, vol 24, n° 7, pp 1553-1556. *Calophyllum cordato-oblongum*
- 1983, N.J. Alcock, W. Kuhn et D.E. Games, "LC/MS and MS/MS studies of natural oxygen heterocyclic compounds", Int. J. Mass Spectro. Ion Phys., vol 48, pp 153-156. *Calophyllum inophyllum*
- 1983, F. Ramiandrasoa, N. Kunesch et J. Poisson, "Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogénèse des néo-flavonoïdes", Tetrahedron, vol 33, n°23, pp 3923-3928.

- 1980, T.N. Bhalla, R.C. Saxena, S.K. Nigam, G. Misra et K.P. Bhargava, "Calophyllolide - A new non-steroidal anti-inflammatory agent", Indian J. Med. Res. (1913-1988), vol 72, Nov, pp 762-765. *C. inophyllum*
- 1978, D.E. Games, J.L. Gower, N.J. Haskins, M. Rossiter et P. Scourides, "Newer mass spectral methods in structural studies of natural compounds" Biochem. Appl., vol 7B, pp 1561-1566. *C. inophyllum*
- 1975, B. Bhushan, S. Rangaswami et T.R. Seshadri, "Calaustralin, a new 4-phenylcoumarin from the seed oil of *Calophyllum inophyllum* Linn.", Indian J. Chem., vol 13, pp 746-747. *C. inophyllum*
- 1972, A. Cavé, M. Debray, G. Henry, G. Kunesch et J. Polonsky, "Sur la structure d'une nouvelle alkyl-4 coumarine isolée de *Calophyllum inophyllum*", J. Compt. Rend. Acad. Sc. Paris, vol 275, pp 1105-1107. *C. inophyllum*
- 1972, D.E. Games, "Identification of 4-phenyl and 4-alkylcoumarins in *Mammea americana* L., *Mammea africana* G. Don and *Calophyllum inophyllum* by gas chromatography - mass spectrometry", Tetrahedron Lett., n° 31, pp 3187-3190. *C. inophyllum*
- 1972, J. Gautier, A. Cavé, G. Kunesch et J. Polonsky, "On the biosynthesis of Neoflavonoids", Experientia, vol 28, n° 7, pp 759-761.
- 1972, J. Gautier, G. Kunesch et J. Polonsky, "Structure of calophynic acid, a novel constituent of *Calophyllum inophyllum*", Tetrahedron Lett., n° 27, pp 2715-2718. *C. inophyllum*
- 1972, K. Kawazu, H. Ohigashi, N. Takahashi et T. Mitsui, "Piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum*", Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., vol 50, n° 3, pp 160-167. *C. inophyllum*
- 1972, V.V.S. Murti, P.S.S. Kumar et T.R. Seshadri, "Structure of ponnalide", Indian J. Chem., vol 10, pp 255-257. *C. inophyllum*
- 1969, G.D. Breck et G.H. Stout, "*Calophyllum* products. V. A new 4-phenylcoumarin from *Calophyllum australianum* FvM Vesq.", J. Org. Chem., vol 34, n° 12, pp 4203-4204. *C. australianum*
- 1968, K. Kawazu, H. Ohigashi et T. Mitsui, "The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn.", Tetrahedron Lett., n° 19, pp 2383-2385. *C. inophyllum*
- 1967, S.K. Nigam et C.R. Mitra, "Constituents of *Calophyllum tomentosum* and *Calophyllum apetalum* nuts : structure of a new 4-alkyl- and of two new 4-phenyl-coumarins", Tetrahedron Lett., n° 28, pp 2633-2636. *C. tomentosum* et *apetalum*
- 1965, D. Adinarayana et T.R. Seshadri, "Chemical components of the Indian seeds of *Calophyllum inophyllum*; the structure of a new 4-phenylcoumarin, ponnalide", Bull. Nat. Inst. Sci. India, n° 31, pp 91-99. *C. inophyllum*
- 1964, G.H. Stout et K.L. Stevens, "The structure of costatolide", J. Org. Chem., vol 29, pp 3604-3609. *C. costatum*
- 1958, J. Polonsky et Z. Baskevitch, "Structures du calophyllolide, de l'inophyllolide et de l'acide calophyllique", Bull. Soc. Chim. Fr., n° 168, pp 929-944. *C. inophyllum*
- 1957, J. Polonsky, "Structure chimique du calophyllolide, de l'inophyllolide et de l'acide calophyllique, constituants des noix de *Calophyllum inophyllum*", Bull. Soc. Chim. Fr., pp 1079-1087. *Calophyllum inophyllum*
- 1956, J. Polonsky et R. Toubiana, "Sur les constituants des noix de *Calophyllum inophyllum* : isolement d'une nouvelle lactone, l'inophyllolide", Compt. Rend., vol 242, pp 2877-2880. *Calophyllum inophyllum*
- 1951, A. Potier-O., A. Buzas et E. Lederer, "Sur le calophyllolide et l'acide calophyllique isolés des graines de *Calophyllum inophyllum*", Bull. Soc. Chim. Fr., n° 146, pp 577-580. *Calophyllum inophyllum*

2. Les xanthones

- 2004, H.-C. Cheng, L.-T. Wang, A.T. Khalil, Y.-T. Chang, Y.-C. Lin, et al., "Pyranoxanthenes from *Calophyllum inophyllum*", J. Chin. Chem. Soc. (Taipei), vol 51, n° 2, pp 431-435. *C. inophyllum*
- 2003, A.-E. Hay, D. Guilet, C. Morel, G. Larcher, D. Macherel, et al., "Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*", Planta Med., vol 69, n° 12, pp 1130-1135. *C. caledonicum*
- 2003, A.-E. Hay, "Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique", Thèse de l'Université d'Angers, France. *C. caledonicum*
- 2003, Y. Wu, P.-C. Zhang, R.-Y. Chen, D.-Q. Yu, X.-T. Liang, "Two new xanthenes from *Calophyllum inophyllum*", Huaxue xuebao, vol 61, n° 7, pp 1047-1051. *C. inophyllum*
- 2002, C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V.C. Filho, T. Mukainaka, et al., "Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis* : structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity", J. Nat. Prod., vol 65, n° 3, pp 267-272. *C. brasiliense*
- 2002, C. Morel, A.-E. Hay, M. Litaudon, T. Sévenet, D. Séraphin, et al., "Thirteen new xanthone derivatives from *Calophyllum caledonicum* (Clusiaceae)", Molecules, vol 7, n° 1, pp 38-50. *C. caledonicum*
- 2002, C. Morel, D. Séraphin, A. Teyrouz, G. Larcher, J.P. Bouchara, et al., "New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*", Planta Med., vol 68, n° 1, pp 41-44. *C. caledonicum*
- 2002, Y. Sakagami, K. Kajimura, W.M.N.M. Wijesinghe et H.R.W. Dharmaratne, "Antibacterial activity of calozeyloxanthone isolated from *Calophyllum* species against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics", Planta Med., vol 68, n° 6, pp 541-543.
- 2001, I. Bin Jantan, J. Jalil et N.M.A. Warif, "Platelet activating factor (PAF) antagonistic activities of compounds isolated from Guttiferae species", Pharm. Biol., vol 39, n° 4, pp 243-246. *C. inophyllum* et *inophylloide*
- 2000, A. Kijjoa, M.J. Gonzalez, C.M. Afonso, M.M.M. Pinto, C. Anantachoke, et al., "Xanthenes from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*", Phytochemistry, vol 53, n° 8, pp 1021-1024. *C. teysmannii*
- 2000, A. Kijjoa, M.J. Gonzalez, M.M.M. Pinto, A.M.S. Silva, C. Anantachoke, et al., "Xanthenes from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*", Phytochemistry, vol 55, n° 7, pp 833-836. *C. teysmannii*
- 2000, C. Morel, D. Séraphin, J.M. Oger, M. Litaudon, T. Sévenet, et al., "New xanthenes from *Calophyllum caledonicum*", J. Nat. Prod., vol 63, n° 11, pp 1471-1474. *C. caledonicum*
- 1999, H.R.W. Dharmaratne, W.M.N.M. Wijesinghe et V. Thevanasem, "Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)", J. Ethnopharmacol., vol 66, n° 3, pp 339-342.
- 1999, M.J. Gonzalez, M.S.J. Nascimento, H.M. Cidade, M.M.M. Pinto, A. Kijjoa, et al., "Immunomodulatory activity of xanthenes from *Calophyllum teysmannii* var. *Inophylloide*", Planta Med., vol 65, n° 4, pp 368-371. *C. teysmannii*
- 1997, H.R.W. Dharmaratne et W.M.N.M. Wijesinghe, "A trioxygenated diprenylated chromenxanthone from *Calophyllum moonii*", Phytochemistry, vol 46, n° 7, pp 1293-1296. *C. moonii*
- 1997, M. Iinuma, T. Ito, T. Tanaka, R. Miyake et V. Chelladurai, "Prenylated xanthonoids from *Calophyllum apetalum*", Phytochemistry, vol 46, n° 8, pp 1423-1429. *C. apetalum*
- 1997, M. Iinuma, T. Ito, H. Tosa, T. Tanaka, R. Miyake, et al., "New linear pyranoxanthenes from *Calophyllum apetalum*", Heterocycles, vol 45, n° 2, pp 299-308. *C. apetalum*

- 1997, R. Reyes-Chilpa, M. Jimenez-Estrada, E. Estrada-Muniz, "Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood", J. Chem. Ecol., vol 23, n° 7, pp 1901-1911. *C. brasiliense*
- 1996, H.R.W. Dharmaratne et W.M.A.P. Wanigasekera, "Xanthenes from root bark of *Calophyllum thwaitesii*", Phytochemistry, vol 42, n° 1, pp 249-250. *C. thwaitesii*
- 1996, M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka, T. Ito, S. Yonemori, et al., "Occurrence of xanthonolignoids in guttiferous plants", Heterocycles, vol 43, n° 7, pp 1521-1528.
- 1996, M. Iinuma, H. Tosa, N. Toriyama, T. Tanaka, T. Ito, et al., "Six xanthenes from *Calophyllum austro-indicum*", Phytochemistry, vol 43, n° 3, pp 681-686. *C. austro-indicum*
- 1996, C. Ito, Y. Miyamoto, K.S. Rao et H. Furukawa, "A novel dibenzofuran and two new xanthenes from *Calophyllum paniciflorum*", Chem. Pharm. Bull., vol 44, n° 2, pp 441-443. *C. paniciflorum*
- 1995, M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two xanthenes from roots of *Calophyllum inophyllum*", Phytochemistry, vol 38, n° 3, pp 725-728. *C. inophyllum*
- 1994, A. Banerji, A.D. Deshpande, B.R. Prabhu et P. Pradhan, "Tomentonone, a new xanthonoid from the stem bark of *Calophyllum tomentosum*", J. Nat. Prod., vol 57, n° 3, pp 396-399. *C. tomentosum*
- 1994, M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*", Phytochemistry, vol 35, n° 2, pp 527-532. *C. inophyllum*
- 1994, M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka et S. Yonemori, "Two new xanthenes in the underground part of *Calophyllum inophyllum*", Heterocycles, vol 37, n° 2, pp 833-838. *C. inophyllum*
- 1991, S.H. Goh et I. Jantan, "A xanthone from *Calophyllum inophyllum*", Phytochemistry, vol 30, n° 1, pp 366-367. *C. inophyllum*
- 1989, G.J. Bennett et H.H. Lee, "Xanthenes from Guttiferae", Phytochemistry, vol 28, n°4, pp 967-998.
- 1986, S.A. Ampofo et P.G. Waterman, "Xanthenes and neoflavonoids from two asian species of *Calophyllum*", Phytochemistry, vol 25, n° 11, pp 2617-2620.
- 1986, H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et J. Reisch, "Xanthenes from roots of three *Calophyllum* species", Phytochemistry, vol 25, n° 8, pp 1957-1960.
- 1986, B.M. Sundaram, C. Gopalkrishnan et S. Subramanian, "Antibacterial activity of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* L.", Arogya (Manipal, India), vol 12, n° 1, pp 48-49. *C. inophyllum*
- 1982, V. Kumar, S. Sotheeswaran, S. Surendrakumar et S. Balasubramaniam, "Calocalabaxanthone, the putative isoprenyl precursor of calabaxanthone from *Calophyllum calaba*", Phytochemistry, vol 21, n° 3, pp 807-809. *C. calaba*
- 1981, S.P. Gunasekera, S. Sotheeswaran et M.U.S. Sultanbawa, "Two new xanthenes. Calozeyloxanthone and zeyloxanthone, from *Calophyllum zeylanicum* (Guttiferae)", J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, pp 1831-1835. *C. zeylanicum*
- 1981, S. Karunanayake, S. Sotheeswaran, M.U.S. Sultanbawa et S. Balasubramaniam, "Xanthenes and triterpenes of *Calophyllum tomentosum*", Phytochemistry, vol 20, n° 6, pp 1303-1304. *C. tomentosum*
- 1980, C. Gopalakrishnan, D. Shankaranarayanan, S.K. Nazimudeen, S. Viswanathan et L. Kameswaran, "Antiinflammatory and CNS depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrea*", Indian J. Pharmacol., vol 12, n° 3, pp 181-191. *C. inophyllum*
- 1977, P. Gunasekera, G.S. Jayatilake, S.S. Selliah et M.U.S. Sultanbawa, "Chemical investigation of Ceylonese plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Guttiferae)", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, pp 1505-1511. *C. cuneifolium* et *soulattri*

- 1976, V. Kumar, S. Ramachandran et M.U.S. Sultanbawa, "Xanthonés and triterpénoïdes from timber of *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, vol 15, pp 2016-2017. *C. inophyllum*
- 1972, R. Somanathan et M.U.S. Sultanbawa, "Chemical investigation of Ceylonese plants. Part 1. Extractives of *Calophyllum calaba* L. and *Calophyllum bracteatum* Thw. (Guttiferae)", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pp 1935-1943. *C. calaba* et *bracteatum*
- 1971, F.S. Al-Jeboury et H.D. Locksley, "Extractives from Guttiferae. XVII. Xanthonés in the heartwood of *Calophyllum inophyllum*. Geographical survey", *Phytochemistry*, vol 10, n° 3, pp 603-606. *C. inophyllum*
- 1969, B. Jackson, H.D. Locksley et F. Scheinmann, "Extractives from Guttiferae. XI. Isolation of 6-deoxyjacareubin, 2-(3,3-diméthylallyl)-1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone, and jacareubin from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, vol 8, n° 5, pp 927-929. *C. inophyllum*
- 1968, T.R. Govindachari, B.R. Pai, N. Muthukumaraswamy, U.R. Rao et N. Rao, "Chemical components of heartwood of *Calophyllum inophyllum*. I. Isolation of mesuaxanthone B and new xanthone, calophyllin B", *Indian J. Chem.*, vol 6, n° 2, pp 57-59. *C. inophyllum*
- 1968, O.R. Gottlieb, T. Magalhaes, M. Ottoni, M. Da Silva Pereira, L.A.A. Mesquita, et al., "The chemistry of brazilian Guttiferae-XII-isopentylated xanthonés from *Kielmeyera* and *Calophyllum* species", *Tetrahedron*, vol 24, pp 1601-1610.
- 1967, M.O. Pereira, O.R. Gottlieb et M.T. Magalhaes, "A química de gutíferas brasileiras-XIII-novas xantonas do *Calophyllum brasiliense*", *An. Acad. Brasil. Cienc.*, vol 39, pp 255-256. *C. brasiliense*

3. Les tritérpenes

- 2003, A.-E. Hay, "Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude chimique et valorisation biologique", Thèse de l'Université d'Angers, France.
- 2001, S.A. Vieira Filho, L.P. Duarte, G.D.F. Silva, I.S. Lula et M.H. dos Santos, "Total assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of two 3,4-secofriedelanes from *Austroplenckia populnea*", *Magn. Reson. Chem.*, vol 39, n° 12, pp 746-748.
- 1999, M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, G.H. Rizwani et V.U. Ahmad, "Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae", *J. Chem. Soc. Pak.*, vol 21, n° 2, pp 174-178. *C. inophyllum*
- 1999, J. Bruneton, "Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales", Ed. TEC et DOC, 3^e édition, Paris, France.
- 1998, S. Mahmud, G.H. Rizwani, M. Ahmad, S. Ali, S. Perveen, et al., "Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Pak. J. Pharmacol.*, vol 15, n° 2, pp 13-25.
- 1997, S.G. Cao, K.Y. Sim, S.H. Goh, F. Xue et T.C.W. Mak, "Gracilipene : a heterocyclic seco-trisnor-oleanane from *Calophyllum gracilipes* (Guttiferae)", *Tetrahedron Lett.*, vol 38, n° 27, pp 4783-4786. *C. gracilipes*
- 1994, S.B. Mahato et A.P. Kundu, "Review article number 98. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpénoïdes - a compilation and some salient features", *Phytochemistry*, vol 37, n° 6, pp 1517-1575.
- 1988, S.H. Nigam, R. Banerji, S. Rebuffat, M. Cesario, C. Pascard, et al., "Soulattrone A, a C₂₄ terpénoïde from *Calophyllum soulattri*", *Phytochemistry*, vol 27, n° 2, pp 527-530. *C. soulattri*
- 1985, D.E. Cane, *Acc. Chem. Res.*, vol 18, p 220.

- 1984, H.R.W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran et S. Balasubramaniam, "Triterpenes and neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*", *Phytochemistry*, vol 23, n° 11, pp 2601-2604. *C. lankaensis* et *thwaitesii*
- 1984, A.A.L. Gunatilaka, A.M.Y.J.D. Silva, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam et M.I.M. Wazeer, "Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum calaba* and *Garcinia spicata* from Sri Lanka", *Phytochemistry*, vol 23, n° 2, pp 323-328. *C. calaba*
- 1973, M.U.S. Sultanbawa, "Chemistry of the Guttiferae of Ceylon", *J. Natl. Sci. Council of Sri Lanka*, vol 1, pp 123-165.
- 1967, T.R. Govindachari, N. Viswanathan, B.R. Pai, R. Rao et M. Srinivasan, "Triterpenes of *Calophyllum inophyllum* Linn.", *Tetrahedron*, vol 23, n° 4, pp 1901-1910. *C. inophyllum*
- 1960, W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning et F. Lynen, "Biosynthesis of terpenes. VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase", *J. Biol. Chem.*, n° 235, pp 326-332.
- 1956, D.E. Wolf, C.H. Hoffman, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, vol 78, p 4499.

4. Les Flavonoïdes

- 2001, S.G. Cao, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Minor methylated pyranoamentoflavones from *Calophyllum venulosum*", *Nat. Prod. Lett.*, vol 15, n° 5, pp 291-297. *C. venulosum*
- 1999, C. Ito, M. Itoigawa, Y. Miyamoto, K.S. Rao, J. Takayasu, et al., "A new biflavonoid from *Calophyllum paniciflorum* with antitumor-promoting activity", *J. Nat. Prod.*, vol 62, n° 12, pp 1668-1671. *C. paniciflorum*
- 1997, S.G. Cao, K.Y. Sim et S.H. Goh, "Biflavonoids of *Calophyllum venulosum*", *J. Nat. Prod.*, vol 60, n° 12, pp 1245-1250. *C. venulosum*
- 1987, B. Ravelonjato, N. Kunesch et J.E. Poisson, "Neoflavonoids from the stem bark of *Calophyllum verticillatum*", *Phytochemistry*, vol 26, n° 11, pp 2973-2976. *C. verticillatum*
- 1974, S.M. Kasim, S. Neelakantan et P.V. Raman, "Structure of the myricetin glucoside from the flowers of *Calophyllum inophyllum*", *Current Science*, vol 43, n° 15, pp 476-477. *C. inophyllum*

5. Les benzopyranones

- 1999, H.R.W. Dharmaratne, D.S.C. Perera, G.P.K. Marasinghe et J. Jamie, "A chromene acid from *Calophyllum cordato-oblongum*", *Phytochemistry*, vol 51, n° 1, pp 111-113. *C. cordato-oblongum*
- 1996, N.U.D. Khan, N. Parveen, M. Singh, R. Singh, B. Achari, et al., "Two isomeric benzodipyranone derivatives from *Calophyllum inophyllum*", *Phytochemistry*, vol 42, n° 4, pp 1181-1184. *C. inophyllum*
- 1994, V. Babu, R. Arya, M. Ilyas et K.T. Nasim, "9-hydroxy-2,2,6,7-tetramethyl-2H-[1]-benzopyran-(1-phenylethylene-10-yl)-(3,2-b-)-dihydropyran-4-one from *Calophyllum tomentosum*", *Phytochemistry*, vol 35, n° 2, pp 507-510. *C. tomentosum*
- 1983, U. Samaraweera, S. Sotheeswaran, M.U.S. Sultanbawa et S. Balasubramaniam, "Bark acids of seven *Calophyllum* species (Guttiferae)", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, n° 4, pp 703-706.

IV. DIVERS

- 2004, F. Abe, S. Nagafuji, H. Okabe, H. Akahane, E. Estrada-Muniz, et al., “Trypanocidal constituents in plants. 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*”, Biol. Pharm. Bull., vol 27, n° 1, pp 141-143. *C. brasiliense*
- 2002, A.C. Dweck et T. Meadows, “Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – The African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea”, Int. J. Cosmet. Sci., vol 24, n° 6, pp 341-348. *C. inophyllum*
- 2002, M.R. Khan, M. Kihara et A.D. Omoloso, “Antimicrobial activity of *Calophyllum soulattri*”, Fitoterapia, vol 73, n° 7-8, pp 741-743. *C. soulattri*
- 2002, R. Sumathi, V. Maina et P.V. Sreekumar, “*Calophyllum austro-indicum* kosterm, ex. P. Stevens - a case of extended distribution”, Indian For., vol 128, n° 3, pp 353-354. *C. austro-indicum*
- 2001, K.L. Da Silva, A.R. Dos Santos, P.E. Mattos, R.A. Yunes, F. Delle-Monache, et al., “Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves”, Therapie (Paris), vol 56, n° 4, pp 431-434. *C. brasiliense*
- 2000, L. Lebart, A. Morineau et M. Piron, “Statistique exploratoire multidimensionnelle”, 3^e édition, Editions Dunod, Paris.
- 2000, R.A. Oderinde et I.A. Ajayi, “Physico-chemical and metal composition of *Calophyllum inophyllum* seed and seed oil”, Pak. J. Sci. Ind. Res., vol 43, n° 6, pp 357-358. *C. inophyllum*
- 1999, M.S. Ali, S. Mahmud, S. Perveen, G.H. Rizwani et V.U. Ahmad, “Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. Guttiferae”, J. Chem. Soc. Pak., vol 21, n° 2, pp 174-178. *C. inophyllum*
- 1999, N.T. Sartori, D. Canepelle, P.T. De Sousa et D.T. Martins, “Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice”, J. Ethnopharmacol., vol 67, n° 2, pp 149-156. *C. brasiliense*
- 1998, K. Kumaran, S.U. Kanna et J.A. Amal, “A note on twin seedlings in *Calophyllum inophyllum* (Linn.)”, Indian For., vol 124, n° 9, pp 751-752. *C. inophyllum*
- 1998, S. Mahmud, G.H. Rizwani, M. Ahmad, S. Ali, S. Perveen, et al., “Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum* Linn.”, Pak. J. Pharmacol., vol 15, n° 2, pp 13-25. *C. inophyllum*
- 1993, P.L. Boyer, M.J. Currens, J.B. McMahan, M.R. Boyd et S.H. Huges, J. Virol., vol 67, p 2412.
- 1993, A. Hizi, R. Tal, M. Shaharabany, M.J. Currens, M.R. Boyd, et al., Antimicrob. Agents Chemother., vol 37, p 1037.
- 1993, R. Pauwels, K. Andries, Z. Debyser, P. Van Daele, D. Schols, et al., “Potent and highly selective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition by a series of alpha-anilinophenylacetamide derivatives targeted at HIV-1 reverse transcriptase”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 90, pp 1711-1715.
- 1992, L.A. Kohlstaedt, J. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice et T.A. Steitz, “Crystal structure at 3,5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor”, Science, vol 256, pp 1783-1790.
- 1992, J.R.E. Rasoarahona, “Valorisation annuelle de la composition en acides gras des lipides de poisons d’eau douce de Madagascar : *Cyprinus*, *Carassius*, *Arius* et *Tilapia*. Application à la différenciation du genre *Tilapia*”, Thèse de l’Université d’Aix-Marseille III.
- 1991, A. Adeyeye, “Studies on seed oils of *Garcinia kola* and *Calophyllum inophyllum*”, J. Sci. Food Agric., vol 57, n° 3, pp 441-442. *C. inophyllum*
- 1991, T. Okuyama, M. Takata, J. Takayasu, T. Hasegawa, H. Tokuda, et al., “Antitumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*”, Planta Med., vol 57, n° 3, p 242.

- 1990, J. Hemavathy et J.V. Prabhakar, "Lipid composition of *Calophyllum inophyllum* kernel", J. Am. OilChem. Soc., vol 67, n° 12, pp 955-957. *C. inophyllum*
- 1990, T. Okuyama, M. Takata, H. Nishino, A. Nishino, J. Takayasu, et al., Chem. Pharm. Bull., vol 38, n° 4, pp 1084-1086.
- 1984, F.M. Dean, H. Khan, N. Minhaj, S. Prakash et A. Zaman, "The structure of wightianone, the pigment of a clathrate from *Calophyllum wightianum*", J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, n° 8, pp 1755-1759. *C. wightianum*
- 1983, M.M. Siddiqui, I. Ahmad, F. Ahmad et S.M. Osman, "Chemical reinvestigation of Guttiferae seed oils", J. Oil Technol. Ass. India (Mumbai, India), vol 15, n° 4, pp 82-83. *C. inophyllum*
- 1981, U. Samaraweera, S. Sotheeswaran et M.U.S. Sultanbawa, "Calozeilanic acid, a new bark acid from three *Calophyllum* species (Guttiferae)", Tetrahedron Lett., vol 22, n° 50, pp 5083-5086.
- 1980, F.M. Dean, H. Khan, N. Minhaj, S. Prakash et A. Zaman, "Wightianone-palmitic acid, a clathrate from *Calophyllum wightianum*", J. Chem. Soc. Chem. Commun., n° 6, pp 283-284. *C. inophyllum*
- 1974, R.D. Plattner, G.F. Spencer, D. Weisleder et R. Kleiman, "Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil", Phytochemistry, vol 13, pp 2597-2602. *C. brasiliense*
- 1973, M.U.S. Sultanbawa, "Chemistry of the Guttiferae of Ceylon", J. Natl. Sci. Council of Sri Lanka, vol 1, pp 123-165.
- 1973, N. Venkatesan et D.V. Rege, "Nutritional evaluation of the seed proteins of *Calophyllum inophyllum* Linn. and *Bassia latifolia*", J. Sci. Food. Agric., vol 24, n° 11, pp 1317-1323. *C. inophyllum*
- 1970, G.R. Potti et P.A. Kurup, "Antibacterial principle of the root bark of *Calophyllum inophyllum* : isolation and antibacterial activity", Indian J. Exp. Biol., vol 8, n° 1, pp 39-40. *C. inophyllum*
- 1969, M.J. Vacheron, G. Michel et R. Guilluy, Bull. Soc. Chim. Fr., vol 51, p 171.
- 1968, S.K. Nigam et C.R. Mitra, "Constituents of *Calophyllum tomentosum* and *Calophyllum apetalum* nuts", Planta Med., vol 16, n° 4, pp 450-457. *C. tomentosum* et *apetalum*
- 1946, A. Chevalier, "Nouvelles utilisations de l'huile de *Calophyllum inophyllum*", Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale, n° 283-284, pp 202-212. *C. inophyllum*

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

I. APPAREILLAGE ET TECHNIQUES D'ANALYSE

1. Collecte et traitement du matériel végétal

Les échantillons massifs de feuilles collectés sont séchés dans une étuve ventilée à une température d'environ 60°C pendant 72 heures.

Les différentes extractions de ces échantillons massifs de feuilles sont effectuées en utilisant un extracteur de Soxhlet (cartouche de 2 L), à reflux du solvant pendant huit heures (reflux de l'hexane : 69 °C, reflux de l'acétate d'éthyle : 77 °C, reflux du méthanol : 65 °C).

Les échantillons de feuilles destinés à l'étude de la biodiversité sont séchés trois jours dans une étuve ventilée dont la température est réglée à 60°C. Elles sont ensuite coupées en petits morceaux afin d'améliorer le rendement de l'extraction. Dans la mesure du possible, la masse de feuilles sèches coupées en morceaux qui est extraite est d'environ 10 g. Ces 10 g de feuilles sèches sont extraits à froid avec 100 mL d'acétate d'éthyle, pendant une semaine. L'extrait est ensuite filtré sur coton pour éliminer les particules végétales, évaporé à sec à l'évaporateur rotatif, puis pesé.

Tous les extraits subissent ensuite une étape de purification :

- chaque extrait est redissous dans 10 mL d'acétate d'éthyle (il peut être nécessaire de chauffer ou de passer aux ultra-sons pour obtenir la dissolution complète) ;
- on prélève 0,5 mL de cette solution, qui est déposée sur un filtre en nylon de 0,45 µm, qui est suivi d'un sep-pak silice (waters) de 1mL ;
- on ajoute à la seringue 2 mL d'acétate d'éthyle, l'extrait migre alors sur le sep-pak et on récupère environ 1 mL de cette solution purifiée dans un vial de CLHP ;
- cette solution purifiée peut alors être injectée sur la colonne CLHP (toutes les molécules qui sont éluées avec l'acétate d'éthyle pur sur le sep-pak (dont toutes les coumarines) seront éluées par le système chromatographique, et les impuretés végétales ont été filtrées).

Les échantillons d'amandes ont été séchés pour la plupart au soleil pendant 3 semaines par le laboratoire IAA (Industries Agro-Alimentaires) du SDR de Papara. Cependant certains échantillons ont été séchés à l'étuve pendant 3 jours à 70°C quand le séchage au soleil n'était pas possible. Le taux d'humidité résiduelle des amandes à la fin du séchage était compris entre 0,75 % et 2 %, quelque soit la méthode employée. Les amandes sèches ont ensuite été pressées par le laboratoire IAA, à l'aide d'une presse rotative à vis sans fin (presse de marque Komet, température de sortie de l'huile : environ 60°C).

2. Séparations chromatographiques préliminaires (Cf. [Chap. IV § III.1.](#))

Une première colonne chromatographique liquide à basse pression (CLBP) est effectuée sur 5g d'extrait. Ces 5g sont dissous dans du dichlorométhane, et on ajoute 11g de silice. On triture à l'évaporateur rotatif, puis on évapore le solvant avec précautions. Le ballon est ensuite placé à l'étuve à 70°C pour éliminer les traces d'eau. L'extrait à l'hexane est alors totalement imprégné dans la silice, qui est déposée sur une colonne de silice de 1,2m x 0,025m (275g de silice), calorifugée à 15°C, et conditionnée avec de l'hexane. On utilise une pompe basse pression pour faire couler le solvant, qui est un gradient allant de 100 % d'hexane à 100 % d'acétate d'éthyle (5,5 L de solvant en tout). La silice est rincée avec 1 L de méthanol puis recyclée. On obtient 191 tubes, qui sont analysés en CCM (avec ou sans migration, révélation à la vanilline sulfurique) et/ou en CLHP analytique afin de grouper les tubes similaires pour former 18 fractions (Cf. [Annexe 6](#) pour le détail des fractions).

Afin de doubler les masses de matière première pour les séparations chromatographiques ultérieures, nous refaisons une colonne similaire sur 6g d'extrait à l'hexane, mais en modifiant le gradient pour utiliser moins de solvant ainsi que pour gagner du temps. On commence cette fois par un mélange hexane / acétate d'éthyle 92:8 pour finir par 100 % d'acétate d'éthyle, en utilisant 3,5 L de solvant en tout. La colonne est toujours rincée avec 1 L de méthanol. On obtient cette fois 119 tubes que l'on regroupe en 17 fractions. Les fractions des deux colonnes ne sont pas mélangées, car les groupes formés ne sont pas assez proches, selon les CCM réalisées (Ce qui n'est pas étonnant puisque le gradient de solvants utilisé n'est pas le même que pour la colonne n°1. Cf. [Annexe 6](#) pour le détail des fractions).

On traite ensuite les extraits de feuilles de Tamanu obtenus au soxhlet avec l'acétate d'éthyle. On va cette fois traiter de plus grandes quantités de matière, afin d'obtenir au final le plus possible de molécules pures. On dispose de 140 g d'extraits à l'acétate d'éthyle de différents échantillons. Ces extraits sont mis en commun, et triturés dans 2 L de dichlorométhane. La pâte blanchâtre insoluble est éliminée par filtration, et on évapore le solvant. On obtient 104g d'une huile vert foncé très épaisse. On partage ces 104g en deux, et on fait ensuite deux précolonnes de silice (environ 1,2 L de silice) de 1m x 0,05 m, sur lesquelles on fait un dépôt solide composé de 52g d'extrait à l'acétate d'éthyle prépurifié et de 100g de silice. Cette fois, pas besoin de pompe, et on recueille uniquement 3 fractions par colonne : une fraction obtenue avec un mélange hexane / acétate d'éthyle 85:15, une fraction obtenue avec 100 % d'acétate d'éthyle, et une fraction obtenue avec 100 % de méthanol. Ce sont les fractions à l'acétate d'éthyle 100 % qui nous intéressent, car elles contiennent les molécules de polarité moyenne que nous recherchons, et elles sont les plus abondantes (m = 14,9 et 13,5 g).

Remarque : le rendement global de chacune de ces deux colonnes est d'environ 40 %, ce qui peut s'expliquer par la présence d'eau et éventuellement d'acide acétique qui se serait formé à partir de l'acétate d'éthyle.

Les fractions à l'acétate d'éthyle sont ensuite triturées dans du dichlorométhane avec chacune 30 g de silice ; le solvant est évaporé, et la silice ainsi imprégnée est séchée à l'étuve. On peut alors procéder à deux nouvelles colonnes de silice identiques aux colonnes n°1 et 2 précédentes, à ceci près que l'éluant de départ est un mélange hexane / acétate d'éthyle 85:15.

Révéléateur utilisé pour les CCM : la vanilline sulfurique. On dissout 3g de vanilline dans 100 mL d'éthanol absolu et on ajoute 0,5 mL d'acide sulfurique concentré.

Les conditions de CLHP préparative les mieux adaptées pour chromatographier le groupe 12 issu de la colonne CLBP n°1 (pris comme exemple) et isoler des triterpènes sont les suivantes :

- colonne de silice (100 Å, 5 µm) de dimensions 250 x 21,4 mm (marque Varian) ;
- éluant iso-octane / acétate d'éthyle (85:15) avec un débit de 10 mL / min ;
- détecteur réfractométrique avec enregistreur papier (en dérivation) ;
- injection de 20 mg de produit dans 1 mL d'acétate d'éthyle.

Pour les chromatographies des autres groupes, seule change la composition du mélange isocratique en fonction de la polarité du groupe à chromatographier.

Les conditions de CLHP analytique anisocratiques les mieux adaptées pour contrôler la composition en coumarines des fractions obtenues par CLBP ou par CLHP préparative sont les suivantes :

- colonne de silice (60 Å, 5 µm) de dimensions 250 x 4,6 mm (marque interchrom) ;
- gradient d'iso-octane / iso-propanol allant de 1 à 7 % d'iso-propanol en 20' et avec un palier à 7 % pendant 10' (débit : 1 mL / min) ;
- détection UV avec barettes de diodes ;
- injection d'environ 10 µg dans 10 µL.

Les conditions de CLHP préparative anisocratiques les mieux adaptées pour séparer les coumarines d'un mélange sont les suivantes :

- colonne de silice (100 Å, 5 µm) de dimensions 250 x 21,4 mm (marque Varian) ;
- gradient iso-octane / iso-propanol de 1 à 5 % en 10' puis de 5 à 10 % en 1' puis palier à 10 % pendant 15', et avec un débit de 10 mL / min ;
- détection UV à barette de diodes (en dérivation) ;
- injection maximale de 20 mg de produit dans 1 mL de mélange iso-octane / iso-propanol 80:20.

3. Déterminations structurales

a) Spectres Infra-Rouge

Tous les spectres Infra-Rouge ont été enregistrés sur un spectrophotomètre JASCO FT/IR-460, à l'aide de pastilles de KBr.

b) Spectres Ultra-Violet

Tous les spectres Ultra-Violet ont été enregistrés par le détecteur UV-DAD de la CLHP analytique lors des analyses des échantillons en chromatographie analytique. Il s'agit d'un détecteur HP 1100 UV-DAD G1315A.

c) Résonance Magnétique Nucléaire

Toutes les analyses RMN ont été effectuées au Spectropôle de l'Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III). Nous avons utilisé trois appareils de fréquences différentes :

- Un appareil à 500 MHz : Bruker Avance DRX-500 avec cryosonde
- Un appareil à 400 MHz : Bruker Avance DPX-400 muni d'un passeur d'échantillons Sixpack.
- Un appareil à 300 MHz : Bruker Avance DPX-300 muni d'un passeur d'échantillons à 60 positions B-ACS60.

Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés : CDCl_3 pour l'essentiel, mais CD_3OD ou CD_3OCD_3 quand l'échantillon était peu soluble dans le chloroforme deutéré.

d) Spectrométrie de Masse

Toutes les analyses SM ont été effectuées au Spectropôle de l'Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III). Nous avons utilisé un spectromètre de masse Sciex API III Plus à triple quadripole (Concord, ON, Canada) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) de type électrospray (ESI).

Préparation des échantillons pour les triterpènes : chaque échantillon est dissous dans 500 μL de méthanol, puis dilué au 1/10 dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Préparation des échantillons pour les coumarines : chaque échantillon est dissous dans 500 μL de méthanol, puis dilué au 1/1000 dans une solution de méthanol à 3mM d'acétate d'ammonium.

Conditions expérimentales d'analyses pour les triterpènes :

- En mode positif : ESI+ (ISV : 5000 V; OR : 70 V)
Débit de solution : 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Débit du gaz de nébulisation : 0.6 L/min
- En mode négatif : ESI- (ISV : -4800 V; OR : -70 V)
Débit de solution : 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Débit du gaz de nébulisation : 0.6 L/min

Conditions expérimentales d'analyses pour les coumarines :

- En mode positif : ESI+ (ISV : 5000 V; OR : 50 V)
Débit de solution : 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Débit du gaz de nébulisation : 0.6 L/min

4. Etude de la biodiversité

Méthode CLHP analytique

Le matériel utilisé est un système HP-1100 muni d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV-DAD à barette de diodes (Cf. **Chap III § I.5.**).

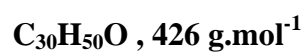
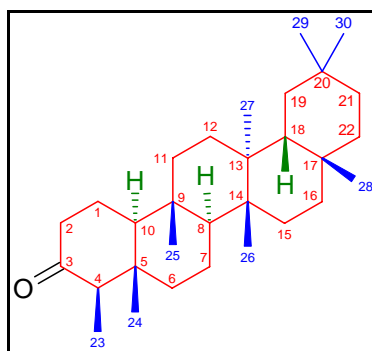
La colonne chromatographique est en fait constituée de trois colonnes identiques de silice mises en série dont les caractéristiques sont les suivantes : Interchrom Modulo-Cart, phase normale silice de type Uptisphere, de porosité égale à 120 Å, de granulométrie égale à 5 µm, et de dimensions 250 x 4,6 mm.

La méthode chromatographique employée est la suivante : gradient d'isopropanol dans de l'iso-octane, allant de 1 à 2,5 % en 15 minutes, puis de 2,5 à 20 % en 10 minutes, avec enfin un palier à 20 % de 25 minutes. Le débit étant fixé à 1 mL / min, le temps d'une analyse est de 50 minutes, avec un retour aux conditions initiales immédiat, et une durée de stabilisation de 15 minutes avant une nouvelle analyse. Le volume d'échantillon injecté pour chaque analyse est de 15 µL. La longueur d'onde d'enregistrement du chromatogramme est fixée à 360 nm, qui est une longueur d'onde où toutes les coumarines absorbent modérément, de manière à toutes les identifier, mais à ne pas saturer le détecteur.

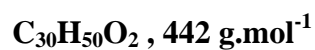
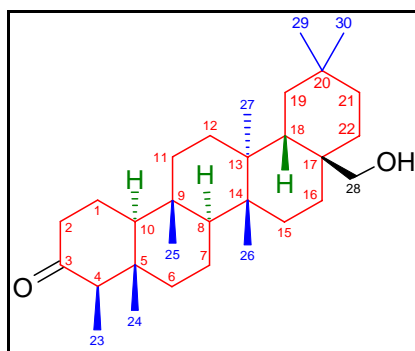
Méthode CLHP analytique de quantification

On utilise une seule colonne de silice phase normale : Interchrom SiO₂ 250 x 4,6 mm, modulo-cart QS-Lichrosorb 5 µm.

Méthode analytique : De 1 à 7 % d'isopropanol en 20 min, puis palier de 10 min à 7 %.
Débit : 1 mL/min.
Solutions injectées : 1 mg/mL sauf pour Inophyllum C : 1,58 mg/mL.
Injection : 10 µL soit 10 µg sauf pour Inophyllum C : 15,8 µg.

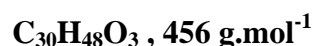
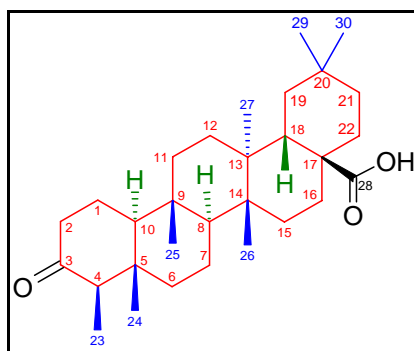
II. MONOGRAPHIESII.1. La friedeline (73)RMN :

Friedeline (73)		
Position n°	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		22.37
2		41.61
3		213.43
4		58.31
5		42.24
6		41.36
7		18.32
8		53.18
9		37.52
10		59.55
11		35.70
12		30.59
13		39.78
14		38.38
15		32.50
16		36.09
17		30.08
18		42.86
19		35.42
20		28.26
21		32.85
22		39.33
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.91
24	0.72, s	14.74
25	0.99, s	18.03
26	0.86, s	20.35
27	1.17, s	18.75
28	1.04, s	32.17
29	1.00, s	35.11
30	0.94, s	31.86

II.2. Le canophyllol (74)RMN :

Position n°	Canophyllol (74)	
	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		22.34
2		41.58
3		213.29
4		58.29
5		42.54
6		41.31
7		18.32
8		52.55
9		37.53
10		59.54
11		35.50
12		30.17
13		39.44
14		38.22
15		31.30
16		29.21
17		35.23
18		39.44
19		34.56
20		28.23
21		31.46
22		33.43
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.91
24	0.71, s	14.75
25	0.90, s	18.16
26	0.86, s	19.15
27	1.12, s	19.28
28	3.61 et 3.64, d, J=10.4 Hz	68.12
29	0.98, s	32.93
30	0.97, s	34.36

II.3. L'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)



IR : (KBr, cm^{-1}) : 3448 ; 2926 ; 2858 ; 1711 ; 1458 ; 1389 ; 799.

Spectrométrie de masse ESI-SM : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 457 et m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ = 474

Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z (457) = 163, 191, 203, 205, 207, 217, 221, 235, 247, 249, 263, 393, 411, 439, 457.

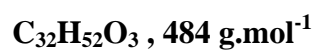
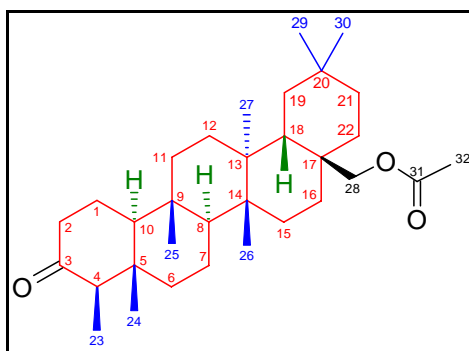
RMN :

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC ^S
1	22.84	-CH ₂ -	1.95, m ; 1.65, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	41.84	-CH ₂ -	2.37, dd ; 2.22, dm	H-1	H-1, H-4, H-10
3	211.59	-C=O	—	—	H-1, H-2, H-4, H-23
4	58.36	-CH-	2.32, q	H-23	H-2, H-6, H-10, H-23, H-24
5	42.50	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	41.75	-CH ₂ -	1.73, m ; 1.34, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.84	-CH ₂ -	1.44, m ; 1.40, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.76	-CH-	1.50, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	38.40	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	59.67	-CH-	1.67, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.23	-CH ₂ -	1.47, m ; 1.34, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	31.94	-CH ₂ -	1.51, m ; 1.43, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.59	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	39.72	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	33.69	-CH ₂ -	1.47, m ; 1.24, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.47	-CH ₂ -	2.37, m ; 1.73, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.19	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	38.61	-CH-	2.49, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.62	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.20, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.14	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.39	-CH ₂ -	1.29, m ; 1.22, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	36.54	-CH ₂ -	1.50, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	7.23	-CH ₃	0.79, d	H-4	H-4
24	14.93	-CH ₃	0.69, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.02	-CH ₃	0.88, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.55	-CH ₃	0.85, s	—	H-8, H-15
27	18.97	-CH ₃	1.08, s	—	H-12, H-18
28	180.24	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	30.26	-CH ₃	1.01, s	—	H-19, H-21
30	34.93	-CH ₃	0.93, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

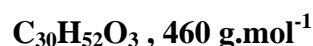
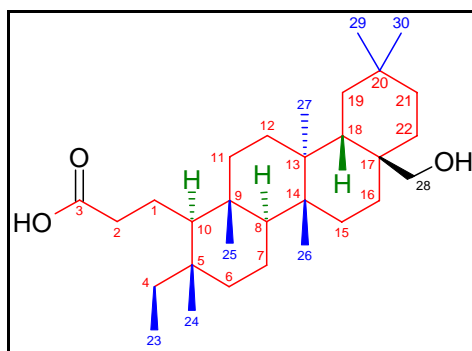
(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(S) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

II.4. L'acétate de canophyllol (**86**)**RMN :**

Position n°	Acétate de canophyllol (86)	
	^1H (δ , ppm)	^{13}C (δ , ppm)
1		22.41
2		41.60
3		212.19
4		58.32
5		42.20
6		41.34
7		32.44
8		52.61
9		37.54
10		59.57
11		35.51
12		29.87
13		39.48
14		38.20
15		31.44
16		29.70
17		33.17
18		39.29
19		34.51
20		28.15
21		32.28
22		33.82
23	0.87, d, J=6.6 Hz	6.94
24	0.72, s	14.77
25	0.93, s	18.33
26	0.86, s	19.30
27	1.12, s	19.31
28	2.19, s	67.43
29	0.98, s	32.80
30	0.97, s	34.43
31		171.60
32	2.08, s	21.19

II.5. L'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)



IR (KBr, cm^{-1}): 3443 ; 2933 ; 2870 ; 1708 ; 1464 ; 1389 ; 1275 ; 1016 ; 797.

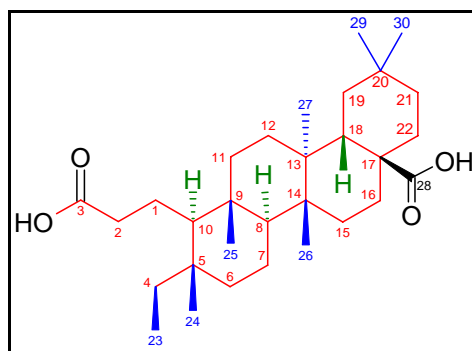
RMN :

Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY [#]	HMBC ^{\$}
1	22.66	-CH ₂ -	1.56, m ; 1.48, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	39.00	-CH ₂ -	2.29, m	H-1	H-1, H-10
3	169.34	-COOH	—	—	H-1, H-2
4	37.14	-CH ₂ -	1.36, m ; 1.14, m	H-23	H-6, H-10, H-23, H-24
5	38.86	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	40.07	-CH ₂ -	1.52, m ; 1.20, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	19.20	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.35, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.69	-CH-	1.33, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	40.17	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	60.99	-CH-	0.88, t	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.11	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.26, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	31.02	-CH ₂ -	1.38, m ; 1.31, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	39.31	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	40.41	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	32.36	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.32, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.34	-CH ₂ -	1.88, ddd ; 1.24, ddd	H-15	H-15, H-18, H-22, H-28
17	36.40	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22, H-28
18	40.79	-CH-	1.30, m	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22, H-28
19	35.56	-CH ₂ -	1.50, m ; 1.29, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	28.97	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	34.34	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.22, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	32.43	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.30, m	H-21	H-16, H-18, H-21, H-28
23	7.96	-CH ₃	0.81, t	H-4	H-4
24	19.95	-CH ₃	0.81, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.75	-CH ₃	0.90, s	—	H-8, H-10, H-11
26	19.53	-CH ₃	0.93, s	—	H-8, H-15
27	20.03	-CH ₃	1.13, s	—	H-12, H-18
28	69.04	-CH ₂ -OH	3.54, d ; 3.57, d	—	H-16, H-18, H-22
29	33.44	-CH ₃	0.97, s	—	H-19, H-21
30	34.68	-CH ₃	0.98, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(\$) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

II.6. L'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (**88**)

$C_{30}H_{50}O_4$, 474 g.mol⁻¹

IR (KBr, cm⁻¹) : 3448 ; 2938 ; 2864 ; 1699 ; 1458 ; 1389 ; 1289 ; 1223.

Spectrométrie de masse ESI-SM : m/z [M-H]⁻ = 473 et m/z [M+NH₄]⁺ = 492

Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z (492) = 247, 265, 291, 319, 429, 439, 457, 475.

RMN :

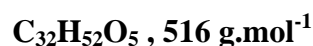
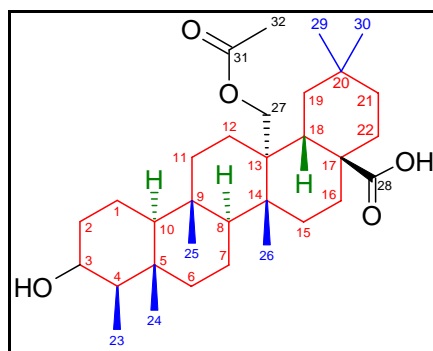
Position n°	¹³ C (δ, ppm)	Type de C	HMQC*	COSY [#]	HMBC [§]
1	22.55	-CH ₂ -	1.56, m ; 1.49, m	H-2, H-10	H-2, H-10
2	38.93	-CH ₂ -	2.29, t	H-1	H-1, H-10
3	177.88	-COOH	—	—	H-1, H-2
4	37.17	-CH ₂ -	1.37, m ; 1.13, m	H-23	H-6, H-10, H-23, H-24
5	38.84	-C-	—	—	H-1, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	39.96	-CH ₂ -	1.51, m ; 1.20, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	19.06	-CH ₂ -	1.40, m ; 1.35, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	54.32	-CH-	1.34, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	40.38	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	60.83	-CH-	0.87, t	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.21	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.26, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	32.01	-CH ₂ -	1.45, m ; 1.38, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.84	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	39.96	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	33.83	-CH ₂ -	1.43, m ; 1.19, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	30.82	-CH ₂ -	2.34, ddd ; 1.69, ddd	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.84	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	39.09	-CH-	2.44, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.97	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.18, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.40	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.66	-CH ₂ -	1.42, m ; 1.27, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	37.10	-CH ₂ -	1.49, m ; 1.38, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	7.94	-CH ₃	0.81, t	H-4	H-4
24	19.89	-CH ₃	0.81, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.11	-CH ₃	0.89, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.27	-CH ₃	0.82, s	—	H-8, H-15
27	19.14	-CH ₃	1.04, s	—	H-12, H-18
28	182.69	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	30.31	-CH ₃	1.03, s	—	H-19, H-21
30	35.03	-CH ₃	0.93, s	—	H-19, H-21

(*) HMQC : Couplage direct avec ¹H (δ, ppm)

(#) COSY : Couplage ¹H / ¹H

(§) HMBC : Couplage indirect avec ¹H

II.7. L'acide 27-acétoxy-canophyllique (89)



IR (KBr, cm^{-1}) : . 3444 ; 2946 ; 2870 ; 1720 ; 1642 ; 1478 ; 1454 ; 1389 ; 1371 ; 1242 ; 1029.

Spectrométrie de masse ESI-SM : m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 515$ et m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 534$

Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z (534) = 177, 191, 223, 233, 247, 261, 393, 411, 429, 439, 471 et 517.

RMN :

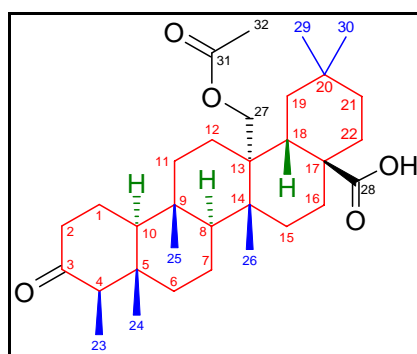
Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC [§]
1	17.11	-CH ₂ -	1.58, m ; 1.35, m	H-2, H-10	H-2, H-3, H-10
2	36.20	-CH ₂ -	1.85, dm ; 1.49, m	H-1, H-3	H-1, H-3, H-4, H-10
3	73.10	-CH-OH	3.67, q	H-2, H-4	H-1, H-2, H-4, H-23
4	50.77	-CH-	1.20, m	H-3, H-23	H-2, H-3, H-6, H-10, H-23, H-24
5	39.03	-C-	—	—	H-1, H-3, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	42.87	-CH ₂ -	1.74, dm ; 0.99, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.77	-CH ₂ -	1.41, m ; 1.33, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	54.73	-CH-	1.33, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	38.48	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	62.71	-CH-	0.89, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	37.53	-CH ₂ -	1.50, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	26.18	-CH ₂ -	1.98, dm ; 1.35, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	39.36	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	43.83	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	32.71	-CH ₂ -	1.50, m ; 1.15, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	37.13	-CH ₂ -	1.45, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	45.85	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	39.52	-CH-	2.49, dd	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	36.79	-CH ₂ -	1.60, m ; 1.17, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	29.25	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	33.59	-CH ₂ -	1.20, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	30.73	-CH ₂ -	2.47, dd ; 1.60, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	12.15	-CH ₃	0.91, d	H-4	H-3, H-4
24	16.92	-CH ₃	0.96, s	—	H-4, H-6, H-10
25	18.49	-CH ₃	0.92, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.98	-CH ₃	0.88, s	—	H-8, H-15
27	66.33	-CH ₂ -	4.43, d ; 4.48, d	—	H-12, H-18
28	182.18	-COOH	—	—	H-16, H18, H-22
29	29.94	-CH ₃	1.03, s	—	H-19, H-21
30	35.00	-CH ₃	0.90, s	—	H-19, H-21
31	173.08	-COO-	—	—	H-27, H-32
32	21.22	-CH ₃	2.04, s	—	—

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

(§) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

II.8. L'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (85)



$C_{32}H_{50}O_5$, 514 g.mol⁻¹

IR (KBr, cm⁻¹) : 3449 ; 2945 ; 2869 ; 1712 ; 1453 ; 1390 ; 1372 ; 1241.

Spectrométrie de masse ESI-SM : m/z [M-H]⁻ = 513 et m/z [M+NH₄]⁺ = 532

Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z (532) = 163, 177, 223, 233, 247, 409, 437, 455, 515.

RMN :

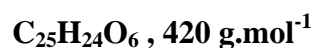
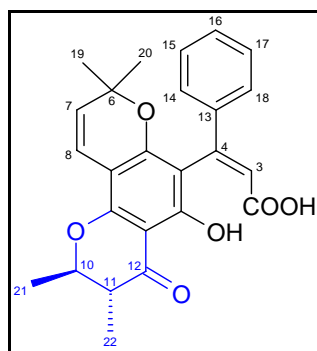
Position n°	¹³ C (δ, ppm)	Type de C	HMQC*	COSY#	HMBC\$
1	22.30	-CH ₂ -	1.96, m; 1.70, m	H-2, H-10	H-2, H-3, H-10
2	41.48	-CH ₂ -	2.39, m; 2.27, m	H-1	H-1, H-3, H-4, H-10
3	213.03	-C=O	—	—	H-1, H-2, H-4, H-23
4	58.12	-CH-	2.37, m	H-23	H-2, H-3, H-6, H-10, H-23, H-24
5	42.43	-C-	—	—	H-1, H-3, H-4, H-6, H-7, H-10, H-23, H-24
6	40.93	-CH ₂ -	1.74, m; 1.38, m	H-7	H-4, H-7, H-8, H-10, H-24
7	18.36	-CH ₂ -	1.48, m; 1.44, m	H-6, H-8	H-6, H-8
8	53.11	-CH-	1.48, m	H-7	H-6, H-7, H-10, H-11, H-25, H-26
9	37.70	-C-	—	—	H-1, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-25
10	59.10	-CH-	1.60, m	H-1	H-1, H-2, H-4, H-6, H-8, H-11, H-24, H-25
11	36.24	-CH ₂ -	1.55, m; 1.13, m	H-12	H-8, H-10, H-12, H-25
12	25.01	-CH ₂ -	2.01, m; 1.41, m	H-11	H-11, H-18, H-27
13	38.04	-C-	—	—	H-8, H-11, H-12, H-15, H-18, H-19, H-26, H-27
14	42.06	-C-	—	—	H-7, H-8, H-12, H-15, H-16, H-18, H-26, H-27
15	31.49	-CH ₂ -	1.56, m; 1.18, m	H-16	H-8, H-16, H-26
16	36.00	-CH ₂ -	1.47, m	H-15	H-15, H-18, H-22
17	44.75	-C-	—	—	H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22
18	38.24	-CH-	2.54, m	H-19	H-12, H-16, H-19, H-22
19	35.57	-CH ₂ -	1.34, m; 1.20, m	H-18	H-18, H-21, H-29, H-30
20	28.34	-C-	—	—	H-18, H-19, H-21, H-22, H-29, H-30
21	32.25	-CH ₂ -	1.20, m	H-22	H-19, H-22, H-29, H-30
22	29.32	-CH ₂ -	2.50, m; 1.60, m	H-21	H-16, H-18, H-21
23	6.90	-CH ₃	0.86, d	H-4	H-3, H-4
24	14.79	-CH ₃	0.71, s	—	H-4, H-6, H-10
25	17.61	-CH ₃	0.91, s	—	H-8, H-10, H-11
26	21.57	-CH ₃	0.90, s	—	H-8, H-15
27	65.14	-CH ₂ -O-	4.36, d; 4.49, d	—	H-12, H-18
28	182.87	-COOH	—	—	H-16, H-18, H-22
29	29.47	-CH ₃	1.02, s	—	H-19, H-21
30	34.59	-CH ₃	0.87, s	—	H-19, H-21
31	171.46	-COO-	—	—	H-27, H-32
32	21.51	-CH ₃	2.09, s	—	—

(*) HMQC : Couplage direct avec ¹H (δ, ppm)

(#) COSY : Couplage ¹H / ¹H

(\$) HMBC : Couplage indirect avec ¹H

II.9. L'acide calophyllique (21)

**RMN :**

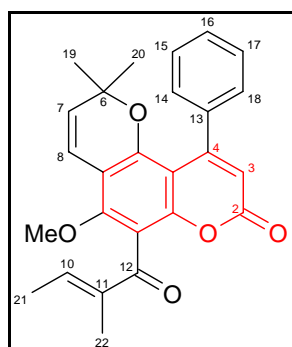
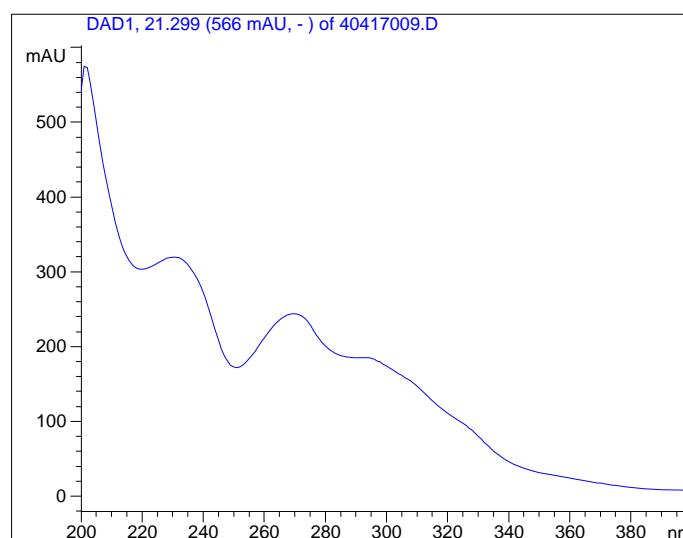
Position n°	^{13}C (δ , ppm)	Type de carbone	HMQC*	COSY#	HMBC ^{\$}
2	166.66	COOH	—	—	H-3
3	121.53	-CH=	6.42, s	—	—
4	148.30	-C=	—	—	H-3, H-14, H-18
4a	109.28	-C=	—	—	H-3
4b	159.35	-C=	—	—	H-8
6	78.81	-C-	—	—	H-7, H-8, H-19, H-20
7	127.21	-CH=	5.52, d, J=10.0 Hz	H-8	H-8, H-19, H-20
8	116.26	-CH=	6.54, d, J=10.0 Hz	H-7	H-7
8a	102.30	-C=	—	—	H-7, H-8
8b	157.26	-C=	—	—	H-8, H-10
10	79.98	-CH-	4.33, dq, J=11.5, 6.3 Hz	H-11, H-21	H-11, H-21, H-22
11	46.34	-CH-	2.71, dq, J=11.5, 6.9 Hz	H-10, H-22	H-10, H-21, H-22
12	200.17	-C=O	—	—	H-10, H-11, H-22
12a	101.99	-C=	—	—	H-11
12b	161.33	-C=	—	—	—
13	141.61	-C=	—	—	H-14, H-15, H-17, H-18
14, 18	127.85	-CH=	7.40, m	H-15, H-17	H-15, H-16, H-17
15, 17	129.20	-CH=	7.33, m	H-14, H-16, H-18	H-14, H-16, H-18
16	129.68	-CH=	7.33, m	H-15, H-17	H-14, H-15, H-17, H-18
19	28.49	-CH ₃	1.24, s	—	H-7, H-20
20	27.71	-CH ₃	0.93, s	—	H-7, H-19
21	19.90	-CH ₃	1.53, d, J=6.3 Hz	H-10	H-10, H-11
22	10.04	-CH ₃	1.18, d, J=6.9 Hz	H-11	H-10, H-11

(*) HMQC : Couplage direct avec ^1H (δ , ppm)

(#) COSY : Couplage $^1\text{H} / ^1\text{H}$

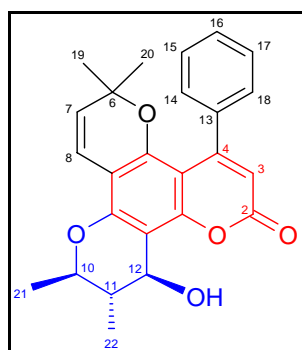
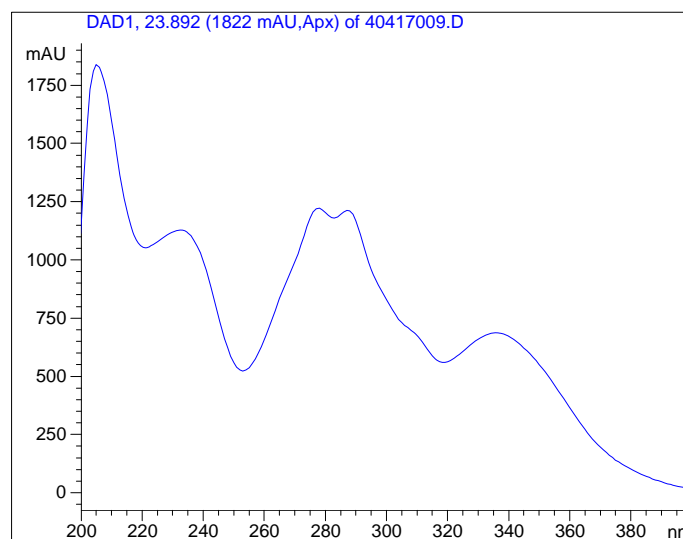
(\$) HMBC : Couplage indirect avec ^1H

II.10. Le calophyllolide (22)

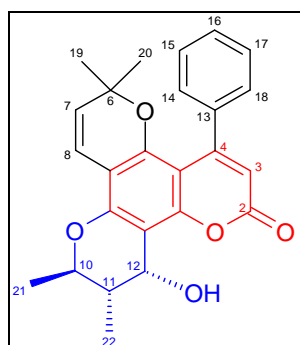
UV : $C_{26}H_{24}O_5$, 416 g.mol⁻¹**Spectrométrie de masse ESI-SM/SM** : m/z $[M+H]^+$ 417 = 361.**RMN :**

Position n°	Calophyllolide (22)	
	¹ H (δ, ppm)	COSY*
2	—	—
3	5.99, s	—
4	—	—
4a	—	—
4b	—	—
6	—	—
7	5.60, d, J=10.0 Hz	H-8
8	6.49, d, J=10.0 Hz	H-7
8a	—	—
8b	—	—
10	6.61, q, J=6.9 Hz	H-21
11	—	—
12	—	—
12a	—	—
12b	—	—
13	—	—
14, 18	7.43, m	H-15, H-17
15, 17	7.31, m	H-14, H-16, H-18
16	7.43, m	H-15, H-17
19	0.99, s	—
20	0.99, s	—
21	1.91, d, J=6.9 Hz	H-10
22	1.97, s	—
23	3.73, s	—

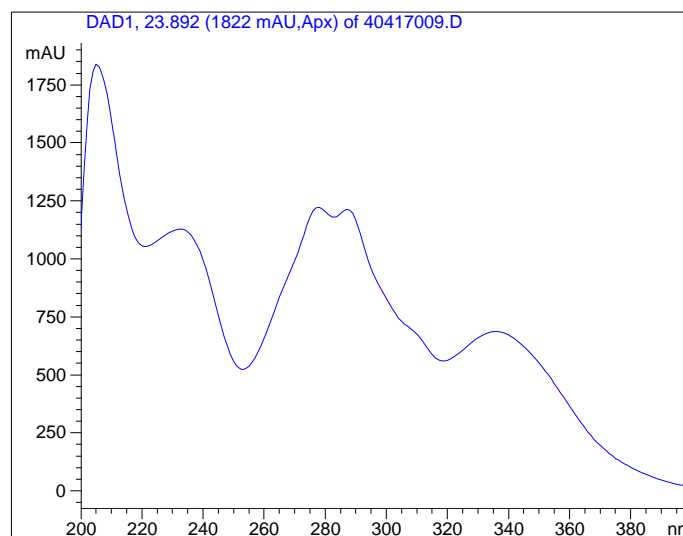
(*) COSY : Couplage ¹H / ¹H

II.11. L'inophyllum B (1)**UV :** $C_{25}H_{24}O_5$, 404 g.mol⁻¹**Spectrométrie de masse ESI-SM/SM** : m/z [M+H]⁺ 405 = 317, 333, 345, 359, 387.**RMN :**

Position n°	Inophyllum B (1)	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
2	—	162.80
3	5.92, s	112.22
4	—	158.56
4a	—	104.76
4b	—	152.24
6	—	78.68
7	5.45, d, J=10.0 Hz	128.84
8	6.52, d, J=10.0 Hz	116.80
8a	—	107.17
8b	—	155.57
10	4.07, dq, J=7.9, 6.5 Hz	78.38
11	1.90, ddq, J=7.9, 6.9, 6.9 Hz	42.44
12	4.72, d, J=6.9 Hz	68.16
12a	—	107.75
12b	—	155.25
13	—	141.49
14, 18	7.27, m	128.84
15, 17	7.40, m	128.84
16	7.40, m	128.84
19	0.96, s	27.35
20	0.90, s	26.95
21	1.47, d, J=6.5 Hz	19.59
22	1.13, d, J=6.9 Hz	15.67

II.12. L'inophyllum P (2)UV :

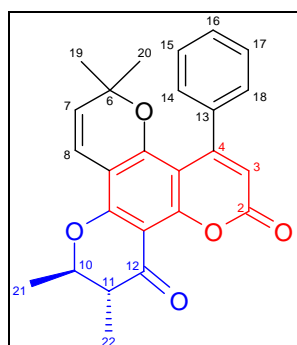
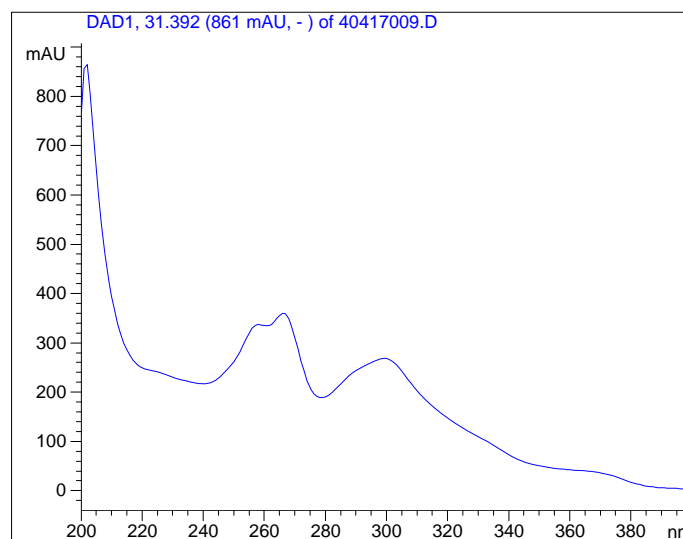
$C_{25}H_{24}O_5$, 404 g.mol⁻¹



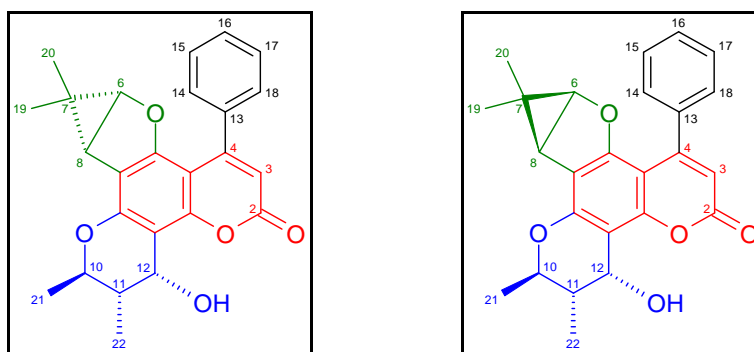
Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z [M+H]⁺ 405 = 317, 333, 345, 359, 387.

RMN :

Position n°	Inophyllum P (2)	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
2	—	161.77
3	5.90, s	112.24
4	—	156.13
4a	—	104.19
4b	—	152.39
6	—	78.35
7	5.43, d, J=10.0 Hz	128.75
8	6.52, d, J=10.0 Hz	116.82
8a	—	107.49
8b	—	154.80
10	4.25, dq, J=10.8, 6.3 Hz	74.46
11	1.73, ddq, J=10.8, 6.9, 3.0 Hz	40.00
12	4.92, d, J=3.0 Hz	62.44
12a	—	107.26
12b	—	155.20
13	—	141.47
14, 18	7.27, m	128.88
15, 17	7.40, m	128.88
16	7.40, m	128.88
19	0.93, s	27.17
20	0.93, s	27.07
21	1.44, d, J=6.3 Hz	19.31
22	1.14, d, J=6.9 Hz	13.21

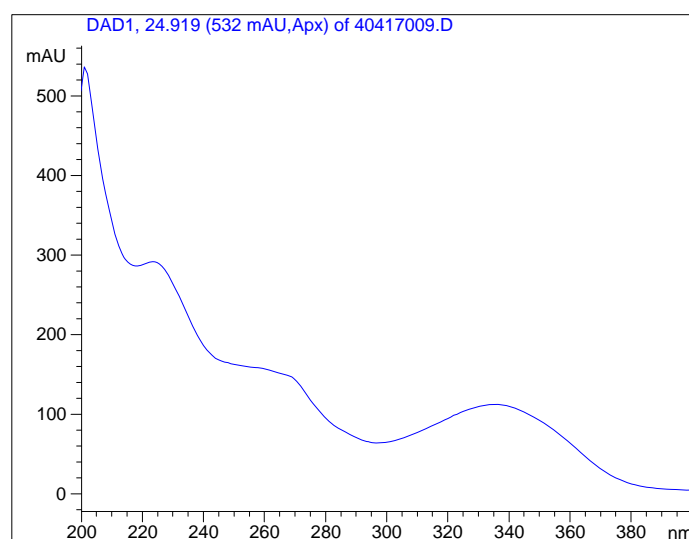
II.13. L'inophyllum C (3)**UV :** $C_{25}H_{22}O_5$, 402 g.mol⁻¹**Spectrométrie de masse ESI-SM/SM** : m/z $[M+H]^+$ 403 = 347.**RMN :**

Position n°	Inophyllum C (3)	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
2	—	162.67
3	6.00, s	113.91
4	—	161.32
4a	—	104.00
4b	—	158.49
6	—	80.19
7	5.54, d, J=10.1 Hz	128.64
8	6.57, d, J=10.1 Hz	115.99
8a	—	105.09
8b	—	157.42
10	4.41, dq, J=11.2, 6.3 Hz	81.05
11	2.64, dq, J=11.2, 6.9 Hz	48.41
12	—	192.40
12a	—	104.34
12b	—	157.18
13	—	141.34
14, 18	7.28, m	128.97
15, 17	7.42, m	128.97
16	7.42, m	129.12
19	0.99, s	27.47
20	0.95, s	27.72
21	1.55, d, J=6.3 Hz	19.83
22	1.20, d, J=6.9 Hz	10.68

II.14. L'inophyllum F1(90) et l'inophyllum F2 (91)

$C_{25}H_{24}O_5$, 404 g.mol⁻¹

UV :



IR (KBr, cm⁻¹) : 3444 ; 2926 ; 2871 ; 1713 ; 1605 ; 1445 ; 1381 ; 1231 ; 1146 ; 1057.

Spectrométrie de masse ESI-SM : m/z [M+H]⁺ = 405 et m/z [M+NH₄]⁺ = 422.

Spectrométrie de masse ESI-SM/SM : m/z (405) = 43, 171, 279, 303, 317, 327, 333, 343, 345, 349, 357, 359, 369, 387.

RMN :

Position n°	¹³ C (ppm)	Type de carbone	HMQC*	COSY#	HMBC\$
2	163.0	COOH	—	—	H-3
3	111.9	-CH=	5.97, s	—	—
4	156.9	-C=	—	—	H-3, H-14, H-18
4a	99.8	-C=	—	—	H-3
4b	159.6	-C=	—	—	H-6, H-8
6	74.0	-C-	4.26, d, J=5.7 Hz	H-8	H-8, H-19, H-20
7	13.6	-C-	—	—	H-6, H-8, H-19, H-20
8	30.6	-C-	2.48, d, J=5.7 Hz	H-6	H-6, H-19, H-20
8a	112.5	-C=	—	—	H-6, H-8
8b	156.3	-C=	—	—	H-8, H-10, H-12
10	74.2	-CH-	4.26, dq, J=10.8, 6.2 Hz	H-11, H-21	H-11, H-12, H-21, H-22
11	40.0	-CH-	1.76, ddq, J=10.8, 6.8, 3.0 Hz	H-10, H-12, H-22	H-10, H-12, H-21, H-22
12	62.7	-CH-OH	4.94, d, J=3.0 Hz	H-11	H-10, H-11, H-22
12a	107.7	-C=	—	—	H-11, H-12
12b	153.8	-C=	—	—	H-12
13	138.9	-C=	—	—	H-14, H-15, H-17, H-18
14, 18	128.8	-CH=	7.34, m	H-15, H-17	H-15, H-16, H-17
15, 17	130.0	-CH=	7.40, m	H-14, H-16, H-18	H-14, H-16, H-18
16	128.8	-CH=	7.40, m	H-15, H-17	H-14, H-15, H-17, H-18
19	22.6	-CH ₃	1.03, s	—	H-6, H-8, H-20
20	12.9	-CH ₃	0.68, s	—	H-6, H-8, H-19
21	19.4	-CH ₃	1.45, d, J=6.2 Hz	H-10	H-10, H-11
22	13.4	-CH ₃	1.15, d, J=6.8 Hz	H-11	H-10, H-11, H-12

(*) HMQC : Couplage direct avec ¹H (δ, ppm)

(#) COSY : Couplage ¹H / ¹H

(\$) HMBC : Couplage indirect avec ¹H

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Lexique Botanique.....	344
Annexe 2 : Glossaire des termes polynésiens utilisés	347
Annexe 3 : Echantillons de feuilles de Tamanu collectés	348
Annexe 4 : Echantillons d'huile de Tamanu collectés	350
Annexe 5 : Echantillonnage : Huiles du laboratoire IAA du SDR.....	351
Annexe 6 : CLBP : liste des fractions des colonne n°1 et 2.....	352
Annexe 7 : Liste des échantillons identifiés comme triterpènes	353
Annexe 8 : Liste des échantillons identifiés comme coumarines.....	354
Annexe 9 : Mesure normalisée de la teneur en acides gras.....	355
Annexe 10 : Mesure de la teneur en résines.....	356

Annexe 1 : Lexique Botanique

Actinomorphe : A éléments disposés selon un axe de symétrie ; fleur actinomorphe.

Albumen : Partie de la graine chargée de substances nutritives, entourant l'embryon, issue du développement de l'œuf secondaire du sac embryonnaire après la fécondation.

Androcée : Ensemble des étamines d'une même fleur.

Angiosperme : Subdivision des spermatophytes réunissant les plantes dont les ovules sont inclus dans un ovaire.

Anthère : Partie de l'étamine qui contient les grains de pollen, généralement divisée en deux loges, elles-mêmes pouvant être à deux sacs polliniques.

Apex : Pointe, sommet d'un organe.

Arille : Excroissance enveloppant plus ou moins la graine, et résultant d'une expansion du funicule ou de la chalaze.

Axillaire : Situé à l'aiselle d'une feuille ou d'une bractée.

Baie : Fruit charnu ou pulpeux, indéhiscent, contenant plusieurs graines, rarement une seule, libres dans le tissu charnu.

Basifixe : Attaché par sa base.

Bractée : Petite feuille ou écaille axillant un pédicelle ou le pédoncule d'une inflorescence ou fixée à un certain niveau sur ce pédoncule.

Calice : Verticille (ou cycle) externe du périanthe, formé des sépales libres ou soudés, verts ; pour des pièces vivement colorées, on parlera d'un calice pétaloïde.

Canaliculé : Creusé d'un sillon peu profond, en forme de gouttière ou marqué de rainures longitudinales.

Carpelle : Constituant unitaire du gynécée, formé d'une partie basale ou ovaire contenant les ovules, surmontée d'un style ou d'un style et d'un stigmate ; les carpelles peuvent être libres ou soudées.

Chalaze : Région de l'ovule d'où divergent les faisceaux des téguments.

Chartacé : Qui a la texture du parchemin, plus épaisse que le papier (ou cartacé).

Coriace : Qui a la texture et la consistance du cuir.

Corolle : Enveloppe la plus interne ou cycle le plus interne du périanthe formé des pétales libres ou soudés, habituellement colorés, non verts.

Crustacé : Rigide, ferme et plus ou moins épais.

Cunéiforme : Dont la base est rétrécie en angle aigu, en forme de coin.

Cupuliforme : En forme de petite coupe ; un réceptacle cupuliforme.

Cycle : Ensemble des organes d'une fleur disposés en cercle ; cycle d'étamines.

Cyme : Inflorescence dont l'axe, à croissance définie, se termine par une fleur, et dont les axes latéraux, apparaissant ultérieurement, sont également terminés par une fleur.

Décussé : Se dit par exemple de feuilles opposées dont les paires successives sont insérées dans des plans perpendiculaires.

Déhiscence : Ouverture par séparation naturelle des parties permettant au contenu d'un organe à maturité de s'y échapper ; déhiscence d'une étamine, d'un fruit.

Dioïque : Qualifie une plante dont les fleurs mâles et les fleurs femelles se trouvent sur des individus différents.

Drupe : Fruit charnu contenant une graine, parfois plus, dont l'endocarpe est induré (noyau).

Endocarpe : Couche la plus interne du péricarpe d'un fruit.

Étamine : Organe mâle de la fleur produisant le pollen.

Exocarpe : Couche externe du péricarpe du fruit.

Faisceau libéro-ligneux : Groupe de vaisseaux de xylème et de phloème (conducteurs de la sève) visibles sur la coupe transversale d'une tige.

Falqué : En forme de faux ou de faucille.

Fascicule : 1. Inflorescence cymeuse, contractée, ayant l'aspect d'une touffe de fleurs pédicellées, insérées en un même point. 2. Groupe d'organes semblables insérés par leur base en un même endroit.

Funicule : Attache de l'ovule ou de la graine au placenta.

Gymnosperme : Subdivision des spermatophytes réunissant les plantes dont les ovules sont nus, c'est à dire non enfermés dans un ovaire.

Gynécée : Organe femelle de la fleur se composant d'un ou de plusieurs carpelles libres ou soudés.

Hermaphrodite : Se dit d'une fleur ayant à la fois un ovaire fertile et des étamines fertiles.

Hypanthe : Partie cupuliforme ou tubuleuse au-dessous de l'insertion des sépales et des pétales et entourant la base du pistil.

Indigène : Se dit d'une plante originaire de la région où elle vit.

Infundibuliforme : En forme d'entonnoir (corolle infundibuliforme du liseron).

Limbe : Partie généralement élargie et aplatie d'un organe ; le limbe d'une feuille, d'un pétale.

-lobé : Suffixe qui marque une division sans aucune indication de la profondeur de ces divisions ; une feuille trilobée.

-loculaire : Suffixe relatif à un organe partagé en plusieurs loges ou compartiments ; un ovaire biloculaire.

Membraneux : Mince, souple et translucide.

Mésocarpe : Couche médiane d'un péricarpe, lorsque l'exocarpe et l'endocarpe sont présents ; le mésocarpe est souvent charnu.

Micropyle : 1. Ouverture de l'ovule par laquelle entre le tube pollinique. 2. Position ou cicatrice de cette ouverture sur le tégument de la graine.

Monoïque : Se dit d'une plante portant des fleurs mâles et femelles sur le même pied.

Naturalisé : Se dit d'une plante introduite qui se dissémine dans un écosystème sans intervention volontaire de l'homme.

Ob- : Préfixe qui marque l'inverse ou une forme renversée.

Oblong : Plus long que large et à bords plus ou moins parallèles.

Obtus : Arrondi, non aigu, ou terminé en angle de plus de 90°.

-oïde : Suffixe qui indique une ressemblance de forme ou de texture, ou un corps tridimensionnel.

Orbiculaire : Employé dans le sens de presque circulaire ; parfois utilisé dans le sens de plus ou moins sphérique.

Orthotrope : 1. Se dit d'un ovule droit, avec le micropyle opposé à la chalaze. 2. Qui se tient dressé ; ex : la flèche d'un arbre.

Ovale : Ayant la forme du contour d'un œuf.

Ovoïde : De volume semblable à un œuf.

Ovule : Petit corpuscule contenu dans l'ovaire d'un carpelle d'un angiosperme, ou attaché à une écaille dans un cône de gymnosperme. L'ovule fécondé par un grain de pollen représente la graine.

Panicule : 1. Inflorescence constituée par des grappes disposées elles-mêmes en grappes ; grappe composée.

Pantropical : Relatif à la zone intertropicale de l'Ancien et du Nouveau Monde.

Pariétal : Placentation pariétale : à insertion des ovules sur la paroi interne d'un ovaire uniloculaire ou exceptionnellement biloculaire par développement d'une fausse cloison.

Pédicelle : Petit pédoncule.

Pédoncule : Queue d'une fleur ou d'un fruit.

Pelté : Se dit d'une feuille dont le pétiole est fixé sur le limbe même, non à la base ou sur la marge ; par extension pour toute autre structure dont le point d'insertion n'est pas basal.

Pérenne : durable, permanent.

Périanthé : Ensemble des enveloppes florales différenciées en calice et corolle, c'est à dire les pièces stériles entourant l'androcée et/ou le gynécée.

Péricarpe : Paroi d'un fruit issue de la paroi de l'ovaire, souvent différenciée en 2 ou 3 couches distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur : exocarpe, mésocarpe et endocarpe.

Pétale : Pièce de la corolle d'une fleur, plus ou moins vivement coloré et attractif pour les pollinisateurs.

Pétiole : Partie amincie d'une feuille portant le limbe et le reliant au rameau ou à la tige.

Phénologie : Etude de l'influence des climats sur les phénomènes biologiques saisonniers végétaux (feuillaison, floraison, etc.) et animaux (migration, hibernation, etc.).

Phloème : Tissu formé des vaisseaux conducteurs de la sève élaborée.

Pistil : Organe femelle des fleurs ; 1. Le gynécée syncarpique (formé de carpelles soudés) comprenant l'ovaire, le ou les styles, le ou les stigmates. 2. Chaque carpelle libre d'un gynécée apocarpe (à plusieurs carpelles libres) ou l'unique carpelle d'un gynécée monocarpellaire.

Pistillode : Pistil rudimentaire non fertile dans une fleur unisexuée à fonction mâle.

Placenta : Partie interne de l'ovaire où s'insèrent les ovules par l'intermédiaire des funicules.

Placentation : Mode d'insertion et de disposition des ovules dans l'ovaire ou des graines dans le fruit.

Racémeux : Sert à qualifier toute inflorescence où l'axe principal présente une croissance prolongée et qui a l'apparence d'une grappe.

Rachis : Axe d'une inflorescence ou axe principal d'une feuille composée-pennée.

Rétus : Tronqué et légèrement déprimé dans la partie centrale.

Révoluté : A bords enroulés vers le bas.

Sépale : Pièce du calice d'une fleur, généralement vert ou de texture foliaire, il protège les éléments internes dans le bouton.

Sérié : Disposé en, ou constitué de rangées.

Sessile : Sans support, pétiole, pédoncule, pédicelle ou stipe ; une feuille ou une fleur sessile.

Sigmoïde : Courbé deux fois, en forme de S.

Spermatophytes : Plantes se reproduisant par graines.

Staminode : Etamine imparfaite sans pollen fertile et quelquefois sans anthère, parfois semblable à un pétale ; staminode pétaloïde.

Stigmate : Partie terminale d'un gynécée affectant des formes diverses, souvent visqueuse, et dont le rôle est de retenir les grains de pollen.

Stipe : Support court et étroit.

Stipule : Pièce située au niveau de l'insertion d'une feuille sur un rameau.

Style : Partie étroite et plus ou moins allongée du gynécée, ou du carpelle libre d'un gynécée apocarpe, située entre l'ovaire et le stigmate.

Supère : Se dit d'un ovaire libre, inséré au-dessus ou sur le même plan que les pièces du périanthe ou enfoncé dans un hypanthe mais non soudé à ses parois.

Tégument : Enveloppe de l'ovule ou de la graine, généralement constituée de deux couches, le tégument externe et le tégument interne.

Tomentelleux : Diminutif de tomenteux.

Tometeux : Couvert de poils nombreux, mous et enchevêtrés, cachant entièrement la surface, à la manière d'un feutre.

Tronqué : Se dit d'un organe dont l'extrémité est coupée transversalement d'une manière abrupte.

Valvaire : 1. Périanthe valvaire : dont les pièces se touchent seulement par leurs bords. 2. Se dit d'une anthère s'ouvrant par de petits clapets.

Verticille : Ensemble d'organes disposés en cercle à un même niveau.

Villeux : Couvert de poils longs, mous, courbés ou plus ou moins dressés.

Xylème : Au sens restreint, désigne le bois primaire ; par extension désigne l'ensemble des tissus ligneux (bois primaire et secondaire) formés des vaisseaux conducteurs de la sève brute.

Annexe 2 : Glossaire des termes polynésiens utilisés

Arioi : Le Roi.

Marae : Temple des anciens temps.

Tabu : Interdit.

Tahua : Le Guérisseur.

Tapa : Fibres d'écorce donnant une sorte de papier souple et résistant, et qui sert d'étoffe.

Umete : Grand plat en bois qui sert de mortier pour écraser les aliments.

Noms vernaculaires :

Ahatea : *Nauclea*

Aito : *Casuarina equisetifolia*

Apape : *Panax*

Atae : *Erythrina*

Ati : *Calophyllum inophyllum*

Fau : *Hibiscus tiliaceus*

Hauou : *Fagraea*

Hutu : *Barringtonia*

Mape : *Inocarpus edulis*

Mara : *Nauclea forsteri*

Mara-uri : *Nauclea*

Miro : *Thespesia populnea*

Ora : *Ficus prolixa*

Pua veoveo : *Crateva religiosa*

Purau : *Hibiscus tiliaceus*

Tamanu : *Calophyllum inophyllum*

Ti'a'iri : *Hernandia nymphaeifolia*

Toa : *Casuarina equisetifolia*

To'i : *Alphitonia zizyphoides*

Vavai : *Gossypium barbadense*

Annexe 3 : Echantillons de feuilles de Tamanu collectés

	Nom échantillon	Description	Expo	GPS		Altitude	Ramasseur	Prélèvement
1	Bora Bora 1	Matira MaraDiveCenter, vieil arbre	SW			0 m	Fred	avril-03
2	Bora Bora 2	Matira MaraDiveCenter, age moyen	SW			0 m	Fred	avril-03
3	Bora Bora 3	Matira en face chez Ben's, vieil arbre	SW			0 m	Fred	avril-03
4	Fiji Viti Levu	Plage de Nataadola, bord de mer, gauche	SW			0 m	Fred	octobre-03
5	Hao 1	vieil arbre	?			0 m	JPB	mai-02
6	Hao 2	age moyen	?			0 m	JPB	mai-02
7	Hao 3	age moyen	?			0 m	JPB	mai-02
8	Hao 4	?	?			0 m	JPB	mai-02
9	Hawaii Big Island 1	?	?			?	Anne	mai-02
10	Hawaii Maui 1	Hana, grand	?			?	JPB	décembre-02
11	Hawaii Oahu 1	jeune rejet	?			?	Anne	mai-02
12	Hawaii Oahu 2	Honolulu Waikiki, petit	?			0 m ?	JPB	décembre-02
13	Hiva Oa 1	Temanu l'Herbier	?	-	-	?	JF	janvier-02
14	Hiva Oa 2	Taaoa, près d'un pont	?	712447 E	8912586 N	26 m	JF	février-04
15	Hiva Oa 3	Atuona, Sacredo	?	714699 E	8915692 N	18 m	JF	février-04
16	Hiva Oa 4	Nahoe, côté mer	?	727784 E	8922650 N	5 m	JF	février-04
17	Hiva Oa 5	Puamau, site Takaii	?	731941 E	8918897 N	120 m	JF	février-04
18	Hiva Oa 6	Puamau, site Takaii	?	731950 E	8918903 N	120 m	JF	février-04
19	Hiva Oa 7	Hanapaaoa, entrée de la baie	?	724056 E	8922603 N	10 m	JF	février-04
20	Hiva Oa 8	Hanapaaoa, entrée de la baie	?	724053 E	8922597 N	12 m	JF	février-04
21	Hiva Oa 9	Hanapaaoa, entrée de la baie	?	724049 E	8922592 N	15 m	JF	février-04
22	Hiva Oa 10	Atuona, plage	?	715159 E	8915508 N	10 m	JF	février-04
23	Hiva Oa 11	Domaine l'Herbier, parcelle 1992	?	-	-	480 m	JF	février-04
24	Hiva Oa 12	Hanaiaapa, bord de rivière	?	719001 E	8923124 N	95 m	JF	février-04
25	Hiva Oa 13	Hanaiaapa, bord de rivière	?	-	-	40 m	JF	février-04
26	Hiva Oa 14	Hanaiaapa, bord de rivière	?	-	-	40 m	JF	février-04
27	Mangareva 1	jeune, 2 m	N	-	-	60 m	JF	octobre-02
28	Mangareva 2	gros	S	-	-	150 m	JF	octobre-02
29	Manihi 1	Motu village, vieil arbre	?	601737 E	8400898 N	0 m	Fred	octobre-03
30	Manihi 2	Motu village, arbre moyen	?	601737 E	8400898 N	0 m	Fred	octobre-03
31	Maupiti 1	Motu W accessible à pied, vieil arbre	E			0 m	Fred	mai-03
32	Maupiti 2	Ile principale avant pointe W, vieil arbre	W			0 m	Fred	mai-03
33	Maupiti 3	Ile principale pointe W, vieil arbre	W			0 m	Fred	mai-03
34	Maupiti 4	Motu E passe, le long passe, rejets	W			0 m	Fred	mai-03
35	Maupiti 5	Motu E passe, près pointe S, arbre moy	W			0 m	Fred	mai-03
36	Maupiti 6	Motu E passe, pointe S, vieil arbre	S			0 m	Fred	mai-03
37	Moorea 1	Plantation SDR Haut	N			60 m	Fred	décembre-02
38	Moorea 2	Plantation SDR Haut	N			60 m	Fred	décembre-02
39	Moorea 3	Plantation SDR Haut	N			60 m	Fred	décembre-02
40	Moorea 4	Plantation SDR Haut	N			60 m	Fred	décembre-02
41	Moorea 5	Plantation SDR Haut	N			60 m	Fred	décembre-02
42	Moorea 6	Plantation SDR Bas	N			10 m	Fred	décembre-02
43	Moorea 7	Plantation SDR Bas	N			10 m	Fred	décembre-02
44	Moorea 8	Plage près Opunohu	N			0 m	Fred	décembre-02
45	Moorea 9	Temae Sofitel Ia Ora Plage	W ?			0 m	Fred	mars-03
46	Moorea 10	Opunohu	N ?			?	JF	mars-03
47	Moorea 11	Motu Club Med (W)	?	-	-	0 m	JF	février-04
48	Moorea 12	Mou'a Roa Vaianae, plantation Marshall	?	-	-	?	JF	octobre-03
49	Motane 1	?	?	738080 E	8894292 N	397 m	JF	février-04
50	Motane 2	?	?	738104 E	8894274 N	398 m	JF	février-04
51	Motane 3	?	?	738063 E	8894290 N	397 m	JF	février-04
52	Motane 4	?	?	737742 E	8895259 N	310 m	JF	février-04
53	Motane 5	?	?	737748 E	8895246 N	310 m	JF	février-04
54	Motane 6	?	?	737754 E	8895233 N	305 m	JF	février-04
55	Nuku Hiva 1	Taiohae bord de mer	S			0 m	JF	janvier-02
56	Nuku Hiva 2	Haahini Vallée n° 1, Grd	W			200 m ?	Fred	décembre-02
57	Nuku Hiva 3	Haahini Vallée n° 2, Grd	W			200 m ?	Fred	décembre-02
58	Nuku Hiva 4	Anaho Plage, Grd	N			0 m	Fred	décembre-02
59	Nuku Hiva 5	Haatuatua Plage n° 1, TGrd	E			0 m	Fred	décembre-02
60	Nuku Hiva 6	Haatuatua Plage n° 2, rejet	E			0 m	Fred	décembre-02
61	Nuku Hiva 7	Haatuatua Plage n° 3, rejet	E			0 m	Fred	décembre-02
62	Nuku Hiva 8	Haatuatua Plage n° 4, rejet	E			0 m	Fred	décembre-02
63	Nuku Hiva 9	Haatuatua Plage Haut Dune	E			10 m ?	Fred	décembre-02
64	Nuku Hiva 10	Aakapa bord route près village, TTGrd	N ?			100 m ?	Fred	décembre-02
65	Nuku Hiva 11	Hakaea bord route	N ?			100 m ?	Fred	décembre-02
66	Nuku Hiva 12	Taiohae vallée Meau	S			?	Willy	juillet-03
67	Nuku Hiva 13	Taiohae bord de mer (idem n°1???)	S			0 m	Willy	juillet-03
68	Raiatea 1	Uturoa, Station total près port	?	665434 E	8150189 N	0 m	Fred	octobre-03
69	Raiatea 2	Baie Pufau pk 11 W, vieil arbre bord mer	?	661070 E	8146362 N	0 m	Fred	octobre-03
70	Raiatea 3	Pte Tereia pk 12 W, arbre moy bord mer	?	660889 E	8145998 N	0 m	Fred	octobre-03

	Nom échantillon	Description	Expo	GPS		Altitude	Ramasseur	Prélèvement
71	Raiatea 4	pk 23, 1 vieil arbre bord mer parmi 30	?	661692 E	8137122 N	0 m	Fred	octobre-03
72	Raiatea 5		?	664341 E	8129071 N	0 m	Fred	octobre-03
73	Raiatea 8	Marae Taputapuatea, arbre moyen	?	674764 E	8137935 N	0 m	Fred	octobre-03
74	Raiatea 9	?	?	-	-	350 m	JF	octobre-03
75	Raivavae 1	?	?			?	JF	avril-02
76	Raivavae 2	Matotea	W			100 m	JF	décembre-02
77	Raivavae 3	Niupapa Rahi	SE			?	JF	décembre-02
78	Raivavae 4	Bord mer	S			0 m	JF	décembre-02
79	Rangiroa 1	?	?			0 m	Marina	début 2002
80	Rangiroa 2	?	?			0 m	Marina	début 2002
81	Rangiroa 3	?	?			0 m	Marina	début 2002
82	Rangiroa 4	Eglise Avatoru	?			0 m	JF	mai-02
83	Rangiroa 5	SDR Avatoru	?			0 m	JF	mai-02
84	Rangiroa 6	Tepuaiti, jeune	?			0 m	JF	mai-02
85	Rangiroa 1 b	Ohotu, bord route près aéroport, vieil arbre	?	428532 E	8346600 N	0 m	Fred	octobre-03
86	Rangiroa 2 b	Ohotu, bord route près aéroport, vieil arbre	?	428456 E	8346605 N	0 m	Fred	octobre-03
87	Rangiroa 3 b	Avatoru, devant pension Cécile, bord route	?	426703 E	8347199 N	0 m	Fred	octobre-03
88	Rangiroa 4 b	Avatoru, chemin pension Cécile, arbre moy	?	426692 E	8347186 N	0 m	Fred	octobre-03
89	Rangiroa 5 b	Milieu village Avatoru, 1 vieil arbre parmi 3	?	423936 E	8348144 N	0 m	Fred	octobre-03
90	Rangiroa 6 b	Milieu village Avatoru, 1 vieil arbre parmi 3	?	423936 E	8348144 N	0 m	Fred	octobre-03
91	Rangiroa 7	Avatoru, bord de la passe, arbre moyen	?	423640 E	8348090 N	0 m	Fred	octobre-03
92	Rangiroa 8	Motu Tiputa, vieil arbre	?	434967 E	8343031 N	0 m	Fred	octobre-03
93	Rangiroa 9	Embarcadère Tiputa, vieil arbre	?	432576 E	8344149 N	0 m	Fred	octobre-03
94	Rangiroa 10	Tiputa, à côté n° 9, arbre jeune	?	432576 E	8344149 N	0 m	Fred	octobre-03
95	Rurutu 1	Paparaï, sol calcaire	?			15 m	JF	novembre-03
96	Rurutu 2	Mato Arei, sol calcaire	?			100 m	JF	novembre-03
97	Rurutu 3	Matonaa, sol calcaire	?			80 m	JF	novembre-03
98	Rurutu 4	Anapuuru, proximité grotte, sol calcaire	?			5 m	JF	novembre-03
99	Rurutu 5	Naairoa, bord de mer, bas falaise	?			0 m	JF	novembre-03
100	Tahaa 1	Plantation SDR Hipu, arbre jeune	?	666133 E	8163777 N	?	Fred	octobre-03
101	Tahaa 2	Pte Matahira, cocoteraie, vieil arbre ds H2O	E	666985 E	8162027 N	0 m	Fred	octobre-03
102	Tahaa 3	Pte Ahuarui, vieil arbre ds H2O bord route	W	-	-	0 m	Fred	octobre-03
103	Tahaa 4	après Tiva, bord de mer	S	-	-	0 m	Fred	octobre-03
104	Tahaa 5	Baie Haameue, très vieil arbre ds H2O	N	664558 E	8158997 N	0 m	Fred	octobre-03
105	Tahaa 6	Baie Haameue, très vieil arbre ds H2O	N	664558 E	8158997 N	0 m	Fred	octobre-03
106	Tahaa 7	Poutoru, vieil arbre au sein peuplement	?	659306 E	8156190 N	?	Fred	octobre-03
107	Tahiti 1	vallée Vaïete	?	-	-	50 m ?	Fred	fin 2001
108	Tahiti 2	Hitia chemin lavatubes	E	-	-	400 m	Fred	mars-03
109	Tahiti 3	Tuauru, au dessus des orgues	?			212 m	Fred	octobre-03
110	Tahiti 4	Tuauru, au dessus des orgues	?			212 m	Fred	octobre-03
111	Tahiti 5	Tuauru, au dessus des orgues	?			212 m	Fred	octobre-03
112	Tahiti 6	Tuauru, au dessus des orgues	?			212 m	Fred	octobre-03
113	Tahiti 7	Te Pari, bord falaise, gros arbre	SE	-	-	100 m	Fred	septembre-03
114	Tahiti 8	Te Pari, bord falaise, arbre moyen	SE	-	-	100 m	Fred	septembre-03
115	Tahiti 9	Te Pari, bord de mer, vieil arbre	SE	-	-	0 m	Fred	septembre-03
116	Tahuata 1	Hapatoni, bord de mer	?	705411 E	8897283 N	5 m	JF	février-04
117	Tahuata 2	Hapatoni, bord de mer	?	705436 E	8897291 N	5 m	JF	février-04
118	Tahuata 3	Hapatoni, bord de mer	?	705536 E	8897286 N	10 m	JF	février-04
119	Tahuata 4	Vaitahu, bord de mer	?	-	-	?	JF	février-04
120	Tahuata 5	Hanamenino, bord de mer	?	710258 E	8905505 N	5 m	JF	février-04
121	Tahuata 6	Hanamenino, bord de mer	?	710219 E	8905509 N	5 m	JF	février-04
122	Tahuata 7	Hanamenino, bord de mer	?	710206 E	8905506 N	5 m	JF	février-04
123	Tahuata 8	Hanahevane, bord de mer	?	710946 E	8905575 N	5 m	JF	février-04
124	Tahuata 9	Hanahevane, bord de mer	?	710935 E	8905576 N	5 m	JF	février-04
125	Tahuata 10	Hanahevane, bord de mer	?	710921 E	8905579 N	5 m	JF	février-04
126	Tetiaroa 1	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-02
127	Tetiaroa 2	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	juin-02
128	Tetiaroa 3	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
129	Tetiaroa 4	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
130	Tetiaroa 5	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
131	Tetiaroa 6	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
132	Tetiaroa 7	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
133	Tetiaroa 8	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
134	Tetiaroa 9	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
135	Tetiaroa 10	Bord plage côté mer	SW			0 m	Fred	avril-03
136	Tetiaroa 11	Motu aéroport	?			0 m	JF	novembre-03
137	Tubuai 1	?	?			?	JF	avril-02
138	Tubuai 2	Huurani, vallée Est, côté montagne	?			20 m	JF	novembre-03
139	Tubuai 3	Motu NE	?			0 m	JF	novembre-03
140	Ua Huka 1	Fond vallée vaipae	W			?	Willy	juillet-03
141	Ua Huka 2	Hinitaihava	W			?	Willy	juillet-03
142	Ua Huka 3	Hinitaihava	W			?	Willy	juillet-03
143	Ua Huka 4	Hinitaihava	W			?	Willy	juillet-03

Annexe 4 : Echantillons d'huile de Tamanu collectés

	Groupe	Echantillon	Réf.	Origine, Echantillonnage	Description Précise	GPS	
1	Huiles du laboratoire (graines)	Tahiti 1 (Te Pari 1)	45	Tahiti, 1 arbre	Vieil arbre à flanc de falaise		
2		Tahiti 2 (Te Pari 2)	46	Tahiti, 1 peuplement	Vieux arbres au bord de l'eau		
3		Raiatea 1	47	Raiatea, 3 arbres	Arbres moyens, près Total Uturoa	665434 E	8150189 N
4		Raiatea 3	48	Raiatea, 1 arbre	Arbre moyen bord de mer Pte Tereia pk12	660889 E	8145998 N
5		Raiatea 5	49	Raiatea, 1 peuplement	Vieux arbres bord de mer Taurere pk35	664341 E	8129071 N
6		Raiatea 6	50	Raiatea, 1 peuplement	Uturoa Pte Te Ava Piti (M. Guillots)		
7		Raiatea 7	51	Raiatea, Guillots	Amandes déjà séchées par M. Guillots		
8		Tahaa 2	52	Tahaa, 3 arbres	Vieux arbres bord de mer, Pte Matahira	666985 E	8162027 N
9		Tahaa 5	53	Tahaa, 1 peuplement	Vieux arbres bord de mer Baie Haamene	664558 E	8158997 N
10		Tahaa 7	54	Tahaa, 1 peuplement	Vieux arbres, Poutoru	659306 E	8156190 N
11		Rangiroa 1	55	Rangiroa, 1 arbre	Vieil arbre bord de route Ohotu	428532 E	8346600 N
12		Rangiroa 2	56	Rangiroa, 1 arbre	Vieil arbre bord de route Ohotu	428456 E	8346605 N
13		Rangiroa 3	57	Rangiroa, 1 arbre	Arbre moyen devant pension Cécile	426703 E	8347199 N
14		Rangiroa 4	58	Rangiroa, 1 arbre	Arbre moyen chemin pension Cécile	426692 E	8347186 N
15		Rangiroa 5	59	Rangiroa, 3 arbres	Vieux arbres village Avatoru	423936 E	8348144 N
16		Rangiroa 7	60	Rangiroa, 1 arbre	Arbre moyen, bord de mer Avatoru	423640 E	8348090 N
17		Manihi 1	61	Manihi, 1 arbre	Vieil arbre motu du village	601737 E	8400898 N
18		Manihi 2	62	Manihi, 1 arbre	Jeune arbre motu village	601737 E	8400898 N
19		Tubuai	63	Tubuai, 1 arbre	Taahuaia, chez Mme Titaua Yieng-Kow		
20		Nuku Hiva	4	Nuku Hiva, 1 arbre	Taiohae, jeune arbre en bord de mer		
21		Hanahevane	64	Tahuata			
22		Hiva Oa	65	Hiva Oa			
23		Hanamenino	66	Tahuata			
24		Hapatoni	67	Tahuata			
25		Vaitahu	68	Tahuata			
26		Rurutu	69	Rurutu			
27	Huiles du laboratoire IAA (SDR)	IAA 1	37	Maupiti, Capel			
28		IAA 2	38	Maupiti, Capel			
29		IAA 3	39	Maupiti, Capel			
30		IAA 4	40	Maupiti, Capel			
31		IAA 5	41	Maupiti, Capel			
32		IAA 6	42	Maupiti, Capel			
33		IAA 7	43	Maupiti, Capel			
34		IAA 8	44	Maupiti, Capel			
35	Huiles diverses des producteurs	Producteur 1 - 1	1	Inconnu, Inconnu	« Tamanu 2002 »		
36		Producteur 1 - 2	21	Moorea, Inconnu	Moorea 2		
37		Producteur 1 - 3	8	Raiatea, Inconnu	Raiatea 00		
38		Producteur 1 - 4	9	Raiatea, Inconnu	Raiatea 000		
39		Producteur 1 - 5	5	Maupiti, Inconnu	Maupiti 1		
40		Producteur 1 - 6	7	Fakarava, Inconnu	Fakarava 1		
41		Producteur 1 - 7	6	Takaraoa, Inconnu	Takaraoa 1		
42		Producteur 1 - 8	11	Fangatau, Inconnu	Fangatau 1		
43		Producteur 1 - 9	10	Rurutu, Inconnu	Rurutu 1		
44		Producteur 1 - 10	22	Inconnu, Inconnu	« Rouge 2003 »		
45		Producteur 2 - 1	16	Raiatea, Guillots	Lot 1		
46		Producteur 2 - 2	17	Raiatea, Guillots	Lot 2		
47		Producteur 2 - 3	19	Raiatea, Guillots	Lot 3		
48		Producteur 2 - 4	34	Raiatea, Guillots	Lot 4		
49		Producteur 2 - 5	35	Raiatea, Guillots	Lot 5		
50		Producteur 3 - 1	2	Inconnu, Inconnu	Pressée SDR		
51		Producteur 3 - 2	24	Moorea, Inconnu	Moorea 3		
52		Producteur 3 - 3	25	Huahine, Inconnu	Huahine 1		
53		Producteur 3 - 4	26	Bora Bora, Inconnu	Bora Bora 1		
54		Producteur 3 - 5	28	Maupiti, Inconnu	Maupiti 2		
55		Producteur 3 - 6	27	Rangiroa, Inconnu	Rangiroa 0		
56		Producteur 4 - 1	12	Moorea, Inconnu	Moorea 1		
57		Producteur 4 - 2	18	Raiatea, Inconnu	Raiatea 0		
58		Producteur 5 - 1	14	Inconnu, Inconnu	« Très claire »		
59		Producteur 6 - 1	13	Takapoto-Takaraoa, Inconnu	Mélange		
60		Huiles commerciales	Tévi 1	3	Inconnu, Inconnu		
61	Tévi 2		33	Inconnu, Inconnu			
62	Savonnerie de Tahiti		29	Inconnu, Inconnu			
63	Tamanu oil (Bora Bora)		30	Inconnu, Inconnu			
64	Fragrances Tahiti		31	Inconnu, Inconnu			
65	Hotu Nui	32	Inconnu, Inconnu				
66	Huiles "étrangères"	Madagascar (Golgamma SA)	23	Inconnu, Inconnu			
67		Vanuatu 1 (Vincenti)	15	Inconnu, Inconnu			
68		Vanuatu 2 (Tebakor Island)	20	Inconnu, Inconnu			
69	Indonésie	36	Inconnu, Inconnu				

Annexe 5 : Echantillonnage : Huiles du laboratoire IAA du SDR

Caractéristiques de l'échantillon de graines traitées :

- Origine : Léonard Touatini
- Lieu de Récolte : Maupiti
- Récoltant : Teva Capel
- Date de réception : 22/09/03

Tableau des paramètres de séchage et de pressage :

Echantillon	Réf.	% HR	Séchage			Pressage
			Type	Durée	Température	Température
IAA 1	37	6,3	Four	6 jours	52-62 °C	Froid
IAA 2	38		Four	6 jours	52-62 °C	Chaud
IAA 3	39	8,2	Soleil	6 jours	/	Froid
IAA 4	40		Soleil	6 jours	/	Chaud
IAA 5	41	1,9	Four	3 jours	70-80 °C	Froid
IAA 6	42		Four	3 jours	70-80 °C	Chaud
IAA 7	43	1,7	Soleil	24 jours	/	Froid
IAA 8	44		Soleil	24 jours	/	Chaud

% HR = pourcentage d'humidité résiduelle après le séchage.

Tableau des masses obtenues :

Echantillon	Réf.	Masse des Amandes Brutes	Masse des Amandes Sèches	Masse des Amandes Pressée	Masse de l'Huile Obtenue
IAA 1	37	2485 g	1555 g	1065 g	453 g
IAA 2	38			490 g	180 g
IAA 3	39	3777 g	2282 g	1141 g	321 g
IAA 4	40			1141 g	280 g
IAA 5	41	5300 g	3229 g	2000 g	?
IAA 6	42			1193 g	538 g
IAA 7	43	2702 g	1692 g	?	?
IAA 8	44			?	?

Annexe 6 : CLBP : liste des fractions des colonne n°1 et 2**Colonne de silice n°1**Dépôt solide : 5 g d'extrait à l'hexane et 11g de SiO₂

Fraction n°	Eluant CLHP	Pics CLHP (min)	Tubes	Masse	Révélation
1	84/16	mélange	1 à 110	410 mg	très pâle
2	id	5,8 et 7,5	111 à 113	80 mg	violet (pâle)
3	id	7,5	114 à 118	40 mg	violet à bleu (pâle)
4	id	mélange	119 à 121	100 mg	bleu (pâle)
5	id	8,5 et 8,9	122 à 123	98 mg	id
6	id	8,9 et 9,2	124	18 mg	très pâle
7	id	mélange	125 à 127	210 mg	id
8	id	crystallisation	128 à part	?	id
9	id	16	129 à 133	225 mg	id
10	id	crystallisation	134 à part	?	id
11	id	crystallisation	135 à part	?	bleu (pâle)
12	id	29,8	136 à 138	380 mg	bleu foncé
13	id	mélange	139 à 141	390 mg	bleu foncé
14	id	47,8	142 à 143	130 mg	bleu (pâle)
15	id	mélange	144 à 145	98 mg	pâle
16	60/40	7,2	146 à 157	780 mg	très pâle
17	id	mélange	158 à 186	350 mg	orange puis très pâle
18	MeOH 100%	/	187 à 191	855 mg	marron

Colonne de silice n°2Dépôt solide : 6 g d'extrait à l'hexane et 11g de SiO₂

Fraction n°	Eluant CLHP	Pics CLHP (min)	Tubes	Révélation
1	84/16	mélange	1 à 17	rien
2	id	2,6 et 3,5	18 à 26	violet (pâle)
3	id	6,2	27 à 34	violet à bleu (pâle)
4	id	mélange	35 à 37	bleu (pâle)
5	id	principal à 4,9	38 à 42	id
6	id	11,05	43 à 51	bleu (pâle)
7	id	mélange	52 à 53	bleu foncé
8	id	principal à 20,4	54 à 57	id
9	id	mélange	58 à 59	id
10	id	principal à 22,9	60 à 64	bleu
11	id	mélange	65 à 67	bleu (pâle)
12	id	principal à 21	68 à 69	id
13	id	mélange	70 à 73	id
14	60/40	7,2	74 à 76	bleu à jaune-vert (pâle)
15	id	mélange	77 à 90	jaune-vert à très pâle
16	id	mélange, faible	91 à 115	très pâle
17	MeOH 100%	/	116 à 119	marron

Remarque : Les temps de rétention indiqués sont ceux des CLHP réalisées en isocratique avec le mélange de solvant indiqué.

Annexe 7 : Liste des échantillons identifiés comme triterpènes

Molécule	Echantillon	Colonne CLBP	Fraction CLBP	Fraction CLHP
Friedeline (73)	FL 104	3 + 4	1	1
	FL 429	3 + 4	1	6
	FL 435	3 + 4	2	3
Canophyllol (74)	JPB "extrait de B1"			
	FL 31	1	8	cristaux
	FL 134	3 + 4	2	3
	FL 140	3 + 4	2	4
Acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	FL 17	1	9	1
	FL 18	1	9	2
	FL 33	1	12	1
	FL 119	3 + 4	1	5
	FL 120	3 + 4	1	6
	FL 126	3 + 4	2	2
	FL 134	3 + 4	2	4
	FL 406	2	6	2
	FL 415	2	7	1
	Acétate de Canophyllol (86)	FL 111		
FL 121				
Acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87)	FL 43	1	13	5
	FL 47	1	13	4
Acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (88)	FL 41	1	13	3
Acide 27-hydroxyacétate canophyllique (89)	FL 38	1	12	3
	FL 61	1	13	7a
	FL 62	1	13	7a
	FL 65	1	13	7b
Acide 3-oxo-27-hydroxyacétate friedelan-28-oïque (85)	FL 35	1	12	2

Annexe 8 : Liste des échantillons identifiés comme coumarines

Molécules	Echantillon	Colonne CLBP	Fraction CLBP	Fraction CLHP
Acide Calophyllique (21)	JPB cristaux			
	FL 251	3 + 4	6	7
	FL 253	3 + 4	6	8
	FL 257	3 + 4	6	8
Calophyllolide (22)	FL 20	1	9	4
	FL 21	1	9	5
	FL 146	3 + 4	2	5
	FL 149	3 + 4	2	5
	FL 161	3 + 4	2	7
	FL 178	3 + 4	4	3
	FL 184	3 + 4	4	4
	FL 185	3 + 4	4	4
	FL 410	2	6	6
Inophyllum B (1)	FL 4			
	FL 10			
	FL 39	1	12	5
	FL 52	1	13	8
Inophyllum P (2)	JPB "mélange"			
	FL 1			
	FL 5			
	FL 6			
	FL 10			
	FL 14	1	12	Brut
	FL 30	1	13	7b
	FL 32	1	12	4
	FL 56	1	13	9
	FL 65	1	13	7b
	FL 66	1	13	7b
	FL 74	1	12	
	FL 75	1	12	
	FL 76	1	12	
	FL 207	3 + 4	4	8
	FL 211	3 + 4	4	9
FL 213	3 + 4	4	9	
FL 421	2	7	7	
Inophyllum C (3)	FL 2			
	FL 3			
	FL 5			
	FL 6			
	FL 15	1	14	Brut
	FL 16	1	16	Brut
	FL 44	1	13	10
	FL 55	1	13	9
	FL 67	1	14	2
	FL 68	1	14	3
	FL 110	3 + 4	1	2
	FL 253	3 + 4	6	8
	FL 257	3 + 4	6	8
	FL 264	3 + 4	7	3
	FL 267	3 + 4	7	3
	FL 276	3 + 4	7	6
	FL 281	3 + 4	7	6
FL 282	3 + 4	7	6	
Inophyllum F1 (90) ou F2 (91)	FL 45	1	13	10
	FL 69	1	14	4
	FL 78	1	13	11
	FL 80	1	14	5
	FL 86	1	13	10
	FL 241	3 + 4	6	5
FL 250	3 + 4	6	7	

Annexe 9 : Mesure normalisée de la teneur en acides gras

Il est nécessaire de préparer les esters méthyliques des acides gras présents dans l'huile de Tamanu. La méthode utilisée suit la norme NF T 60-233 (05/1977) concernant les corps gras neutres (il est donc nécessaire de se débarrasser des résines acides présentes dans l'huile de Tamanu par la méthode de détermination de la teneur en résines décrite en [Annexe 10](#)), dont une synthèse est rapportée ci-après :

Méthode applicable aux corps gras neutres (indice d'acide < 2).

Principe :

Méthanolyse des glycérides en milieu alcalin.

Prise d'essai :

Peser environ 4 g de l'échantillon pour essai.

Préparation des esters méthyliques :

Introduire la prise d'essai dans une fiole de 100 mL. Ajouter environ 40 mL de méthanol, 0.5 mL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium environ molaire, puis porter à ébullition avec de la pierre ponce pendant environ 15 minutes, sous agitation. Arrêter le chauffage, refroidir la fiole sous un courant d'eau, puis transvaser le mélange dans une ampoule à décanter de 125 mL. Rincer la fiole avec 20 mL d'heptane et les verser dans l'ampoule. Ajouter environ 40 mL d'eau distillée, agiter et laisser décanter. Les esters sont alors dissous dans la phase heptanique, que l'on récupère. La phase aqueuse est extraite une seconde fois avec 20 mL d'heptane. Les phases heptaniques sont rassemblées et lavées avec 20 mL d'eau distillée. Elles sont ensuite séchées sur sulfate de sodium. Enfin, on filtre sur coton et on évapore le solvant à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtenir une solution plus concentrée dont le volume est voisin de 20 mL.

Ces esters méthyliques sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse, selon la norme NF ISO 5508 (06/1995) : on utilise un CPG HP 5890 équipé d'une colonne supelcowax de 20 mètres de long, de 0.25 µm de diamètre interne, et de 0.25 µm d'épaisseur de phase. L'analyse est effectuée en gradient de température, de 60 à 220 °C, avec une injection de type splitless. La pression du gaz vecteur (Hélium) est fixée à 100 kPa. Le détecteur est de type Détecteur à Ionisation de Flamme (DIF).

Annexe 10 : Mesure de la teneur en résines

La méthode utilisée pour déterminer la teneur en résines d'une huile végétale n'étant **pas normalisée**, nous avons retenu le protocole suivant (d'après P. Pétard, 1986) :

Définition :

On entend ici par teneur en résines d'un corps gras le pourcentage de ce corps gras préalablement dissout dans de l'hexane, soluble dans de l'éthanol à 76°.

Prise d'essai :

Environ 1.5 g d'huile de Tamanu, pesés à 1 mg près dans un tube à essai.

Détermination :

- ❑ Dissoudre le corps gras dans un 1 mL d'hexane, et ajouter 5 mL d'éthanol à 76°.
- ❑ Agiter fortement, et séparer les deux phases par centrifugation (4000 tr/min pendant 5 minutes).
- ❑ Récupérer la phase éthanolique, et extraire de nouveau la phase hexanique avec 2 fois 5 mL d'éthanol à 76° (on fera donc en tout trois extractions successives de la phase hexanique)
- ❑ On réunit les phases éthanoliques, qui sont séchées dans une boîte de pétri sur l'étuve.
- ❑ Le résidu obtenu qui correspond aux résines de l'huile de Tamanu a généralement une couleur verte caractéristique.
- ❑ On pèse ce résidu à 1 mg près.

Expression des résultats :

La teneur en résines est égale à : $TR = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \%$

où :

- m_1 est la masse en g du résidu obtenu.
- m_2 est la masse en g de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations effectuées.

TABLES

LISTE DES SPECTRES

Spectre 1 : RMN ¹ H de la friedeline (73) entre 0,7 et 1,2 ppm.....	118
Spectre 2 : RMN ¹ H du canophyllol (74) entre 2,5 et 4 ppm.....	120
Spectre 3 : Infra-Rouge de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	121
Spectre 4 : RMN 2D HMQC de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	124
Spectre 5 : RMN 2D HMBC de l'acide 3-oxo-friedelan-28-oïque (75)	124
Spectre 6 : RMN ¹ H de l'acétate de canophyllol (86) entre 3,9 et 4,4 ppm.....	137
Spectre 7 : Infra-Rouge de l'acide 3,4-secofriedelan-28-ol-3-oïque (87).....	138
Spectre 8 : RMN ¹ H du triterpène 87 entre 1,6 et 2,4 ppm	141
Spectre 9 : RMN ¹ H du triterpène 87 entre 3,2 et 4,3 ppm	141
Spectre 10 : RMN ¹³ C DEPT du triterpène 87 entre 45 et 75 ppm	142
Spectre 11 : RMN 2D COSY du triterpène 87 entre 0,5 et 2,5 ppm.....	142
Spectre 12 : RMN 2D HMQC n° 1 du triterpène 87	143
Spectre 13 : RMN 2D HMQC n° 2 du triterpène 87	143
Spectre 14 : Infra-Rouge de l'acide 3,4-secofriedelan-3,28-dioïque (88).....	144
Spectre 15 : RMN ¹ H du triterpène 88 entre 1,6 et 1,8 ppm	147
Spectre 16 : RMN ¹ H du triterpène 88 entre 2,2 et 2,5 ppm	147
Spectre 17 : RMN 2D COSY du triterpène 88 entre 0,5 et 2,5 ppm.....	148
Spectre 18 : RMN 2D HMQC du triterpène 88	148
Spectre 19 : Infra-Rouge de l'acide 27-acétoxy-canophyllique (89)	156
Spectre 20 : RMN ¹ H du triterpène 89 entre 2,4 et 2,6 ppm	159
Spectre 21 : RMN ¹ H du triterpène 89 entre 4,3 et 4,6 ppm	159
Spectre 22 : RMN ¹³ C DEPT du triterpène 89 entre 45 et 75 ppm	160
Spectre 23 : RMN 2D COSY du triterpène 89 (zoom)	160
Spectre 24 : RMN 2D HMQC n° 1 du triterpène 89	161
Spectre 25 : RMN 2D HMQC n° 2 du triterpène 89	161
Spectre 26 : Infra-Rouge de l'acide 3-oxo-27-acétoxy-friedelan-28-oïque (85)	172
Spectre 27 : RMN ¹ H du triterpène 85 entre 4,3 et 4,6 ppm	175
Spectre 28 : RMN ¹³ C du triterpène 85 entre 52 et 67 ppm	175
Spectre 29 : RMN 2D COSY du triterpène 85 entre 0,5 et 2,5 ppm.....	176
Spectre 30 : RMN 2D HMQC du triterpène 85	176

Spectre 31 : Ultra-Violet des inophyllums F1 et F2.....	194
Spectre 32 : RMN ¹ H de l'acide calophyllique (21) entre 0,8 et 1,3 ppm	200
Spectre 33 : RMN ¹ H de l'acide calophyllique (21) entre 6,4 et 6,6 ppm	200
Spectre 34 : RMN 2D COSY de l'acide calophyllique (21) entre 2,5 et 5 ppm	201
Spectre 35 : RMN 2D COSY de l'acide calophyllique (21) entre 5,5 et 7,5 ppm.....	201
Spectre 36 : RMN 2D HMQC n° 1 de l'acide calophyllique (21)	202
Spectre 37 : RMN 2D HMQC n° 2 de l'acide calophyllique (21)	202
Spectre 38 : Ultra-Violet du calophyllolide (22).....	203
Spectre 39 : RMN ¹ H du calophyllolide (22) entre 5,5 et 7,5 ppm.....	205
Spectre 40 : RMN 2D COSY du calophyllolide (22) entre 5,5 et 7,5 ppm.....	206
Spectre 41 : RMN 2D COSY du calophyllolide (22) (zoom)	206
Spectre 42 : Ultra-Violet de l'inophyllum B (1)	208
Spectre 43 : RMN ¹ H de l'inophyllum B (1) entre 0,5 et 2 ppm	210
Spectre 44 : RMN ¹ H de l'inophyllum B (1) entre 4 et 5 ppm	210
Spectre 45 : RMN ¹ H de l'inophyllum B (1) entre 5 et 7 ppm	211
Spectre 46 : RMN ¹³ C de l'inophyllum B (1) entre 100 et 170 ppm	211
Spectre 47 : Ultra-Violet de l'inophyllum P (2).....	215
Spectre 48 : RMN ¹ H de l'inophyllum P (2) entre 1,6 et 1,9 ppm.....	217
Spectre 49 : RMN ¹ H de l'inophyllum P (2) entre 4,1 et 4,4 ppm.....	217
Spectre 50 : RMN ¹ H de l'inophyllum P (2) entre 4,8 et 5,6 ppm.....	218
Spectre 51 : RMN ¹³ C de l'inophyllum P (2) entre 55 et 85 ppm.....	218
Spectre 52 : Ultra-Violet de l'inophyllum C (3)	220
Spectre 53 : RMN ¹ H de l'inophyllum C (3) entre 2,5 et 2,8 ppm	222
Spectre 54 : RMN ¹ H de l'inophyllum C (3) entre 4,3 et 4,5 ppm	222
Spectre 55 : RMN ¹ H de l'inophyllum C (3) entre 5,4 et 6,7 ppm	223
Spectre 56 : RMN ¹ H d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 5 et 7 ppm	223
Spectre 57 : RMN ¹³ C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 10 et 30 ppm	224
Spectre 58 : RMN ¹³ C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 154 et 164 ppm	224
Spectre 59 : RMN ¹³ C d'un mélange d'inophyllums (C + P) entre 191 et 194 ppm	225
Spectre 60 : Ultra-Violet des inophyllums F1 (90) et F2 (91)	227
Spectre 61 : Infra-Rouge des inophyllums F1 (90) et F2 (91)	228
Spectre 62 : RMN 2D COSY de l'inophyllum F2 (91) entre 0,5 et 4,5 ppm.....	231
Spectre 63 : RMN 2D COSY de l'inophyllum F2 (91) : protons H-6, 10 et 12	231

Spectre 64 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (91) : les 4 groupes méthyle	232
Spectre 65 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (91) : protons entre 2 et 5ppm	232
Spectre 66 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (91) : protons aromatiques.....	233
Spectre 67 : RMN 2D HMQC de l'inophyllum F2 (91) : résolution des H-6/10	233
Spectre 68 : Ultra-Violet du calophyllolide ($T_R = 21,3$ min)	256
Spectre 69 : Ultra-Violet de l'inophyllum B ($T_R = 23,9$ min).....	257
Spectre 70 : Ultra-Violet de l'inophyllums F1 ($T_R = 24,9$ min)	258
Spectre 71 : Ultra-Violet du pic n° 8 ($T_R = 29,2$ min)	259
Spectre 72 : Ultra-Violet de l'inophyllum C ($T_R = 31,4$ min).....	259
Spectre 73 : UV du pic n°11 ($T_R = 39,7$ min)	260

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les sources de coumarines parmi les espèces de <i>Calophyllum</i> ⁴	44
Tableau 2 : Stéréochimie des cycles chromanol dans les chromanol-coumarines ⁴	47
Tableau 3 : Stéréochimie des cycles chromanone dans les chromanone-coumarines ⁴	48
Tableau 4 : Liste des coumarines et néoflavonoïdes connus dans le <i>C. inophyllum</i>	53
Tableau 5 : Liste des xanthones connues dans le <i>Calophyllum inophyllum</i>	65
Tableau 6 : Résultats des extractions des échantillons importants de feuilles de Tamanu ...	104
Tableau 7 : Rendements d'extraction des échantillons de feuilles de Tamanu.....	106
Tableau 8 : Détails de formation des groupes des colonnes n°3 et 4.....	110
Tableau 9 : Chemin d'obtention des molécules pures isolées.....	113
Tableau 10 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C de 73 et comparaison à la littérature ⁴	118
Tableau 11 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C de 74 et comparaison à la littérature ⁴	120
Tableau 12 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 75.....	122
Tableau 13 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 75 à la littérature ⁴	123
Tableau 14 : Attributions des signaux ¹ H et ¹³ C de 86 et comparaison au canophyllol (74). 137	
Tableau 15 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 87.....	139
Tableau 16 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 87 à la littérature ¹³	140
Tableau 17 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 88.....	145
Tableau 18 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 88 à ceux de 87	146
Tableau 19 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 89.....	157
Tableau 20 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 89 à ceux de 76 ⁷	158
Tableau 21 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 85.....	173
Tableau 22 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 85 à ceux de 75	174
Tableau 23 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 21.....	198
Tableau 24 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 21 à la littérature ¹	199
Tableau 25 : Attribution des signaux ¹ H et couplages COSY observés pour 22	204
Tableau 26 : Comparaison des signaux ¹ H de 22 à la littérature ³	205
Tableau 27 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C de 1 et comparaison à la littérature ^{1, 2}	209
Tableau 28 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C de 2 et comparaison à la littérature ¹	216
Tableau 29 : Comparaison des signaux ¹ H et ¹³ C de 3 à la littérature ^{1, 2}	221
Tableau 30 : Attribution des signaux ¹ H et ¹³ C et couplages observés pour 91.....	230

Tableau 31 : Comparaison des signaux ^1H et ^{13}C de 91 aux signaux de 34 et 2 ¹	230
Tableau 32 : Quantification des coumarines dans l'échantillon de feuilles n°40	252
Tableau 33 : Pourcentages relatifs des pics CLHP des échantillons de feuilles	261
Tableau 34 : Corrélations entre les variables décrivant les échantillons de feuilles	263
Tableau 35 : Moyennes des 11 variables dans les 4 archipels de Polynésie française	280
Tableau 36 : Moyennes des 11 variables dans 7 îles de la Société	280
Tableau 37 : Moyennes des 11 variables dans 3 îles des Tuamotu	281
Tableau 38 : Moyennes des 11 variables dans 5 îles des Marquises	281
Tableau 39 : Moyennes des 11 variables dans 3 îles des Australes	281
Tableau 40 : Teneurs en acides gras et en résines des échantillons d'huile de Tamanu	286
Tableau 41 : Corrélations entre les variables décrivant les échantillons de feuilles	287

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de division chez les eucaryotes du règne végétal.....	12
Figure 2 : Cladogramme des Angiospermes selon l'Angiosperm Phylogeny Group (APG)...	13
Figure 3 : Planche botanique du <i>Calophyllum inophyllum</i> ¹²	16
Figure 4 : Distribution du <i>Calophyllum inophyllum</i> en Asie du Sud-Est ¹	18
Figure 5 : Carte de la zone Pacifique : le <i>C. inophyllum</i> se répartit entre les 2 tropiques ^{1,3,12} .	19
Figure 6 : Schéma d'une synthèse diastéréosélective d'une chromanol-coumarine.....	30
Figure 7 : Schéma de synthèse du précurseur (A) de l'inophyllum B (1).....	31
Figure 8 : Schéma de synthèse de l'inophyllum B (1) à partir du précurseur (A)	32
Figure 9 : Schéma de biosynthèse du précurseur des néo-flavonoïdes	39
Figure 10 : Biosynthèse du précurseur des coumarines à partir de celui des néo-flavonoïdes	39
Figure 11 : Schéma de biosynthèse des xanthones ^{15,16}	61
Figure 12 : Biosynthèse du 2,3-Epoxysqualène à partir de l'acide mévalonique	68
Figure 13 : Biosynthèse des triterpènes à partir du 2,3-Epoxysqualène	68
Figure 14 : Schéma général du DDL.....	84
Figure 15 : Schéma de la séquence impulsionnelle 1D du proton ¹ H.....	87
Figure 16 : Schéma de la séquence impulsionnelle 1D du carbone ¹³ C.....	88
Figure 17 : Schéma de la séquence multi-impulsionnelle DEPT du ¹³ C.....	88
Figure 18 : Schéma de la séquence multi-impulsionnelle COSY ¹ H- ¹ H	90
Figure 19 : Schéma des séquences multi-impulsionnelles ¹ H- ¹³ C HMQC et HMBC	91
Figure 20 : Schéma de la méthode d'ionisation électrospray ou spray d'ions.....	93
Figure 21 : Schéma de l'interface à gaine liquide de la source électrospray ²⁸	94
Figure 22 : Formation de gouttelettes enveloppées par la gaine liquide ²⁸	94
Figure 23 : Effet de la concentration et du débit de la gaine liquide sur l'aire des pics ²⁸	95
Figure 24 : Amélioration de la résolution des pics avec l'interface à gaine liquide ²⁸	95
Figure 25 : Schéma d'un analyseur quadripolaire - Lignes d'équipotentiel	96
Figure 26 : Zones de stabilité pour un ion de masse m donnée suivant x et y	97
Figure 27 : Zones de stabilité en fonction de U et V pour des ions de masses m _i	98
Figure 28 : CCM sans migration	109
Figure 29 : CCM avec migration (Hex/AE [70:30])	109
Figure 30 : CCM analytique des 10 premiers groupes issus des colonnes n°3 et 4.....	111

Figure 31 : Schéma des différentes étapes permettant d'isoler des molécules pures.....	112
Figure 32 : Chromatogramme réfractométrique du groupe n°12 issu de la CLBP n°1	115
Figure 33 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène 75.....	125
Figure 34 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 457 (E _{coll} : 10eV ; CGT 90).....	126
Figure 35 : Agrandissement du spectre des ions fragments de l'ion m/z 457.....	126
Figure 36 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène 88.....	149
Figure 37 : Spectre de masse (ESI- SM) en mode négatif du triterpène 88.....	150
Figure 38 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 492 (E _{coll} : 20eV ; CGT 107).....	150
Figure 39 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif du triterpène 89.....	162
Figure 40 : Spectre de masse (ESI- SM) en mode négatif du triterpène 89.....	163
Figure 41 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 534 (E _{coll} : 10eV ; CGT 107).....	163
Figure 42 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 515 (E _{coll} : 40eV ; CGT 107).....	170
Figure 43 : Spectre de masse (ESI + SM) en mode positif du triterpène 85.....	177
Figure 44 : Spectre de masse (ESI - SM) en mode négatif du triterpène 85.....	178
Figure 45 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 532 (E _{coll} : 10eV ; CGT 107).....	178
Figure 46 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 513 (E _{coll} : 40eV ; CGT 107).....	184
Figure 47 : Chromatogramme silice du tube 135 de la colonne n°1, mélange 84:16	189
Figure 48 : Chromatogramme silice du tube 139 de la colonne n°1, mélange 84:16	189
Figure 49 : Chromatogramme silice du tube 145 de la colonne n°1, mélange 60:40	189
Figure 50 : Chromatogramme réfractométrique du groupe n°6 issu des CLBP n°3 et 4.....	191
Figure 51 : Chromatogramme UV analytique du pic n°5	192
Figure 52 : Pic n°1 correspondant à l'inophyllum B ou P	193
Figure 53 : Pic n°2 correspondant à l'inophyllum F1	193
Figure 54 : Pic n°3 correspondant à l'inophyllum F2	193
Figure 55 : Pic n°4 correspondant à l'inophyllum C.....	194
Figure 56 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (417→361)	207
Figure 57 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (405→387)	212
Figure 58 : Spectre des ions fragments de l'ion [M+H] ⁺ m/z 405.	213
Figure 59 : Chromatogramme enregistré avec une détection SM/SM (403→347)	226
Figure 60 : Spectre de masse (ESI+ SM) en mode positif de l'inophyllum F2 (91).....	234
Figure 61 : Spectre des ions fragments de l'ion m/z 405 (E _{coll} : 30eV ; CGT 90).....	235
Figure 62 : Agrandissement du spectre SM/SM sur la gamme m/z 300-380	235
Figure 63 : Chromatogramme CLHP-SM/SM d'un échantillon brut de Tamanu.....	248

Figure 64 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 417	253
Figure 65 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 405	253
Figure 66 : Chromatogramme CLHP-SM du mélange d'étalons ciblé sur l'ion m/z 403	254
Figure 67 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 417 → m/z 361.	255
Figure 68 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 405 → m/z 387.	255
Figure 69 : Chromatogramme CLHP-SM/SM de 'Rurutu 4' ciblé sur m/z 403 → m/z 347.	255
Figure 70 : Chromatogramme CLHP-UV de l'échantillon de feuilles 'Tetiaroa 3'	256
Figure 71 : Répartition des variables des feuilles selon les axes F1 et F2 (ACP).....	264
Figure 72 : ACP n°1 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel	265
Figure 73 : ACP n°2 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel	265
Figure 74 : ACP n°3 sur tous les échantillons de feuilles classés par archipel	266
Figure 75 : Carte des 5 archipels de Polynésie française	267
Figure 76 : Répartition des variables des feuilles selon les axes F1 et F2 (AFD)	268
Figure 77 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel	268
Figure 78 : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel	269
Figure 79 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles de Polynésie classés par archipel	270
Figure 80 : Carte des îles de l'archipel de la Société	271
Figure 81 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île.....	272
Figure 82 : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île.....	272
Figure 83 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles de la Société classés par île.....	273
Figure 84 : Carte des îles de l'archipel des Tuamotu	274
Figure 85 : AFD sur les échantillons de feuilles des Tuamotu classés par île	274
Figure 86 : Carte des îles de l'archipel des Marquises.....	275
Figure 87 : AFD n°1 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île	276
Figure 88 : AFD n°2 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île	277
Figure 89 : AFD n°3 sur les échantillons de feuilles des Marquises classés par île	277
Figure 90 : Carte des îles de l'archipel des Australes	278
Figure 91 : AFD sur les échantillons de feuilles des Australes classés par île	279
Figure 92 : CPG des esters méthyliques d'AG d'un échantillon d'huile de Tamanu	283
Figure 93 : Diagramme d'identification des acides gras pour l'huile d'olive.....	284
Figure 94 : Diagramme d'identification des acides gras pour l'huile de soja.....	285
Figure 95 : ACP sur tous les échantillons d'huile analysés	288
Figure 96 : ACP n°1 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur	289

Figure 97 : ACP n°2 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur	289
Figure 98 : ACP n°3 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur	290
Figure 99 : ACP n°1 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel.....	291
Figure 100 : ACP n°2 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel.....	291
Figure 101 : ACP n°3 sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel.....	292
Figure 102 : AFD sur les échantillons d'huile du laboratoire classés par archipel.....	293
Figure 103 : AFD sur les échantillons d'huile des producteurs classés par archipel	294
Figure 104 : AFD n°1 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel	295
Figure 105 : AFD n°2 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel	295
Figure 106 : AFD n°3 sur tous les échantillons d'huile classés par archipel	296
Figure 107 : AFD n°1 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île	297
Figure 108 : AFD n°2 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île	297
Figure 109 : AFD n°3 sur les échantillons d'huile de la Société classés par île	298
Figure 110 : AFD sur les échantillons d'huile des producteurs classés par producteur.....	299
Figure 111 : AFD n°1 sur tous les échantillons d'huile classés par producteur.....	300
Figure 112 : AFD n°2 sur tous les échantillons d'huile classés par producteur.....	300
Figure 113 : AFD n°3 sur tous les échantillons d'huile classés par producteurs.....	301

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Fleur de Tamanu *	16
Photo 2 : Tamanu poussant au bord du lagon à Raiatea *	17
Photo 3 : Jeune rameau et inflorescence de Tamanu *	17
Photo 4 : Fruits et amande de Tamanu de maturités différentes #	18
Photo 5 : Umete en Tamanu de Nuku Hiva (Benoît Tamarii)	23
Photo 6 : Tronc écorcé d'un Tamanu de Raiatea : le latex suinte *	24
Photo 7 : Séchoirs d'amandes de Tamanu sur l'île de Raiatea *	26
Photo 8 : Amandes de Tamanu séchant au soleil : la résine suinte *	26
Photo 9 : Plaque CCM : coumarines révélées à la vanilline sulfurique	82
Photo 10 : Colonne de CLBP avec gel de silice	83
Photo 11 : CLHP préparative avec détecteurs RI, DDL et UV-VWD	84
Photo 12 : CLHP analytique avec injecteur automatique et UV-DAD	84
Photo 13 : Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG) avec injecteur automatique	85
Photo 14 : Spectromètre Bruker Avance DRX-500 et sa cryosonde ^1H , ^{13}C et ^{15}N	91
Photo 15 : Couplage d'un système CLHP à un spectromètre de masse ESI/SM/SM (Sciex)	92
Photo 16 : Source électrospray améliorée connectée à un triple quadripole	93