

Reçu le 18 mai 1974.

**CARACTÈRES CHIMIQUES  
ET PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES  
DE PLUSIEURS ALCALOÏDES  
EXTRAITS DE *Strychnos usambarensis* <sup>(1)</sup>**

PAR

M. DUBOIS, Ch. GINION, L. ANGENOT \*, W. VAN DORSSER et A. DRESSE

(Université de Liège, Laboratoire de Pharmacologie, Prof. A. Dresse et  
Laboratoire de Pharmacognosie\*, Prof. A. Denoël)

(3 figures)

Les extraits de racines de *Strychnos usambarensis*, utilisés comme poison de flèche par les indigènes Banyambo du Rwanda, possèdent des propriétés curarisantes importantes chez la grenouille et le chat (ANGENOT *et al.*, 1970; ANGENOT, 1973).

Ces extraits bruts ont été fractionnés, purifiés, analysés chimiquement et soumis à une nouvelle expérimentation pharmacologique. Ils contiennent des alcaloïdes *tertiaires* et *quaternaires* doués d'activités multiples. Nous désirons présenter ici les éléments pharmacologiques de cette expérimentation nouvelle sans détailler les aspects chimiques qui feront l'objet d'une autre publication (ANGENOT, L., DUBOIS, M., GINION, Ch., VAN DORSSER, W., & DRESSE, A., résultats non publiés).

MÉTHODES

I. — EXTRACTION, SÉPARATION ET IDENTIFICATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ALCALOÏDES.

Certaines techniques utilisées pour extraire, séparer et identifier les alcaloïdes du *Strychnos usambarensis* ont déjà été décrites antérieurement (ANGENOT, 1973) ou le seront prochainement (ANGENOT,

(<sup>1</sup>) Un résumé de ce travail a été présenté sous forme de communication à la séance de la Société belge de Physiologie et de Pharmacologie du 18 mai 1974 à Namur.

L., DUBOIS, M., GINION, Ch., VAN DORSSER, W. & DRESSE, A.). Nous nous bornerons à préciser que les alcaloïdes sont obtenus à partir des écorces de racines, séparés par chromatographie sur colonne ou sur couche mince, puis analysés par spectrométrie ultraviolette et infrarouge. On détermine leur spectre de masse et de résonance magnétique nucléaire. D'autres moyens physiques et chimiques sont également utilisés.

## II. — ANALYSE DES PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES.

### 1. — Récepteurs muscariniques et adrénergiques des muscles lisses du rat.

a) Une action éventuelle des fractions alcaloïdiques sur les récepteurs muscariniques de l'iléon terminal du rat est recherchée *in vitro*. Les fragments d'iléon sont placés sous une force de 1 g dans du Tyrode à 37° oxygéné par du carbogène. La composition du Tyrode est la suivante (en concentration millimolaire) : NaCl 137; KCl 2.68; NaHCO<sub>3</sub> 11.9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.417; MgCl<sub>2</sub> 0.105; CaCl<sub>2</sub> 1.82 et glucose 5.55.

Les contractions provoquées par la carbamoyl-choline (Carbachol®) sont captées par une jauge isométrique raccordée à un enregistreur Kipp et Zohnen. Une potentiation ou un antagonisme éventuels sont recherchés au moyen de courbes cumulatives réalisées suivant la méthode d'ARIËNS (1964). Le temps de contact des substances étudiées est de 20 minutes.

b) L'interaction avec les récepteurs noradrénergiques est étudiée sur le canal déférent du rat. Les conditions expérimentales sont identiques à celles qui viennent d'être décrites. Seule, la force initiale est différente : 200 mg. L'agoniste est le bitartrate de L-noradrénaline.

### 2. — Plaques motrices des muscles striés.

Les propriétés curarisantes des alcaloïdes sont analysées sur la préparation nerf sciatique-muscle extenseur commun des orteils de la patte postérieure.

Des rats mâles d'environ 500 g sont anesthésiés par le pentobarbital sodique (Nembutal® 30 mg/kg i.p.) et placés sur une

table Palmer (1). Le nerf et le muscle sont soigneusement disséqués en respectant les conditions habituelles d'humidité et de vascularisation. Le muscle extenseur est relié à un capteur de force FTA 10 et les contractions enregistrées sur un appareil Hewlett Packard 7702 B. La stimulation du nerf sciatique est réalisée par chocs rectangulaires uniques en courant descendant au moyen de 2 électrodes en platine reliées à un stimulateur Tektronix ( $\pm 1.5$  V; 0.1 msec; 0.1 Hz). La pression carotidienne est enregistrée simultanément. Les substances étudiées sont injectées par voie intraveineuse soit en doses isolées de concentration croissante à intervalles de 30 minutes, soit de façon cumulative.

## RÉSULTATS

### I. — IDENTIFICATION DES ALCALOÏDES DU *Strychnos usambarensis*.

Les procédés physico-chimiques mis en œuvre ont abouti, par approches successives, à l'isolement et à l'identification de 10 alcaloïdes différents.

Ils se classent en 3 groupes :

1. Les alcaloïdes tertiaires comprenant une substance déjà connue, l'harmane, et deux nouvelles, l'usambarensine et la dihydro-usambarensine.

2. Un groupe de 3 alcaloïdes, la méthyl-usambarensine, la méthyldihydro-usambarensine et la dihydroflavopéridine qui présentent la particularité de posséder simultanément des fonctions amines tertiaires et ammoniums quaternaires.

3. Le dernier groupe contient 4 alcaloïdes quaternaires identifiés, la dihydrotoxiférine, l'afrocurarine (substance nouvelle), la curarine et la calebassine. La structure chimique de l'afrocurarine n'est pas complètement élucidée. Par ailleurs, ce groupe contient encore 2 alcaloïdes inconnus, fortement polaires, actuellement à l'étude.

Toutes ces substances possèdent un noyau indole. L'harmane et la 6,7-dihydroflavopéridine sont des monomères. Les autres alcaloïdes cités sont des bis-indoles dimères symétriques ou non.

---

(1) Nous remercions le professeur M. Goffart qui nous a prêté ce matériel et aidé de ses conseils.

La structure chimique détaillée de ces alcaloïdes paraîtra dans la publication d'ANGENOT *et al.*

## II. — PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES.

La séparation chimique en alcaloïdes tertiaires, hybrides et quaternaires se retrouve dans les résultats pharmacologiques. En effet, l'usambarensine, alcaloïde tertiaire, agit sur les muscles lisses tandis que les alcaloïdes quaternaires identifiés modifient la contraction de la préparation nerf sciatique-muscle strié.

### 1. — *Action de l'usambarensine et des autres alcaloïdes sur les muscles lisses.*

L'usambarensine diminue les effets du Carbachol® sur l'iléon isolé de rat. A la concentration de  $3 \times 10^{-6}M$ , on observe un déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite. Pour des concentrations plus importantes ( $10^{-5}M$  et plus), on constate un abaissement de la réponse maximale qui suggère un antagonisme non compétitif. Le  $pD'2$  calculé suivant la méthode de VAN ROSSUM (1963) est de 4.755. Le  $pA2$  de l'atropine dans nos conditions d'expérience est égal à 8.41. Il faut noter que les autres alcaloïdes sont inactifs dans ce test, sauf la fraction 13.

Les effets de la noradrénaline sur le canal déférent du rat ne sont pas modifiés de façon reproductible par l'usambarensine.

### 2. — *Action des alcaloïdes quaternaires sur la plaque motrice neuro-musculaire.*

#### a) Analyse qualitative des fractions partiellement purifiées.

Les propriétés curarisantes des alcaloïdes quaternaires sont rassemblées à la figure 1. Elle reprend en abscisse les 22 fractions obtenues par chromatographie sur colonne. L'ordonnée est composite et indique les pourcentages d'inhibition mesurés aux différentes concentrations étudiées. A titre d'exemple, on pourra observer que la D-tubocurarine, utilisée comme substance de référence, produit une inhibition de 21 % à la dose de  $10^{-7}$  moles/kg et de 100 % à  $10^{-6}$  moles/kg. L'activité curarisante est donc proportionnelle à la hauteur des colonnes. Il nous faut insister sur le fait qu'à ce stade du travail, les fractions ne sont que partiellement

purifiées et que la structure chimique exacte des substances actives n'est pas encore parfaitement connue. Pour les besoins de l'expérimentation, on leur a assigné un poids moléculaire hypothétique de 600. L'erreur ainsi introduite est faible puisque les poids moléculaires réels obtenus ultérieurement sont proches de cette valeur.

Seuls les alcaloïdes quaternaires (fractions 10 à 22) sont efficaces. Les fractions 10, 13, 15 et 19 sont particulièrement actives. Les trois premières contiennent respectivement la dihydrotoxiférine, la curarine et la calebassine. Nous ne connaissons pas la nature exacte de la substance active contenue dans la fraction 19. La fraction 11, contenant l'afrocurarine est également active.

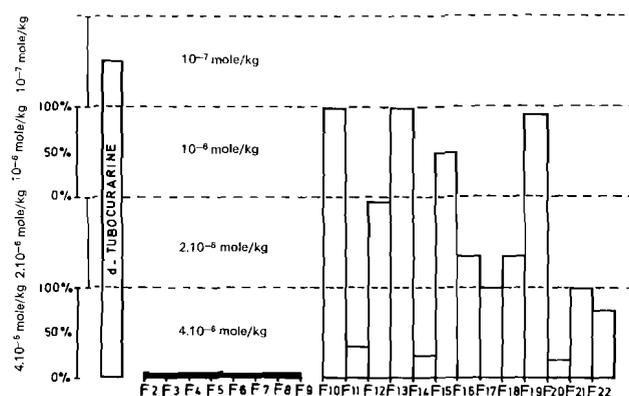


FIG. 1. *Activité curarisante des 22 fractions chromatographiques étudiées.* Explications dans le texte en II, 2, a.

#### b) Analyse quantitative des substances purifiées.

Les activités curarisantes de la dihydrotoxiférine et de la calebassine, entièrement isolées et purifiées, ont été comparées à celles de la D-tubocurarine.

La figure 2 montre l'effet inhibiteur produit par l'injection de doses croissantes de calebassine (de  $1.66 \times 10^{-7}$  à  $7.2 \times 10^{-7}$  moles/kg).

L'ensemble des résultats obtenus est condensé à la figure 3 qui permet de calculer la dose efficace 50 et les limites de confiance à 95 % de la D-tubocurarine ( $1.4 \times 10^{-7}$ ), de la dihydrotoxiférine ( $4 \times 10^{-7}$ ) et de la calebassine ( $7.2 \times 10^{-7}$  moles/kg).

Les caractères des inhibitions observées sous l'influence des

différents alcaloïdes ont pu être précisés par des expériences complémentaires.

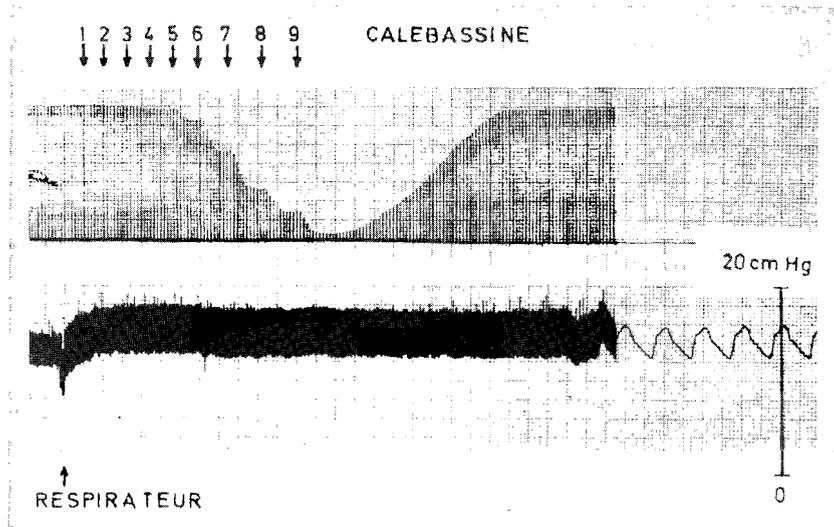


FIG. 2. Action curarisante de la calebassine.

Partie supérieure : contraction du muscle extenseur commun des orteils par stimulation électrique du sciatique ( $\pm 1.5$  V; 0.1 msec; 0.1 Hz). La calebassine est injectée en i.v. à des doses géométriquement croissantes de  $1.66$  à  $7.2 \times 10^{-7}$  moles/kg (raison 1.2).

Partie inférieure : pression artérielle en cm de Hg. La respiration artificielle est installée immédiatement avant les injections (vitesse de déroulement : 5 mm/min).

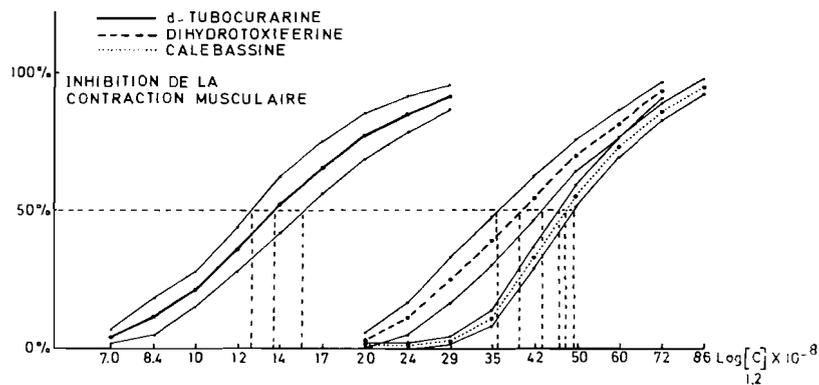


FIG. 3. Actions curarisantes de la *D*-tubocurarine, de la dihydrotoxiférine et de la calebassine.

En abscisse : doses administrées en moles/kg.

En ordonnée : pourcentage d'inhibition. Etablissement des E.D. 50 et limites de confiance à 95 %.

L'ésérine, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, antagonise le bloc neuromusculaire à la concentration de  $10^{-6}$  moles/kg.

Par ailleurs, il est toujours possible d'obtenir une contraction musculaire maximale par stimulation électrique directe du muscle lorsque la stimulation du nerf sciatique est devenue inefficace. Ces différentes observations permettent de localiser l'antagonisme au niveau de la jonction neuromusculaire.

Enfin, il faut souligner qu'une première injection d'un alcaloïde sensibilise la préparation à une deuxième administration, même lorsque la réponse motrice a retrouvé son niveau initial. Cet effet persiste pendant au moins 30 minutes.

#### DISCUSSION

Nos observations montrent qu'un sens empirique remarquable a guidé les Banyambo dans le choix des constituants principaux de leur poison de flèche. Les extraits de racines de *Strychnos usambarensis* qu'ils introduisent dans leur préparation contiennent, en effet, des alcaloïdes quaternaires curarisants très puissants.

Nous avons isolé, purifié et étudié pharmacologiquement la dihydrotoxiférine, la curarine et la calebassine. Elles inhibent la réponse de la préparation nerf sciatique-muscle strié à des doses inférieures à la micromole par kilog.

L'action inhibitrice de ces alcaloïdes est qualitativement semblable à celle du curare et s'exerce par un antagonisme des effets de l'acétylcholine au niveau de la plaque motrice. Le bloc est levé par une augmentation de la quantité de transmetteur. La stimulation directe du muscle reste toujours efficace.

Quantitativement, les trois alcaloïdes purifiés sont légèrement moins actifs que la D-tubocurarine.

Les extraits de *Strychnos* contiennent, en outre, de l'afrocurarine, alcaloïde nouveau, possédant des propriétés curarisantes inférieures à celles des substances déjà citées. Deux nouveaux alcaloïdes (fractions 19 et 21) doivent encore être purifiés et identifiés.

Les alcaloïdes tertiaires et hybrides qui ont été isolés des extraits de *Strychnos* ne sont pas curarisants. Par contre, l'un d'entre eux, l'usambarensine, possède des propriétés antagonistes de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques. Cette action est quantitativement inférieure à celle de l'atropine et partagée par un alcaloïde quaternaire contenu dans la fraction 13.

Nous pouvons conclure que les alcaloïdes curarisants ne sont pas localisés uniquement en Amérique latine, comme on le pensait jusqu'à présent. L'Afrique centrale possède également des substances remarquablement actives à cet égard.

#### RÉSUMÉ

Les propriétés pharmacologiques de dix alcaloïdes tertiaires, hybrides et quaternaires extraits de *Strychnos usambarensis* ont été examinées. Un alcaloïde tertiaire, l'usambarensine, inhibe les effets muscariniques de l'acétylcholine sur l'iléon isolé de rat. Quatre dérivés ammoniums quaternaires, la dihydrotoxiférine, l'afrocurarine (substance nouvelle), la curarine et la calebassine sont des agents curarisants très actifs.

#### SUMMARY

The pharmacological properties of ten tertiary, hybrid and quaternary alkaloids isolated from the barks of *Strychnos usambarensis* roots have been investigated. Usambarensine, a tertiary amine derivative, inhibits the muscarinic effects of acetylcholine. Four ammonium quaternary products, dihydrotoxiferine, afrocurarine (a new substance), curarine and calebassine are potent curarizing agents.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ANGENOT, L., DENOËL, A. & GOFFART, M. (1970) *J. Pharm. Belg.* **25**, 73-77.  
ANGENOT, L. (1973) *Contribution à l'étude du Strychnos usambarensis GILG, principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain*. Thèse de Doctorat en Sc. pharmaceutiques, Université de Liège.  
ARIËNS, E. J. (1964) *Molecular Pharmacology*, vol. 1, Academic Press, New York.  
VAN ROSSUM, J. M. (1963) *Arch. internat. Pharmacodyn. Thérap.* **143**, 299-330.

A. DRESSE  
Laboratoire de Pharmacologie  
Université de Liège  
32, Boulevard de la Constitution, B-4000 Liège, Belgique