

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

—
Faculté de Médecine
—

Laboratoire de Pharmacognosie

Professeur A. DENOËL

Contribution à l'étude
du *Strychnos usambarensis* GILG,
principal constituant d'un poison
de flèche curarisant africain

Luc ANGENOT

Pharmacien

Assistant à l'Université

Mémoire présenté en vue de
l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques
—

Liège, avril 1973. -

A Monsieur le Professeur A. DENOËL qui m'a accueilli dans le Service de Pharmacognosie, a dirigé ce travail et en a suivi la réalisation avec intérêt et enthousiasme,

en témoignage de ma vive reconnaissance et de mon respectueux attachement

A Monsieur le Docteur N.G. BISSET (Chelsea College - University of London) qui a suivi mes recherches avec une attention soutenue et dont la grande compétence m'a permis de mener à bien ce travail,

en témoignage de ma profonde gratitude

A Messieurs les Professeurs de l'Institut de Pharmacie de l'Université de Liège auxquels je dois la plus grande partie de ma formation universitaire et en particulier à Monsieur le Professeur C.L. LAPIÈRE dont j'ai admiré le profond savoir et les conseils judicieux,

en témoignage de mes plus sincères remerciements

A Monsieur le Professeur L. CAHEN, Directeur du Musée Royal de l'Afrique Centrale à Tervuren et à feu Monsieur le Professeur P. DEUSE, Directeur de l'I.N.R.S. à Butare (Rwanda) qui ont favorisé grandement ma mission dans le Parc National de l'Akagera, en apportant la collaboration scientifique et matérielle de l'I.N.R.S.,

en témoignage de ma vive reconnaissance

A Monsieur le Professeur E.J. SHELLARD (Chelsea College - University of London) qui m'a fait l'honneur de m'accepter dans son laboratoire et m'a prodigué de nombreuses marques d'intérêt

en témoignage de mes plus vifs remerciements

Le présent mémoire est le résultat d'une collaboration étroite avec des chercheurs et techniciens de divers services, sans laquelle il n'est plus possible de progresser dans le domaine de la Pharmacognosie, science interdisciplinaire par excellence.

C'est la raison pour laquelle je remercie tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont coopéré à ce travail et en particulier:

- MM. les Professeurs J. BOSLY, F. JAMINET, C.L. LAPIERE et M. RENSON qui soit m'ont permis d'utiliser certains appareils de leur laboratoire, soit ont mis à ma disposition leurs techniciens qualifiés

- les botanistes de l'I.N.R.S. du Rwanda (Dr G. TROUPIN, Mr M. RADOUX et principalement Mr Guy BOUXIN qui n'a cessé de rester en contact avec nous durant son long séjour en Afrique

- Mr le Dr J.D. PHILLIPSON (University of London) pour les discussions fructueuses sur la stéréochimie des alcaloïdes

- Mr D. CARTER (Mass Spectrometry Service - University of London) qui s'est chargé de la prise des spectres de masse

- Mr J. DENOËL, Assistant au laboratoire commun de R.M.N. du Sart Tilman pour sa précieuse collaboration

- Mr J.J. TASSIN, Ingénieur de la firme CAMECA qui m'a reçu à Paris et a procédé à la prise de spectres sur un appareil Thomson 250 MHz

- Mr le Professeur M. GOFFART, Mr le Dr A. DRESSE, MM. J. GERARDY et B. NZENGU qui ont réalisé les expériences physiologiques et pharmacologiques sur les différents extraits du *S. usambarensis*

- le personnel du Service de Pharmacognosie et principalement Mr M. REMY, Premier Technicien, pour son aide consciencieuse, Melle A. BAUCHE, qui a assuré la dactylographie du présent mémoire, MM. L. BADA et R. DISTER qui se sont chargés des planches et photographies illustrant le travail

- tous ceux (parents, épouse, amies et amis) qui m'ont apporté leur affection, leur amitié ou leur collaboration pendant toutes les années consacrées à ce travail

Le Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique a subventionné notre mission d'étude au Rwanda ainsi que notre stage de perfectionnement à l'Université de Londres. Nous l'en remercions vivement.

PLAN DU TRAVAIL

Première partie: Essais phytochimiques sur quelques plantes médicinales du Rwanda

Chapitre I.	Le Rwanda.....	p.1
Chapitre II.	Considérations sur l'étude des pharmacopées traditionnelles africaines.....	p.3
Chapitre III.	Choix du <i>Strychnos usambarensis</i>	p.10

Deuxième partie: Généralités sur les poisons de flèches..... p.12

Les Banyambo et leur poison de chasse

Le *Strychnos usambarensis* GILG (Ethnobotanique-
Pharmacologie-Botanique)

Chapitre I.	Les poisons de flèche.....	p.12
Chapitre II.	Les Banyambo et leur poison de chasse.....	p.18
Chapitre III.	Propriétés curarisantes du <i>Strychnos usambarensis</i> et du poison Banyambo.....	p.25
Chapitre IV.	Le curare.....	p.28
Chapitre V.	La botanique du <i>Strychnos usambarensis</i> GILG.....	p.31

Troisième partie: Les alcaloïdes du *Strychnos usambarensis* du Rwanda..... p.38

Chapitre I.	Résumé des recherches consacrées aux <i>Strychnos</i>	p.39
Chapitre II.	Extraction des alcaloïdes des écorces de racines	
a)	Choix des écorces de racines.....	p.46
b)	Extraction des alcaloïdes.....	p.48
Chapitre III.	Usambarensine.....	p.59
Chapitre IV.	Stéréochimie de l'usambarensine.....	p.66
Chapitre V.	Dihydro-usambarensine.....	p.72
Chapitre VI.	Harmane.....	p.76
Chapitre VII.	Méthyl-usambarensine.....	p.81
Chapitre VIII.	Dihydro-méthyl-usambarensine.....	p.87
Chapitre IX.	Dihydro-flavopéireirine.....	p.90
Chapitre X.	Isolement des alcaloïdes quaternaires.....	p.101
Chapitre XI.	Dihydro-toxiférine.....	p.106
Chapitre XII.	Curarine.....	p.115

Quatrième partie: Identification de l'acide loganique

Considérations biogénétiques et chimiotaxinomiques..... p.118

Chapitre I.	Identification de l'acide loganique.....	p.119
Chapitre II.	Rôle possible de l'acide loganique dans la biogénèse des alcaloïdes du <i>S. usambarensis</i>	p.122

Chapitre III. Corrélations entre la biogenèse de l'usambarensine et celle des alcaloïdes de l'Ipéca (Rubiaceae), du Quinquina (Rubiaceae) et des Ochrosia (Apocynaceae).....	p.125
<u>Conclusions générales</u>	p.128
<u>Appendice I</u> : Plantes rwandaises soumises au screening phytochimique- Résultats.....	p. I à XV
<u>Appendice II</u> : Essais pharmacologiques réalisés sur les alcaloïdes isolés du S. usambarensis..... (activités atropiniques curarisantes et inhibi- trices de la M.A.O.)	p.XVI à XX
<u>Bibliographie</u> (8 pages terminales)	

Première partie

ESSAIS PHYTOCHIMIQUES SUR QUELQUES PLANTES MEDICINALES DU RWANDA

"Natural products have been, and still remain as, an interesting and important source of biologically active substances, the major sources of which remain untapped..."

Pr Norman R. FARNSWORTH

Chapitre I

LE RWANDA

Le Rwanda actuel, petit pays de 26.338 km², est limité

- à l'ouest par le lac Kivu et la Ruzizi (frontière du Zaïre)
- au sud par les rivières Lua et Akanyaru (frontière du Burundi)
- à l'est par l'Akagera (frontière de la Tanzanie)
- au nord par le massif des Virunga (frontière de l'Ouganda).

Le pays peut être divisé en trois aires physiques qui sont:

- le Rwanda oriental, dont l'altitude varie de 1300 m à 1700 m
- le Rwanda central, haut plateau intérieur à l'altitude moyenne de 1700 m
- le Rwanda occidental et septentrional, qui comprend la crête Congo-Nil, les bords du lac Kivu (altitude 1462 m), le massif volcanique des Virunga (point culminant: le Karisimbi à 4507 m). Cette dernière région comprend le Parc National des Volcans qui est la partie rwandaise du Parc National Albert. (voir figure n° 1, carte du Rwanda)

Le climat, et par le fait même la végétation, diffèrent nettement d'une région à l'autre:

- à l'ouest se trouvent de vastes étendues de forêts primitives, ayant les caractéristiques des forêts des régions montagneuses africaines dès qu'on dépasse l'altitude de 2000 m
- à l'est, le Parc National de l'Akagera et le domaine de chasse du Mutara constituent la région la plus sèche et la plus chaude du pays; c'est une succession de savanes arborescentes et arbustives.

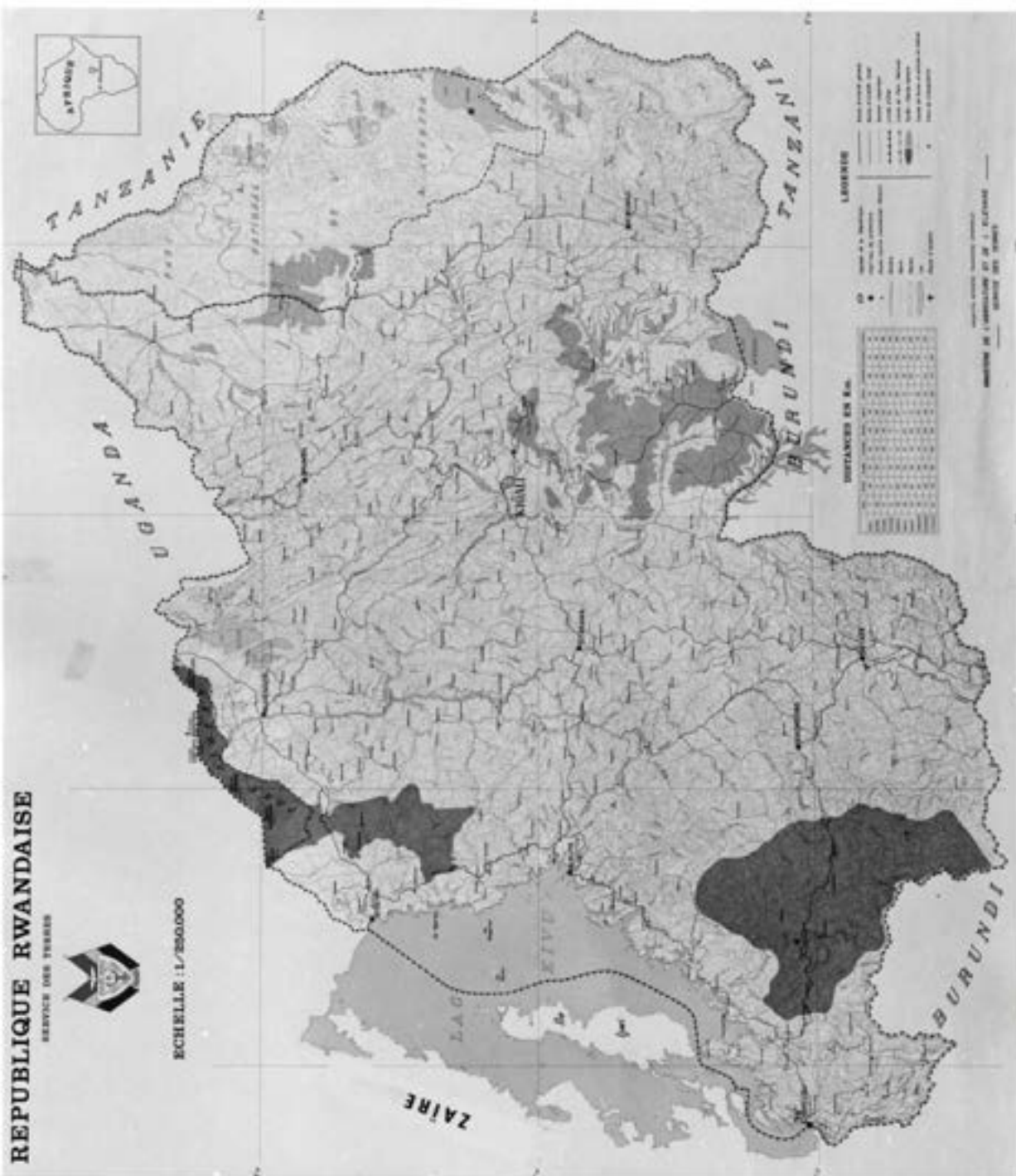
La position géographique du Rwanda au coeur de l'Afrique lui vaut également de posséder une flore très diversifiée: à l'ouest, flore guinéo-congolaise; au centre et à l'est, flore soudano-zambezienne; au nord, flore montagnarde africaine.

Le climat tropical, adouci par l'altitude, est souvent qualifié de "méditerranéen", ce qui explique une population nombreuse: le Rwanda possède en effet la densité de population la plus élevée du continent africain. Elle atteint par endroits 1000 habitants au km²; seules les régions orientales (terres arides et mouches tsé-tsé) et occidentales (forêts) sont peu habitées.

REPUBLICQUE RWANDAISE



RECHERCHES : 1/2500.000



Si la situation géographique a évité au Rwanda une colonisation précoce, (-en effet, le Rwanda fut le dernier pays d'Afrique à être exploré. Ce n'est qu'en 1894 que le comte allemand Adolf von Götzen traversa la région et découvrit le lac Kivu-) elle le défavorise actuellement pour les échanges commerciaux. Le manque de ressources minérales ajouté aux facteurs précédents fait du Rwanda le pays théoriquement le plus pauvre du monde (suivant le revenu moyen par habitant).

Conscient de ces problèmes, le gouvernement rwandais a décidé de développer les trois pôles d'intérêt du pays:

- tourisme grâce à la beauté des sites: le lac Kivu, le parc des Volcans, le parc de l'Akagera et le domaine de chasse du Mutara
- élevage par l'introduction de nouvelles races bovines
- agriculture en étudiant notamment les plantes utilitaires y compris les plantes médicinales indigènes ou acclimatées.

A côté des plantes alimentaires (sorgho, haricots, pois, patates douces, maïs, manioc, bananiers, papayers, passiflores, ananas), les Rwandais cultivent et exportent café, pyrèthre, thé, kousso, eucalyptus, quinquina et depuis trois ans: Vinca major L., Vinca minor L., camomille, digitale laineuse, angélique, mauve et souci. Des essais doivent être effectués avec la belladone, le boldo, l'ipéca et le ginseng. Toutes ces plantes sont acclimatées au Rwanda, excepté le kousso.

Le gouvernement rwandais souhaitait que l'Institut National de Recherche Scientifique (I.N.R.S.) envisage une étude des plantes médicinales indigènes(1). Aussi avons-nous pu compter sur la collaboration de cet Institut lorsqu'en 1969, nous avons manifesté notre intention d'étudier quelques plantes indigènes du Rwanda.

En ce qui concerne les investigations sur les propriétés médico-magiques des plantes rwandaises, une mention doit être faite des oeuvres de LESTRADE (2) et du Père DURAND (3). Malheureusement ces travaux ne s'appuient pas sur des déterminations botaniques précises.

En 1969, une enquête sur les médicaments rwandais a été entreprise par le Dr TROUPIN dans la région de Rwinkwavu. Les préparations d'une centaine de remèdes ont été mises sur fiches avec indications des plantes utilisées et constitution d'un herbier de référence.

Quant aux recherches chimiques, aucune n'avait à notre connaissance, été entreprise sur une plante rwandaise avant le début de nos travaux.

Chapitre II

CONSIDERATIONS SUR L'ETUDE DES PHARMACOPEES TRADITIONNELLES AFRICAINES

L'expression "pharmacopées traditionnelles africaines" doit être prise au sens large qui est: recueils de formules pour préparer les médicaments, recueils qui ne sont pas écrits mais qui se perpétuent par l'enseignement oral de génération en génération. La pharmacopée traditionnelle ne peut qu'être prise au sérieux puisque produit de l'expérience humaine au contact de la nature. C'est d'ailleurs cette expérience populaire - acquise par l'emploi thérapeutique souvent séculaire ou millénaire, de plantes totales ou de certaines de leurs parties - qui constitue très souvent le point de départ pour la recherche et l'étude de substances naturelles actives.

Nos connaissances relatives aux plantes médicinales et toxiques des régions tropicales d'Afrique, en particulier, sont encore très incomplètes. Les découvertes de principes aussi actifs que l'ouabaïne, l'yohimbine, l'ibogaïne, l'ésérine, la physostigmine, les alcaloïdes du Rauwolfia vomitoria APZ., les bases de la kola... justifient les espoirs que nous plaçons encore dans ce domaine.

L'étude des ressources médicinales d'une région exige une collaboration étroite de diverses disciplines, classées par ordre chronologique:

- 1) des études botaniques et ethnobotaniques
- 2) des études phytochimiques et pharmacologiques succédant à des essais préliminaires destinés à orienter les recherches ultérieures
- 3) des études agronomiques

1) L'étude botanique ne pose plus guère de problème au Rwanda, étant donné la publication d'une flore par la mission botanique de l'I.N.R.S. Il est en effet essentiel de travailler des plantes soigneusement identifiées.

Le point de vue ethnobotanique devrait être couvert par une étude complète s'appuyant sur des échantillons d'herbier répertoriés avec soin, renseignant les noms vernaculaires et scientifiques ainsi que l'usage et le mode de préparation des remèdes ou poisons. L'étude des principes actifs des plantes et celle de leur action est loin d'être facile; elle exige de longues recherches

et dès le début, l'intervention de nombreux facteurs, dont au premier plan, la coopération de l'indigène qui, s'il dit la vérité sur l'origine du médicament, ne la dit pas souvent tout entière soit par suite d'une incompréhension de la question soit parce qu'il n'aime pas livrer ses secrets. D'autre part, s'il y a des remèdes connus de tous les indigènes, il y en a d'autres plus foudroyants, gardés jalousement par des guérisseurs dont il faudra s'efforcer de gagner la confiance. Un guérisseur peut avoir acquis des connaissances étendues, fruit non seulement de ses observations personnelles mais aussi de celle de ses devanciers; c'est par empirisme que l'on est arrivé à la connaissance de la valeur pharmacodynamique de tous les produits végétaux. Le Professeur Emile PERROT était un fervent partisan de l'étude des remèdes indigènes et il s'est étonné à maintes reprises que des plantes d'un même groupe systématique et parfois de même genre et de même espèce soient utilisées par des indigènes de pays très éloignés dans des circonstances analogues: "Cette convergence extraordinaire des découvertes de peuplades dont il ne semble pas qu'on puisse admettre un contact dans le temps, n'inspire-t-elle pas au médecin et au philosophe une admiration sans bornes envers une semblable puissance d'observation?"

Au Rwanda - comme dans d'autres régions d'Afrique -, il serait urgent de recueillir les recettes des remèdes utilisés par les populations ayant eu très peu de contacts avec les Européens et les villes, et tout particulièrement les Batwa de la forêt, les Banyambo et les Banyarwanda du nord et de l'est du pays (région du Gisaka et du Mutara). Nous ne pensons pas que toutes les médications relevées dans une telle étude seraient reconnues de valeur. Nous sommes persuadés du contraire: nous croyons que certaines formules sont tout à fait inefficaces ou même dangereuses mais si certains médicaments méritent d'être conservés, la réalisation d'une telle étude serait pleinement justifiée.

2) Les études pharmacognostiques (phytochimiques en ordre principal)

Les problèmes de prospection et d'approvisionnement en matériel végétal intéressant sont spécifiquement africains et doivent de ce fait être traités sur place à l'aide d'organismes y situés, dans notre cas l'I.N.R.S. à Butare. Par contre, les recherches chimiques et pharmacologiques sur des espèces bien déterminées doivent être poursuivies dans des laboratoires disposant d'équipements scientifiques adéquats. Cependant, la plupart des tests du screening phytochimique doivent pouvoir être effectués dans le pays prospecté. Dans ce but, les méthodes seront simples, rapides, sélectives et nécessiteront un minimum d'équipement.

Les essais entrepris sur les drogues rwandaises ont été les suivants:

I) recherche des alcaloïdes

Cette recherche occupe dans les tests la place la plus importante car les alcaloïdes exercent une activité pharmacologique marquée, d'habitude sur le système nerveux central; d'ailleurs la grande majorité des produits naturels utilisés en médecine est de nature alcaloïdique: ajmaline, atropine, caféine, cocaïne, codéine, colchicine, émétine, éphédrine, ergométrine, ergotamine, hyoscyamine, leurocristine, lobéline, morphine, papavérine, physostigmine, pilocarpine, protovératrines, psilocybine, quinine, quinidine, réserpine, scopolamine, spartéine, strychnine, théobromine, théophylline, tubocurarine, vincaléukoblastine, vincamine, yohimbine...

A. Test général en milieu acide:

5 gr de poudre de drogue sont introduits dans un erlenmeyer à large ouverture et additionnés de 25 ml d'acide chlorhydrique dilué à 5 %. On bouche et on laisse macérer 24 h, en agitant de temps en temps. On filtre et on recueille le filtrat. Sur 1 ml du filtrat introduit dans un tube à essai, on ajoute 5 gouttes du réactif de MAYER (solution aqueuse d'iodure double de mercure et de potassium).

S'il n'y a ni précipité, ni louche dans le tube, on peut conclure à l'absence d'alcaloïdes.

Cependant, il y a un risque de réactions faussement positives:

- protéines qui précipitent par addition d'un réactif contenant un métal lourd
- certains glucosides et sucres
- les bétaines, la choline, les purines, les amines méthylées, les tanins et les sels ammoniques.

Aussi dans le cas d'une réaction positive, faut-il confirmer la présence d'alcaloïdes après extraction par un solvant organique.

B. Extraction des alcaloïdes

Cette extraction sera effectuée sur le filtrat de l'expérience précédente ou suivant la technique ci-après: 5 gr de poudre de drogue sont introduits dans un erlenmeyer et imbibés de 5 ml d'ammoniaque diluée au demi, puis additionnés de 25 ml d'éther-chloroforme (2:1). Macération de 24 h en flacon bouché en agitant fréquemment, filtrer les solutions organiques sur sulfate sodique anhydre, et les épuiser dans une ampoule à décantation par deux fois 5 ml d'acide chlorhydrique dilué à 5 %. La solution aqueuse est alors additionnée du réactif de MAYER.

Réactions faussement négatives: les alcaloïdes quaternaires ne passent pas dans les solvants organiques. Les protoalcaloïdes tels mescaline et bufoténine ne précipitent pas par le réactif de MAYER.

Il conviendra également de se méfier de l'ammoniaque qui peut transformer des corps oxygénés en azotés (exemples de la rosmarinine, alcaloïde artéfact du romarin (4) et de la gentianine, alcaloïde artéfact

de l'Anthocleista procera LEPRIEUR ex BUREAU (7).

- C. Chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1
Phase de Partridge (n-Butanol-Acide acétique-Eau 4:1:5)
Révélateur: réactif de DRAGENDORFF
Dépôts: 20 λ de teinture au 1/10e dans l'éthanol à 70°

Les produits possédant un carbonyle conjugué ou une fonction lactone peuvent réagir aussi avec le réactif de DRAGENDORFF; c'est le cas des cardénolides, bufadiénolides, flavones et pyrones...

Suivant ces 3 tests, la présence d'alcaloïdes peut être établie avec un maximum de garantie. Une idée de la teneur peut être déduite du test C.

II) recherche des composés polyphénoliques

a) tanins galliques et/ou catéchiques

La recherche a lieu sur l'infusé à 5 ou 10 % de la drogue; dans un berlin rempli d'eau bouillante, on projette la drogue broyée en remuant avec un agitateur. On arrête l'ébullition et on laisse infuser 15 minutes; on filtre. Sur deux portions du filtrat:

1° addition de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1 %: obtention d'une coloration bleu-foncée, noire ou verte si tanins

2° à 30 ml du filtrat, ajouter 15 ml du réactif de STIASNY (formol à 30 %: 2 volumes/HCl concentré: 1 volume). Un chauffage au bain-marie à 90°C provoque la précipitation quantitative des tanins catéchiques (précipité rose). Après filtration, le filtrat saturé d'acétate sodique est additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique (présence de tanins galliques si l'on obtient une teinte bleue ou noire).

b) flavonoïdes

Réaction à la cyanidine, dite de SHINODA. La recherche a lieu sur l'infusé préparé en a). 5 ml d'infusé sont additionnés de 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol à 50°, HCl concentré 2:1 V/V) et de poudre de magnésium. On observe la coloration obtenue (orangée, rouge, violette). La présence de flavonoïdes est confirmée par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1, dans la phase de Partridge, après avoir déposé 20 λ de teinture au 1/10e dans l'éthanol à 70°. Les chromatogrammes sont observés aux U-V avant et après imbibation par des vapeurs d' NH_3 , ainsi qu'avant et après pulvérisation par une solution de trichlorure aluminique à 1 % dans l'éthanol à 94° suivie d'un chauffage de 10 minutes à l'étuve chauffée à une température de 100°C.

c) anthocyanes

Leur présence confère à l'infusé une coloration rouge qui s'accroît par l'addition d'un acide et qui vire au bleu violacé ou verdâtre par alcalinisation par l'ammoniaque. De plus, en chromatographie sur papier dans la phase de Partridge, on observe des taches rouges.

d) leucoanthocyanes

5 ml d'infusé sont additionnés de 5 ml d'alcool chlorhydrique puis chauffés au bain-marie. L'apparition d'une coloration rouge cerise ou violacée indique la présence de leucoanthocyanes.

III) recherche des dérivés quinoniques

2 gr de drogue pulvérisée sont humectés avec 2 ml d'HCl dilué et introduits dans un flacon. On ajoute 20 ml de chloroforme. Après quelques heures, on filtre le solvant et on agite avec 5 ml d'ammoniaque (Réaction de BORN-TRAGER). Une coloration rose à rouge-violacée est une réaction positive.

IV) recherche des saponosides

Ils sont mis en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante. Dans une fiole conique de 500 ml environ, renfermant 100 ml d'eau bouillante, introduisez 1 gr de poudre de la drogue. Maintenez une ébullition modérée pendant 30 minutes. Filtrez, ajustez à 100 ml après refroidissement. Dans une série de 10 tubes à essais de 16 cm de haut et de 16 mm de diamètre, mesurez successivement 1, 2, 3..., 10 ml de décocté et ajustez le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agitez chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes: deux agitations par seconde, après l'avoir bouché avec le pouce. Laissez reposer 15 minutes et mesurez la hauteur de la mousse. Si elle est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est inférieur à 100 (négligeable). Si elle est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution de la drogue dans ce tube est l'indice de mousse cherché.

V) recherche des stéroïdes et triterpénoïdes (y compris les saponosides et les cardénolides)

Nous effectuons cette recherche à partir d'une teinture au 1/10e de la drogue dans l'éthanol à 70°. Ajouter à 10 ml de teinture, 10 ml d'eau et 2 ml d'acétate de plomb à 10 %. Laisser reposer 15 minutes, filtrer, ajouter 2 ml de solution aqueuse de phosphate disodique à 10 %; repos 15 minutes; filtrer et recueillir le filtrat dans une ampoule à décanter; extraire la solution à 3 reprises par 5 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont filtrées sur sulfate sodique anhydre. Le filtrat est divisé en 4 fractions qui sont évaporées à siccité.

- a) Le résidu est solubilisé dans quelques gouttes d'acide acétique et additionné de 3 ml d'un mélange anhydride acétique-acide sulfurique concentré 50:1. Une coloration violette à bleue ou verte indique une réaction positive.
- b) Le résidu est repris par quelques gouttes de chloroforme et déposé sur une plaque chromatographique Silicagel Merck F254. On procède au développement dans les systèmes préconisés par STAHL et on révèle par les réactifs classiques de ces substances: solution de $SbCl_3$ à 25 % dans chloroforme; solution d'acide chlorosulfonique dans l'acide acétique; réactif de LIEBERMANN-BURCHARD.(8).
- c) Réaction de RAYMOND pour les cardénolides: elle consiste à ajouter au résidu successivement 2 gouttes d'une solution alcoolique à 1 % de métadinitrobenzène et 2 gouttes de NaOH à 20 %. Une coloration bleue indique une réaction positive.
- d) Réaction de KEDDE également pour les cardénolides: on ajoute au résidu 2 gouttes d'une solution alcoolique d'acide dinitrobenzoïque à 2 % et 2 gouttes de NaOH N. Une coloration rouge pourpre ou rouge vin indique une réaction positive.

VI) recherche des dérivés cyanogénétiques

Réalisée sur les plantes fraîchement récoltées.

Découper finement environ 2 gr de drogue. Transvaser le mélange dans un petit erlenmeyer; ajouter 15 ml d'eau et boucher immédiatement. Après une heure de contact (agiter de temps en temps), recouvrez le col à

l'aide d'un papier micro-sodé de GUIGNARD. Chauffer quelques minutes: une coloration marron apparaît s'il y a dégagement d'HCN.

VII) recherche d'un mucilage

La présence d'un mucilage est décelée par la viscosité des infusés et décoctés qu'il est impossible de filtrer sans expression. Un second test consiste à additionner le filtrat obtenu par expression d'un volume égal d'alcool à 94° qui provoque la précipitation du mucilage.

VIII) recherche des huiles essentielles

La présence d'huile essentielle décelable lors des essais organoleptiques est confirmée par entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil décrit à cet usage dans la Pharmacopée Belge 5e édition. Le distillat est recueilli dans le tube gradué, éventuellement en présence de xylène si l'essence est plus lourde que l'eau.

Les études pharmacologiques doivent en théorie accompagner les études chimiques. Elles doivent être entreprises par des laboratoires disposant de gammes variées de tests praticables en série sur les animaux et organes isolés. Nous ne voulons pas discuter ici du choix des expériences à réaliser, cela échappant au domaine de nos compétences. Le lecteur intéressé consultera avec profit les publications de FARNSWORTH (4) et de SANDBERG (5), traitant de screening pharmacologique appliqué aux plantes médicinales. Les recherches pharmacodynamiques interviennent en premier lieu pour déceler l'activité des plantes et trancher les cas litigieux, notamment quand l'analyse chimique ne permet pas de déceler des principes actifs caractéristiques. Dans ce dernier cas, seules les recherches pharmacologiques peuvent guider les chimistes dans la recherche des fractions responsables de l'activité de la drogue.

Un résultat faussement négatif peut cependant se produire si l'on travaille sur des plantes où les principes actifs se sont dégradés suite à une mauvaise dessiccation. L'idéal serait de disposer toujours de plantes stabilisées ou mieux d'extraits lyophilisés (6). Enfin un résultat négatif se produira également si la fraction analysée contient des substances antagonistes soit minérales, tels le sélénium, le cuivre, les nitrates... ou organiques. C'est ainsi que SVOBODA a isolé la leurocristine et la leurosine, deux alcaloïdes hautement actifs contre la leucémie à partir d'une fraction alcaloïdique brute qui était démunie d'activité contre le même néoplasme!! En conclusion, la prudence doit toujours être de rigueur dans l'appréciation des résultats.

Ces recherches de "screening" phytochimique et pharmacologique ne constituent qu'un point de départ. Il faudra attendre des années avant une exploitation des espèces les plus intéressantes. En effet, lorsque les essais préliminaires auront été effectués sur la majorité des espèces utilisées en médecine traditionnelle, les espèces ainsi sélectionnées seront étudiées

tant d'un point de vue clinique que thérapeutique. Si les essais cliniques sont concluants, l'exploitation des ressources végétales sera envisagée.

3) Les études agronomiques

Pour les recherches de laboratoire, la matière première fournie par la cueillette suffit largement. Par contre, l'alimentation du marché international en drogues végétales doit être étudiée par les instituts agronomiques africains, tel l'Institut des Sciences Agronomiques du Rwanda (I.S.A.R.) à Rubona.

Ces instituts préciseront à l'aide d'études écologiques et génétiques, les espèces se prêtant à des cultures rationnelles, ou du moins protégeront les gîtes médicinaux naturels. Il est évident que les études agronomiques pouvant prendre assez bien de temps, peuvent être commencées avant d'avoir obtenu les résultats cliniques, d'autant plus que les possibilités de multiplication (graines, boutures, greffes) peuvent être réalisées sur très peu de matériel.

Finalement, la fourniture des matières premières à l'industrie, au départ d'une exploitation publique ou privée, marquera l'aboutissement des travaux entrepris en suivant la longue filière décrite ci-avant.

Chapitre III

Au cours d'une mission d'étude au Rwanda, nous avons récolté des échantillons d'une trentaine d'espèces qui ont été soumis aux tests phytochimiques détaillés dans le chapitre précédent. Les résultats obtenus sont repris dans le premier appendice de ce mémoire.

A partir de ce screening, il apparut que le Strychnos usambarensis est particulièrement riche en alcaloïdes, ce qui retint notre attention, le laboratoire dont nous faisons partie ayant, par le passé, consacré une grande part de ses activités à l'étude des Strychnos du Zaïre (ex Congo belge).

L'intérêt que cette plante présentait fut renforcé par l'observation de son utilisation par les indigènes dans la confection d'un poison de chasse, ainsi que par la mise en évidence des propriétés curarisantes de certaines de ses fractions alcaloïdiques.

C'est à l'étude de ce Strychnos et du poison en dérivé que le présent mémoire est consacré.

*
* *

Deuxième partie

- GENERALITES SUR LES POISONS DE FLECHES
- LES BANYAMBO ET LEUR POISON DE CHASSE
- LE STRYCHNOS usambarensis GILG
(Ethnobotanique-Pharmacologie-Botanique)

"Moins qu'un parcours, l'exploration est une fouille: une scène fugitive, un coin de paysage, une réflexion saisie au vol, permettent seuls de comprendre et d'interpréter des horizons autrement stériles".

Claude LEVI-STRAUSS

Chapitre I

LES POISONS DE FLECHE

Les poisons de flèche ont toujours fasciné l'imagination; les plus anciens écrits relatent l'histoire de ces poisons. Le mot toxique provient d'ailleurs du mot grec: *τοξικόν* = poison de flèche.

Produit spécifique de l'intelligence humaine, la confection de telles armes a permis à l'homme d'une part de survivre, d'autre part, de s'assurer la suprématie à l'égard d'espèces animales plus fortes que lui. Chaque groupe ethnique possédait son poison secret et c'est là que résidait la difficulté d'obtenir des indications précises. Leur préparation apparaissait très mystérieuse et ce n'est qu'occasionnellement que des renseignements filtraient. Heureusement les indiscretions se sont multipliées et ont permis d'obtenir une image assez valable des différents poisons utilisés par le monde. Il est cependant certain que tout n'a pas été révélé sur cette question et l'on ne peut que formuler le souhait que le plus rapidement possible des ethnobotanistes tentent de capter des renseignements auprès des populations conservant un contact étroit avec la nature, se souvenant de ce dicton: "Chaque fois qu'un vieillard meurt, c'est une bibliothèque qui brûle".

Peu d'ouvrages spécialisés ont cependant été consacrés aux poisons de flèche. Il est vrai que les ouvrages de PERROT et VOGT d'une part, de LEWIN d'autre part, sont remarquables (46,47) et que peu de nouveaux poisons ont été signalés depuis leur parution. Néanmoins une révision s'impose et l'on doit louer les publications récentes de BISSET concernant les poisons de flèche. Nul autre mieux que lui n'était préparé à cette tâche car les poisons sont bien souvent à base de Loganiacées, Apocynacées et Moracées, familles à principes tantôt cardiotoniques, tantôt alcaloïdiques qui ont toujours retenu l'attention de cet auteur (48 à 53).

Nous avons dressé une carte schématique de la répartition des principaux poisons de flèche utilisés dans le monde, nous attachant particulièrement à ceux d'Afrique.

Classification botanique des plantes entrant dans ces poisons

- A. Europe: Renonculacées: Aconits, Hellébore
Taxacées: If (utilisés par les anciens peuples d'Europe: Gaule, Barbarie)
- B. Asie et Océanie: Renonculacées: Aconits, Anémones
Moracées: Antiaris toxicaria LERCH* et autres espèces
Loganiacées: Strychnos ignatii BERG, S. axillaris COLEBR.,
S. vanprukii CRAIB (S. quadrangularis HILL),
S. minor DENNST. (S. colubrina L.) S. ovata
A.W. HILL, S. nux-vomica L.
Apocynacées: Beaumontia sp., Tabernaemontana
Légumineuses: Derris
Dioscoréacées: Dioscorea sp.
Euphorbiacées: Sapium
Celastracées: Lophopetalum
- C. Amérique:
Nord: Renonculacées: Anémones
Centre et sud: Euphorbiacées
Sud: CURARE à partir de Loganiacées (Strychnos) et de Ménispermacées
(Chondrodendron) + Euphorbiacées et Solanacées
Moracées: Naucleopsis
- D. Afrique: Apocynacées: Strophanthus sp., Acokanthera sp.
Loganiacées: Strychnos sp. (surtout S. icaia BAILL.)
Légumineuses: Erythrophleum sp., Physostigma sp.
Amaryllidacées: Buphane disticha HERB.
Asclépiadacées: Calotropis sp.
Euphorbiacées

A côté de ces poisons végétaux, il convient de signaler l'existence de poisons animaux (reptiles, batraciens, poissons, insectes...), de poisons cada-
vériques (animaux en décomposition), de poisons microbiens de Mélanésie à
base de bacilles du tétanos!

Au terme d'une bibliographie plus poussée, (18,19,55 à 72) nous avons dressé
la carte des poisons de flèche africains: carte p. 15.

Les principaux genres botaniques sont classés dans les familles ci-après:

1. Amaryllidacées: Buphane
2. Apocynacées: Acokanthera, Adenium, Cerbera, Funtumia, Landolphia, (Pachypo-
dium?), Picralima, Rauvolfia, Strophanthus, Carissa, Nerium
3. Aracées: Amorphophallus
4. Asclépiadacées: Calotropis
5. Cactacées: Opuntia
6. Capparidacées: Boscia
7. Combrétacées: Combretum
8. Commélinacées: Palisota
9. Composées: Microglossa, Vernonia
10. Connaracées: Cnestis
11. Dioscoréacées: Dioscorea
12. Ebénacées: Diospyros, Euclea

* Les noms d'auteurs sont cités uniquement la première fois que nous mention-
nons le nom latin de la plante.

13. Euphorbiacées: Euphorbia, Elaeophorbia, Croton, Jatropha, Pluggea, Synadenium, Dichapetalum
14. Guttiferacées: Ha r ungana
15. Légumineuses: Physostigma, Erythrophleum, Tephrosia, Detarium, Ormosia, Mucuna, Albizia, Crotalaria
16. Liliacées: Aloe, Asparagus, Gloriosa, Urginea
17. Loganiacées: Strychnos, Usteria
18. Ménispermacées: Triclisia
19. Moracées: Ficus, Antiaris
20. Périplocacées: Parquetina, Periploca
21. Polygalacées: Securidaca
22. Rubiacées: Nauclea
23. Rutacées: Fagara
24. Sapindacées: Eriocoelum
25. Sterculiacées: Mansonia
26. Solanacées: Nicotiana, Solanum, Datura, Capsicum
27. Thyméléacées: Lasiosiphon
28. Vitacées: Cissus

Quant aux poisons animaux, on y rencontre des insectes (larves de *Diamphidia locusta* et de *Diamphidia simplex*, *Blepharidia* et *Blepharidella*), des venins de serpents (*naja*, cobra, vipères), des venins de scorpions.

La distribution géographique de ces poisons se répartit comme suit:

- Somalie: *Adenium somalense* BALF F.; *Acokanthera schimperi* SCHWEINF.; *Acokanthera venenata* G. DON.; *Acokanthera ouabaio* POISS.; différentes espèces d'*Euphorbia*
- Ethiopie: *Acokanthera schimperi*; *Euphorbia* sp.
- Soudan: *Euphorbia candelabrum* TREM. ex. KLOTZSCH; *Euphorbia venenata* MARL.; *Adenium honghel* A. DC.; *Strophanthus* sp.; *Acokanthera* sp.; *Cissus quadrangularis* L.; *Palisota barteri* BENTH.
- Kenya: *Acokanthera* sp.; *Strophanthus* sp.; *Vernonia hildebrandtii* VATKE (Afrique de l'Est); *Albizia versicolor* WELW. ex. OLIV. (Afrique de l'Est)
- Tanzanie: *Acokanthera schimperi*; *Acokanthera longiflora* STAPP; *Acokanthera venenata*; *Strophanthus emini* ASCH et PAX.; *landolphia parviflora* K. SCHUM.; *Urginea* sp.; *Euphorbia* sp.; *Dioscorea triphylla* L.
- Afrique du Sud: Euphorbiacées; *Buphane disticha*; *Acokanthera venenata*; *Adenium boehmanium* SCHINZ.; *Hyaenanche globosa* LAMB.; (*Pachypodium* sp.?); Poisons animaux
- Mozambique-Rhodésie-Zambie: *Strophanthus kombe* OLIV.; *Nerium oleander* L.
- Sud-Ouest Africain: poisons animaux (*Diamphidia*, *Blepharidia*, *Blepharidella*)
- Angola: *Buphane disticha*; *Strophanthus* sp.; poisons animaux
- Madagascar: *Cerbera venenifera* STEND.

- Zaïre: *Erythrophleum suaveolens* (GUILL. et PERR.) BRENNAN (syn. *E. guineense* G. DON); *Palisota barteri*; *Nauclea diderrichii* (DE WILD) MERRILL; *Combretum grandiflorum* DON; *Strychnos icaia*; *Periploca nigrescens* AFZ.; *Crotalaria* sp.; *Tephrosia* sp.; *Strophanthus gratus* FRANCH; *Euphorbia* sp.
- Congo (Brazzaville): *Strophanthus hispidus* A.DC.; *Strophanthus gratus*; *Rauvolfia vomitoria* AFZ.; *Palisota schweinfurthii* C.B. CLARK; *Parquetina nigrescens* AFZEL.
- République Centre Africaine: *Strychnos icaia*; *Strychnos johnsonii* HUTCH. et M.B. MOSS; *Strophanthus gratus*; *Strophanthus sarmentosus* DC.; *Rauvolfia vomitoria*; *Triclisia dictyophylla* DIELS
- Nigéria: *Strophanthus hispidus*; *Strophanthus sarmentosus*; *Euphorbia* sp.; *Erythrophleum suaveolens*; *Strychnos spinosa* LAM.; *Calotropis procera* AIT.; *Boscia senegalensis*; Poisons animaux
- Cameroun: *Strophanthus gratus*; *Strophanthus hispidus*; *Calotropis procera*; *Euphorbia* sp.
- Sierra Leone: *Erythrophleum suaveolens*; *Physostigma venenosum* BALF.
- Senegal: *Detarium senegalense* GMEL.; *Strophanthus sarmentosus*; *Strophanthus preussii* ENGL. et PAX.; *Strophanthus hispidus*; *Erythrophleum suaveolens*; *Datura* sp.; poisons animaux
- Côte d'Ivoire: *Croton* sp.; *Fagara angolensis* ENGLER.; *Mansonia altissima* A. CHEV.; *Eriocoelum racemosum*; *Strophanthus hispidus*; *Calotropis procera*; *Euphorbia* sp.; *Elaeophorbia* sp.; *Sapium grahamii* PRIN; *Erythrophleum suaveolens*; *Picralina elliotii* STAFF; *Diospyros xanthochlamys* GÜRKE; *Fagara macrophylla* ENGL.; *Microglossa volubilis* DC.; *Funtumia elastica* STAFF; *Harungana madagascariensis* POIR.; *Nauclea* sp.; *Lasiosiphon kraussianus* HUTCH. et DALZ. (Afrique de l'Ouest).
- Dahomey: *Strophanthus hispidus*; *Cnestis ferruginea* DC.; *Elaeophorbia drupifera* STAFF; *Usteria guineensis* WILD.; *Caesalpinia crista* L.; *Fluggea virosa* BAILL.; poisons animaux.
- Rwanda: *Carissa oppositifolia*; *Fagara chalybea* ENGL.; *Euphorbia grantii* OLIV.; et découvert en 1970: *Strychnos usambarensis*; *Euphorbiacées*; *Nuclea* sp.; et autres plantes reprises plus loin; *Acokanthera schimperi*.

Les poisons les plus foudroyants sont ceux qui contiennent des hétérosides cardiotoniques (*Acokanthera*, *Strophanthus*, *Adenium*, *Cerbera*, *Mansonia*, *Calotropis*, *Nerium*, *Periploca*, *Urginea*) et/ou des alcaloïdes (*Strychnos*, *Gloriosa*, *Buphane*, *Physostigma*, *Erythrophleum*, *Crotalaria*, *Datura*, *Solanum*, *Triclisia*, *Fagara*, *Vernonia*, ...)

Au cours de la mission d'étude réalisée au Rwanda en 1970, nous avons pu observer la préparation d'un poison de chasse à base de *Strychnos usambarensis*. Ce poison a été préparé par des chasseurs de la tribu des Banyambo. Il serait également connu de certains Banyarwanda du Gissaka (région sise au sud-est du Rwanda).

Chapitre II

LES BANYAMBO ET LEUR POISON DE CHASSE

Les Banyambo et le Parc National de l'Akagera

Le Parc National de l'Akagera (superficie: 250.000 ha) est situé à l'Est du Rwanda, le long de la rivière Akagera qui sert de frontière avec la Tanzanie. L'Akagera se crée un passage vers le lac Victoria, dans une vaste étendue de marais (papyrus, nénuphars). C'est dans cette dépression marécageuse que sont établis les campements et les villages de Banyambo, tantôt sur les rives de l'Akagera (côté tanzanien), tantôt sur les flots flottants dans les marais. Les Banyambo qui habitaient la vallée de l'Akagera bien avant la création du Parc National ont été tolérés dans ces lieux jusqu'en 1958, date à laquelle cette population fut déplacée.



Figure n° 2

Marais de l'Akagera avec les collines
de Tanzanie à l'arrière-plan

Comme on peut le constater sur les cartes ci-après, représentant la répartition des tribus en Tanzanie, les Banyambo forment une petite tribu située à égale distance du lac Kivu et du lac Victoria.

Cartes tribales du Tanganyika (87)



Filigrane historique des Banyambo et de leurs poisons de chasse

L'histoire des Banyambo étant étroitement liée à l'Akagera, il faut attendre la découverte de l'Akagera par STANLEY en 1875 pour qu'ils entrent dans l'histoire moderne (73): STANLEY notait que dans les trois quarts de sa largeur, la Kagera (baptisée par lui Nil Alexandra) glissait lentement au milieu de carex, de papyrus et de roseaux. Des hauteurs du Karagwe (collines de la Tanzanie, il écrivait: "... la vallée du Nil Alexandra, large tapis de papyrus, moucheté du nord au sud de petits lacs bleus reliés par le fil sinueux et argenté de la rivière, et donnant à penser qu'il y avait là un sujet d'exploration du plus haut intérêt".

Désirant réaliser ce projet, STANLEY s'approche de la Kagéra, un peu au sud du lac Ihéma et écrit: "Tout l'espace qui me semblait être la vallée de la Kagéra, espace compris entre les montagnes de Mouvari (Parc National au Rwanda) et celles du Karougoué (Karagwe en Tanzanie) est complètement occupé par la rivière, par le fourré de papyrus et par plus d'une dizaine de lacs. Les papyrus couvrent de 9 à 14 pieds d'eau; chacun de ces lacs a une profondeur de 20 à 65 pieds; ils sont tous reliés entre eux ainsi qu'avec la rivière sous le tapis flottant". (Cette description correspond tout à fait à ce que nous avons nous-mêmes constaté). STANLEY gagne ainsi le lac d'Ihéma et l'île du même nom et tente ensuite d'accoster: "... le lendemain, ayant quitté l'île d'Ihéma, nous longeâmes la côte du Mouvari; un petit village était près de la rive, nous essayâmes d'atterrir; aussitôt les indigènes nous montrèrent les dents avec une colère de chien hargneux et bandèrent leurs arcs d'une façon menaçante, ce qui nous obligea à nous éloigner et d'abandonner ces gens à leur féroce exclusivisme." STANLEY reconnaissait ne pas avoir pénétré les secrets de la région et concluait: "... répugnant à nous ouvrir un chemin par la force, à traverser un pays malgré les habitants, à opposer sans y être contraints nos carabines à des lances et à des flèches, nous avons dit adieu aux contrées qui alimentent le Nil et nous nous étions tournés vers le Tanganyika (lac)".

Cette attitude hostile des Banyambo valut au Rwanda de rester inexploré jusqu'en 1894, date à laquelle une expédition militaire allemande pénétra dans le pays par la frontière sud (Burundi) pour aboutir à la découverte du lac Kivu et au protectorat allemand sur le Rwanda.



Figure n° 3
Munyambo

WEISS fut le premier à décrire les Banyambo (74); il n'a vraisemblablement pas visité les marais car il ne parle ni de pêche ni de chasse. Il s'attarde aux caractères physiques. Les Banyambo - ainsi que le montre la figure n° 3 - sont d'origine bantoue, comme les Bahutu au Rwanda et au Burundi. Leur présence dans ces lieux était antérieure à l'arrivée des Bahima ou Batutsi (76). La chevelure des femmes est caractéristique: elle consiste en de courtes mèches graissées.

Les premières allusions claires à l'existence d'un poison de flèche dans cette région sont celles de BRAUN (75) qui écrit que 4 à 5 plantes non déterminées ainsi que des insectes entrent dans la préparation d'un poison utilisé pour la chasse. Ce poison serait même utilisé contre le rhinocéros et l'hippopotame.

Le spécialiste des poisons de flèche de Tanzanie, RAYMOND (57), - auteur d'une réaction spécifique des génines de cardénolides -, reconnaît ne pas avoir analysé de poison de cette région et écrit que les indigènes de la région (district de Bukoba) sont très réticents en ce qui concerne leurs poisons: "The natives of this area are reticent regarding their poisons and the area where it is made is rather inaccessible". D'autre part, il signale que dans le district de Biharamulo (au sud de la zone habitée par les Banyambo) existe un poison complexe à base d'*Acokanthera* mais également de vésicule biliaire de crocodile, de lézards, de vipères et du venin de mamba (*Dendroaspis*) cracheur! Le poison serait très violent et utilisé pour tous les types de gibier. Nous ne pensons pas personnellement que les Banyambo utiliseraient le mamba cracheur dans la réalisation de leurs poisons car nous avons pu constater que cet animal était un des rares parvenant à effrayer ces intrépides chasseurs. D'après eux, ce serpent punirait infailliblement durant la nuit la personne qui aurait tenté de l'attaquer de jour.

HAEZAERT (58) décrit pour la première fois un poison de chasse utilisé par les Banyambo et les Banyarwanda du nord du Parc (territoire annexe où les autochtones - assez peu nombreux il est vrai - sont toujours autorisés à habiter). Ce poison est à base de *Carissa oppositifolia* (L.) PICHON, de *Fagara chalybea* et de différentes cucurbitacées, euphorbiacées... Des échantillons d'herbier n'ont malheureusement pas été déposés.

Jusqu'en 1958, des villages de Banyambo installés au bord des lacs dans le sud du Parc National (réserve naturelle intégrale) furent tolérés car leurs seules cultures consistaient en de petites bananeraies (pour la préparation de la bière de banane). Ils se nourrissaient de rhizomes de nénuphars et de poissons qui abondent dans les marais et les lacs, ainsi que de gibier. Ils vivaient et vivent encore dans une région extrêmement malsaine où sévissent le paludisme et la maladie du sommeil. Ils vivaient heureux dans un isolement assez poussé (7 mois par an inaccessibles dans leurs marais) à l'écart de toute présence européenne (mission). Une enquête médicale réalisée en 1955 releva un pourcentage de malaria chronique très élevé et une mortalité infantile atteignant 74 %. Cet argument humanitaire ajouté au fait que les Banyambo - pourtant réduits à une centaine de familles - chassaient en tout temps et par tous les moyens antilopes, buffles, lions, hippopotames et crocodiles, incitèrent les autorités belges à expulser cette population. A partir de ce moment, les Banyambo se retrouvaient parmi les braconniers contre lesquels les autorités ne sont pas équipées (77). Les gardes ne disposent pas de véhicule ni d'embarcation pour effectuer la surveillance des lacs ou marais (la zone lacustre occupe le 1/4 de la superficie du Parc). D'autre part, qui mieux que l'indigène ne connaît à fond une région dans laquelle il est né, a vécu et chassé?

Toutes ces considérations permettent d'expliquer comment le patrimoine de cette tribu fut préservé jusqu'à notre époque, ce qui nous permit de découvrir l'existence d'un poison de chasse préparé à partir de *Strychnos usambarensis*.

Préparation du poison de flèche

Le tableau 1 renseigne les plantes utilisées lors de la préparation du poison. Des échantillons d'herbier ont été déposés par nous à l'herbarium de l'I.N.R.S. à Butare (Rwanda), au Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles et au laboratoire de Pharmacognosie de Liège.

TABLEAU 1 - Plantes entrant dans la préparation du poison

Nom kinyar-wandaïs	Nom latin	n° d'herbier	Famille	Partie utilisée	Observations
Umuhoiko	<i>Strychnos usambarensis</i> GILG	22	Loganiaceae	Racines Feuilles	Les écorces de racines exercent une activité curarisante typique
Uruseénda	<i>Capsicum frutescens</i> L.	34	Solanaaceae	Fruits	-Appelé "pili-pili" ou poivrier de Cayenne
Umushikiri	<i>Euclea schimperi</i> (DC) DANDY	32	Ebenaceae	Racines	-Les racines de cet arbre de savane ont un effet purgatif (18). -Au Rwanda, les feuilles sont utilisées contre les vers. -Contient des naph-toquinones et tri-terpénoïdes (78,79).
Umuryâanyoni	<i>Ipomoea wightii</i> (WALL.) CHOISY var. <i>wightii</i>	35	Convolvulaceae	Tubercules	Contient vraisemblablement des gluco-résines drastiques (espèce non étudiée).
Igakâkarubamba	<i>Aloe laterita</i> ENGLER	33	Liliaceae	Feuilles	Plante à suc.
Umukoni	<i>Synadenium grantii</i> HOOK.	31	Euphorbiaceae	Tiges	Contient un latex blanc très irritant (18) provoquant des vomissements et des diarrhées.
Umuyeenzi	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	30	Euphorbiaceae	Tiges feuillées	-Plante à port de cactus suite à l'avortement des feuilles. -Contient un latex très irritant (18)
Ngabo	<i>Opuntia ficusindica</i> MILL.		Cactaceae	"Feuilles"	-Espèce introduite connue sous le nom de "Figuier de Barbarie" -Contient également un suc.

N.B. Le fruit de *Capsicum frutescens*, même à l'état sec, est irritant et provoque de la rubéfaction (18). Il est également utilisé dans la préparation du curare amazonien. Il provoque une vasodilatation locale qui favoriserait la diffusion du poison (90). Il influencerait de plus favorablement le pH de la solution pour une meilleure extraction des principes actifs (pH acide).

Le poison dont nous avons pu observer la préparation est à base de *Strychnos* mélangé à d'autres plantes principalement à latex et à suc, afin:

- 1° de donner une consistance gommeuse qui permettra l'adhérence du poison aux pointes de flèches;
- 2° de faciliter la diffusion du poison dans le sang;
- 3° d'augmenter la toxicité du poison.

Les plantes reprises dans le tableau sont introduites dans une marmite et recouvertes d'eau. Le tout est porté à l'ébullition. C'est l'opération d'extraction par l'eau bouillante. La mousse est modérée à l'aide d'un balai d'herbes tressées afin que l'eau ne déborde pas. Il n'y a donc pas d'écumage. Lorsque le niveau de l'eau a baissé et que l'épuisement des différents échantillons est jugé suffisant, la filtration a lieu et est suivie de la concentration par ébullition vive. Le filtrat est ainsi évaporé à siccité sous agitation constante et l'on obtient un magma noirâtre et pâteux qui constitue le poison. (Les opérations d'extraction et de concentration s'effectuent donc dans un même récipient). Ce poison est conservé soit dans une corne vide, soit dans unealebasse, plus souvent il est emballé dans de l'écorce de tronc de bananier (figure n° 4).



Figure n° 4
Poison emballé

Au moment de la chasse, le poison est malaxé avec un peu de graisse et appliqué sur les pointes de flèches préalablement échauffées. La figure n° 5 montre le poison enduit sur une douzaine de centimètres entre les crampons et la hampe en bois de la flèche (longueur moyenne des flèches: 75 cm).

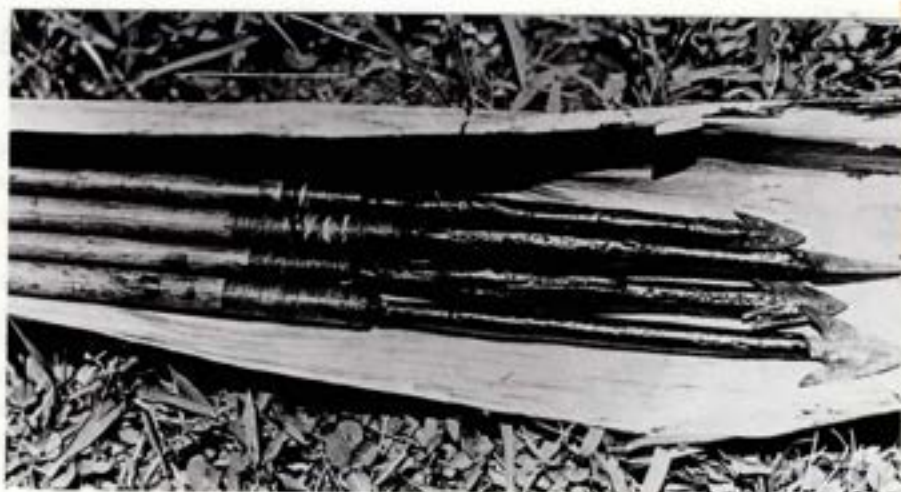


Figure n° 5.

Partie empoisonnée des flèches

Il faut indiquer que les préparateurs ajoutent parfois des feuilles et des racines d'Acokanthera schimperi (A.DC) BENTH. -nom vernaculaire: UMUSHEGWE -. Cette plante contient des hétérosides cardiotoniques: ouabaïne et autres strophantosides. L'utilisation de cette plante est bien connue dans toute l'Afrique orientale (18). Lorsque l'Acokanthera schimperi est ajouté au poison contenant le Strychnos usambarensis, il y a addition des activités cardiotonique et curarisante. SANDBERG a noté l'existence en République Centre-Africaine d'un poison de flèche à base d'un cardiotonique (graines de Strophanthus gratus) et d'un Strychnos à propriétés tétanisantes: le Strychnos icaja BAILLON (racines)(16).

Aucune autre observation concernant l'utilisation par les Africains du S. usambarensis ne se trouve dans la littérature, si ce n'est une information toxicologique relatant le cas de deux enfants empoisonnés en Zambie (ex-Rhodesie du Nord) après avoir mangé des fruits du S. distichophylla GILG (considéré synonyme du S. usambarensis GILG (35), les symptômes étant vomissements, extrême faiblesse, incapacité d'avaler et coma.

*
* *

Chapitre III

PROPRIETES CURARISANTES DU STRYCHNOS USAMBARENSIS ET DU POISON BANYAMBO

Obtention des fractions alcaloïdiques

Afin de fractionner les alcaloïdes en tertiaires et quaternaires, nous avons suivi le procédé utilisé par DELLE MONACHE et MARINI-BETTOLO dans leurs recherches sur les *Strychnos* américains (80). La poudre d'écorce de racines est épuisée par l'acide acétique à 2 % jusqu'à épuisement des alcaloïdes. La solution acétique, amenée à pH 8 par l'ammoniaque concentré est traitée par du chlorure de méthylène qui extrait les alcaloïdes tertiaires: fraction alcaloïdique T (rendement: 1,35 %). La solution alcaline est réacidifiée à pH 2 par HCl concentré et les alcaloïdes quaternaires sont précipités par une solution saturée d'acide picrique. Les picrates d'alcaloïdes sont transformés par passage sur résine échangeuse d'ions (Amberlite IRA 400, activée par HCl 2N) en chlorures d'alcaloïdes quaternaires: fraction alcaloïdique Q (rendement: 1,1 %). Cette dernière fraction, soumise à des chromatographies dans les solvants C et D de KARRER et SCHMID, laisse apparaître une dizaine d'alcaloïdes révélables par le réactif de DRAGENDORFF, le réactif au sulfate cérique (40) et le réactif à l'aldéhyde cinnamique/HCl gazeux (81).

Expérimentation pharmacologique

La fraction alcaloïdique quaternaire (fraction Q) injectée à la dose de 50 µg dans le sac lymphatique ventral de grenouilles d'un poids moyen de 30 g détermine l'apparition d'une paralysie très accentuée: le corps devient flasque, mou et ne réagit plus aux excitations.

Afin de vérifier que ce mélange d'alcaloïdes quaternaires possède bien la propriété d'inhiber la transmission neuro-musculaire, des expériences furent réalisées sur la Grenouille et sur le Rat, tant *in vivo* qu'*in vitro** (82).

1° L'expérience maintenant classique de Claude BERNARD a été choisie afin de démontrer que l'activité des alcaloïdes quaternaires est localisée spécifiquement à la jonction neuro-musculaire.

Après avoir isolé le sciatique d'un gastrocnémien de *Rana temporaria* et ligaturé le membre en dessous de ce nerf, il a été constaté que le membre ainsi ligaturé restait excitable, tant par voie directe qu'indirecte, après injection de 50 µg de fraction Q dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille. Par contre, l'excitation mécanique des pattes qui ont subi l'action des alcaloïdes n'est pas suivie de réflexe de rétraction de ces pattes bien que les muscles de celles-ci continuent à répondre à une excitation directe.

2° On sait que l'acétylcholine joue le rôle de transmetteur entre la fibre nerveuse motrice et le muscle strié qui présente à ce niveau une formation particulière: la plaque motrice. L'acétylcholine libérée par l'influx nerveux dépolarise la plaque motrice, cette dépolarisation induisant l'onde contractile de la fibre musculaire.

Les alcaloïdes quaternaires du *Strychnos usambarensis* suppriment toute

* Les essais physiologiques (1° à 4°) ont été réalisés dans le laboratoire de Physiologie de l'Université de Liège (Pr M. GOFFART).

réponse à l'acétylcholine auprès d'un organe isolé: dans notre cas, l'abdomen grand droit de grenouille.

Le muscle grand droit de l'abdomen de grenouille - rectus abdominis de *Rana temporaria* - isolé dans un bain de liquide de RINGER oxygéné, subit un raccourcissement isotonique soutenu, si on réalise dans ce bain une concentration d'acétylcholine de $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml. L'acétylcholine excite les nombreuses plaques motrices situées à la surface de ces fibres musculaires striées lentes. Les réponses successives sont d'amplitude constante. Les alcaloïdes du *Strychnos usambarensis* à la concentration de $8 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ suppriment toute réponse à l'acétylcholine. La fibre musculaire reste cependant fonctionnelle puisqu'elle est encore susceptible de se contracter si on la dépolarise par le KCl. Le bloc de la réponse à l'acétylcholine est réversible quand on soumet la préparation à des lavages répétés.

Nous sommes donc en présence de substances entrant en compétition avec l'acétylcholine pour les récepteurs situés sur les plaques motrices. Ces substances empêchent l'acétylcholine de faire la modification des potentiels.

3° Les grosses molécules de curarisants empêchent l'arrivée d'acétylcholine et le passage des ions. Pour les enlever, il faut un gros excès d'acétylcholine que l'on peut obtenir en bloquant les cholinestérases par l'ésérine; alors l'excès d'acétylcholine joue par la loi d'action des masses et le transmetteur récupère ses récepteurs au niveau de la membrane (expérience réalisée sur une préparation isolée: nerf phrénique-diaphragme de Rat).

Des préparations isolées nerf phrénique-diaphragme de Rat ont été réalisées suivant la technique de BULBRING (83). Une concentration de $1-3 \cdot 10^{-5}$ de la fraction Q abolit rapidement la réponse à la stimulation indirecte, alors que le muscle conserve ses propriétés contractiles s'il est stimulé directement.

Cet effet est totalement et complètement réversible par lavage de la préparation.

Au cours du développement progressif du bloc neuro-musculaire, l'ésérine $5 \cdot 10^{-6}$ augmente la réponse mécanique à l'excitation nerveuse et diminue donc le bloc de transmission au niveau de la plaque motrice.

4° La curarisation peut être également levée en provoquant un tétanos. Dans ce cas, le nerf est excité et il y a production d'un excès d'acétylcholine. C'est ce que nous avons réalisé in vivo sur des rats.

Nous avons enregistré la contraction isométrique maximale des muscles gastrocnémien et tibial antérieur de rats anesthésiés au nembutal. Ces muscles étaient stimulés par le nerf sciatique toutes les 10 secondes. L'injection I.V. de $170 \mu\text{g}$ de fraction Q/100 g d'animal produit très rapidement l'abolition de la réponse à la stimulation indirecte. Les mouvements thoraciques cessent et la respiration artificielle doit être installée. Ces effets sont spontanément et totalement réversibles. L'administration subséquente de plus petites doses du produit ($50 \mu\text{g}$ /100 g I.V.) provoque les mêmes effets.

Au cours de l'établissement d'un bloc incomplet de la transmission neuro-musculaire, l'interpolation d'un tétanos d'une durée de 10 secondes à la fréquence de 120/seconde diminue le bloc de façon spectaculaire.

L'injection I.V. de $300 \mu\text{g}$ d'ésérine/100 g d'animal provoque aussi une suppression progressive, rapide et totale du bloc.

CONCLUSIONS

Les diverses expériences réalisées permettent de préciser que les alcaloïdes quaternaires des écorces de racines du *Strychnos usambarensis* possèdent une action curarisante du type de la d-tubocurarine [*Chondrodendron* sp.

(Ménispermacées)] ou de la C-curarine [*Strychnos* sp. (Loganiacées)]; en effet, le mécanisme du bloc de la transmission neuromusculaire ne ressemble pas à celui de curarisants par dépolarisation comme le décaméthonium.

ANALYSE DES POISONS

Les poisons que nous avons pu nous procurer auprès des Banyambo ont été analysés de la même façon que les écorces de racines du *Strychnos usambarensis*. Nous y avons retrouvé les mêmes alcaloïdes tertiaires et quaternaires (noyau indole).

-Révélation des chromatogrammes par le réactif de DRAGENDORFF ainsi que par le réactif à l'aldéhyde cinnamique/HCl gazeux.

Les fractions alcaloïdiques quaternaires injectées dans le sac lymphatique ventral de grenouilles provoquent une paralysie suivie de mort.

En 1951, l'attention du Professeur DENOËL avait été attirée par l'activité pharmacologique de fractions alcaloïdiques brutes du *Strychnos angolensis* GILG récolté au Zaïre en 1948. Ces fractions révélaient une activité curarisante à une dose cependant plus élevée que la tubocurarine (84). C'était une découverte importante puisqu'on pensait que seuls les *Strychnos* sud-américains étaient curarisants. Le Professeur MARINI-BETTOLO reprit des expériences sur un autre lot de *Strychnos angolensis* mais ne parvint pas à retrouver la même action (85). SANDBERG entreprit en 1968 un screening phytochimique et pharmacologique de différents organes de 23 espèces de *Strychnos* provenant de 5 pays africains (Cameroun, République Centre-Africaine, Congo-Brazzaville, Zambie et Afrique du Sud). Lui aussi enregistrait des résultats variables suivant l'origine mais confirmait une action myorelaxante pour cette espèce (86).

Le *Strychnos usambarensis* est donc une espèce curarisante, comme le *Strychnos angolensis*; par ce fait, nous sommes en présence d'un *Strychnos* dont les alcaloïdes quaternaires exercent une activité curarisante mise à profit par les indigènes lors de la confection de leurs poisons de flèches. Ce qui constitue un fait entièrement nouveau. En effet, en 1957, lors du Symposium International sur le Curare tenu à Rio de Janeiro, le Professeur MARINI-BETTOLO déclarait que l'utilisation de *Strychnos* curarisants par les indigènes d'Afrique équatoriale n'avait jusqu'alors jamais été signalée (85, p. 144). Plus récemment, en 1968, BISSET et LEEUWENBERG ont dépouillé la littérature scientifique et ethnologique à la recherche des renseignements concernant l'utilisation des *Strychnos* dans les poisons d'ordalie et de flèches en Afrique noire. Ils n'y découvrirent aucune preuve de l'existence d'un poison de flèche curarisant (53).

Chapitre IV

LE CURARE

Rappelons brièvement nos connaissances sur les curares sud-américains, telles qu'elles découlent des ouvrages récents (88 à 91).

Le terme "curare" est la transposition française d'un mot caraïbe (ourari) qui désignerait encore actuellement des lianes du genre *Strychnos*. Il est apparu pour la première fois en 1596 dans le livre de Walter RALEIGH: "Découverte du vaste, grand et merveilleux empire des Guyanes". La préparation du curare fut entourée de légendes jusqu'en 1800, date à laquelle HUMBOLDT en donna une description précise, telle qu'elle se pratiquait près de l'Orénoque. Il s'agissait en fait d'une opération de la plus grande simplicité, à laquelle de nombreux ethnologues ont pu assister depuis (lire notamment les descriptions de VELLARD).

Le curare n'est pas une drogue définie. Chaque tribu prépare le poison d'après la tradition locale et avec les plantes les plus abondantes dans la région. Le poison est ensuite conservé dans les récipients dont les indigènes disposent; ce qui avait permis à BOEHM de classer les curares en tubocurare (tubes de bambou), curares enalebasse et curares en pot. Cette classification ne peut être maintenue à l'heure actuelle car les indiens ont remplacé les emballages anciens par de vieilles boîtes de conserves ou tout autre récipient à leur disposition.

La dualité botanique des curares préparés soit à partir de *Strychnos* (Loganiacées) soit à partir de *Chondrodendron* (Ménispermacées) a permis à VELLARD de proposer une classification géographique des curares (figure n° 6).

La zone orientale est à base de *Strychnos* (*S. toxifera* SCHOMB. ex BTH. et *S. guianensis* (AUBL.) MART. surtout): de cette région provenait le curare enalebasse.

La zone occidentale est à base de *Chondrodendron*: de cette région provenait le curare en tube.

La zone intermédiaire est à base d'un mélange de *Strychnos* (*S. castelnaeana* WEDD.) et de *Chondrodendron*: de cette région provenait le curare en pot.

Si les trois premières zones étaient forestières, la zone méridionale par contre est à base de *Strychnos* de savane: ce curare n'est pas repris dans la classification de BOEHM.



POISSONS DE GUERRE ET CURARES
EN AMÉRIQUE DU SUD

I. POISSONS DE GUERRE

1. Guafiro; 2. Indiens du Chaco; 3. Poisson du Rio Juruá;
4. Poisson des Chiquitos; 5. Anciens Araucans; 6. Anciens Moco-
via; 7. Indiens Chiriguano; 8. Anciens Tupacatus; 9. Anciens
Bororo; 10. Indiens rencontrés par Orellana.
En pointillé, poisons de guerre des anciens Caribbes.

II. ZONES DE CURARES

A. Zone orientale : curares de Strychnos.
B. Zone intermédiaire : curares de Strychnos et Chondrodendron.
C. Zone occidentale : curares de Chondrodendron.
D. Zone subéquatoriale : curares de Strychnos de suram.

En réalité les curares préparés à partir de Strychnos seul sont très rares, d'autres plantes - principalement à latex et à suc - participent à la composition d'un poison complexe afin

1° de donner une consistance gom-
meuse qui permettra l'adhérence du
poison aux pointes de flèches ou
fléchettes (rôle des Euphorbiacées,
Guttiféracées, Asclépiadacées, Mo-
racées)

2° de faciliter la diffusion du
poison dans le sang, suite à une
vasodilatation (rôle des Pipé-
racées et du Capsicum)

3° d'augmenter la toxicité du poi-
son soit par un caractère toxique
propre (notamment les Euphorbia-
cées), soit par des réactions chi-
miques qui se passeraient lors de
l'élaboration du poison (particu-
lièrement pour les curares à base
de Ménispermacées).

Figure n° 6 tirée de (90)

Des curares très complexes contiennent également des poisons d'origine animale (détruits partiellement lors de la concentration?): fourmis, arai-
gnées, chenilles, crapauds, serpents et poissons venéneux.

Le curare présente sur les armes à feu un sérieux avantage. C'est le "poi-
son qui tue tout bas". Le gibier curarisé est paralysé très rapidement, il
tombe de l'arbre où il a été atteint et est récupéré aisément par le chas-
seur. Les Indiens d'Amérique du Sud chassent de deux façons qui sont des
exemples de similitude de l'intelligence humaine.

a) la sarbacane est l'arme réservée à la grande forêt où le chasseur pro-
fite du couvert des arbres pour approcher le gibier. Les fléchettes sont si
légères que le moindre souffle fait dévier leur trajectoire mais heureusement
l'air est immobile dans la forêt amazonienne. Il est intéressant de remarquer
que son usage est également à l'honneur dans les forêts de Malaisie!

b) le second procédé est la chasse à l'arc. C'est la comparaison entre

les Nambikwara (habitant la savane du Matto Grosso) et les Banyambo (habitant la savane arbustive de l'Est africain). Ces deux tribus utilisent les *Strychnos* de savanes (arbres ou arbustes et non lianes) pour la réalisation d'un curare qu'ils enduisent ensuite sur de grandes flèches (figure n° 7).

On ne peut expliquer ces faits dans des régions sans communication apparente: c'est l'éternel problème de l'évolution humaine.



Figure n° 7

Chasseur Mnyambo

Quant aux recherches chimiques et physiologiques sur les curares, plus particulièrement à partir du *Strychnos*, il serait trop long de les énumérer; nombre de chercheurs y consacrèrent une grande partie de leurs activités. En 1829, ROULIN et BOUSSINGAULT notaient la présence d'alcaloïdes solubles dans l'eau et non extractibles par les solvants organiques. Les expériences de BERNARD et de BOEHM montrèrent l'intérêt de ces poisons mais il fallut attendre WIELAND et ensuite KARRER et SCHMID pour isoler et identifier la plupart des alcaloïdes contenus dans les curares. Cependant les structures de la majorité de ces alcaloïdes ne sont pas encore connues. En 1949, KING isolait la C-curarine à partir de *Strychnos toxifera*, ce qui détruisait l'hypothèse selon laquelle

les alcaloïdes curarisants étaient formés lors de la préparation par les indiens.

Le curare a jusqu'à présent trouvé des applications:

- en chirurgie, comme adjuvant en anesthésie (opérations sur le poulmon, à coeur ouvert et des yeux)
- en gynécologie, dans les accouchements difficiles
- lors des endoscopies (pharynx, larynx, rectum, vessie)
- dans des cas de paraplégie spasmodique, de scléroses combinées, pour les malades atteints du mal de Parkinson et/ou de danse de St Guy congénitale
- dans des cas de tétanos et d'intoxication à la strychnine...

Chapitre V

LA BOTANIQUE DU STRYCHNOS USAMBARENSIS

En 1737, LINNE a instauré le genre *Strychnos* d'après les planches de trois espèces de Caniram, décrites dans "Hortus Indicus Malabaricus" de l'administrateur colonial hollandais Van Rhee de tot Draakestein (105).

Le genre *Strychnos* contient 150 à 200 espèces toutes tropicales qui sont classées suivant la localisation géographique en trois zones:

1. les espèces asiatiques et océaniques (environ 50)
2. les espèces africaines (au nombre de 75)
3. les espèces sud-américaines (environ 70).

Cette classification est basée sur le fait que chaque espèce n'est localisée que sur une des trois aires précitées (à l'exception du *Strychnos potatorum* L. f. que l'on retrouve en Asie et en Afrique).

C'est à LEEUWENBERG que l'on doit la plus récente révision taxonomique du genre *Strychnos* en Afrique (35). A la suite de ces travaux, les espèces africaines ont été ramenées au nombre de 75.

Le *Strychnos usambarensis*

Synonymes: *S. micans* S. MOORE; *S. fernandiae* DUVIGN. ex DENOËL; *S. cooperi* HUTCH. et M.B. MOSS; *S. stenura* DUVIGN. ex DENOËL; *S. cerasifera* GILG (?); *S. distichophylla* GILG (?)

Le *Strychnos usambarensis* GILG a été décrit pour la première fois en 1894, à partir d'un échantillon récolté par HOLST dans les Monts Usambara, d'où le nom de l'espèce. Les Monts Usambara sont situés dans le Nord-Est de la Tanzanie (anciennement Territoire du Tanganyika), à peu de distance du Kenya. Bien que le nom pourrait faire penser que cette espèce est localisée dans une région bien déterminée d'Afrique, il n'en est rien. Le *Strychnos usambarensis* est en effet un des trois *Strychnos* les plus répandus (avec le *Strychnos innocua* DEL. et le *Strychnos spinosa* LAM.

Description:

En Afrique Occidentale, le *Strychnos usambarensis* se présente sous forme d'une liane énorme pouvant atteindre 70 m de long. A l'Est et dans le Nord de l'Afrique Australe, il peut aussi se présenter sous cette forme, mais plus souvent, il s'agit d'arbres de 5 à 15 m de haut, à l'écorce du tronc grise, lisse et de section orange; aux branches dépourvues de cirrhes (à la différence des lianes de la même espèce); aux feuilles glabres, mucronées au sommet et arrondies à la base, présentant la nervation caractéristique des

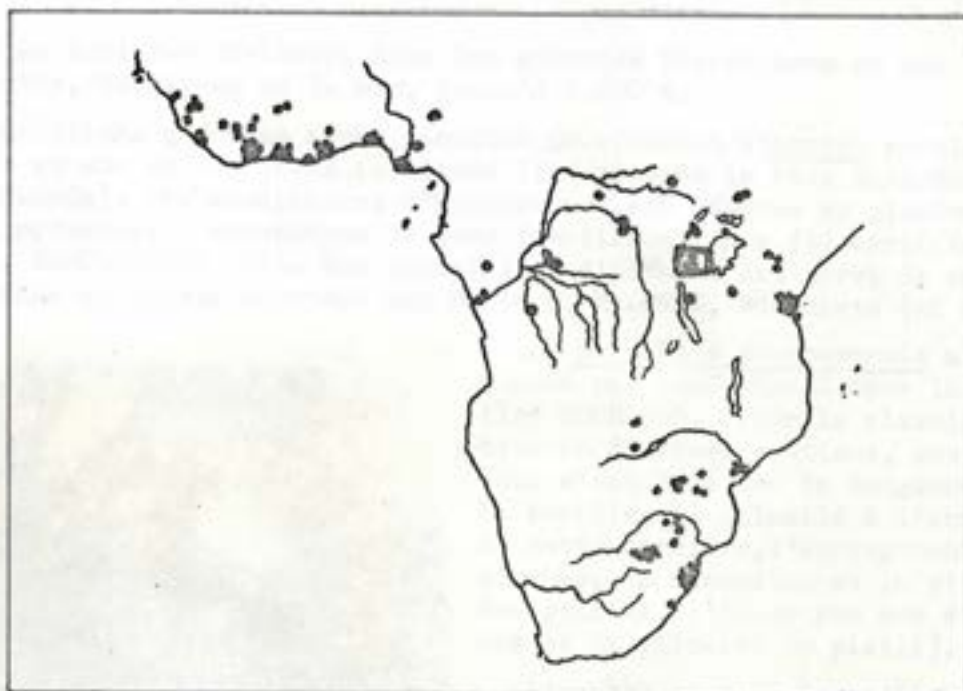


Figure n° 8

Distribution géographique du *Strychnos usambarensis*
d'après (35)

Strychnées (dimensions des feuilles: 3-8 cm x 1,5-3,5 cm); aux inflorescences axillaires beaucoup plus courtes que les feuilles; aux fleurs tétra et pentamères; aux sépales vert-pâle très courts et connés à la base; à la corolle blanche quatre fois plus longue que le calice; au pistil glabre. Le fruit est une baie de la grosseur d'une prune; non mûr, il est vert pâle et recouvert d'un duvet glauque, tandis qu'à maturité, il est orangé et ne contient qu'une graine sise dans une pulpe orange.



Figure n° 9

Rameau en fruits

Habitat:

Surtout au bord des rivières, dans les galeries forestières et des forêts toujours vertes, du niveau de la mer, jusqu'à 2.000 m.

Les échantillons que nous avons récoltés proviennent d'arbres peuplant une forêt située au sud du lac Ihéma (altitude 1150 m) dans le Parc National de l'Akagera (Rwanda). Des exemplaires d'herbier ont été déposés en plusieurs herbariums, notamment à Wageningen où leur identification a été vérifiée par le Dr A.J.M. LEEUWENBERG (92). Nos exemplaires d'herbier ont servi de modèle pour la planche ci-jointe dessinée par Melle R. MELOTTE, botaniste. (cf p. 34).



Figure n° 11

Forêt à *S. usambarensis*

Le *Strychnos usambarensis* a été classé par LEEUWENBERG dans la section ROUHAMON. (Pour la classification en diverses sections, cet auteur s'est basé sur la longueur de la corolle, la pilosité à l'intérieur de cette dernière, l'arrangement des cirrhes, la dimension et la pilosité des graines, l'insertion des étamines et la pilosité du pistil).

L'espèce type de la section ROUHAMON est le *Strychnos guianensis*, espèce sud-américaine des plus usitées pour la préparation des curares.

Dans la même section se trouvent les espèces sud-américaines suivantes: *S. glabra* SACOT ex PROG., *S. subcordata* SPR. ex BTH, *S. bicolor* PROG., *S. panamensis* SPR. et SANDW., *S. duckei* KR. et MONACH., *S. hirsuta* SPR. ex BTH., *S. cogens* BTH, *S. melinoniana* BAILL. et africaines: *S. potatorum* L.f., *S. decussata* (PAPPE) GILG, *S. floribunda* GILG, *S. dale* DE WILD, *S. retinervis* LEEUWENBERG, *S. elaeocarpa* GILG ex LEEUWENBERG, *S. ndengensis* PELLEGR., *S. gnetifolia* GILG ex ONOCHIE et HEPPER, *S. boonei* DE WILD et *S. variabilis* DE WILD.

Anatomie et micrographie des racines

LEEUWENBERG signale que toutes les espèces excepté les *Spinosaes* et le *Strychnos henningsii* GILG, contiennent des flots libériens dans le bois.

Les poudres d'écorces de racines des *Strychnos* récoltés au Rwanda ont été observées au microscope dans le réactif de GAZET du CHAPELIER (106).

Les résultats sont repris dans le tableau II.

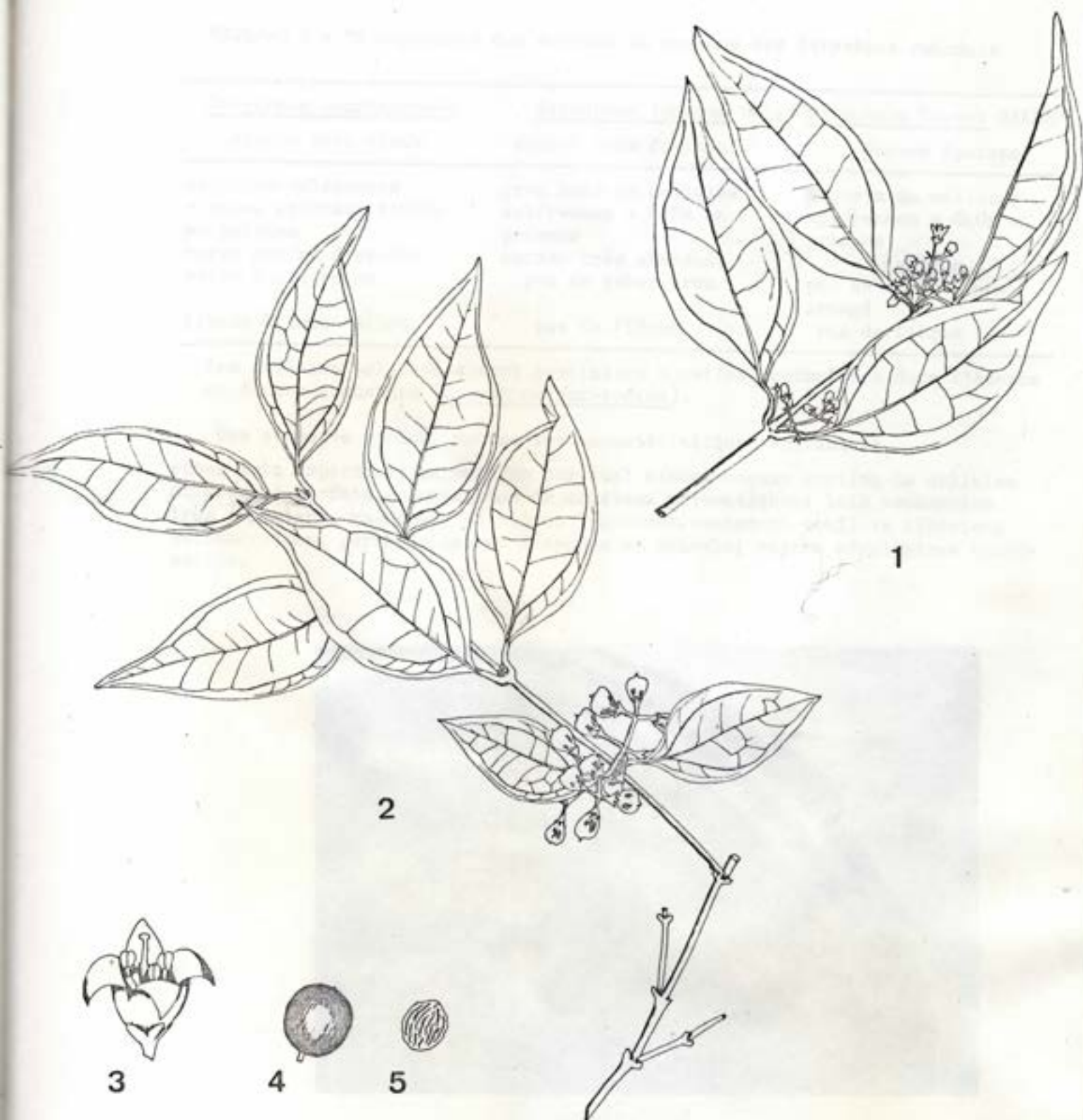


Figure n° 10

STRYCHNOS USAMBARENSIS

1. Rameau florifère x 1
3. Fleur tétramère x 10

2. Rameau portant de jeunes fruits x 1
4. Fruit mûr x 1 5. Graine x 1

TABLEAU 2 - Micrographie des écorces de racines des *Strychnos* rwandais

<i>Strychnos usambarensis</i>	<i>Strychnos innocua</i> DEL.	<i>Strychnos lucens</i> BAKER
écorce très mince	écorce très épaisse	écorce épaisse
cellules scléreuses + rares cristaux d'OxCa en prismes rares grains d'amidon suber épais rouge	gros amas de cellules scléreuses + CaOx en prismes amidon très abondant peu de suber brun	paquets de cellules scléreuses + CaOx en prismes amidon peu de suber brun- orangé pas de fibres
fibres à lumen mince	pas de fibres	

Les cellules scléreuses sont semblables à celles rencontrées dans l'écorce de fausse angusture (*Strychnos nux-vomica*).

Une coupe de racine* montre les caractéristiques suivantes:

suber très important; parenchyme cortical mince; anneau continu de cellules scléreuses parfois accompagnées de cristaux prismatiques; bois secondaire très important, vaisseaux et fibres ligneuses, contenant des filots libériens surnuméraires, pérимédullaires disposés en spirale; rayons médullaires pluri-sériés.



Figure n° 12

Coupe dans la racine de *S. usambarensis* (16 x)

S = suber; A.C.S. = anneau continu de cellules scléreuses

B = bois (très important); L = filot libérien

* Coupe réalisée par Mr L. SAILLARD, technicien, Service du Pr J. RAMAUT.

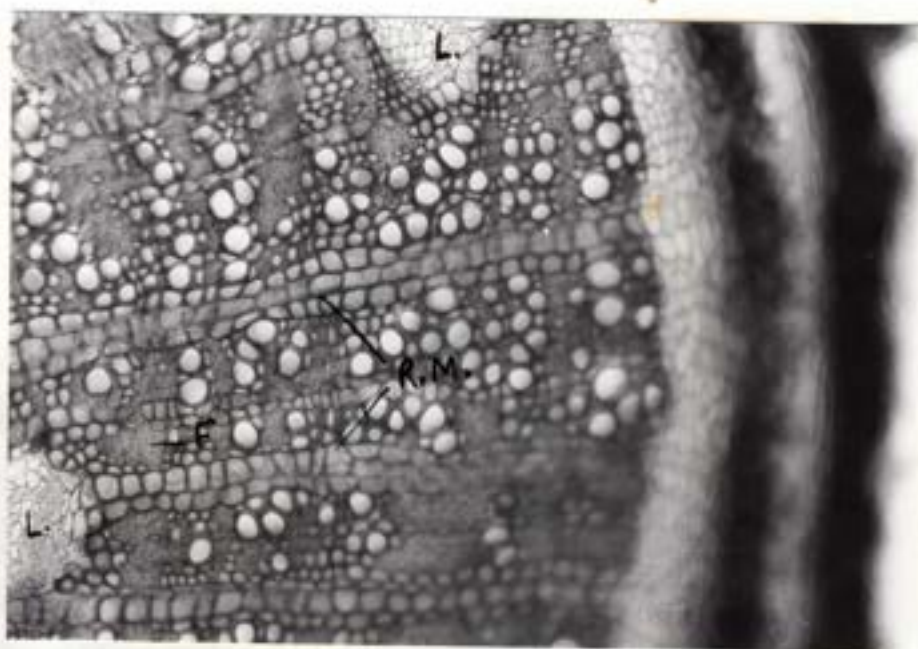


Figure n° 13

Détail de la coupe précédente (45 x)

R.M. = rayons médullaires; F = fibres ligneuses
L = flots libériens disséminés dans le bois



Figure n° 14

Ecorce de racine (90 x)

S = suber (important); C.S. = cellules scléreuses communes
aux Strychnos; CR = cristal prismatique (CaOx?)

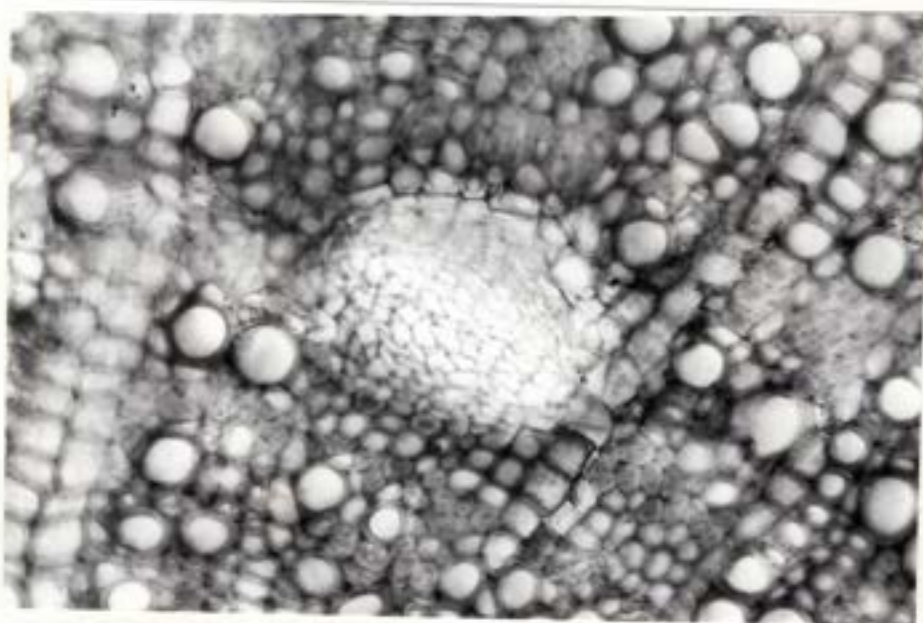


Figure n° 15

Ilot libérien inclus dans le bois (90 x)
caractéristique de la plupart des *Strychnos* et des *Loganioidae*

*
* *

Troisième partie

LES ALCALOÏDES DU STRYCHNOS USAMBARENSIS DU RWANDA

"Le curare, à l'égal de beaucoup d'autres poisons énergiques, entrera certainement dans le domaine de la médecine mais il serait nécessaire pour cela d'en connaître exactement la composition..."

(Claude BERNARD)

Chapitre I

RESUME DES RECHERCHES CONSACREES AUX STRYCHNOS

Depuis plus de deux siècles, des recherches chimiques et pharmacologiques ont été consacrées à des représentants du genre *Strychnos*. Aussi n'entre-t-il pas dans nos intentions de reprendre dans le détail le déroulement de toutes ces recherches. Les travaux furent laborieux et les *Strychnos* ne livrèrent que peu à peu leurs secrets.

En effet, quoique PELLETIER et CAVENTOU isolèrent dès 1818 la strychnine et la brucine à partir de la noix vomique, les structures de ces alcaloïdes ne furent cependant élucidées qu'en 1954, à la suite des brillants travaux de WOODWARD. Quant aux espèces sud-américaines, (constituants de certains curares), il fallut attendre 1937 pour que WIELAND isolât les premiers alcaloïdes à l'état pur. Quelques années plus tard, KARRER et SCHMID en isolèrent davantage au terme de travaux de longue haleine et grâce à l'amélioration des techniques chromatographiques. Cependant, seules les structures de certains de ces alcaloïdes sont jusqu'à présent connues.

La classification géographique des *Strychnos* en trois zones paraissait d'autant plus justifiée que des différences chimiques et physiologiques marquées existaient entre les premiers alcaloïdes isolés tantôt des *Strychnos* asiatiques, tantôt des *Strychnos* sud-américains. C'est ainsi que des bases quaternaires curarisantes (monomères ou dimères symétriques) étaient extraites des espèces américaines tandis que des bases tertiaires tétanisantes (strychnine et dérivés) étaient isolées à partir des espèces asiatiques.

Les *Strychnos* africains étaient dans la littérature assimilés assez curieusement aux *S. asiatiques*, vraisemblablement parce que les premiers alcaloïdes des *Strychnos* africains étaient tous tertiaires et apparentés à la strychnine. Cependant, une activité curarisante avait été mise en évidence dès 1951 dans le *Strychnos angolensis* GILG (84)!

Les recherches récentes ont démontré que les *Strychnos* présentent une grande diversité chimique, qui ne tient nullement compte des limites géographiques. Il convient donc de nuancer fortement la classification antérieure, malgré tout reprise par des auteurs contemporains (95).

C'est ainsi que la strychnine, préalablement isolée des seuls *Strychnos* asiatiques, a également été isolée à partir des racines du *S. icaia* (Afrique) et à partir des graines du *S. panamensis* (Amérique)(98).

La diaboline a été extraite de *Strychnos* de tous les continents: *S. diabolii* SANDW. (Amérique) ainsi qu'autres espèces; *S. henningsii* (Afrique); *S. ignatii* (Asie); *S. ledermanni* GILG et BENED (Océanie).

Les alcaloïdes dimères très curarisants (caractéristiques du *S. toxifera* et autres *Strychnos* d'Amérique) sont également présents dans les écorces de racines du *S. usambarensis* (voir suite de ce mémoire).

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant, les différents types d'alcaloïdes rencontrés jusqu'à présent dans les *Strychnos* (36,94).

STRYCHNOS ASIATIQUES ET OCEANIENS:

- type "strychnine": séries normales, pseudo et N-méthyl (96)
S. nux-vomica, *S. ignatii*, *S. nux-blanda* A.W. HILL, *S. wallichiana* STEUD. ex DC. (*S. gauthierana* PIERRE ex DOP; *S. cinnamomifolia* THWAITES)
S. lucida R. Br.
- type "diaboline" : *S. ignatii*, *S. potatorum* (96), *S. ledermanni* (97).
- type "C-mavacurine": *S. nux-vomica* (graines d'Indochine semées au Guatemala)
- type "spermostrychnine": *S. axillaris* COLLEB. (*S. psilosperma* F. V. MUELL.).

STRYCHNOS AMERICAINS

- type "strychnine": série normale: *S. panamensis*
- type "akuammicine": dimères (C-curarine, toxiférines..) dans de nombreuses espèces tel le *S. toxifera*
- type "diaboline": *S. diabolii*; *S. tabascan* SPR. et SANDW.; *S. castelnaeana*; *S. panamensis*...
- type "spermostrychnine": *S. brasiliensis* MART. (99); *S. tabascan* (100)
- type "ajmalicine": mélinonine A (*S. melinoniana*)
- type "yohimbine": mélinonine E (*S. melinoniana*)
- type "sarpagine": macusines (*S. toxifera*)
- type "corynanthéine": mélinonine B (*S. melinoniana*)
- type " β -carboline": mélinonine F (*S. melinoniana*)
- type C-mavacurine et C-fluorocurine: plusieurs espèces (94)
- type "indoloquinolizine": mélinonine G (*S. melinoniana*).

STRYCHNOS AFRICAINS

- type "strychnine": séries normales, pseudo et N-méthyl
S. icaia BAILL.
- type "akuammicine": dimères symétriques: *S. usambarensis* GILG

type "diaboline": S. henningsii GILG (syn.: S. holstii GILG, var. reticulata (BURTT-DAVY et HONORE) forma condensata DUVIGN.); S. camptoneura GILG et BUSSE (103)

type "spermostrychnine": S. splendens GILG

type "ajmalicine": alstonine et serpentine du S. camptoneura

type "corynanthéine": S. usambarensis (101,102)

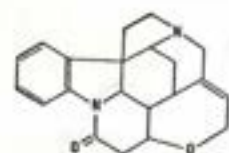
type " β -carboline": S. usambarensis

type "adifoline": S. camptoneura

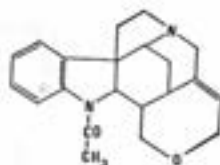
type "indoloquinolizine": 6,7-dihydro-flavopérérine du S. usambarensis (voir suite de ce mémoire)

Il existe en outre le type "adifoline" rencontré dans la structure de la camptoneurine (figure n° 19).

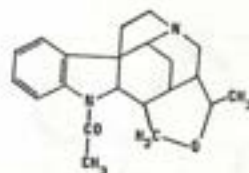
TABLEAU 3 - Types de structures alcaloïdiques



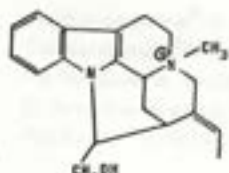
type strychnine



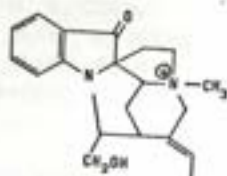
type diaboline



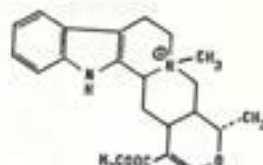
type spermostrychnine



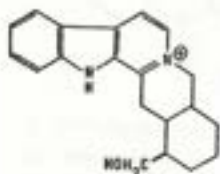
type C-mavacurine



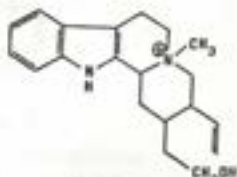
type C-fluorocurine



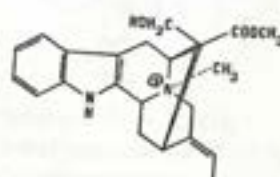
type "ajmalicine"
(mollisonine A)



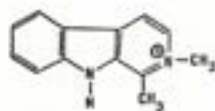
type "yohimbine"
(mollisonine E)



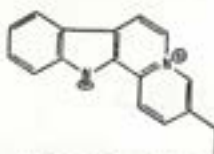
type "corynanthéine"
(mollisonine B)



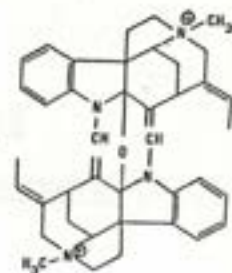
type "sarpagine"
(mollisonine A)



type " β -carboline"
(mollisonine F)



type "indoloquinolizine"
(mollisonine G)



type "akumicine (dinéne)"
(C-curarine)

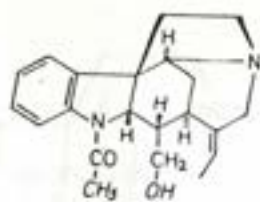
Dans une publication récente, BISSET et PHILLIPSON font état des résultats obtenus jusqu'en 1971 dans l'étude des *Strychnos* africains (36): à ce moment, seules 4 espèces de *Strychnos* avaient permis l'isolement et la détermination de structure de certains de leurs alcaloïdes:

S. icaia (figure n° 17): 13 alcaloïdes identifiés

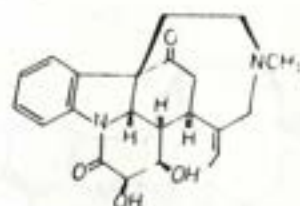
S. henningsii (figure n° 16): 14 alcaloïdes identifiés

S. splendens (figure n° 18): 7 alcaloïdes identifiés

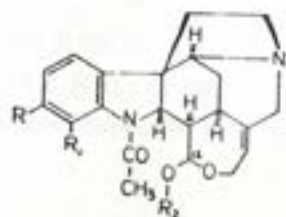
S. camptoneura (figure n° 19): 2 alcaloïdes identifiés (alstonine et serpentine).



Retuline



Holstiine



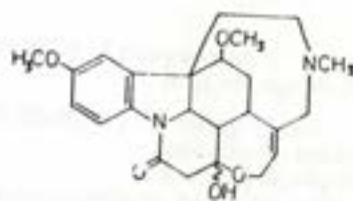
Henningsamine^a R=R₁=H, R₂=COCH₃

Condensamine^a R=OCH₃, R₁=H, R₂=COCH₃

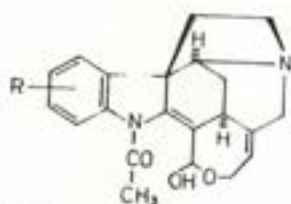
Henningsoline R=OCH₃, R₁=OH, R₂=H

O-Acetylhenningoline R=OCH₃, R₁=OH, R₂=COCH₃

Diaboline^a R=R₁=R₂=H

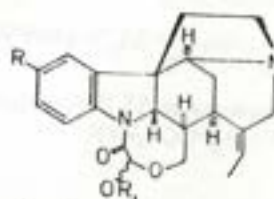


Rindline



8,13-Dehydrodiaboline R=H

α-Methoxy-8,13-dehydrodiaboline
R=OCH₃



Tsilanine R=H, R₁=CH₃

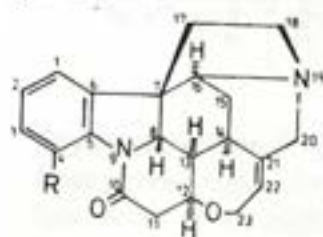
2-Methoxytsilanine R=OCH₃, R₁=CH₃

O-Demethyltsilanine R=R₁=H

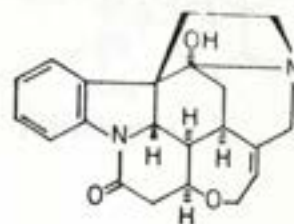
2-Methoxy-O-demethyltsilanine
R=OCH₃, R₁=H

Figure n° 16

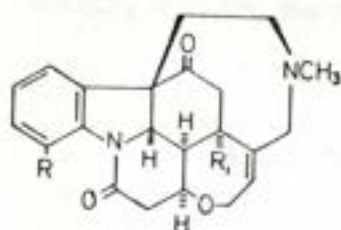
Alcaloïdes du *Strychnos henningsii* (*S. holstii*)



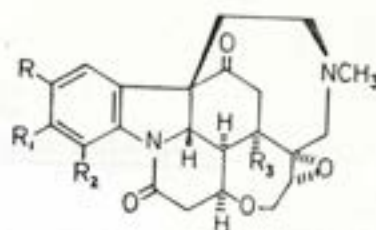
Strychnine R=H
4-Hydroxystrychnine R=OH



Pseudostrychnine



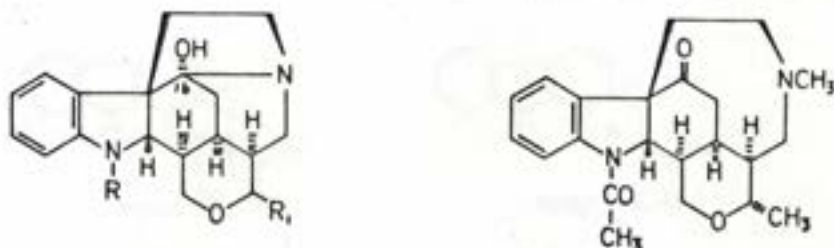
Icajine R=H, R₁=H
Vomicine R=OH, R₁=H
14-Hydroxyicajine R=H, R₁=OH



21,22-α-Epoxyvomicine
R=R₁=H, R₂=OH, R₃=H
21,22-Epoxy-N-methyl-Sec-
pseudo-β-colubrine
R=OCH₃, R₁=R₂=R₃=H
(stereochemistry not determined)
21,22-α-Epoxy-3-methoxyvomicine
R=H, R₁=OCH₃, R₂=OH, R₃=H
21,22-α-Epoxy novacine
R=R₁=OCH₃, R₂=R₃=H
14-Hydroxy-21,22-α-epoxyicajine
R=R₁=R₂=H, R₃=OH
14-Hydroxy-21,22-α-epoxyvomicine
R=R₁=H, R₂=R₃=OH
14-Hydroxy-21,22-α-epoxynovacine
R=R₁=OCH₃, R₂=H, R₃=OH

Figure n° 17

Alcaloïdes du Strychnos icaja



Strychnosplendine $R=H, R_1=\beta-CH_3$
 Isostrychnosplendine $R=H, R_1=\alpha-CH_3$
 Splendoline $R=COCH_2OH, R_1=\beta-CH_3$
 Isosplendoline $R=COCH_2OH, R_1=\alpha-CH_3$
 N_2 -Acetylisostrychnosplendine
 $R=COCH_3, R_1=\alpha-CH_3$
 (N_2 -Acetyl-16-deoxyisostychnosplendine
 $R=COCH_3, R_1=\alpha-CH_3, 16\alpha-OH$ replaced
 by $16\alpha-H$)

Isosplendine

Figure n° 18

Alcaloïdes du Strychnos splendens

Depuis la parution de cette publication, nous avons publié (101) l'isolement et la détermination de structure de 4 nouveaux alcaloïdes extraits des racines du S. usambarensis du Rwanda (forme arborescente): il s'agit de l'usambarensine (figure n° 20) et de ses dérivés. Ce nouveau type de structure se retrouve dans l'usambarine ou Nb-méthyl-1,3,4-trihydro-usambarensine (figure n° 21) extraite des feuilles du S. usambarensis de Côte d'Ivoire (forme lianeuse) au terme de recherches parallèles aux nôtres (102). La poursuite de nos travaux nous a permis d'isoler encore 4 autres alcaloïdes, ce qui porte à 9 le nombre d'alcaloïdes connus pour le S. usambarensis.

Enfin, deux nouveaux alcaloïdes (N-oxy-rétuline et camptoneurine) ont été isolés à partir du S. camptoneura (figure n° 19)(103).

En conclusion, aucune étude chimique approfondie du S. usambarensis n'avait été entreprise avant le début de nos travaux mais des screenings réalisés par des chercheurs cités ci-après dans l'ordre chronologique, ont démontré ou confirmé l'intérêt de cette espèce: DENOËL (41) avec le S. fernandiae et le S. stenura, synonymes du S. usambarensis (35); BOUQUET (30); SANDBERG (39 et 104); BISSET et PHILLIPSON (36).

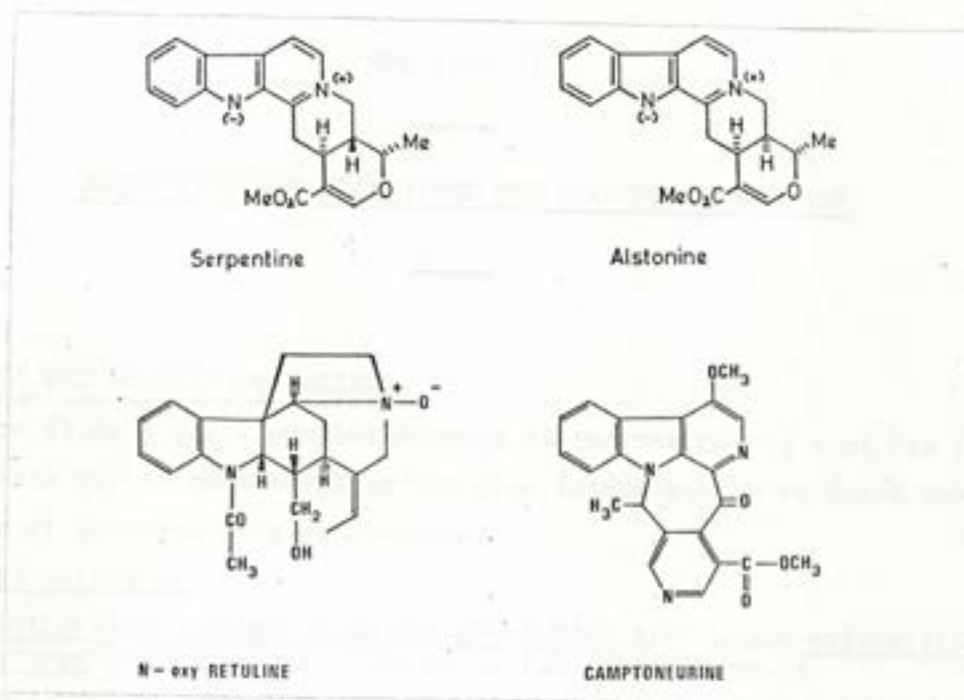


Figure n° 19

Alcaloïdes du Strychnos camptoneura

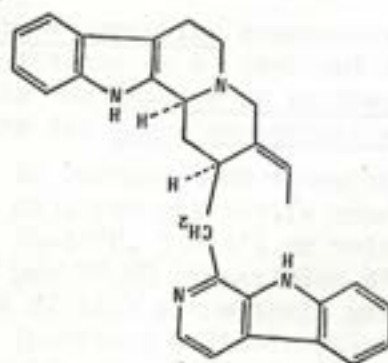


Figure n° 20

Usambarensine

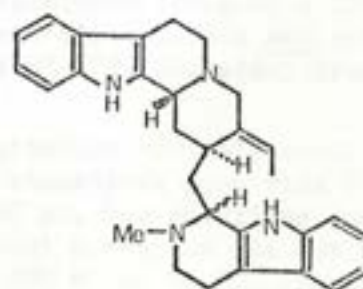


Figure n° 21

Usambarine

Alcaloïdes du Strychnos usambarensis

Chapitre II

EXTRACTION DES ALCALOÏDES DES ÉCORCES DE RACINES

§ 1. CHOIX DES ÉCORCES DE RACINES

Notre étude a porté sur les écorces de racines car ce sont les parties de la plante qui se sont révélées les plus intéressantes eu égard aux tests chimiques et pharmacologiques réalisés.

A. Tests chimiques

a) Estimation gravimétrique des alcaloïdes tertiaires extractibles par le chloroforme (technique inspirée de la P.B. 5ème édition)

Peser un gramme de poudre; ajouter un ml d'eau, un ml d' NH_4OH officinale et 50 ml de chloroforme; agiter 30 minutes; ajouter un gramme⁴ de gomme adragante. Filtrer; recueillir une aliquote, soit 40 ml. Transvaser quantitativement dans un matras de 150 ml. Distiller le CHCl_3 à siccité. Dessercher le résidu 5 minutes à l'étuve (100°C). Dissoudre dans 5 ml de CHCl_3 ; ajouter 2 ml d' HCl dilué et 18 ml d'eau. Chasser le chloroforme au bain-marie bouillant et filtrer la solution aqueuse refroidie sur un filtre mouillé d'un diamètre de 9 cm; on recueille dans une ampoule à décanter de 250 ml. Laver le filtre par quelques ml d'eau jusqu'à l'obtention d'une réaction négative avec le réactif de MAYER. Alcaliniser par 10 ml d' NH_4OH (apparition d'un précipité brun-rouge) et extraire les alcaloïdes par⁴ 3 fois 25 ml de CHCl_3 . Déshydrater le CHCl_3 sur sulfate sodique anhydre et distiller le chloroforme. Reprendre par quelques gouttes d'éthanol. Chauffer à siccité. Peser le résidu.

Les écorces de racines donnent un taux de 2,59 %, tandis que les feuilles ne contiennent qu'1 %.

b) Les chromatographies comparatives des teintures (éthanol à 70°) et des extractifs obtenus en a) révèlent la présence d'alcaloïdes non extractibles dans le cas des écorces de racines (figure n° 22). Ces alcaloïdes se comportent comme des bases quaternaires:

45 g d'écorces de racines sont extraits sous agitation par de l'acide acétique à 2 % (800 ml). Les extractifs réunis sont concentrés sous vide à une température de $35-40^\circ\text{C}$, jusqu'à un volume de 200 ml. Les solutions sont alors amenées à pH 8 par NH_4OH (apparition d'un abondant précipité qui est retenu sur filtre). Le filtrat est extrait par 5 fois 200 ml de CH_2Cl_2 (formation d'un précipité important à l'interphase CH_2Cl_2 -eau; ce précipité recueilli et chromatographié est constitué principalement par l'alcaloïde situé au R_f 0,33 dans la figure n° 22). La solution épuisée par le CH_2Cl_2 est amenée à pH 2 par HCl concentré, et les alcaloïdes sont précipités par une solution saturée d'acide picrique. Le précipité est recueilli sur filtre et redissous dans un volume minimum d'acétone-eau (9:1). Cette solution est passée sur une colonne d'Amberlite IRA 400 préalablement activée par HCl 2N. On obtient de la sorte les sels d'alcaloïdes qui sont alors soumis à des chromatographies soit sur couche mince: zone Q sur la figure 22, soit sur papier. Ces alcaloïdes donnent diverses colorations avec le réactif au sulfate cérique.

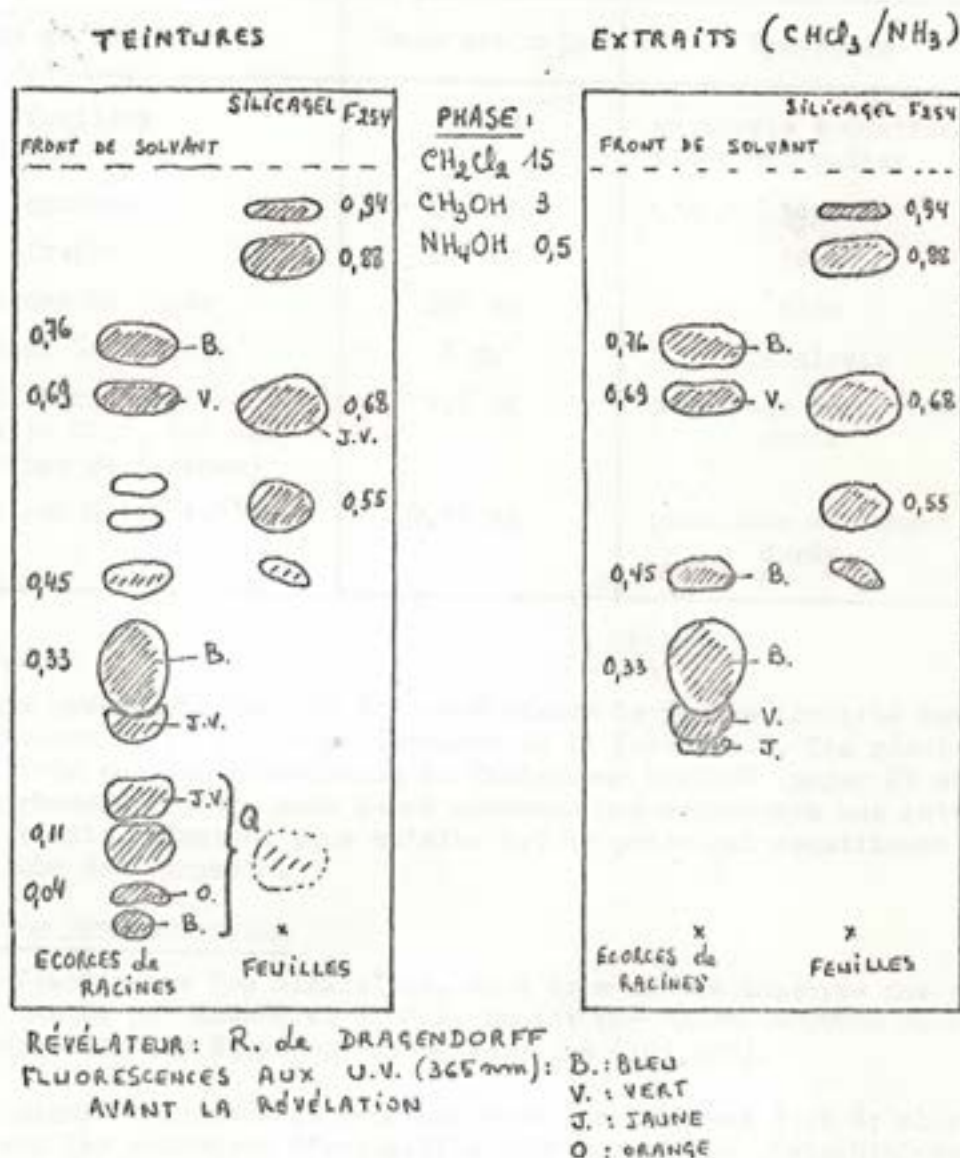


Figure n° 22

Chromatogrammes sur couche mince de Silicagel

B. Tests pharmacologiques

Nous avons injecté dans le sac lymphatique ventral de grenouilles d'un poids moyen de 30 g, différents extractifs du *Strychnos usambarensis* en essayant de déterminer la dose minimale active en ce qui concerne une paralysie ou des convulsions. (tableau 4).

TABEAU 4

Organe de la plante	Dose minimale	Symptômes
feuilles	50 mg	paralyse + contractions des pattes
graines	100 mg	idem
fruits	100 mg	idem
écorces de tiges	100 mg	idem
écorces de racines	1 mg	paralyse
alcaloïdes solubles dans le CHCl_3 (cf A.a) (écorces de racines)	0,5 mg	paralyse de courte durée
fraction Q (cf A.b)	0,05 mg	paralyse de longue durée

Les essais précédents avaient mis en évidence la grande toxicité des écorces de racines et plus particulièrement de la fraction Q. Ces résultats ont été confirmés par les expériences du Professeur GOFFART (pages 25 et 26). Munis de ces renseignements, nous avons commencé nos recherches sur cette partie de la plante, d'autant plus qu'elle est le principal constituant du poison de flèche des Banyambo.

§ 2. EXTRACTION DES ALCALOÏDES

Afin de fractionner les alcaloïdes, nous nous sommes inspirés des procédés utilisés tantôt par KARRER et SCHMID, tantôt par MARINI-BETTOLO dans leurs recherches sur les Strychnos sud-américains (107,108).

Les techniques suivies sont reprises dans les tableaux 5 et 6; elles sont basées sur les principes d'extraction bien connus des phytochimistes.

TABEAU 5

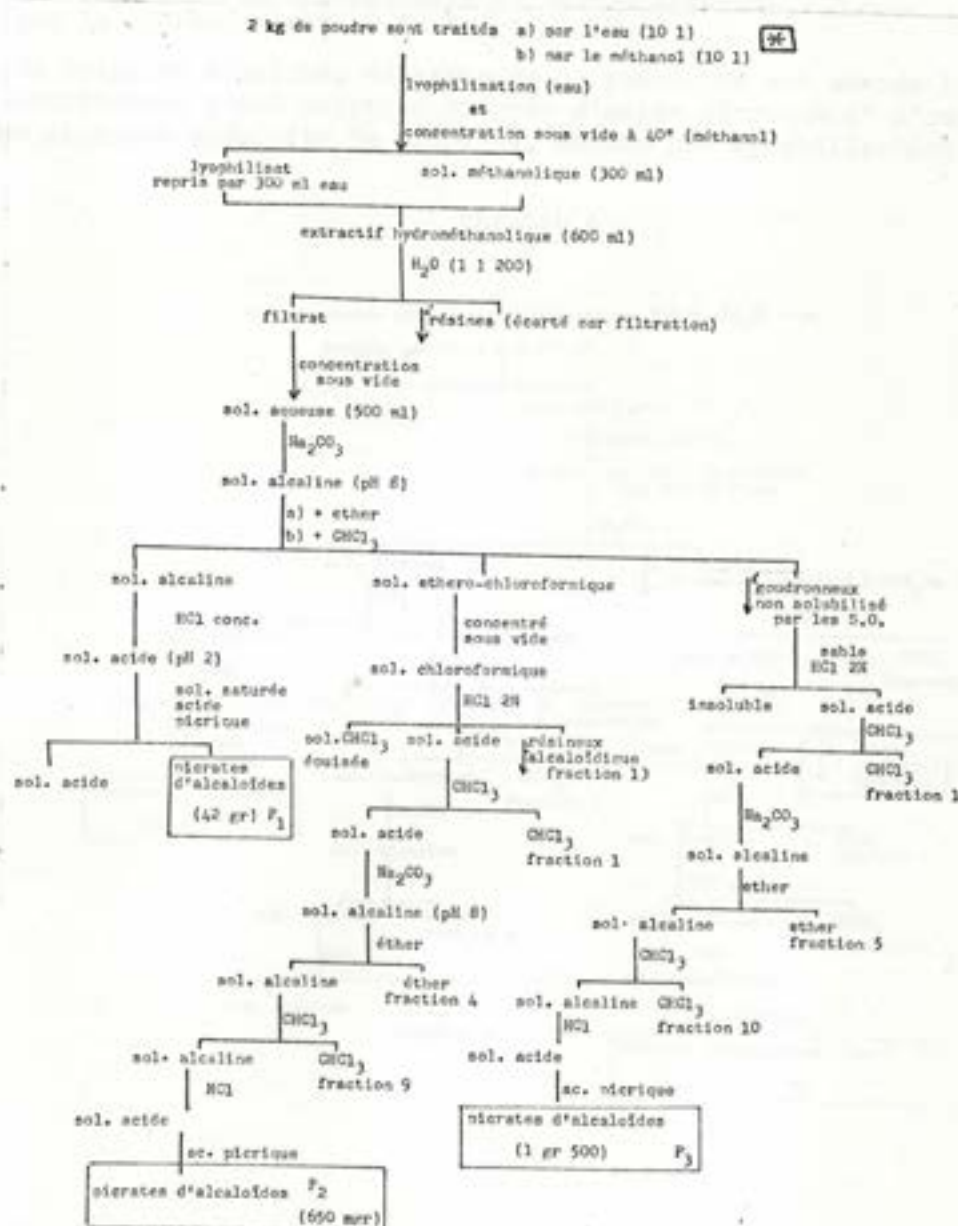
1. 2 kg d'écorces de racines finement broyées sont extraits successivement et à 3 reprises par de l'eau (en tout 10 l), ensuite et également à 3 reprises par du méthanol froid (10 l). Les extraits aqueux sont lyophilisés. Les conditions opératoires sont les suivantes: température du plateau: - 40 à -45°C; température du condenseur: - 55°C; vide: 100 microns de Hg (début de lyophilisation) et 40 à 50 microns de Hg (fin de lyophilisation). Le lyophilisateur EDWARDS Milano Model E I PTC*n'est pas équipé d'un système de réfrigération permettant la lyophilisation des solutions alcooliques ou organiques; aussi avons-nous évaporé les solutions organiques à l'évaporateur rotatif en opérant sous vide et à la température de 45°C. Les solutions méthanoliques sont concentrées sous vide à la t° de 45°C, jusqu'à un volume de 300 ml. Le lyophilisat est redissous dans 300 ml d'eau et réuni à la solution méthanolique. On ajoute une proportion double d'eau (1 l 200), ce qui provoque une précipitation des résines que l'on élimine par filtration. Le filtrat est concentré sous vide à un volume de 500 ml.

2. Cette solution libérée de méthanol est amenée à pH8 par du carbonate sodique et soumise à des extractions liquide/liquide d'abord par l'éther,

* Service de Pharmacie Galénique (Prof. F. JAMINET)

TABLEAU 5

Extraction des alcaloïdes contenus dans les écorces de racines



97 La poudre est ensuite extraite par HAc à 2 % (voir tableau 6) ensuite par le chloroforme dans les appareils ad hoc.

Les solutions extractives organiques réunies sont concentrées sous vide, épuisées par une solution d'HCl 2N. Il y a apparition d'un précipité résineux alcaloïdique de couleur rouge foncé qui se colle aux parois de l'ampoule (fraction 13). La solution acide est soumise à une extraction liquide/liquide par le CHCl₃, qui, après évaporation sous vide, fournit la fraction 1. La solution aqueuse est alors alcalinisée à pH 8 par du carbonate sodique et soumise à deux extractions liquide/liquide d'abord par l'éther (fraction 4), ensuite par le chloroforme (fraction 9).

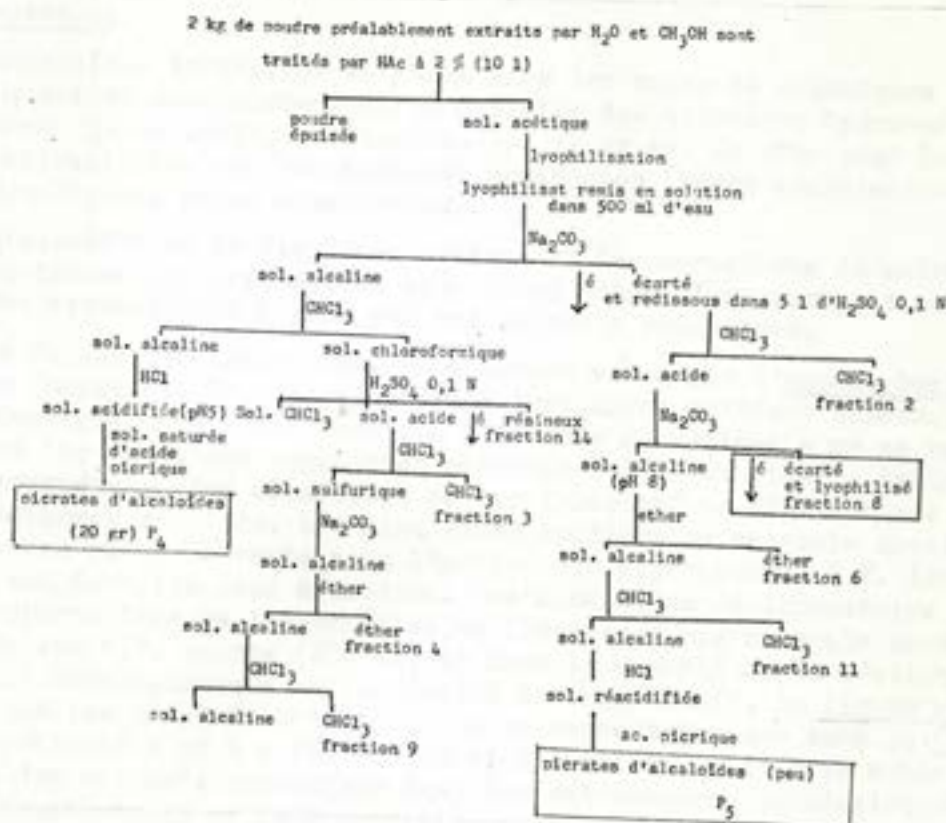
3. La solution aqueuse (pH 8) contient toujours un précipité d'aspect goudronneux qui n'a pas été solubilisé par les solvants organiques. Ce précipité est recueilli, trituré avec du sable et mis en solution dans de l'acide

chlorhydrique 2N. Le filtrat est soumis également à des extractions liquide/liquide:

- par le chloroforme en milieu acide: fraction Ibis semblable à la fraction I (C.C.M.)
- par l'éther à pH 8 (carbonate sodique): fraction 5
- par le chloroforme à pH 8: fraction 10.

4. La solution alcaline, débarrassée du précipité est amenée à pH2 par HCl et additionnée d'une solution saturée d'acide picrique et l'on obtient ainsi un abondant précipité de picrates, séchés par lyophilisation (42 g).

TABEAU 6



TABEAU 6

1. La poudre d'écorce préalablement extraite par l'eau et le méthanol (cf. tableau 5) est finalement extraite par 10 l d'acide acétique à 2 %. Cette solution acétique est lyophilisée puis remise en solution dans 500 ml d'eau. On alcalinise à pH 8 par du carbonate sodique. Il y a formation d'un précipité que l'on écarte et qui est traité ultérieurement. La solution ainsi obtenue est épuisée par du chloroforme (afin d'enlever les alcaloïdes tertiaires). La solution chloroformique est épuisée par une solution d'acide sulfurique 0,1 N qui s'accompagne à nouveau de la formation d'un précipité résineux rouge-noir: fraction 14. La solution sulfurique est extraite par le chloroforme: fraction 3, alcalinisée à pH 8 par du carbonate sodique et extraite successivement par l'éther (fraction 4) et le CHCl₃ (fraction 9).

2. La solution aqueuse épuisée par le chloroforme est réacidifiée à pH 5 par HCl et traitée par une solution saturée d'acide picrique. On obtient de cette façon des picrates d'alcaloïdes, séchés par lyophilisation.

3. Le précipité à pH 8 ayant été écarté (cf 1), il est redissous dans 5 l d' H_2SO_4 0,1 N et soumis à une extraction liquide/liquide par le chloroforme: fraction 2. La solution sulfurique est alcalinisée à pH 8, ce qui provoque la formation d'un abondant précipité qui est écarté par filtration et lyophilisé: fraction 8 (6,5 g). Le filtrat alcalin est soumis à des extractions liquide/liquide par l'éther (fraction 6) et par le chloroforme (fraction 11).

4. Les fractions organiques sont lavées à l'eau. Ces eaux de lavage donnent une réaction de MAYER positive et révèlent lors de chromatographies la présence d'alcaloïdes très polaires qui seraient entraînés partiellement par les solvants organiques. Exemples: fraction 7 (lavage de F 6) et fraction 12 (lavage de F 11), ainsi que P_2 dans la tableau 5.

Résultats obtenus:

1° Les alcaloïdes tertiaires solubles dans les solvants organiques s'obtiennent en quantité sensiblement égale à partir des solutions hydro-méthanoliques (tableau 5) ou acétiques (tableau 6). Il en est de même pour les alcaloïdes non extractibles par les solvants organiques (bases quaternaires, alcaloïdes phénoliques, bases anhydronium).

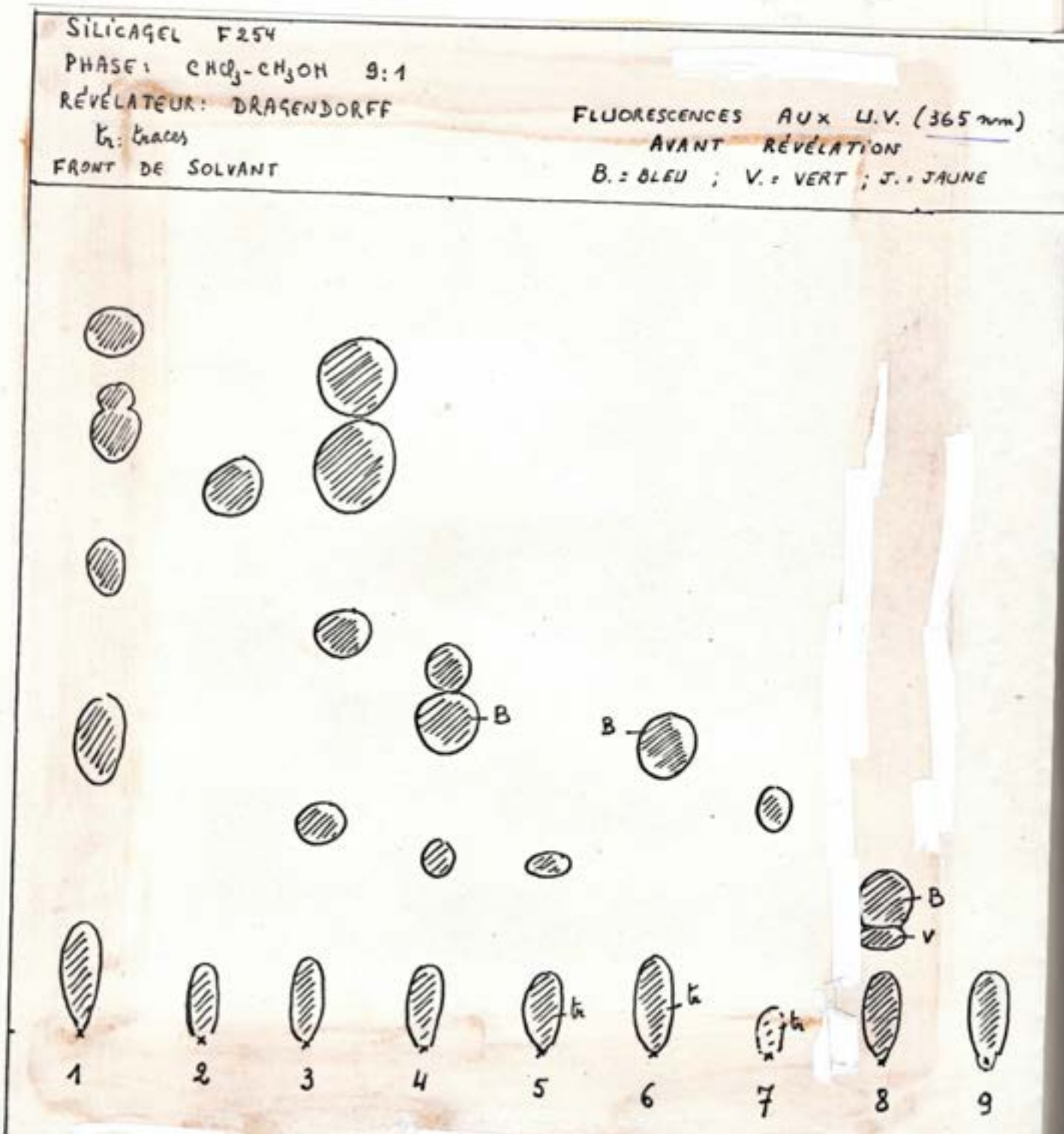
2° Des alcaloïdes de ce Strychnos présentent des caractères de solubilité assez particuliers: ils précipitent en solution acide d'une part, et sont très difficilement extractibles à pH 8 par les solvants organiques.

3° A côté de ces considérations, nous devons envisager l'aspect qualitatif qui est plus important. Or, les alcaloïdes tertiaires initiaux observables lors de chromatographies d'une teinture d'écorces de racines - ne se retrouvent pas dans les fractions organiques obtenues ($CHCl_3$ et éther - tableaux 5 et 6), et inversement, les alcaloïdes de ces fractions ne figurent pas sur les chromatogrammes précités. Les alcaloïdes initiaux ou naturels émettent une fluorescence bleue ou verte sous l'action des rayonnements U.V. longs (360 nm) ce qui facilite leur détection. Les alcaloïdes de laboratoire (ou artefacts) apparus lors de l'extraction ne fluorisent pas mais ils peuvent être observés aux U.V. courts (254 nm) et dans le visible après révélation par le réactif iodoplatinique ou le réactif de Dragendorff. La figure n° 23 nous montre que les alcaloïdes initiaux ne se rencontrent que dans la fraction 8 (ce précipité à pH 8 a été écarté et lyophilisé au lieu de subir l'action néfaste des solvants organiques dans des extracteurs liquide:liquide) et dans les fractions 13 et 14 à condition que ces précipités ne restent pas en contact prolongé avec les solvants organiques précités.

Une preuve supplémentaire de la dégradation de ces alcaloïdes a été apportée lorsque nous avons soumis une partie de la fraction 8 à la distribution à contre-courant avec le chloroforme comme phase organique. Outre les difficultés dues aux solubilités particulières de certains alcaloïdes, nous notons la présence de nouveaux alcaloïdes aussi bien dans la phase organique que dans le tampon: exemple de la figure 24. (T- $CHCl_3$ = phase aqueuse tamponnée, alcalinisée et réextraite au $CHCl_3$)

Figure n° 23

Comparaison entre le chromatogramme de la teinture d'écorces de racines
et ceux des diverses fractions obtenues ensuivant les tableaux 5 et 6





10



11



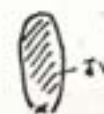
12



13



14

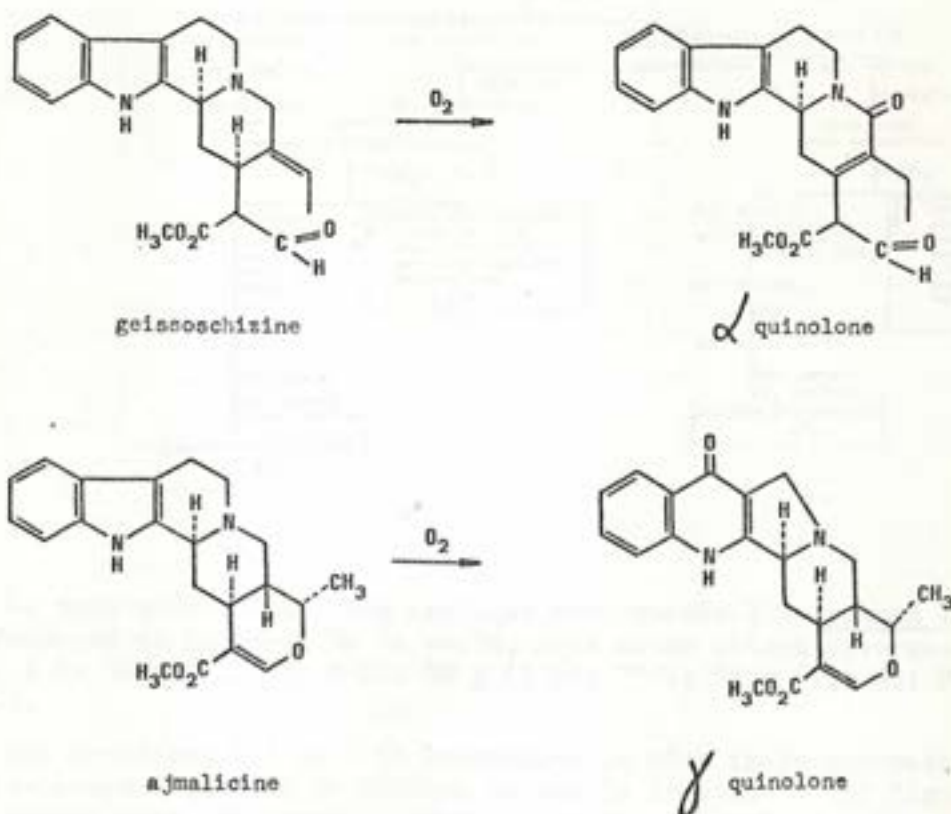


TEINTURE
EC. RACINES



EXTRAIT
CHOL/NH₃

Nous ne pouvons nous prononcer sur la nature de ces artefacts, n'ayant pas entrepris leur étude. Cependant, il convient de signaler que des études récentes traitent de la dégradation des alcaloïdes lors des procédés d'extraction. L'instabilité de certains alcaloïdes indoliques telle la réserpine est bien connue. Des études récentes ont montré que les alcaloïdes dérivés du tétrahydroharmane se transforment facilement en quinolones (109). Exemples de la geissoschizine et de l'ajmalicine:



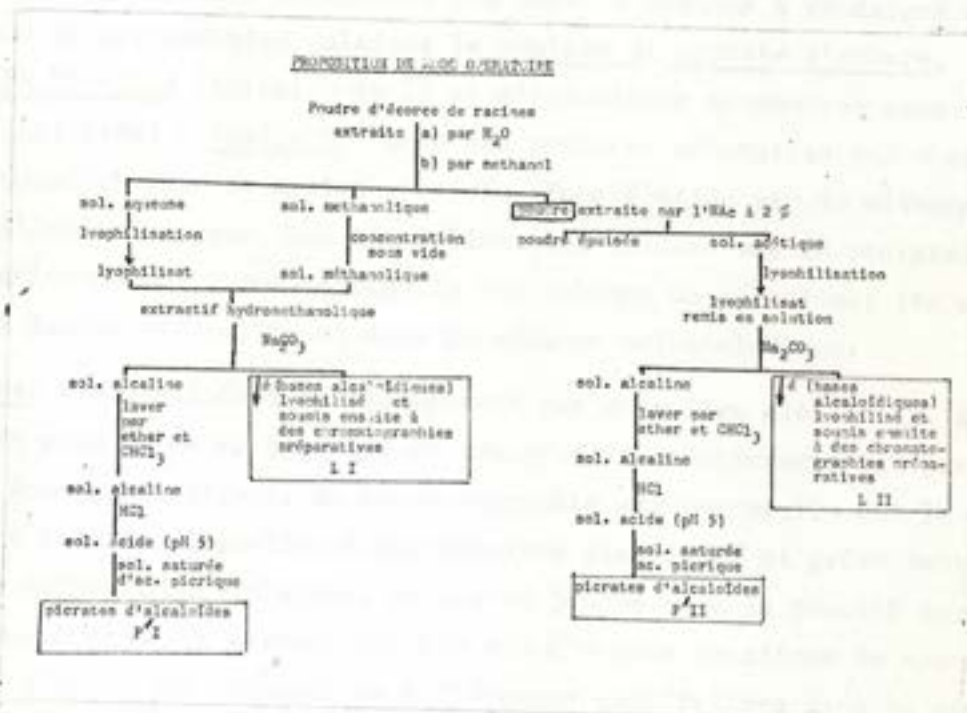
Il est également prouvé que la strychnine se transforme rapidement en solution chloroformique (ainsi que dans le chlorure de méthylène). Parmi les produits de dégradation (artefacts), on relève la pseudostrychnine (16-hydroxystrychnine), le génostrychnine et des dérivés quaternarisés en N_b (110).

De toutes les études réalisées, il ressort qu'il est néfaste de laisser les alcaloïdes en contact prolongé avec le $CHCl_3$ ou le CH_2Cl_2 , par exemple. Les rôles joués par l'oxygène d'une part et la lumière d'autre part sont également prépondérants, notamment dans la transformation des alcaloïdes dimères symétriques des *Strychnos* et curares en dérivés (176). Il est possible d'ailleurs que l'apparition d'artefacts (décelés sur les figures n° 23 et 24), formés lors des procédés classiques d'extraction des alcaloïdes du *Strychnos usambarensis* soit imputable non seulement aux solvants mais aussi à l'oxygène, à la chaleur et à la lumière.

Toutes ces considérations nous ont incité à proposer un mode opératoire valable pour les écorces de racines du *Strychnos usambarensis* (tableau 7). La lyophilisation constitue en effet une technique élégante qui préserve ces alcaloïdes très sensibles à la plupart des solvants. Ce procédé permet

également d'éviter les difficultés dues aux solubilités particulières de certains alcaloïdes de la plante.

TABEAU 7



Ce mode opératoire a été appliqué avec succès à un second lot de 2 kg d'écorces de racines. De la sorte, nous avons obtenu diverses fractions brutes: L I: 34 g (1,7 %); L II: 20 g (1 %); P' I: 32 g (1,6 %); P' II: 19 g (0,95 %).

Les fractions L I et L II présentent la même image chromatographique que la teinture d'écorces de racines ou que la fraction 8 (cf figure 23). Ce qui dénote bien l'absence de dégradation des alcaloïdes.

Les fractions P'I et P'II sont identiques aux fractions PI à P5 obtenues lors du premier procédé d'extraction (tableaux 5 et 6).

Les alcaloïdes naturels des écorces de racines de *S.usambarensis* peuvent être divisés en 3 groupes:

1er groupe: ces alcaloïdes précipitent en milieu alcalin; ils sont solubles dans les solvants organiques et migrent aisément lors de chromatographies sur couche mince de silicagel dans le système A: acétate d'éthyle, isopropanol, ammoniac concentrés: 90:8:2. Ce système a été choisi pour la séparation des alcaloïdes de ce groupe par chromatographie préparative car il permet une migration rapide sans dégradation. L'élution se fait par le méthanol. Les éluats sont concentrés immédiatement sous vide et les fractions obtenues sont purifiées par précipitation répétée dans l'hexane. Auparavant, nous avions en vain tenté de séparer les alcaloïdes de ce groupe dans des systèmes à base de CHCl_3 (et de diéthylamine parfois). Nous obtenions une bonne séparation mais aussi une dégradation importante. Seules des conditions de travail draconiennes (élution en atmosphère d'azote en absence de CHCl_3 et à l'abri de la lumière),

nous avaient permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

2ème groupe: ces alcaloïdes précipitent aussi en milieu alcalin mais ils sont beaucoup moins solubles dans les solvants organiques (CHCl_3 , CH_2Cl_2) et insolubles dans l'hexane (ils ne migrent pas dans le système A renseigné ci-avant mais dans un système plus polaire: le système B: acétate d'éthyle, isopropanol, NH_4OH dilué (dilution de 17 ml d'ammoniaque concentrée dans 100 ml d'eau distillée) = 60:25:15). Après une première séparation par chromatographie préparative dans ce système, suivie d'une élution par du méthanol contenant de l'acide formique, les alcaloïdes sont transformés en picrates, régénérés en chlorures et chromatographiés sur colonne de cellulose; les alcaloïdes ainsi isolés cristallisent dans le mélange méthanol-éther.

3ème groupe: ces alcaloïdes ne précipitent pas en milieu alcalin (p. 48). Ils sont isolés sous forme de picrates et transformés en chlorures par passage sur résine échangeuse d'ions. En chromatographie sur papier, ils ont le même comportement que les alcaloïdes diquaternaires classiques et présentent d'ailleurs des colorations violettes, bleues et jaunes avec le réactif au sulfate cérique. Lors de la chromatographie des diverses fractions de ces alcaloïdes, nous n'avons pas discerné de différences qualitatives dans la composition, seules de légères différences quantitatives sont observées; c'est ainsi que les fractions P4 et P'II provenant des extractions acétiques contiennent une plus grande proportion d'alcaloïdes migrant à des R_f très bas dans les systèmes C et D de KARRER et SCHMID (40). La figure n° 25 (page 57) révèle la complexité des mixtures de ces alcaloïdes non extractibles par les solvants organiques et solubles en milieu alcalin! Nous relevons la présence sur ce chromatogramme de 35 alcaloïdes dont une dizaine sont révélés par le sulfate cérique.

§ 3. REMARQUES GENERALES POUR LA SUITE DU MEMOIRE

1. Les spectres de masse ont été pris à l'aide d'un AEI MS 902 à haute résolution par Mr D. CARTER (Mass Spectrometry Service, School of Pharmacy, University of London)
2. Les spectres de R.M.N. ont été réalisés par Mr José DENOËL (Laboratoire commun de R.M.N. au Sart Tilman) soit sur Varian-HA 60 soit sur Varian HA-100. Certains spectres ont été réalisés sur un Thomson 250 MHz (Laboratoires Cameca-Paris) par Mr J.J. TASSIN.
3. Les spectres infra-rouge ont été pris à l'aide d'un BECKMAN IR-20A par Mr P. PREUDHOMME (Service du Professeur RENSON).
4. Les spectres ultra-violet et visible ont été réalisés soit sur un UNICAM SP 800 (Chelsea College) soit sur un PERKIN-ELMER 124 (Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Idège)

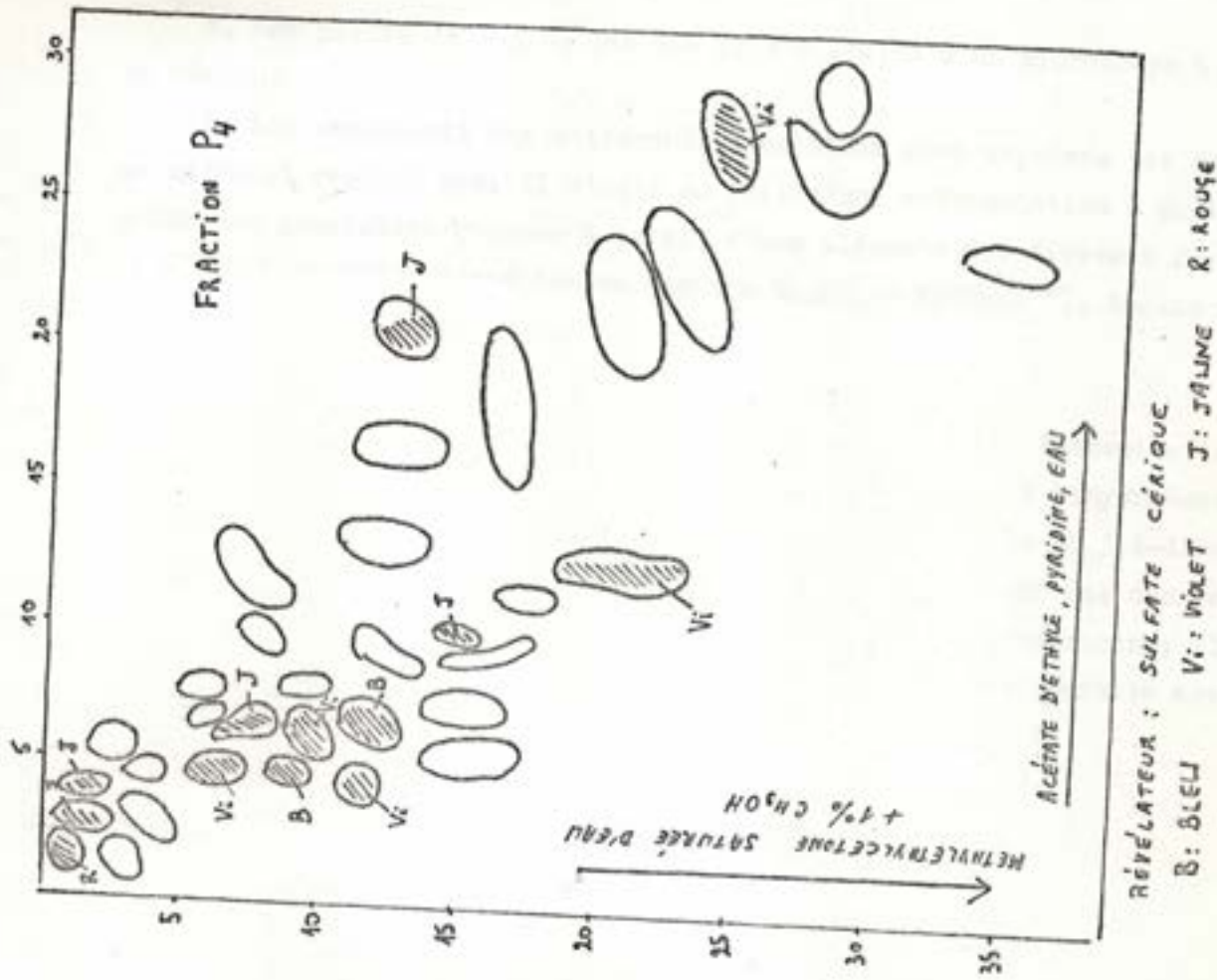
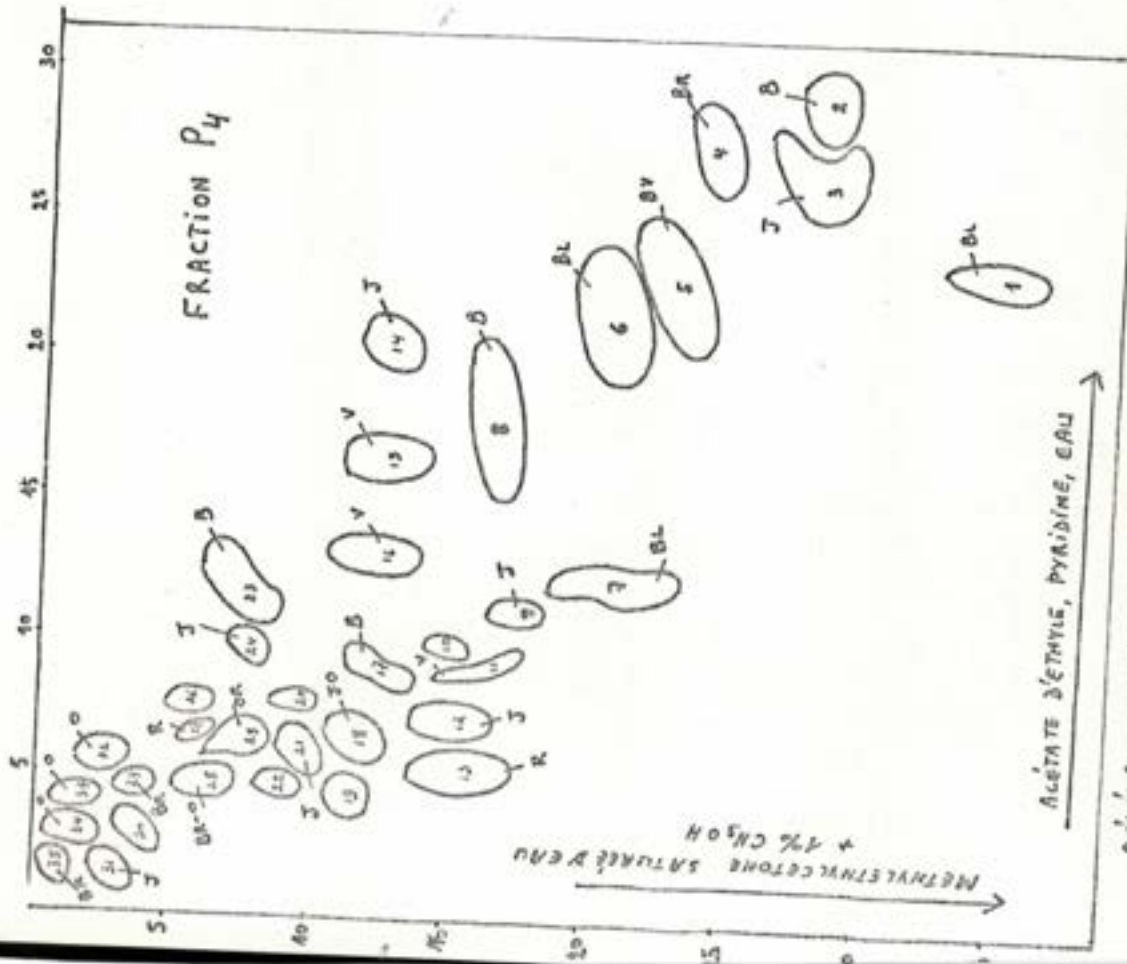


Figure n° 25

CHROMATOGRAPHIES DIMENSIONNELLES SUR PAPIER WHATMAN N°1 (ALCOÏDES QUATERNAIRES)

5. Les points de fusion ont été pris à l'aide d'un microscope à point de fusion.

6. Les rendements des différents alcaloïdes sont exprimés par rapport au matériel végétal sec. Il s'agit en fait d'une extrapolation à partir du poids des alcaloïdes obtenus à partir d'une aliquote des diverses fractions brutes (alcaloïdes précipités ou non par Na_2CO_3 - tableau 7). Aucune technique de dosage n'a donc été appliquée.

La suite de ce travail relate l'isolement et la détermination de structure des alcaloïdes du 1er groupe (usambarensine, 3,4-dihydro-usambarensine et harmane), du 2ème groupe (N'b-méthyl-usambarensine et 3,4-dihydro-N'b-méthyl-usambarensine, 6,7-dihydro-flavopérérine) ainsi que deux alcaloïdes principaux du 3ème groupe: C-dihydro-toxiférine et C-curarine; il est à noter que la 6,7-dihydro-flavopérérine est présente en quantité appréciable dans le 3ème groupe.



Chapitre III

USAMBARENSINE

Le premier alcaloïde que nous nommons usambarensine est une poudre blanche microcristalline (P.F. de la base = 145°C) qui donne en chromatographie sur couche mince de Silicagel, dans le système A, un Rf de 0,35. (Rendement: 444 mgr alc. à partir de 3 gr de L II, soit 0,40 %).

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{29}H_{28}N_4$ (M^+ trouvé: 432,2304; calculé: 432,2314). Cette formule indique l'absence d'oxygène et la présence de 16 insaturations (114).

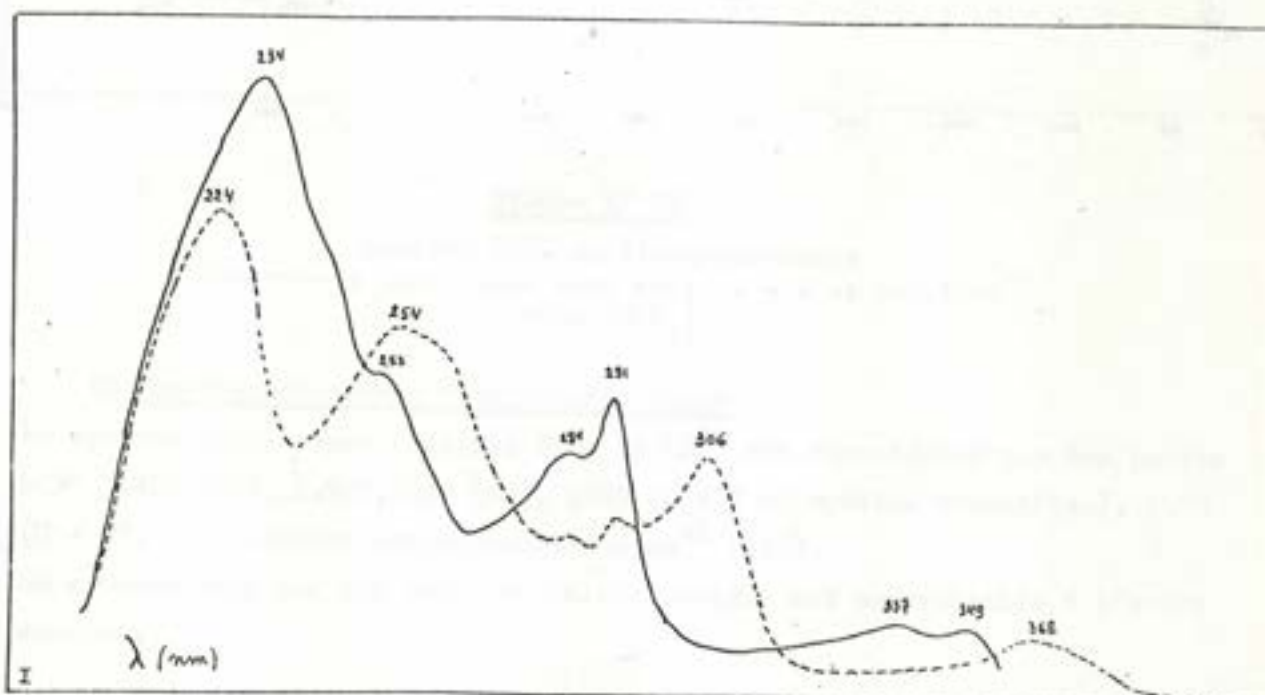


Figure n° 26

Spectres U.V. de l'usambarensine
(— : milieu neutre; - - - : milieu acide)

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet

Le spectre ultra violet, réalisé dans l'éthanol absolu présente des maxima à λ nm (log ϵ) 234 (4,57), 253 et 284 (épaulements), 291 (4,20), 337 (3,53) et 349 (3,53). Il peut être considéré comme la somme des chromophores de l'harmane et de l'indole (tétra-hydro- β -carboline). La fluorescence bleue

Chapitre III

USAMBARENSINE

Le premier alcaloïde que nous nommons usambarensine est une poudre blanche microcristalline (P.F. de la base = 145°C) qui donne en chromatographie sur couche mince de Silicagel, dans le système A, un Rf de 0,35. (Rendement: 444 mgr alc. à partir de 3 gr de L II, soit 0,40 %).

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{29}H_{28}N_4$ (M^+ trouvé: 432,2304; calculé: 432,2314). Cette formule indique l'absence d'oxygène et la présence de 18 insaturations (114).

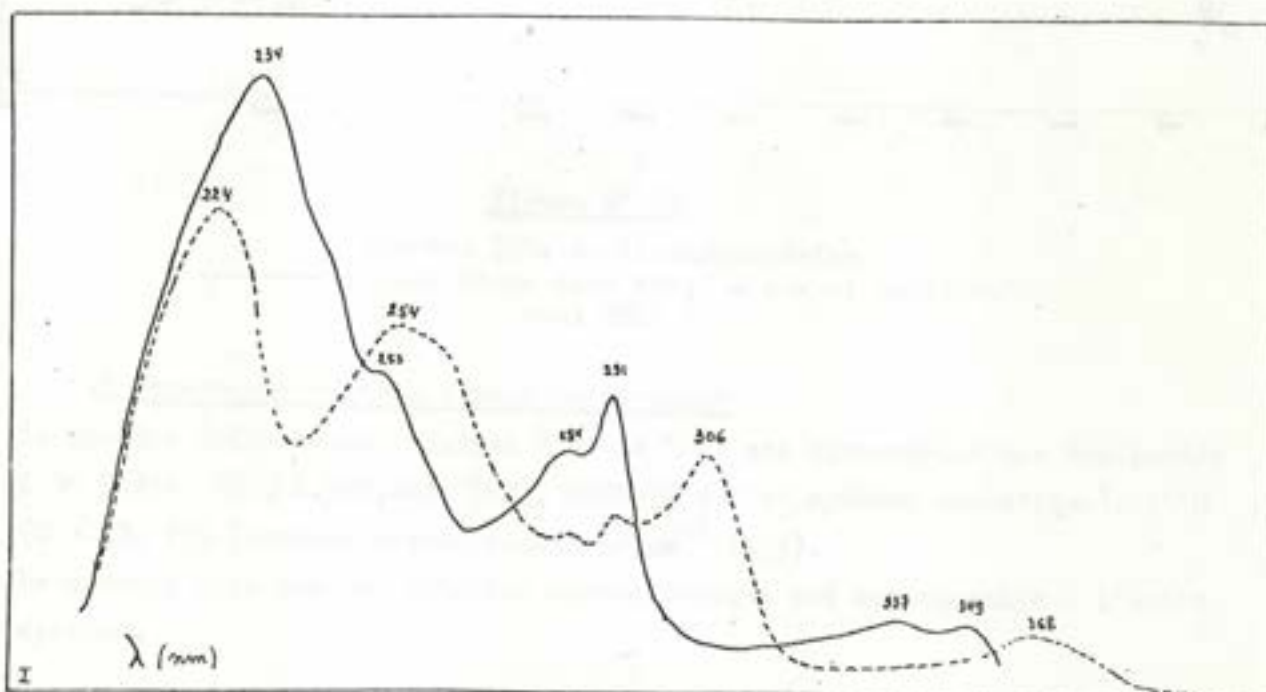


Figure n° 26

Spectres U.V. de l'usambarensine
(— : milieu neutre; - - - : milieu acide)

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet

Le spectre ultra violet, réalisé dans l'éthanol absolu présente des maxima à λ nm (log ϵ) 234 (4,57), 253 et 284 (épaulements), 291 (4,20), 337 (3,53) et 349 (3,53). Il peut être considéré comme la somme des chromophores de l'harmane et de l'indole (tétra-hydro- β -carboline). La fluorescence bleue

observée aux U.V. longs est en accord avec le chromophore de l'harmane. Le spectre n'est pas modifié en milieu alcalin. En milieu acide, il y a modification du spectre (chromophore de l'harmane), tandis que les bandes dues à l'indole (λ 284 et 291 nm) ne sont pas déplacées. Le spectre de l'indole possède une bande à 262 nm qui est absente dans les spectres de la plupart des indoles substitués dont les tétrahydro- β -carbolines (111).

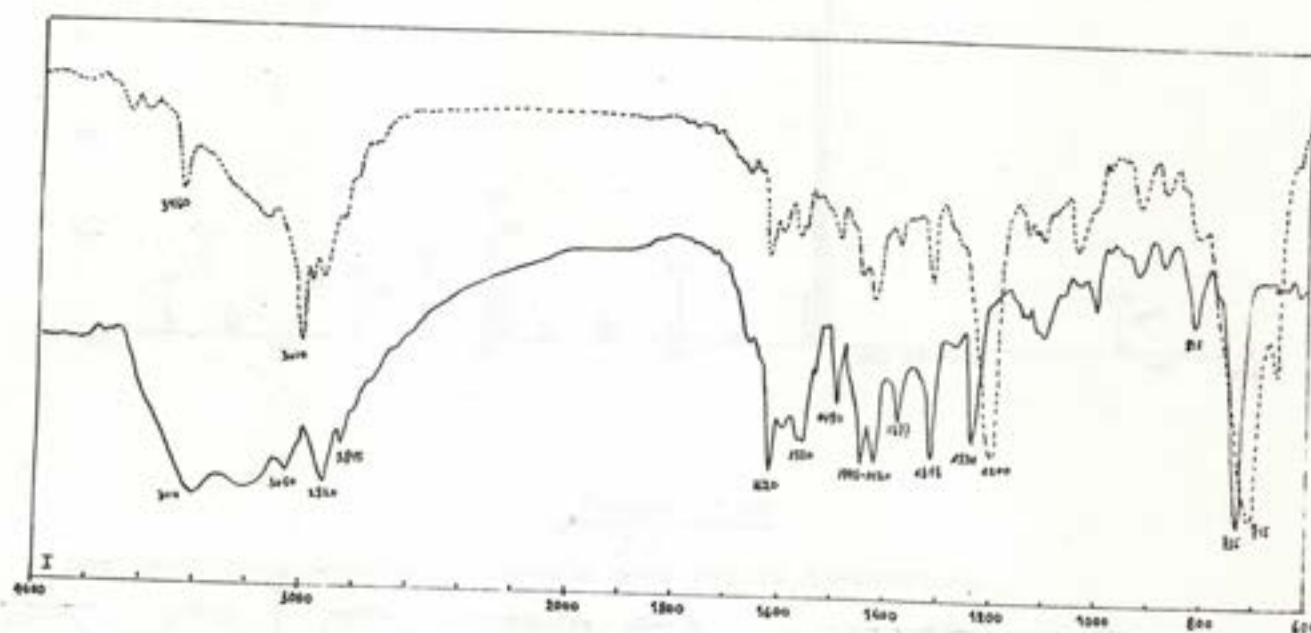


Figure n° 27

Spectre I.R. de l'usambarensine
 (— : pastillage dans KBr; - - - - : solution dans CHCl_3)

c) Spectrophotométrie dans l'infra-rouge

Le spectre infra-rouge (réalisé dans le KBr) est caractérisé par des bandes à ν 3.410 (NH), 2.920, 2845 (CH), 1620 (C = N et système aromatique), 1550 (C = C), 735 (benzène orthodisubstitué) cm^{-1} (113).

Le spectre pris sur une solution chloroformique est superposable à l'autre spectre.

d) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse fait apparaître des pics à m/e (intensité relative) 182(28), 161(10) et 154(12) correspondant à la partie harmane (ion à m/e 182 = $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$ trouvé: 182,0845; calculé: 182,0844) comprenant 3 cycles et 6 doubles liaisons

- et m/e 251 (100 = pic de base), 250(49), 235 (5), 233(7), 221(13), 185(21), 171(8), 169(16), 156(8), 144(10), 143(6), 130(5), correspondant à une partie de type tétrahydro- β -carboline.

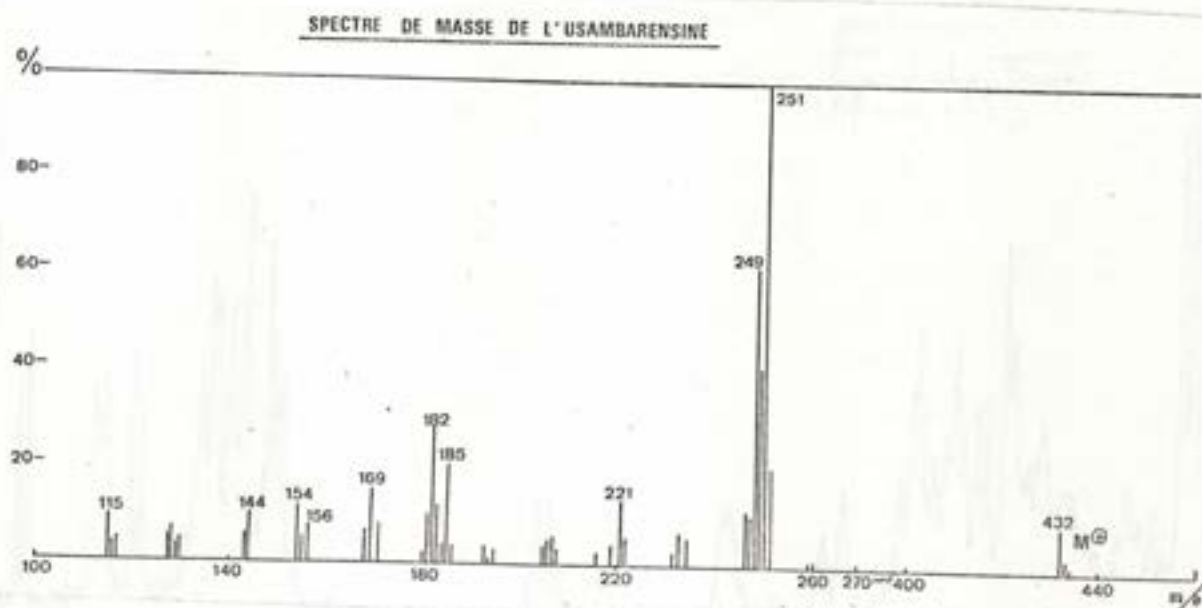
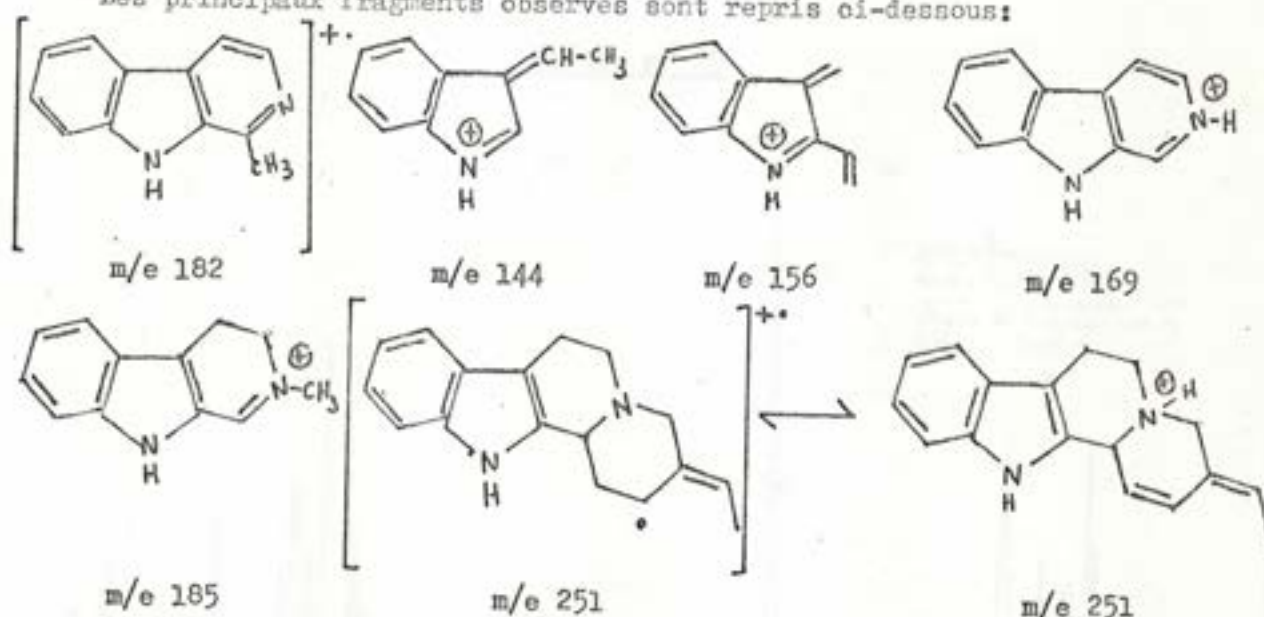


Figure n° 28

Les principaux fragments observés sont repris ci-dessous:



Le pic de base (m/e 251 trouvé 251,1553; calculé: 251,1548) répond à la formule $C_{17}H_{19}N_2$ qui comprend 4 cycles et 5 doubles liaisons. Les ions m/e 249, 185, 171, 169, 156, 144, 143, 130 correspondent à une partie de type corynane (tétra-hydro- β -carboline non substituée)(122). Des ions semblables s'observent pour la tubulosine (123), l'hervine (124), l'isositsirikine(124b) l'hunterabrine (124c), la geissospermine (126), le méthoxy-geissoschizol(128).

e) Résonance magnétique nucléaire

Les figures n° 29 et 30 reproduisent le spectre effectué sur un VARIAN HA 100; on y retrouve les éléments du groupe harmane (numérotation p. 65): les

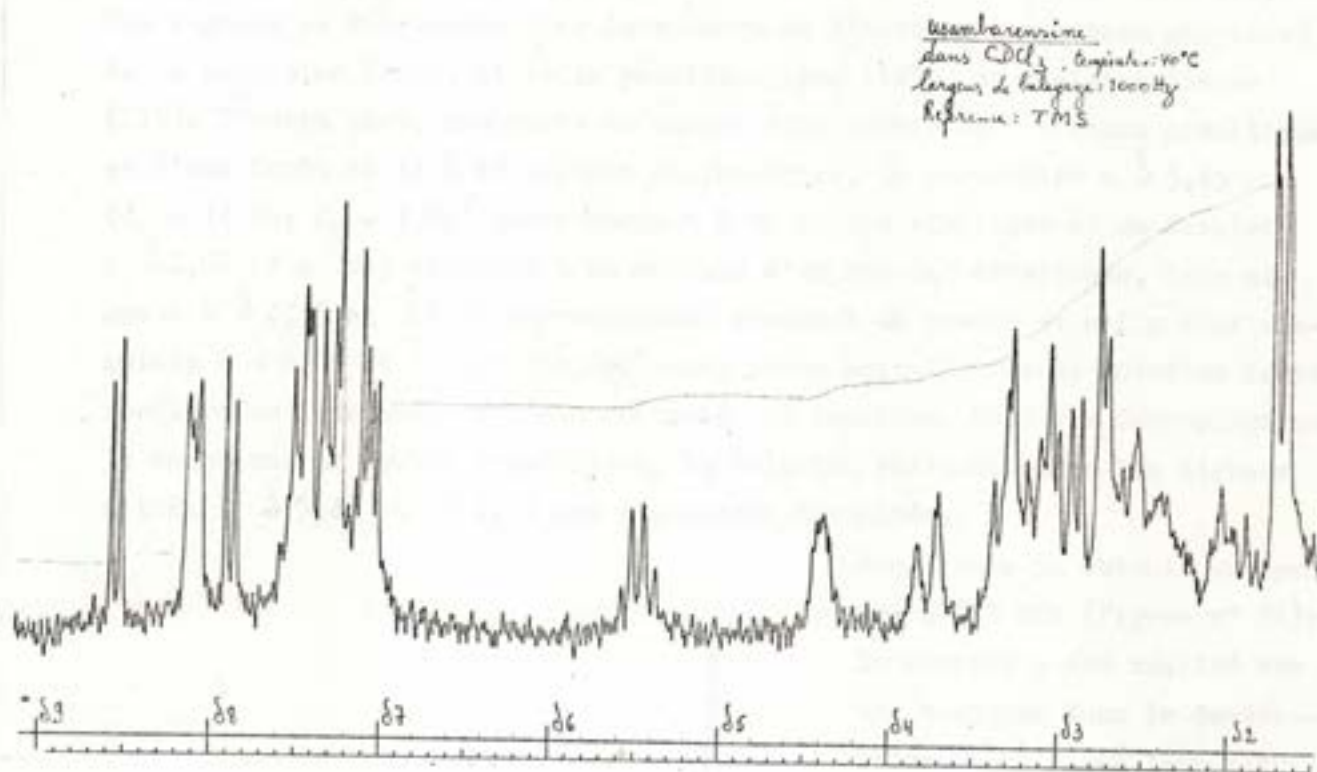


Figure n° 29

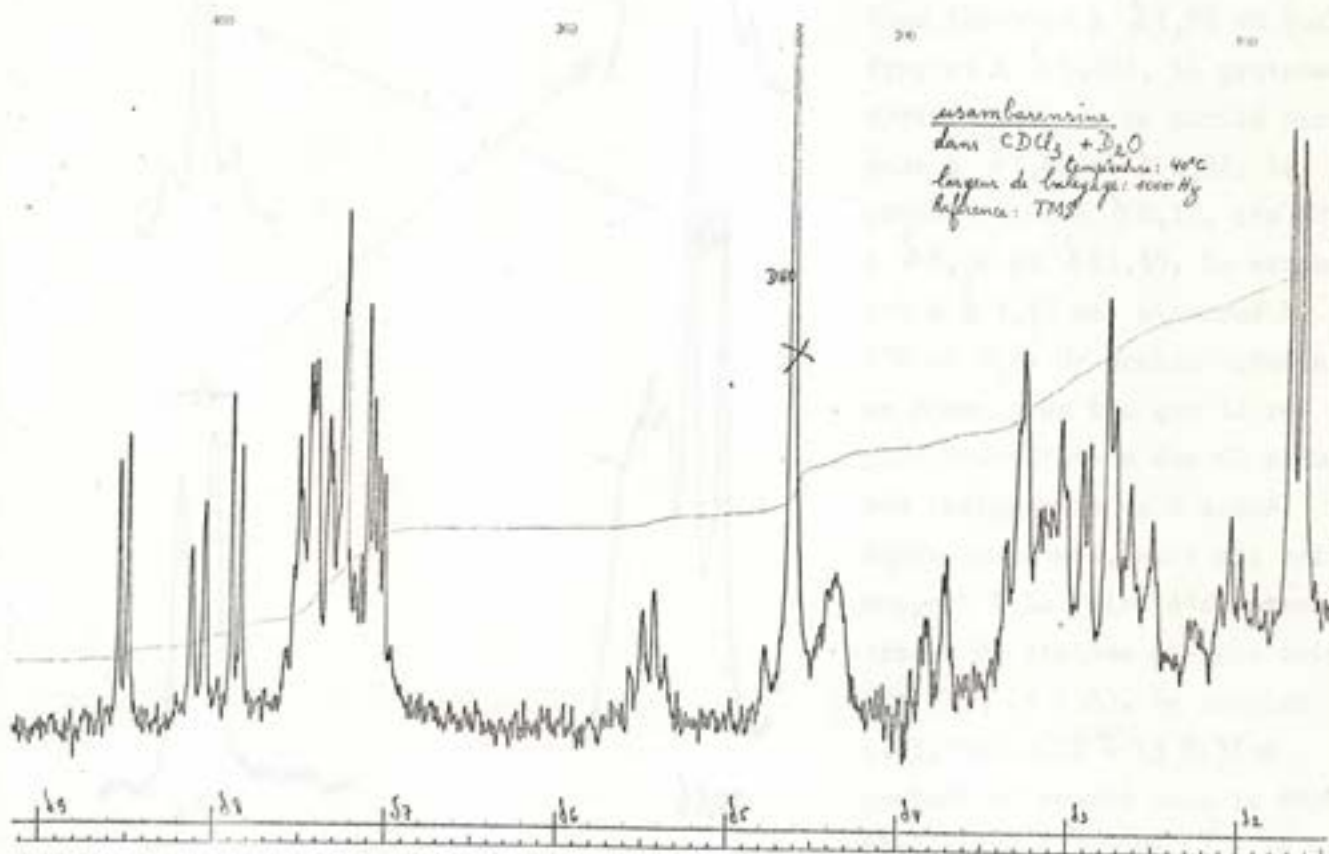


Figure n° 30

protons des C_3 et C_4 sous forme de doublets à δ 8,52 et à δ 7,86 (J 5 Hz) et le proton du C_5 sous forme de "doublet" à δ 8,08 (J 7 à 8 Hz) (118 et 119). Ces signaux se retrouvent dans le spectre de l'harmane (voir 6ème chapitre), de la pavettine (120), et de la paucidanthine (147), de l'alstonilidine (119). D'autre part, on observe en dehors d'un massif de 7 protons aromatiques et d'une forêt de 11 à 12 protons aliphatiques, un quadruplet à δ 5,43 ($J_1 = 14$ Hz; $J_2 = 7$ Hz) correspondant à un proton vinylique et un doublet à δ 1,67 ($J = 7$ Hz) attribué à un méthyle d'un radical éthyldène, deux signaux à δ 4,35 et δ 3,80 correspondant chacun à un proton et enfin deux singulets à δ 8,09 et δ 10,8 disparaissant après agitation de la solution deutérochloroformique avec de l'eau deutériée (2 fonctions NH). Par découplage par la technique de double irradiation, la relation existant entre les signaux situés à δ 5,43 et δ 1,67 est clairement démontrée.

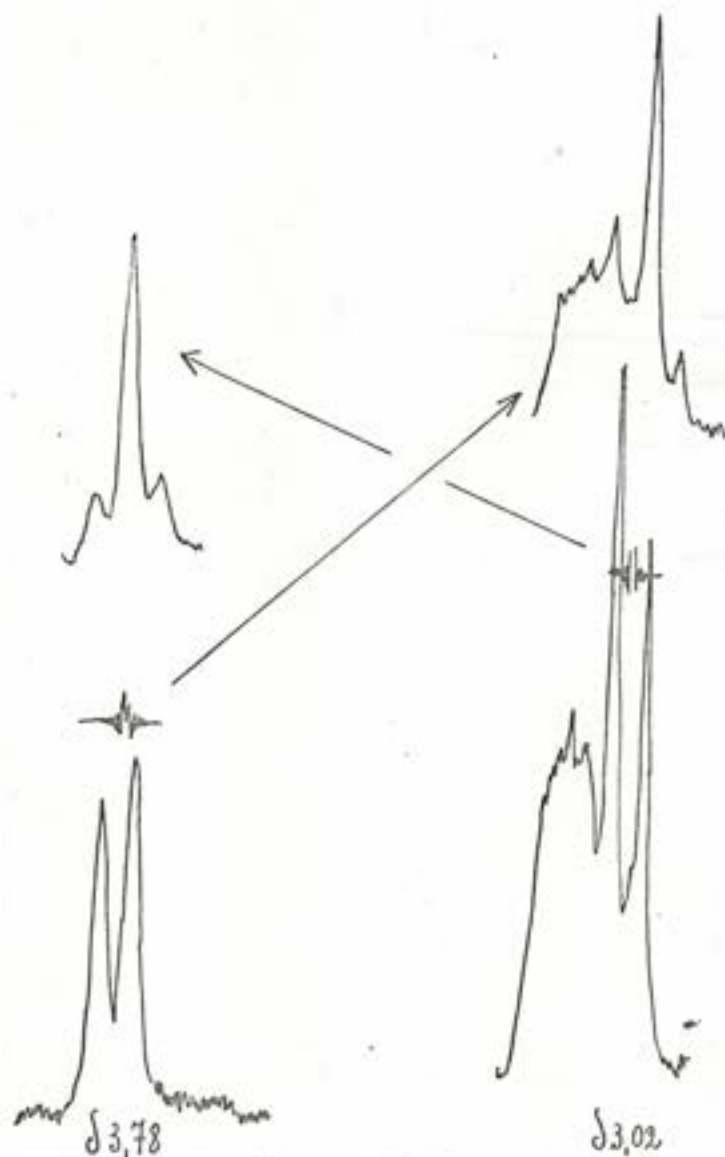


Figure n° 32
Découplage des H du C_{21}

Nous avons pu obtenir un spectre à 250 MHz (figure n° 31); le spectre a été réalisé sur une solution dans le deutérochloroforme à une température de 20°C, le tétraméthylsilane servant de référence. On y retrouve la chaîne éthyldène (doublet à δ 1,65 et quadruplet à δ 5,49), les protons pyridiniques de la partie harmane à δ 7,88 et δ 8,54, le proton en C_5 à δ 8,11, les NH à δ 8,32 et δ 11,35. Le singulet à δ 4,45 est attribué à l'H en C_3' . Ce proton situé à un champ plus bas que la région d'absorption des CH saturés indiquerait un H situé équatorialement, soit cis par rapport à la paire d'électrons libres de l'atome d'azote voisin (134 et 135). Le doublet (δ 3,78; $J = 12$ à 13 Hz) (un proton) est couplé avec le doublet situé à δ 3,02 ($J = 12$ à 13 Hz) (expérience de double



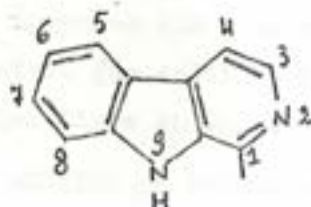
Figure n° 31
Spectre R.M.N. (Thomson 250 MHz) de l'usambarensine

irradiation)(figure n° 32). La grande constante de couplage est typique de protons géminés, tels les H du C₂₁, l'H équatorial étant le plus déblindé (δ 3,78).

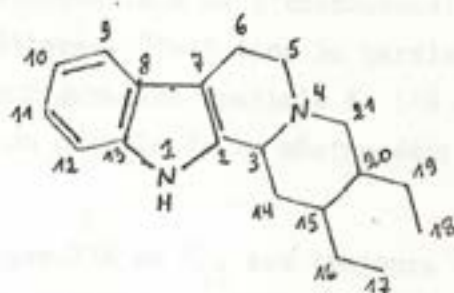
f) Proposition de structure

Tous les renseignements précédents nous permettent de proposer pour cette nouvelle base la structure ci-dessous dont il nous faut préciser la stéréochimie.

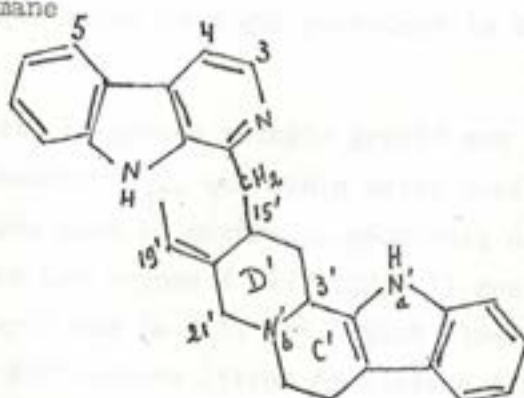
Pour la partie harmane de la molécule, nous avons suivi la numérotation officielle (I.U.P.A.C.); par contre pour la partie corynane, nous avons choisi la numérotation usuelle des phytochimistes et non celle du benz(g)indolo (2,3a) indoloquinolizine (116,117).



harmane



corynane



usambarensine

*
* *

Chapitre IV

STEREOCHIMIE DE L'USAMBARENSINE

La seule méthode infaillible est la diffraction aux rayons X. A défaut de cette analyse, nous pouvons proposer la stéréochimie de l'usambarensine sur la base de données spectrales et biogénétiques. C'est dans la partie de type corynane que nous devons préciser la configuration spatiale de l'H en C₃, ainsi que celle de l'H en C₁₅, et celle du méthyle de la chaîne éthylidénique fixée en C₂₀.

WENKERT et BRINGI ont émis l'hypothèse que l'H en C₁₅ est toujours en position α vu que tous les produits naturels analysés possédaient cette conformation (du moins ceux qui possèdent le type corynane ordinaire) (131).

D'autre part, le groupe méthyle greffé sur le C₁₉ est considéré cis par rapport au centre C₁₅, car seule cette configuration a été jusqu'à présent rencontrée dans la nature, la géométrie de la chaîne éthylidénique ayant été établie aux rayons X (127,128). Il reste donc à préciser la stéréochimie de l'H porté par le C₃. Cet H peut être α ou β -cis ou trans par rapport à la paire d'électrons libres de l'atome d'azote de la partie quinolidine de la molécule.

Nous avons préparé l'épimère en 3' de l'usambarensine après oxydation de l'alcaloïde par l'acétate mercurique (132, 133).

100 mg d'usambarensine et 120 mg d'acétate mercurique sont dissous dans 10 ml d'acide acétique glacial et placés au bain-marie à 60°C durant 24 heures. A ce moment, arrêter la réaction. Filtrer le précipité d'acétate mercurique. Eliminer l'excès d'acétate mercurique par H₂S; filtrer la solution. Diluer avec de l'eau et ajouter de la poudre de zinc (800 mg); agiter durant douze heures. Filtrer le zinc, alcaliniser par l'ammoniaque et extraire au chloroforme. Evaporer et chromatographier dans le système A (préparative); éluer et récupérer l'épimère qui, dans notre cas, possède un Rf supérieur; purifier par cristallisations successives dans l'hexane (18 mg de produit pur).

Le spectre U.V. (figure n° 33) est identique à celui de l'usambarensine (figure n° 26).

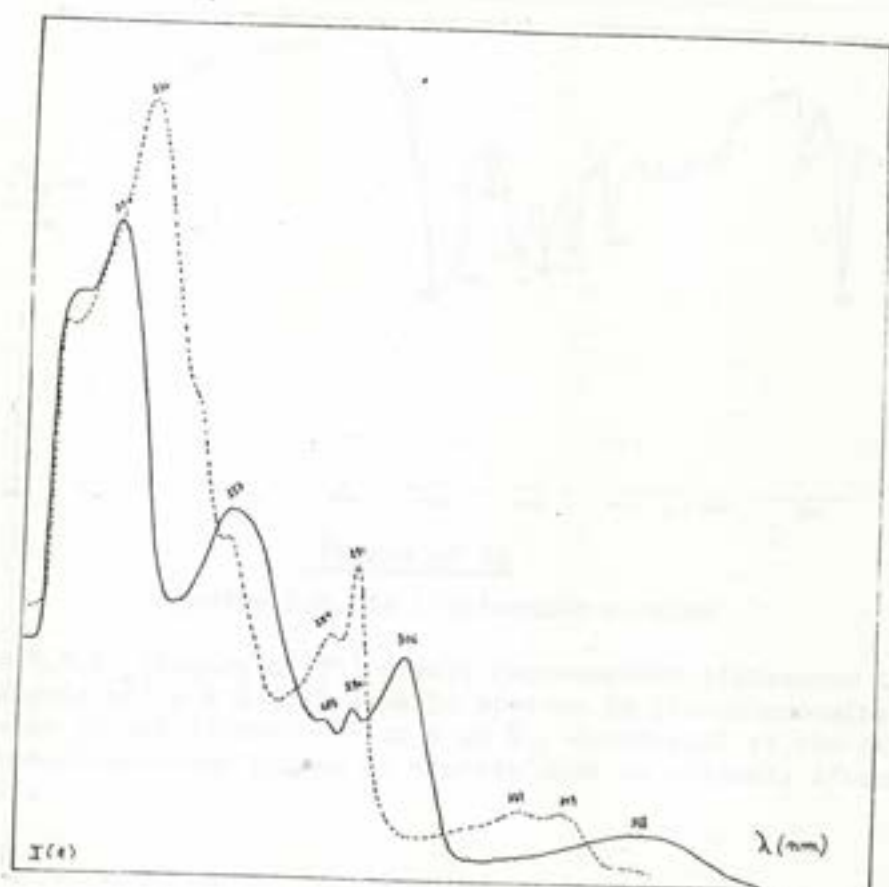


Figure n° 33

Spectre U.V. de l'épi-usambarensine
(-----: milieu neutre; ———: milieu acide)

Le spectre I.R. (pastillage dans KBr) est quasi superposable à celui de l'usambarensine. L'examen des spectres I.R. est important car il permet dans les cas favorables de déceler la présence de bandes dites de BOHLMANN. Ce chercheur a observé que la quinolizine dans laquelle au moins 2 H placés sur les C attachés à l'atome d'azote sont tous deux orientés axialement et trans par rapport à la paire d'électrons libres de l'azote, montrait une absorption I.R. dans la région $2700-2800\text{ cm}^{-1}$ (couplage de fréquences C-H). (130a). Ces bandes sont observées aussi bien en solution chloroformique qu'après pastillage dans le KBr ou KCl. Dans une étude récente, YUNUSOV et coll. ont démontré qu'il pouvait exister des différences dans les spectres I.R. des alcaloïdes contenant des cycles pipéridiniques ou quinoliziniques (région de $2500-2830\text{ cm}^{-1}$) suivant que les spectres étaient pris en solution ou en dispersion dans une phase solide. Les différences étaient dues tantôt à une instabilité des alcaloïdes en solution (inversion de la conformation au niveau de l'atome d'azote), tantôt à une distorsion des molécules en phase solide, distorsion se traduisant par des changements des angles existant entre les électrons libres de l'azote et les liaisons trans des C-H placés en α . En conclusion, les chercheurs russes conseillaient d'étayer les résultats des spectres I.R. par l'observation des spectres de résonance protomagnétique nucléaire (Signaux déblindés des protons équatoriaux cette fois) (130b). Quoi qu'il en soit, l'examen des spectres I.R. de l'usambarensine et de son épimère ne permettent pas de voir dans un des cas les bandes trans de BOHLMANN, camouflées par l'absorption de la partie harmane de la molécule (cf figure n° 43 et littérature).

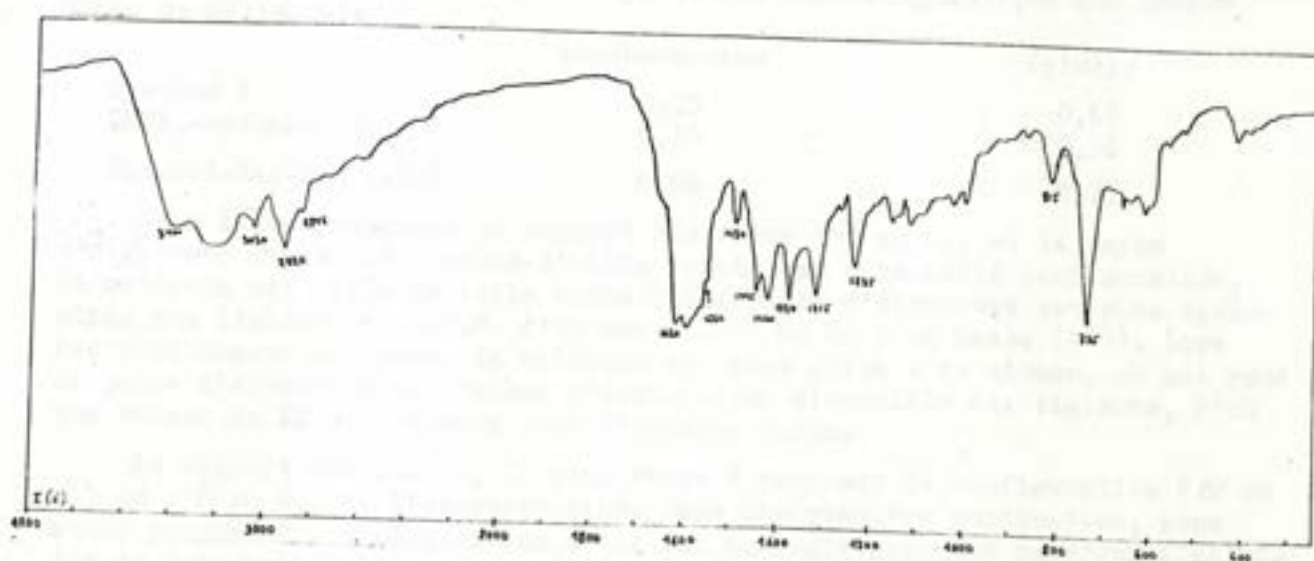


Figure n° 34

Spectre I.R. de l'èpi-usambarensine

Le spectre de R.M.N. (figure n° 35) permet heureusement d'observer la disparition du signal situé à δ 4,45 dans le spectre de l'usambarensine. Cette observation nous permet d'attribuer un H en C₃, équatorial et cis par rapport à la paire d'électrons libres de l'azote dans la molécule d'usambarensine (134,135).

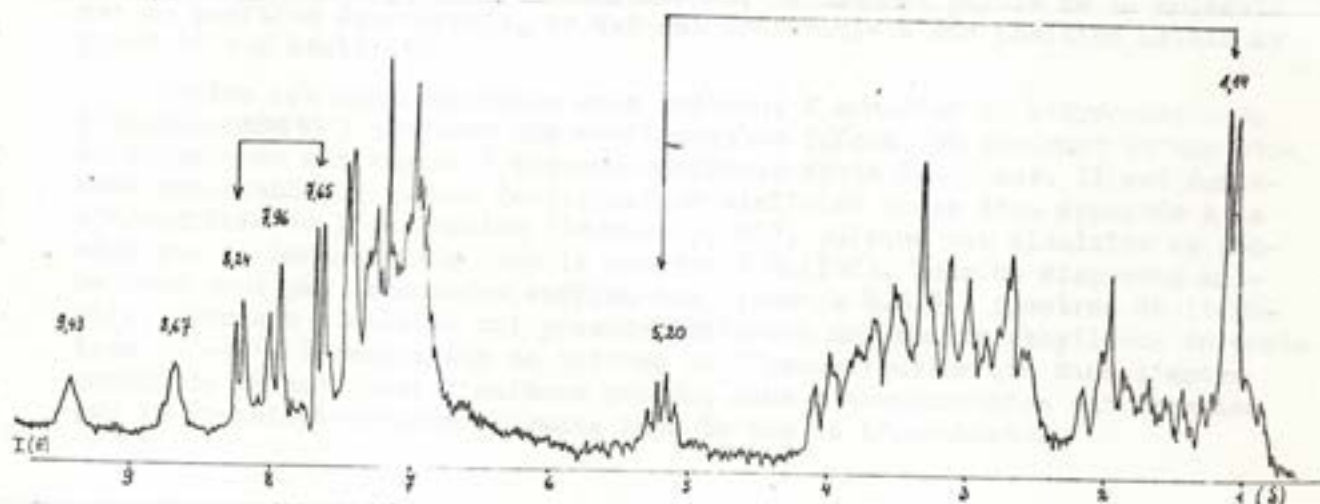


Figure n° 35

Spectre R.M.N. (Varian HA 100) de l'èpi-usambarensine (dans le CDCl_3)

Le spectre (figure n° 35) montre également quelques légères différences dans les valeurs de δ des signaux qui sont plus blindés que dans le cas de la molécule d'usambarensine; ces différences sont sans doute dues au changement de conformation lors de la formation de l'épimère.

Un second indice d'une cis-quinolizidine dans la molécule d'usambarensine réside dans le fait que lors de l'épimérisation par l'acétate mercurique, la réaction s'est passée lentement, alors que dans les molécules possédant une trans-quinolizidine, la réaction est rapide, ce qui s'observe par la précipitation d'acétate mercurique; (le complexe mercurique se fixe plus facilement axialement) (132).

Le troisième indice est le comportement chromatographique sur couche mince de Silicagel:

	usambarensine	épimère
Système A	0,35	0,66
CHCl ₃ -méthanol 9:1	0,35	0,51
Butanol-HAc-Eau 4:1:1	0,68	0,77

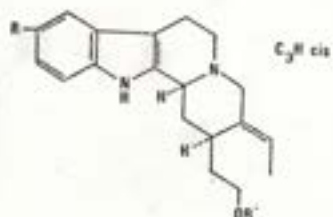
Cela laisse supposer un rapport cis entre l'H en C₃, et la paire d'électrons libres de l'atome d'azote voisin car dans cette configuration, la molécule est pliée de telle sorte que la paire d'électrons est plus disponible aux liaisons en C.C.M. d'où une valeur de Rf plus basse (133). Lors des configurations trans, la molécule est plus plate à ce niveau, ce qui rend la paire d'électrons de l'atome d'azote moins disponible aux liaisons, d'où une valeur de Rf plus élevée pour l'épimère trans.

Le rapport cis établi, il nous reste à proposer la configuration (α ou β) de l'H en C₃, de l'usambarensine. Dans une première publication, nous avons proposé une configuration β cis par analogie avec les nombreux alcaloïdes du type yohimbane et corynane (136). Malheureusement, cette comparaison n'est pas très valable car la présence de la chaîne éthyldène en position 19-20 ne favorise pas la configuration α trans, suite à la forte interaction entre le méthyle (cis par rapport au centre 15') et le substituant greffé en position 15' (128). Il faut constater que tous les alcaloïdes de ce type ont une configuration 3α cis (tableau 8 page 70). Ces alcaloïdes ne montrent pas de bandes de BOHLMANN dans les spectres I.R. (124, 124b, 128) et ne sont pas facilement attaqués par l'acétate mercurique (124, 128). D'autre part, une analyse aux rayons X a prouvé la structure 3α cis de la serpentinine (127). La même étude a mis en évidence une conformation bateau pour le cycle D. Dans cette configuration, la seconde partie de la molécule est en position équatoriale, ce qui est préférable à une position axiale au point de vue stabilité.

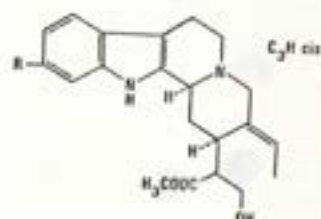
Toutes ces considérations nous incitent à modifier la stéréochimie de l'usambarensine et à proposer une configuration 3α cis, en espérant qu'une étude ultérieure aux rayons X viendra confirmer cette hypothèse. Il est également vraisemblable qu'une rectification similaire doit être apportée à la stéréochimie de l'usambarine (formule p. 45), puisque cet alcaloïde ne possède pas de bandes trans dans le spectre I.R. (102). Nous ne disposons malheureusement pas de données suffisantes (spectre R.M.N.; spectres de l'épimère) pour cet alcaloïde qui possède également une chaîne éthyldène en position 19'-20'. L'usambarine ne diffère de l'usambarensine que dans l'autre partie de la molécule: l'harmaline présent dans l'usambarensine est remplacé par le Nb-méthyl-trihydro-harmaline dans le cas de l'usambarine.

TABLEAU 8

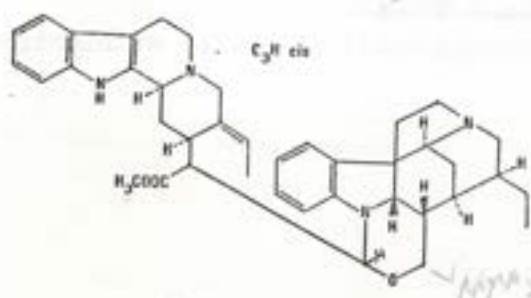
STEREOCHIMIE DES ALCALOÏDES DE TYPE CORYNANE POSSÉDANT
UNE CHAÎNE ÉTHYLÈNE EN POSITION 20



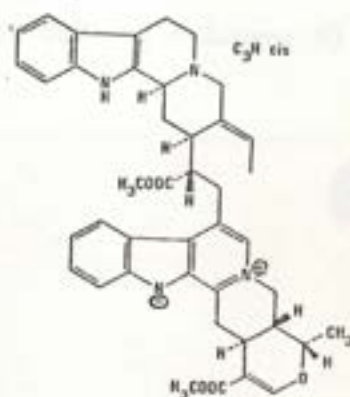
$R=H, R'=H$ geissoschizol
 $R=OCH_3, R'=H$ 10-méthoxy-geissoschizol
 $R=OH, R'=H$ N^b-CH_3 -hunterabrine



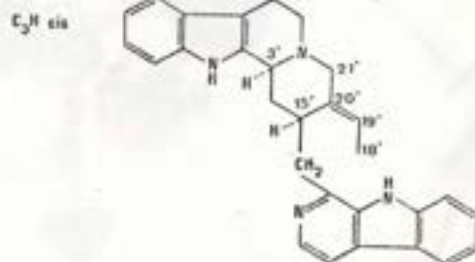
$R=H$ isocaltagirine
 $R=OCH_3$ hervine



geissospermine



serpentinine



usambarensine

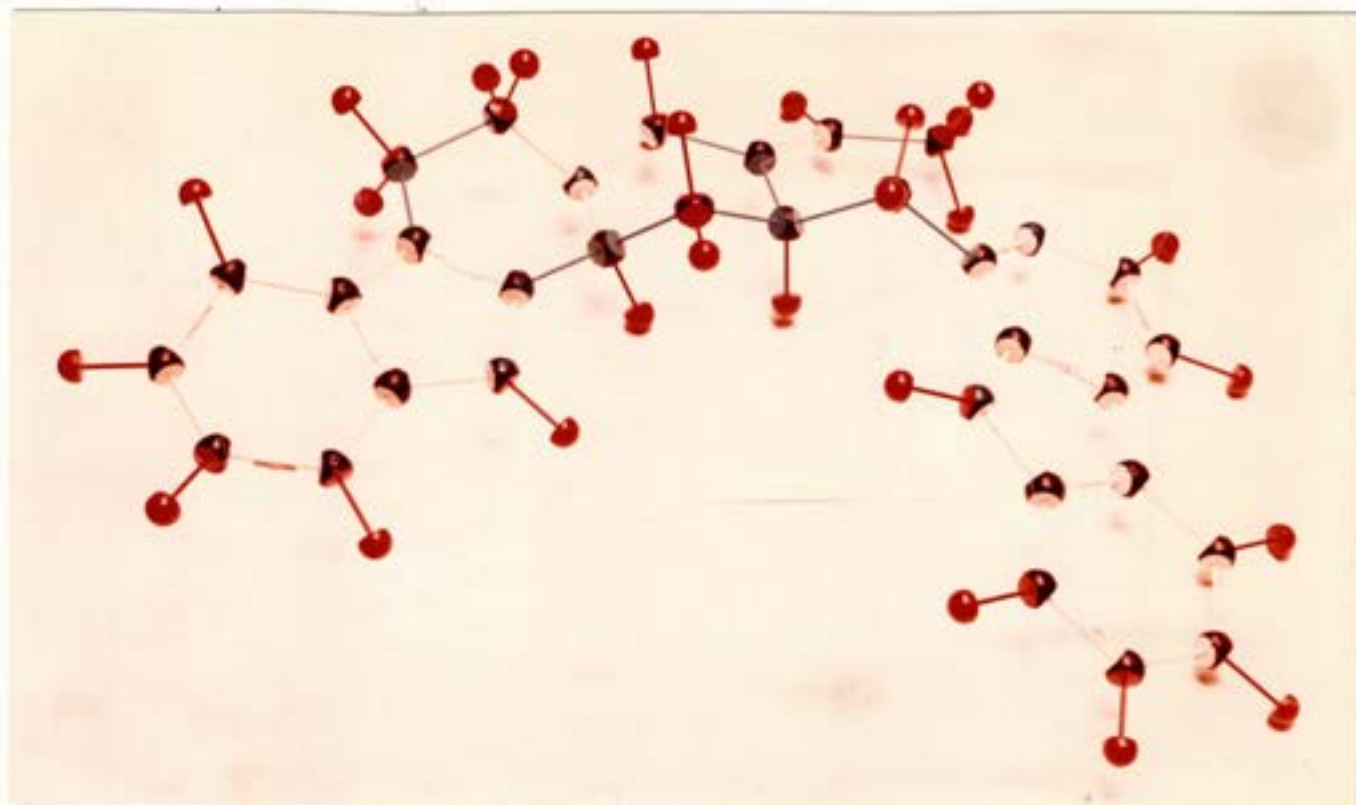


Figure n° 36

Modèle moléculaire éclaté de l'usambarensine (Noir: C; Bleu: N; Rouge: H)

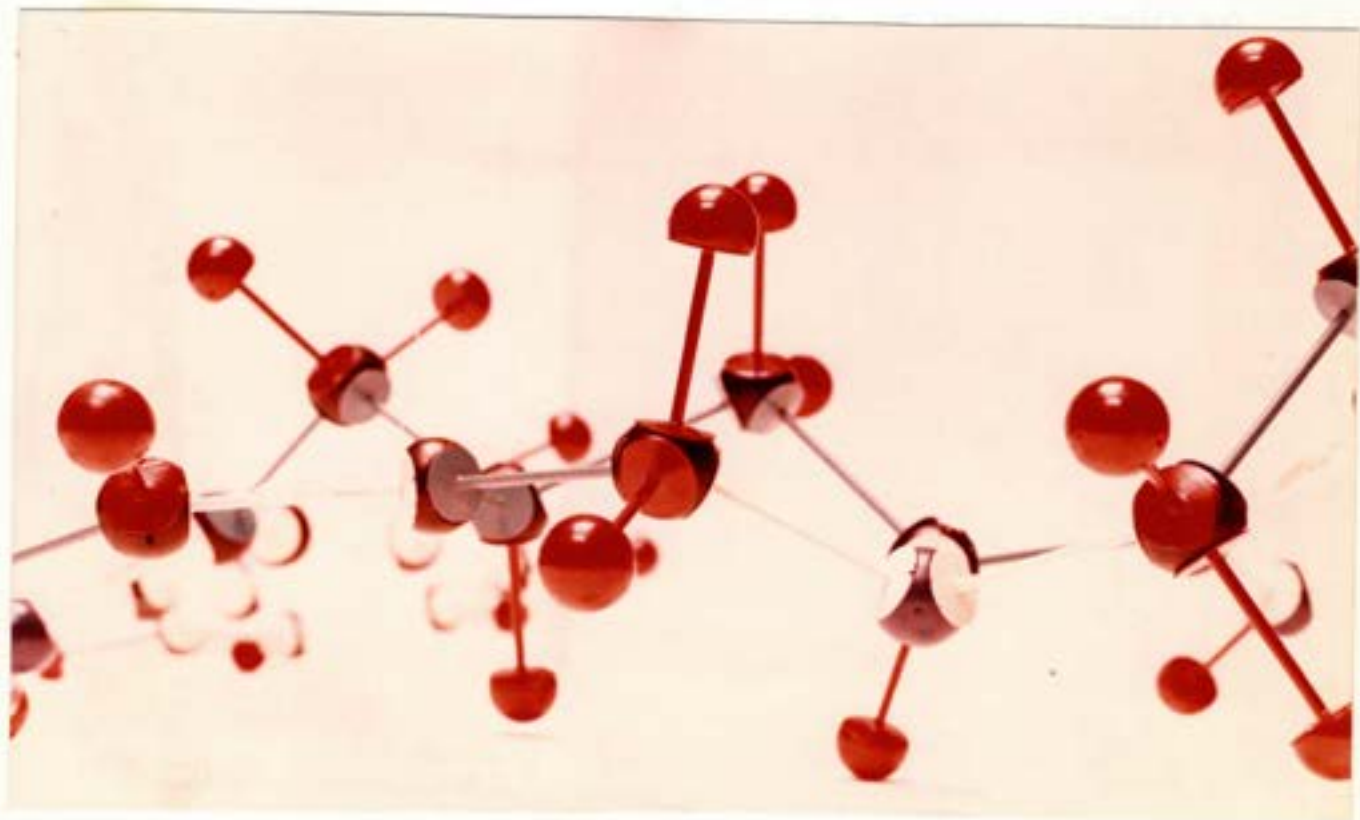


Figure n° 37

Détail (jonction des cycles C' et D', N à l'avant plan
C' à droite et D' à gauche de N)

Chapitre V

3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

Le second alcaloïde est une poudre jaune microcristalline donnant en chromatographie sur couche mince de Silicagel, dans le système A, un Rf de 0,25. Il a été isolé par chromatographie préparative et purifié par cristallisations successives dans l'hexane (alcaloïde du 1er groupe) (Rendement: 0,18 %; 211 mg alc. à partir de 3 g de L II).

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{29}H_{30}N_4$ (PM 434) (M^+ trouvé=434,2466; calculé=434,2470). Cette formule indique à nouveau l'absence d'oxygène et la présence de 17 insaturations.

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet

Le spectre (dans l'éthanol absolu) λ_{max} nm (log ϵ) 229(4,49), 284(3,92), 291(3,96), et 318 (3,94) peut être considéré comme la somme des chromophores de l'indole et de l'harmaline (112).

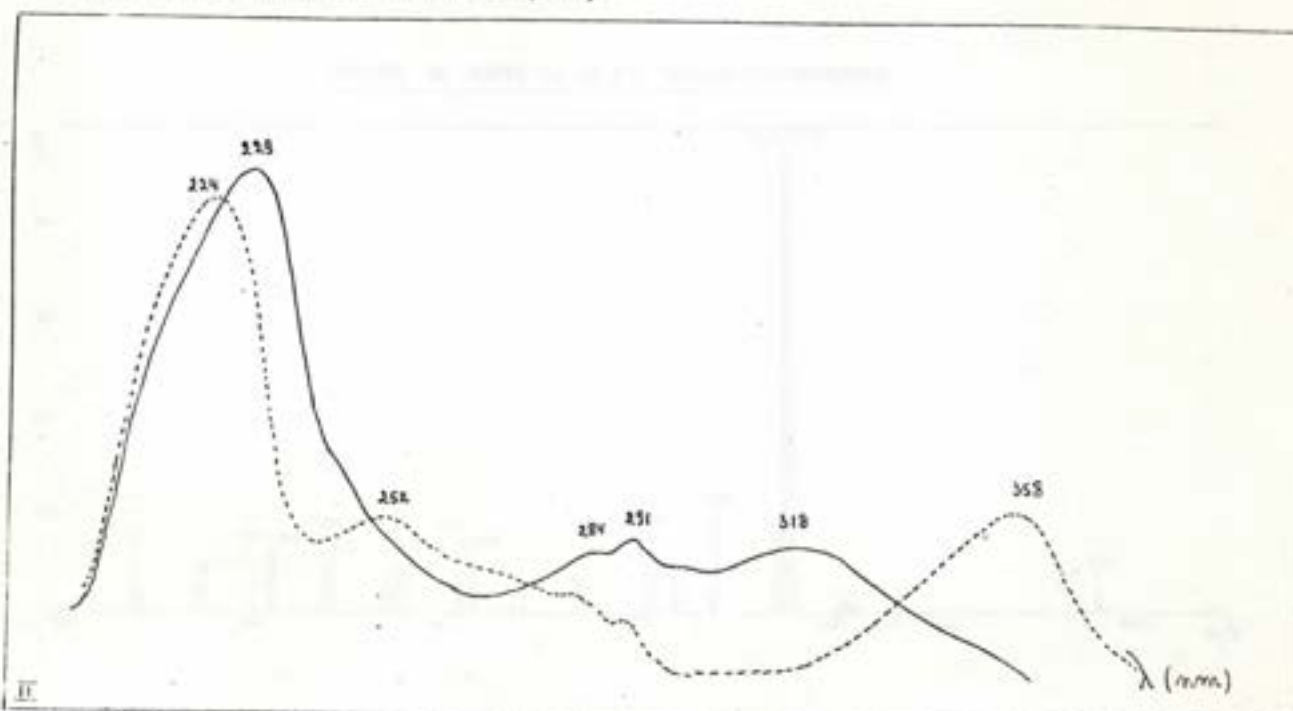


Figure n° 38

Spectre U.V. de la 3,4-dihydro-usambarensine
(— : milieu neutre et alcalin; --- : milieu acide)

La fluorescence verte observée aux U.V. longs est en accord avec le chromophore de l'harmalane. Le spectre n'est pas modifié en milieu alcalin. En milieu acide, il y a une modification importante due à la partie harmalane de la molécule: λ_{max} nm: 224, 252, 284, 291 et 358.

c) Spectrophotométrie infra-rouge

Le spectre I.R. (KBr) est très proche de celui de l'usambarensine et présente des bandes à ν 3400-3200 (NH), 2920, 2840 (CH), 1590 (C=N) et 1550 (C=C), 740 (benzène orthodisubstitué) cm^{-1} .

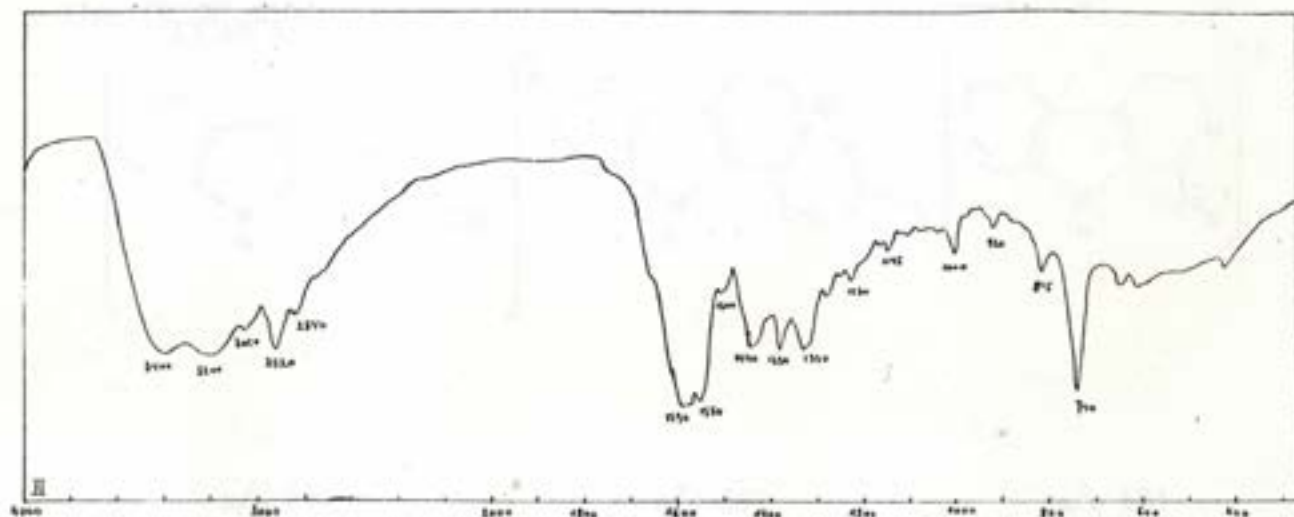


Figure n° 39

Spectre I.R. de la 3,4-dihydro-usambarensine

d) Spectrométrie de masse

SPECTRE DE MASSE DE LA 3-4 DIHYDRO-USAMBARENSINE

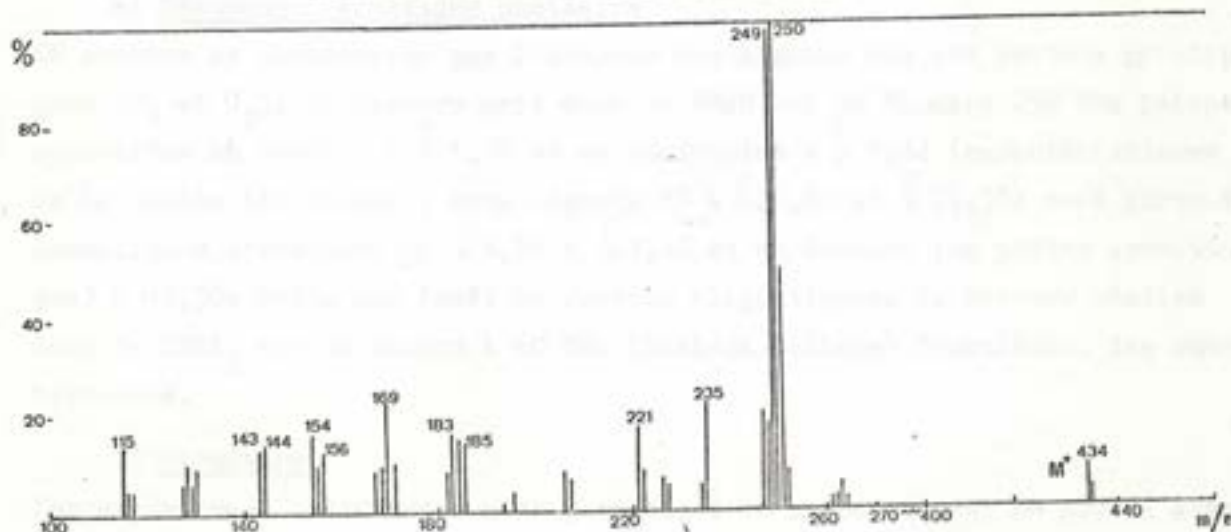
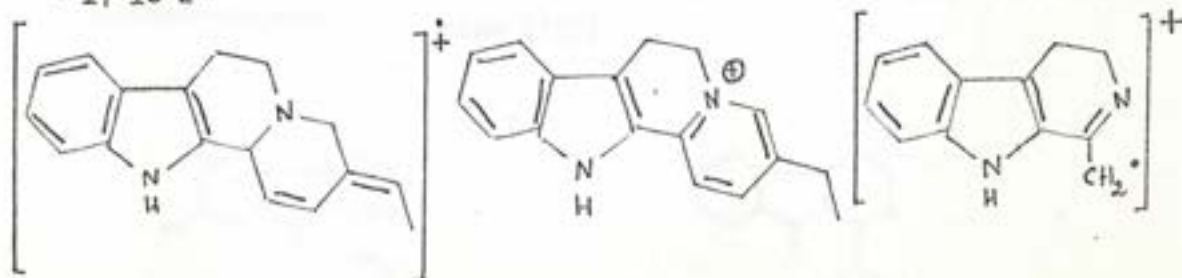


Figure n° 40

Le spectre de masse pris à la t^* de 190°C présente une fragmentation proche de celle de l'usambarensine m/e (intensité relative): 434 [M^+](9), 250(100), 249(98), 235(22), 221(17), 185(14), 184(15), 183(16), 182(8), 171(10), 169(22), 156(12), 155(14), 154(16), 144(14), 143(13), 130(9).

L'ion m/e 183 (trouvé: 183,0923; calculé 183,0922) correspond à la partie harmalane ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2$), tandis que l'ion m/e 250 (trouvé: 250,1451; calculé: 250,1470) représente la partie de la molécule de type tétrahydro- β -carboline ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2$).



m/e 250

m/e 249

m/e 183

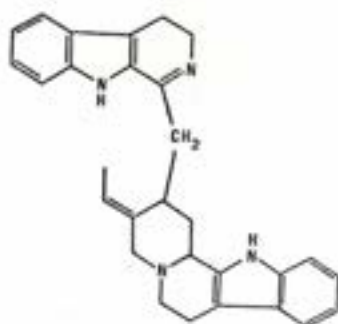
Les ions de la partie harmane sont remplacés par ceux de la partie harmalane qui est l'homologue saturé en 3,4 de l'harmane donc d'un P.M. supérieur de 2 unités. La seconde différence est le pic de base à m/e 250 et non à m/e 251 comme dans le cas de l'usambarensine. En effet, la formation de l'ion 251 est moins favorisée pour le dérivé dihydro que pour l'usambarensine contenant l'harmane complètement aromatique. Le type de fragmentation de l'usambarensine se rapproche de celui de l'émétamine, tandis que celui de la 3,4-dihydro-usambarensine est à comparer à celui de la psychotrine (115).

e) Résonance magnétique nucléaire

Le spectre se caractérise par l'absence des signaux dus aux protons pyridiniques (C_3 et C_4). Le spectre pris dans le DMSO sur un Thomson 250 MHz laisse apparaître un doublet à δ 1,35 et un quadruplet à δ 5,34 (caractéristiques de la chaîne éthylidène), deux signaux NH à δ 10,84 et δ 11,35; sept protons aromatiques s'étendant de δ 6,96 à δ 7,44 et un doublet (un proton aromatique) à δ 7,56; enfin une forêt de protons aliphatiques. Un spectre réalisé dans le CDCl_3 sur un Varian A 60 MHz (Chelsea College) fournissait les mêmes résultats.

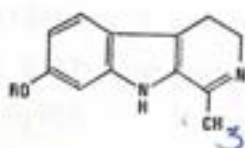
f) Structure

Les expériences précédentes nous permettent de proposer pour ce nouvel alcaloïde la structure suivante:

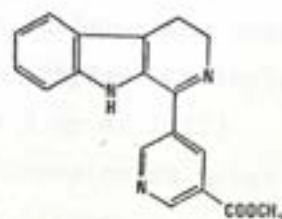


3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

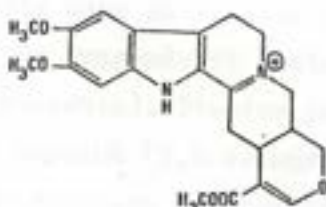
Nous signalerons au passage que les 3,4-dihydro-β-carbolines représentent un état d'oxydation que l'on a trouvé rarement dans la nature. A notre connaissance, l'harmaline, l'harmalol et la naucledine (137) constituent les seuls exemples connus. Par extension, on pourrait y ajouter les alcaloïdes de structure plus complexe tels l'ochroproposine (138) et la déhydro-ochrolifuanine (139)



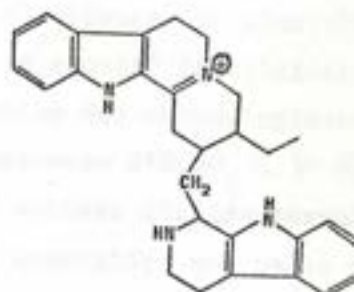
HARMALINE (R=CH₃)
HARMALOL (R=H)



(NAUCLEDINE)



OCHROPROPOSINE



DEHYDRO-OCHROLIFUANINE

Figure n° 41

Autres alcaloïdes de type "3,4-dihydro-β-carboline"

g) Stéréochimie

La conformation de l'H du C₁₅, ainsi que celle de la chaîne éthylidène est sans doute identique à celle de l'usambarensine. Il reste la configuration au niveau de l'H du C₃, et la jonction des cycles C' et D'. Le spectre R.M.N. ne nous est pas utile car les protons du C₃ se superposent au signal éventuellement déblindé du proton du C₃. Seule une étude plus poussée nous renseignerait sur la stéréochimie complète de cet alcaloïde.

Chapitre VI

HARMANE

L'harmane est un alcaloïde que nous avons purifié par chromatographie préparative sur Silicagel dans le système A. (Rf: 0,63 dans ce système). Après élution par le méthanol, il a été soumis à des cristallisations successives dans l'éther. C'est un alcaloïde mineur du *Strychnos usambarensis*, comparativement à l'usambarensine et ses dérivés dihydro et méthylés. (Rendement: 0,036 %) (40 mgr alc. à partir de 3 gr de L II)

a) Point de fusion: 237-238°C; pas de dépression du point de fusion, lorsque l'alcaloïde isolé est mélangé avec de l'harmane de référence (firme Fluka)

b) Chromatographie sur couche mince de Silicagel Merck
L'alcaloïde se situe au même Rf que l'harmane de référence. De plus, il présente la même fluorescence bleue laiteuse lorsqu'il est observé aux U.V. Il est révélé dans le visible par les réactifs classiques des alcaloïdes: le réactif de Dragendorff (coloration orange), le réactif iodoplatinique (coloration violette). D'autre part, la pulvérisation des chromatoplaques par un réactif oxydant (9,8 volumes d'une solution aqueuse d' H_2SO_4 à 30 %; 0,2 volume d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 5 %; 10 volumes d'acide perchlorique à 36 %) suivie d'un chauffage à l'étuve laisse apparaître une belle coloration rose (125).

c) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet
Les spectres ont été effectués sur une solution méthanolique.
Le spectre λ_{max} . nm (log ϵ) 234 (4,57), 242 (épaulement), 250 (4,37), 283 (épaulement), 288 (4,22), 336 (3,67), 348 (3,67) correspond au chromophore de l'harmane.

En milieu acide, nous observons un effet bathochrome marqué ainsi que la perte des bandes fines qui crénelaient le spectre (140). Il n'y a pas de modification en milieu alcalin.

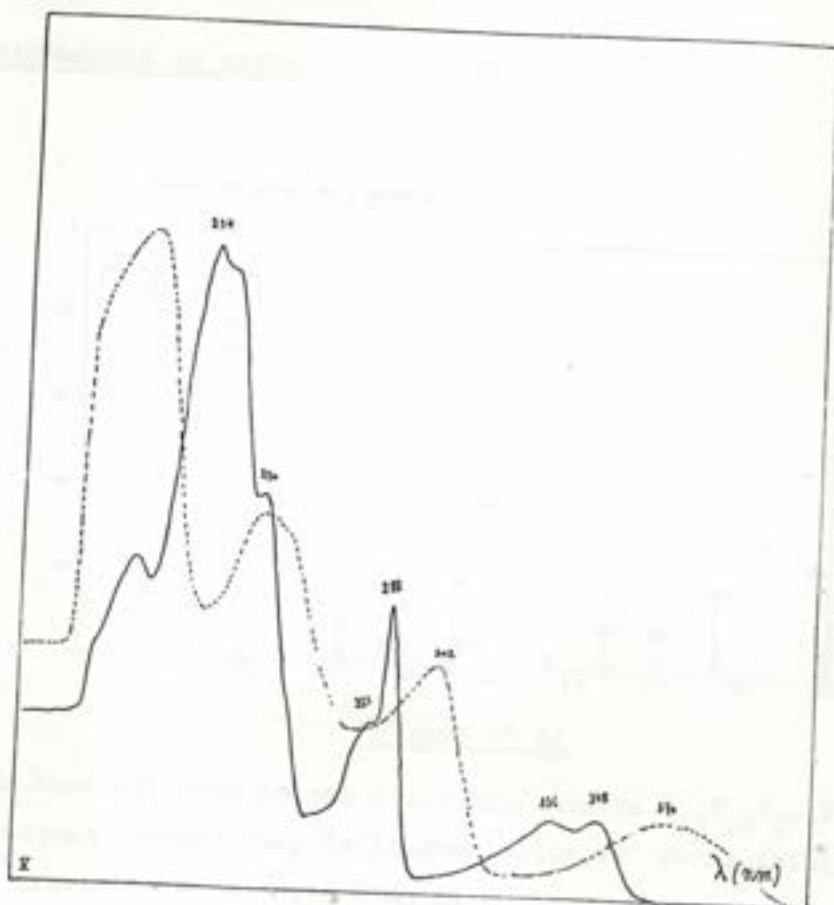


Figure n° 42

Spectre de l'harmane
(—:milieu neutre;---:milieu acide)

d) Spectrophotométrie dans l'infra-rouge

Pastillage de l'alcaloïde dans KBr. Il présente des bandes à ν 3.130, 3060, 2.950, 2.860, 2.780, 1.625, 1.557, 1.490, 1.435, 1.370, 1.312, 1.252, 1.240, 1.225, 810 et 740 cm^{-1} . Le spectre est superposable à ceux renseignés dans la littérature (141).

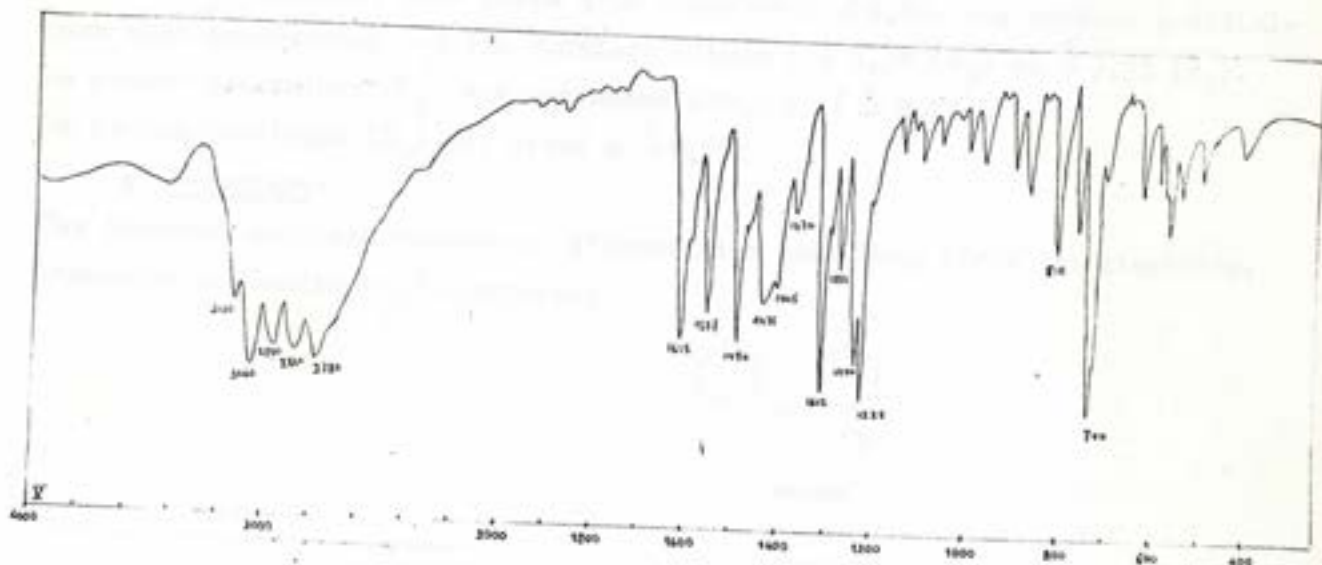


Figure n° 43

Spectre I.R. de l'harmane

e) Spectrométrie de masse

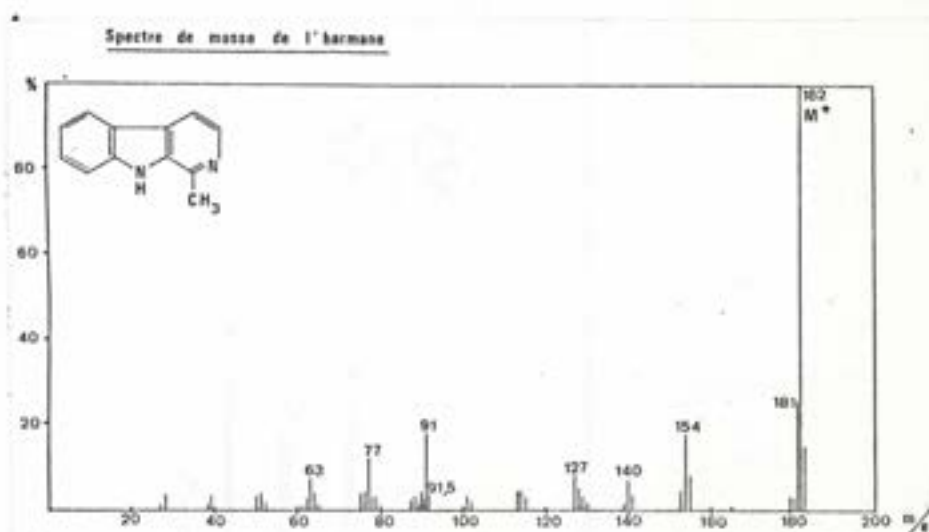


Figure n° 44

Le pic de base est dans ce cas l'ion moléculaire $C_{12}H_{10}N_2$. Vu la grande stabilité du noyau aromatique, la fragmentation est assez faible.

L'ion m/e 181 provient de la perte d'un H.

L'ion m/e 154 correspond à la perte de 27 unités de masse (perte d'HCN qui serait une fragmentation typique des alkylpyridines (123bis)). L'ion m/e 91 peut correspondre à l'ion moléculaire chargé deux fois positivement (M^{++}) mais aussi à l'ion tropylium tandis que l'ion m/e 77 fait penser à un ion phényle (C_6H_5).

f) Résonance magnétique nucléaire

Le spectre (figure n° 45) a été pris en solution dans le deutérochloroforme, à la température de 20°C, à l'aide d'un appareil THOMSON 250 MHz. Le groupe méthyle (C_1) apparaît sous forme d'un singulet à δ 2,83. Les protons pyridiniques sont représentés par les doublets situés à δ 8,38 (H_3) et δ 7,83 (H_4). Le proton benzénique (H_5) est nettement déblindé (δ 8,13). Le proton indolique (H_9) est situé à δ 8,59.

g) Structure:

Ces diverses analyses permettent d'identifier sans coup férir cet alcaloïde: l'harmane ou 1-méthyl- β -carboline.



HARMANE

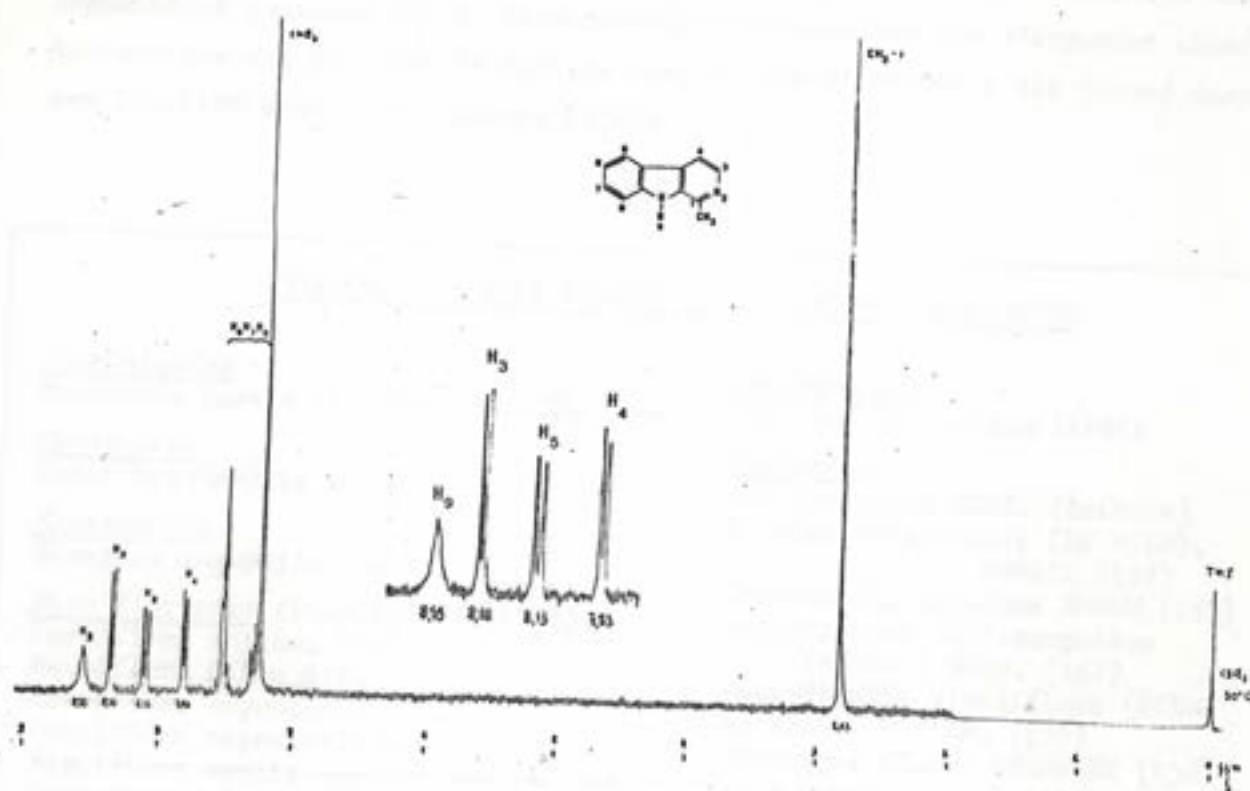


Figure n° 45

Spectre R.M.N. (250 MHz) de l'harmaline

h) Chimiotaxonomie

L'harmaline est isolée pour la première fois à partir d'une loganiacée. Cet alcaloïde a plusieurs synonymes dont aribine et loturine. L'aribine fut isolée en 1861 de l'Arariba rubra (142) et la loturine en 1878 à partir de Symplocos racemosa (écorce de Lotur) (143), deux plantes dont l'écorce constituait un succédané du quinquina. Cependant la structure de ces alcaloïdes ne fut pas précisée à l'époque.

Étudiant les alcaloïdes du Peganum harmala L., FISCHER observa que l'harmaline par déméthoxylation donnait un composé de formule brute $C_{12}H_{10}N_2$, qu'il appela harmaline (144). Plus tard, SPATH montra l'identité de ce corps, d'une part avec l'aribine, d'autre part avec la loturine (145). Enfin NEU signala que la passiflorine isolée par PECKOLT en 1909 de la passiflore était également de l'harmaline (146).

La présence d'harmaline dans le Strychnos usambarensis n'est cependant pas surprenante pour 3 raisons:

1° l'usambarensine est un alcaloïde dimère constitué d'une partie harmaline reliée à une partie de type corynanthe.

2° le dérivé quaternaire de l'harmaline: Nb-méthyl-harmaline ou mélinonine F a été isolé en 1957 à partir d'un Strychnos sud-américain: le Strychnos melinoniana (149).

3° d'autre part l'harmène a été retrouvé dans diverses plantes de la famille des rubiacées, très proches d'un point de vue chimiotaxinomique des loganiacées (tableau 9). Il faut cependant reconnaître que l'argument chimiotaxinomique est plus faible dans ce cas, vu que l'harmène a été trouvé dans des familles sans lien apparent (150)!

TABEAU 9

PLANTES A PARTIR DESQUELLES L'HARMÈNE A ÉTÉ ISOLÉ

<u>Bignoniacées</u>	<u>Polygonacées</u>
Newboldea laevis (P. BRAUV.) SEEM. (148)	Calligonum minimum LIPSKI
<u>Cypéracées</u>	<u>Rubiacées</u>
Carex brevicollis DC.	Arariba rubra MART. (Aribine)
<u>Eleagnacées</u>	Nauclea diderrichii (DE WILD). MERRIL (137)
Eleagnus angustifolius L.	Ophiorrhiza japonica BLUME (153)
<u>Passifloracées (Passiflorine) (146)</u>	Pauridiantha callicarpoides (HIERN.) BREM. (147)
Passiflora actinea HOOK	Pauridiantha viridiflora (SCHW. ex HIERS) HEPPER. (199)
Passiflora alata ALT.	Sickingia klugei STANDLEY (152)
Passiflora bryonoides H.B.K.	<u>Sapotacées</u>
Passiflora capsularis L.	Gambeya lacourtiana (DE WILD) AUBR. et PELL. (151)
Passiflora edulis SIMS	<u>Styracacées</u>
Passiflora eichleriana MAST.	Symplocos racemosa ROXB. (loturine)
Passiflora incarnata L.	<u>Zygophyllacées</u>
Passiflora quadrangularis L.	Zygophyllum fabago L.
Passiflora suberosa L.	

*
* *

Chapitre VII

N^b-METHYL-USAMBARENSINE

§ I. ISOLEMENT

L'isolement des alcaloïdes du 2ème groupe - dont fait partie cet alcaloïde - fut très laborieux car ils jouissent de propriétés spéciales: ils précipitent en milieu alcalin comme les alcaloïdes tertiaires mais ils sont très peu solubles dans les solvants organiques (ils forment un précipité à l'interphase lors des procédés classiques d'extraction).

En chromatographie, ils ont un comportement intermédiaire entre les bases tertiaires et quaternaires. Ces propriétés sont dues à la présence d'un groupe méthyle greffé sur l'atome d'azote de la partie quinolizidine de la molécule (N^b), ce qui constitue un nouveau type d'alcaloïdes indoliques possédant à la fois une fonction amine tertiaire et une fonction ammonium quaternaire.

Les alcaloïdes de ce groupe ont été isolés de la façon suivante:

- 1° séparation chromatographique à l'échelle préparative sur Silicagel dans le système B: acétate d'éthyle-isopropanol-ammoniaque diluée: 60:25:15.
- 2° élution des deux zones alcaloïdiques par le méthanol contenant 2 % d'acide acétique ou formique (l'élution par le méthanol seul est incapable de détacher ces substances polaires du Silicagel).
- 3° l'éluat est concentré sous vide; le résidu est solubilisé dans de l'eau distillée et les alcaloïdes sont précipités sous forme de picrates par une solution saturée d'acide picrique. Les picrates sont recueillis après séjour en glacière, solubilisés dans un volume minimum d'acétone-eau 9:1 et transformés en chlorures par passage sur résine échangeuse d'ions Amberlite IRA 400.
- 4° les chlorures d'alcaloïdes sont alors soumis à une dernière séparation chromatographique sur colonne de cellulose dans les conditions décrites dans le chapitre X. Des fractions de 20 ml sont récoltées et analysées par chromatographie analytique dans d'autres systèmes. Les fractions semblables sont réunies et évaporées; le résidu est repris par du méthanol et l'alcaloïde est recueilli après cristallisation dans le mélange

méthanol-éther.

§ 2. ANALYSE

La méthyl-usambarensine est une poudre blanche microcristalline.
(Rendement: 800 mg d'alc. (Cl^-) à partir de 3 gr de L II, soit 0,76 %).
(P.F. du chlorure: 219°C). En chromatographie sur couche mince de Silicagel, elle se situe aux R_f suivants:

- a) Système B = R_f de 0,35
- b) Propanol-ammoniaque concentrée : 8:2 R_f de 0,68
- c) Butanol-Acide acétique-Eau : 4:1:1 R_f de 0,53
- d) Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque conc.: 45:10:1,5 R_f de 0,30
- a) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et dans l'infra-rouge

Le spectre U.V. (dans l'éthanol absolu) est superposable à celui de l'usambarensine et présente le même comportement aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin.

L'alcaloïde montre d'ailleurs la même fluorescence bleue aux U.V. longs.

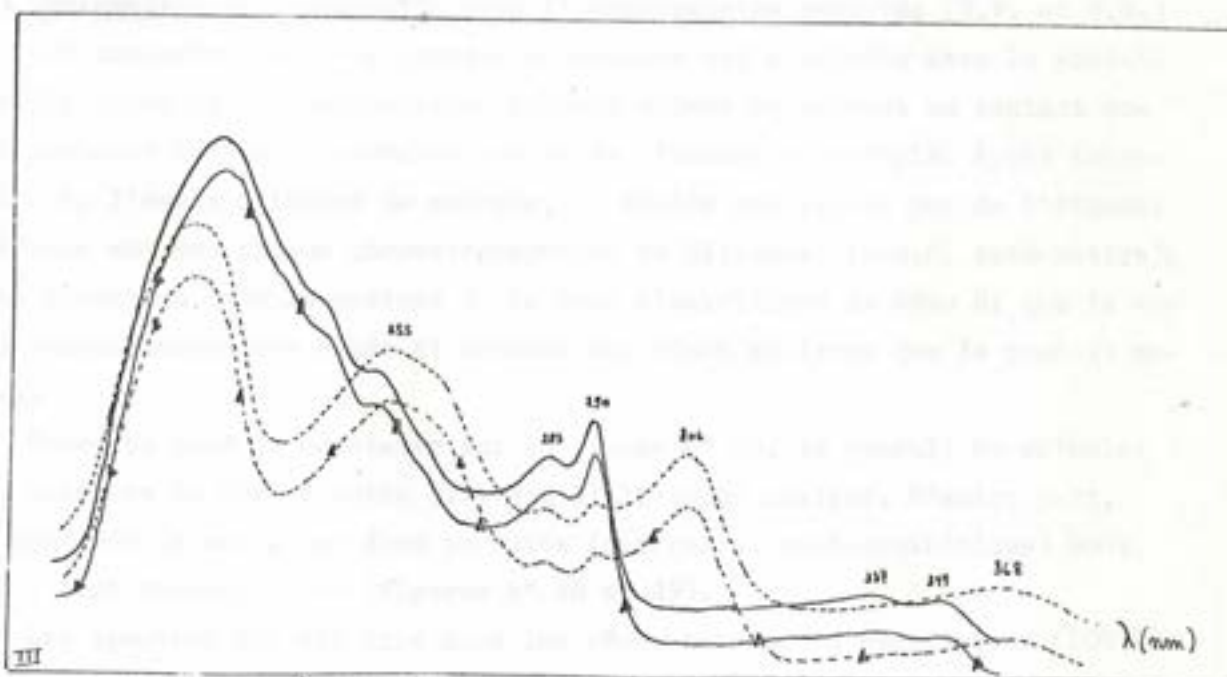


Figure n° 46

Spectres U.V. de la méthyl-usambarensine
(—:milieu neutre et alcalin; ---:milieu acide)
ainsi que du produit de méthylation de l'usambarensine
(Δ—Δ:milieu neutre et alcalin; ×—×:milieu acide)

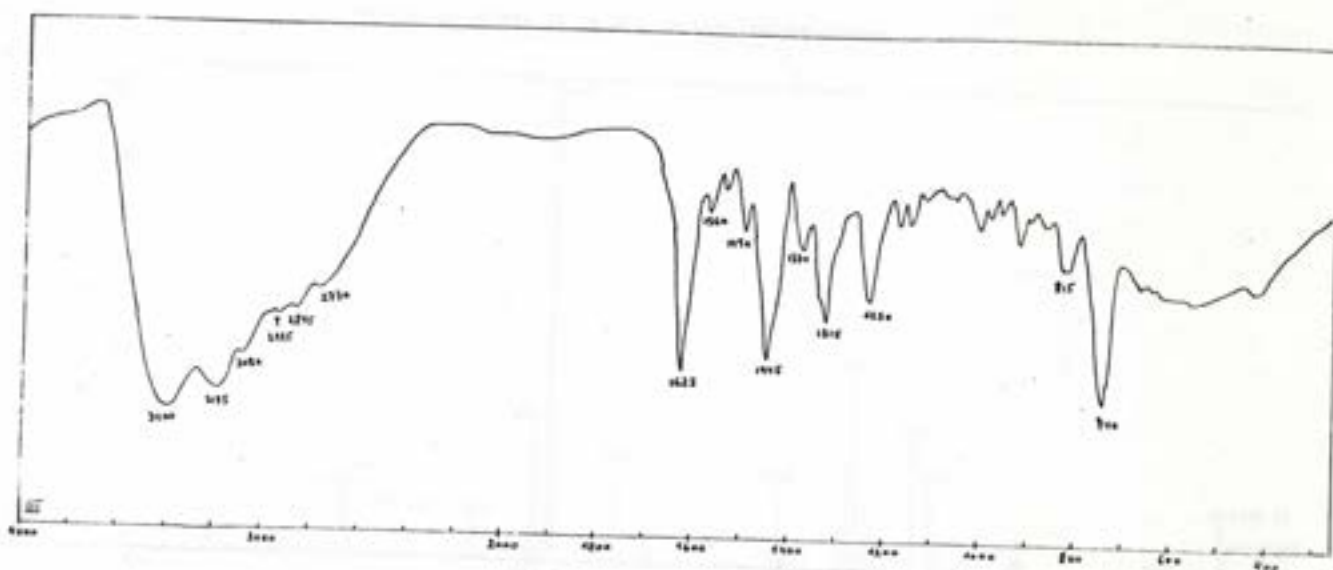


Figure n° 47

Spectre I.R. de la méthyl-usambarensine

Le spectre I.R. (pastillage dans KBr) est également très proche de celui de l'usambarensine.

b) Comparaison de l'alcaloïde avec l'usambarensine méthylée (U.V. et S.M.)

Ces analogies nous ont poussés à comparer cet alcaloïde avec le produit de méthylation de l'usambarensine, produit obtenu en mettant en contact durant quelques heures l'usambarensine et de l'iodure de méthyle. Après évaporation de l'excès d'iodure de méthyle, le résidu est repris par de l'éthanol et déposé sur une plaque chromatographique de Silicagel (C.C.M. préparative); après migration dans le système B, la zone alcaloïdique de même Rf que la méthyl-usambarensine est éluée et soumise aux mêmes analyses que le produit naturel.

Comme on peut le constater sur la figure n° 46, le produit de méthylation présente le même spectre U.V. que l'alcaloïde analysé. D'autre part, les spectres de masse des deux produits (naturel et semi-synthétique) sont tout à fait superposables (figures n° 48 et 49).

Les spectres ont été pris dans les mêmes conditions opératoires (200°C). Le spectre de masse du produit naturel montre à côté de l'ion moléculaire M^+ à 447(5) et de $M^+ - 1$ à 446(12), des pics à m/e (intensité relative) 265(18), 264(12), 261(27), 251(14), 249(16), 248(41), 247(20), 233(16), 199(20), 186(28), 185(100=pic de base), 182(28), 169(9), 156(8), 154(9), 144(17), 143(15).

Le spectre de masse du produit de méthylation de l'usambarensine est le suivant: m/e (intensité relative) 447(M^+)(3), 446($M^+ - 1$)(10), 265(12), 264(8), 261(30), 251(15), 249(15), 248(29), 247(15), 233(10), 199(13), 186(23), 185(100=pic de base), 182(18), 169(6), 156(6), 154(6), 144(11), 143(19).

Le pic à m/e 446 correspond vraisemblablement à l'ion moléculaire ayant subi

SPECTRE DE MASSE DE LA N'-METHYL-USAMBARENSINE

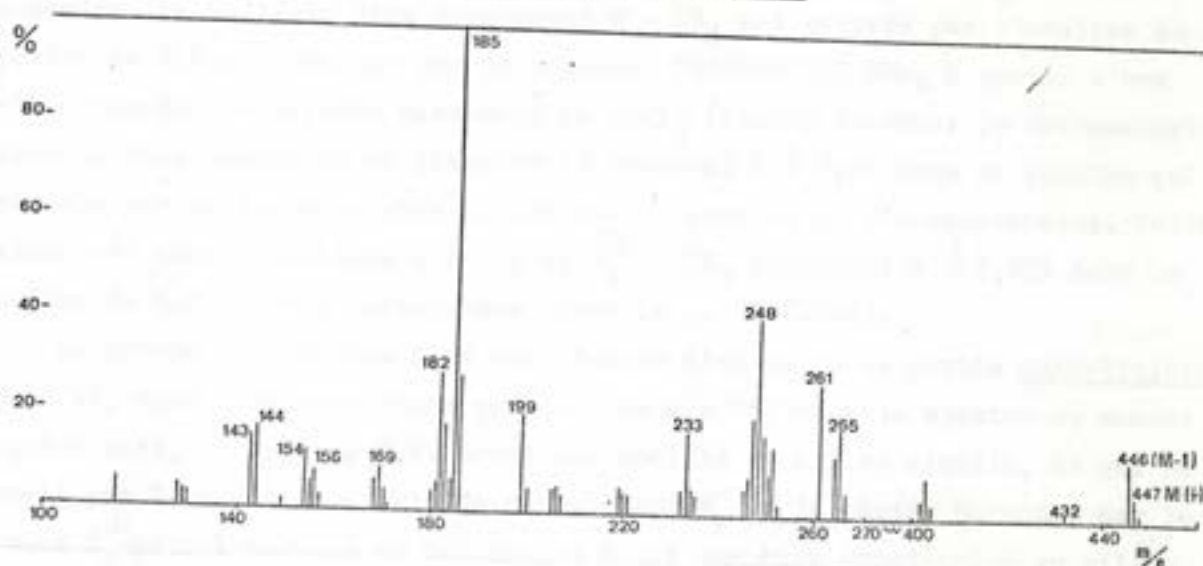


Figure n° 48

SPECTRE DE MASSE DU PRODUIT DE METHYLATION DE L'USAMBARENSINE

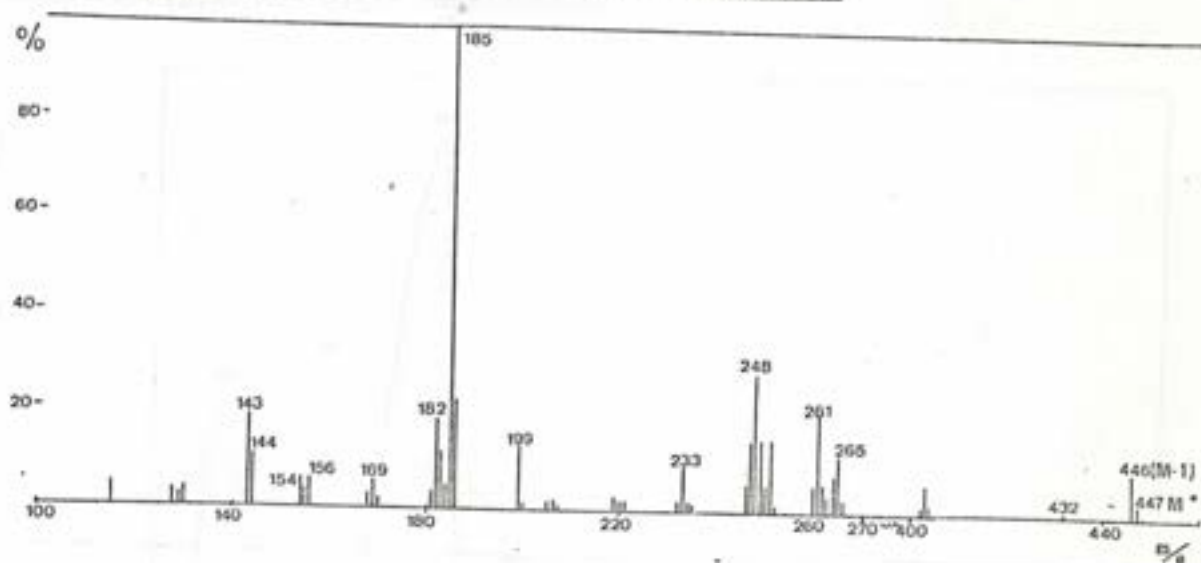
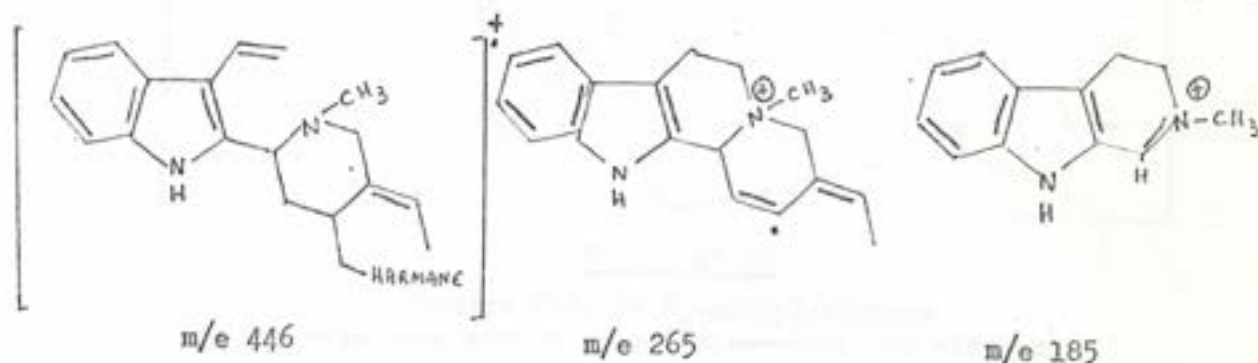


Figure n° 49

une dégradation d'Hofmann, comme cela est décrit pour les ammoniums quaternaires (154)



c) Structure

De ces expériences, il apparaît que cet alcaloïde est le N_b -méthyl-usambarensine. La présence d'un groupement $N - CH_3$ est prouvée par l'analyse du spectre de R.M.N., réalisé sur un appareil THOMSON 250 MHz, à partir d'une saturation de l'alcaloïde base dans le $CDCl_3$ (étalon interne: le tetraméthylsilane). Nous observons un singulet (3 protons) à δ 3,08 dans un spectre qui présente par ailleurs la même allure que le spectre de l'usambarensine. Cette valeur est quasi identique à celle de $N_b^{(4)} - CH_3$ (singulet à δ 3,05) dans le spectre de R.M.N. de l'hunteramine (formule p. 70)(154b).

Le groupe méthyle est fixé sur l'atome d'azote de la partie quinolizidine. En effet, nous observons d'une part un ion m/e 265 dans le spectre de masse; d'autre part, le spectre U.V. n'est pas modifié en milieu alcalin, ce qui ne serait pas le cas d'un alcaloïde méthylé sur N_b de la partie harmane, car le dérivé $N_b^{(4)}$ -méthyl-harmane ou Melinonine F est une base anhydronium en milieu alcalin, ce qui se traduit par un déplacement bathochromique important. Pour vérifier ce point, nous avons préparé l'iodométhylate d'harmane suivant la technique de KEUFER (154c). Le produit ainsi obtenu présente le spectre U.V. caractéristique des bases anhydronium.

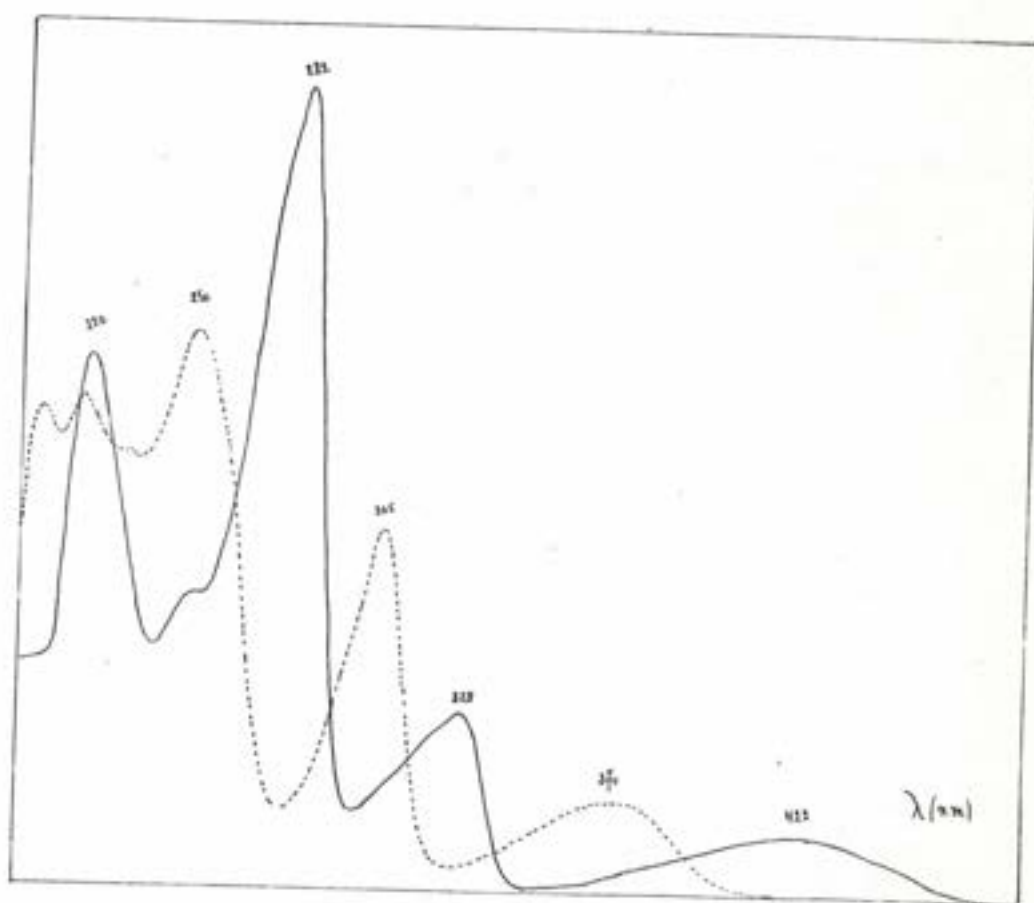
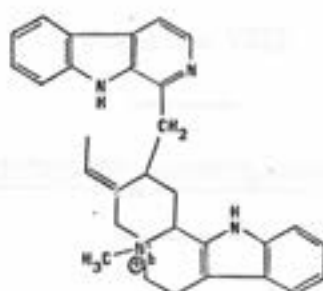


Figure n° 50

Spectre U.V. de N_b -méthyl-harmane
(-----:milieu neutre et acide; ———:milieu alcalin)

Nous proposons donc pour ce nouvel alcaloïde la structure suivante:



N'-b-METHYL-USAMBARENSINE

d) la stéréochimie de l'alcaloïde n'est pas encore déterminée.

Puisque nous avons pu obtenir cet alcaloïde à partir de l'usambarensine, la stéréochimie au niveau du C_{15} , et de la chaîne éthylidène n'aura pas changé.

En fait, seules les conformations du $N'_b^{\oplus}$ -méthyl et de l'H en C_3 , restent à préciser.

*
* *

Chapitre VIII

3,4-DIHYDRO-N^b-METHYL-USAMBARENSINE

Cet alcaloïde a été isolé suivant le procédé renseigné dans le chapitre précédent. La fraction brute qui le contenait renfermait de la méthyl-usambarensine ainsi que de la dihydro-flavopéireirine (voir chapitre IX)

Le chlorure de cet alcaloïde se présente sous forme d'une poudre jaune microcristalline de P.F.: 220°C. (Rendement: 85 mg d'alc. à partir de 3 g de L II, soit 0,08 %).

a) Chromatographie

En chromatographie sur couche mince de Silicagel, cet alcaloïde - fluorescent également en vert - se situe aux Rf suivants:

- a. Système B: Rf de 0,32
 - b. Propanol-ammoniaque concentrée: 8:2 Rf de 0,65
 - c. Butanol-Acide acétique-Eau 4:1:1 Rf de 0,47
 - d. Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque conc. 45:10:1,5 Rf de 0,25
- b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et dans l'infra-rouge

Le spectre U.V. (éthanol absolu) est superposable à celui de la 3,4-dihydro-usambarensine ainsi qu'au spectre du produit de méthylation de cet alcaloïde. (figure n° 52)

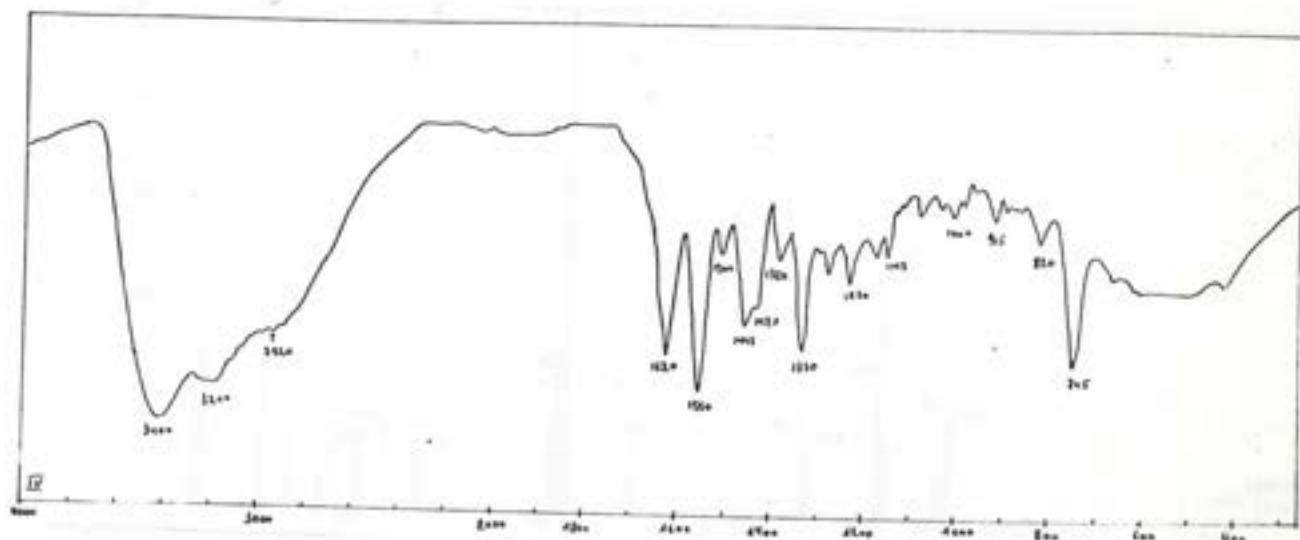


Figure n° 51

Spectre I.R. de la méthyl-dihydro-usambarensine

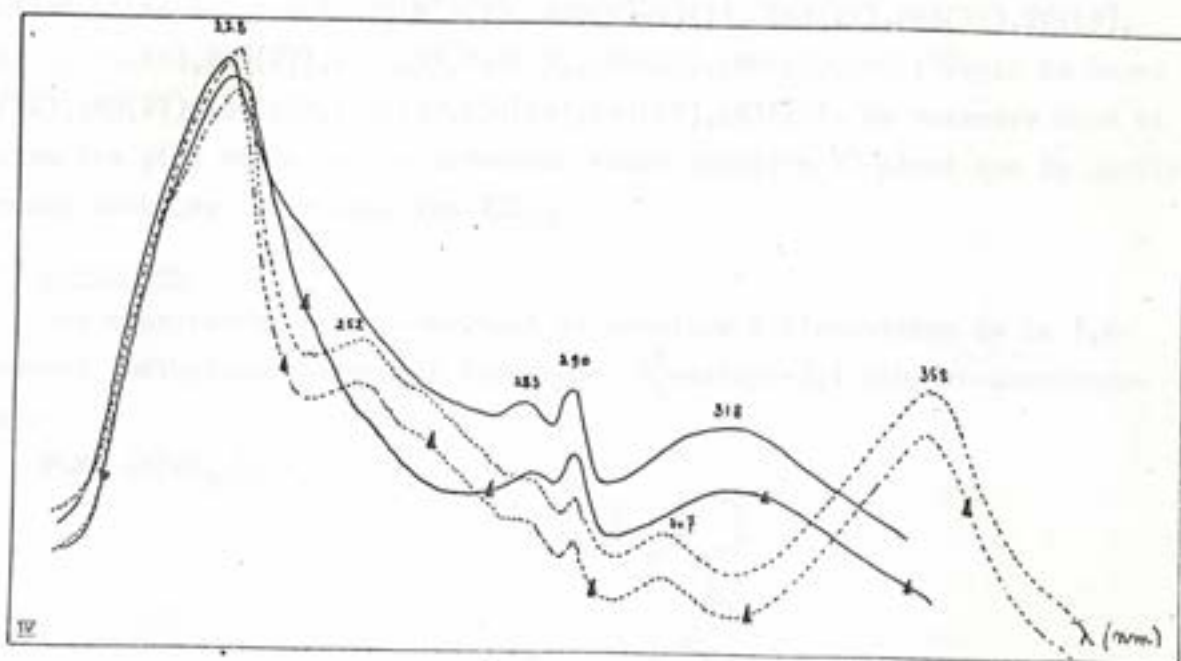


Figure n° 52

Spectre U.V. de la méthyl-dihydro-usambarensine
(—:milieu neutre et alcalin; ---:milieu acide)
et du produit de méthylation de la dihydro-usambarensine
(—▲—▲:milieu neutre et alcalin; ▲---▲:milieu acide)

c) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse réalisé sur une fraction d'élution effectuée après une chromatographie sur Silicagel dans le système B, révèle la présence concomitante de méthyl-usambarensine (ions m/e 447 et 446). Le spectre a été pris à la température de 200°C.

SPECTRE DE MASSE DE LA N°b-METHYL-3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

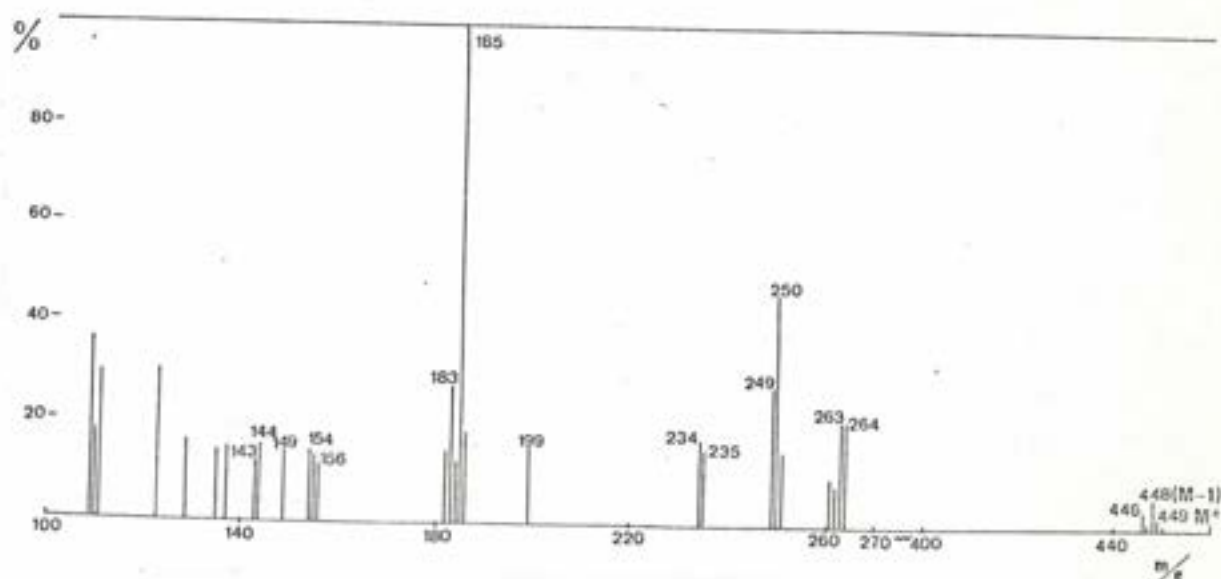


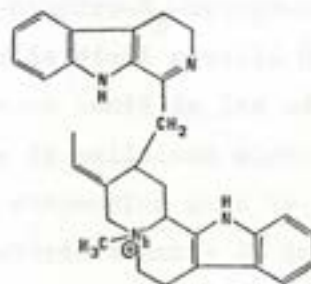
Figure n° 53

m/e (intensité relative) 449(M^+)(2), 448(M^+-1)(7), 264(21), 263(21), 261(9), 251(15), 250(46), 249(27), 235(15), 234(17), 199(15), 186(18), 185(100: pic de base) 184(12), 183(27), 156(12), 155(13), 154(14), 144(15), 143(12). On retrouve dans ce spectre les pics de la partie harmalane (voir chapitre V) ainsi que la partie corynane méthylée (voir chapitre VII).

d) Structure

Ces expériences nous permettent de conclure à l'existence de la 3,4-dihydro-N¹-méthyl-usambarensine (synonyme: N¹-méthyl-3,4 dihydro-usambarensine).

P.M. 449: C₃₀H₃₃N₄



N¹-METHYL-
3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

e) Stéréochimie

A nouveau, nous pouvons supposer que par analogie avec les alcaloïdes indoliques isolés à ce jour, la stéréochimie du C₁₅' et du C₁₈' est la même que dans la molécule d'usambarensine, le reste étant à déterminer.

*
* *

Chapitre IX

6,7-DIHYDROFLAVOPEREIRINE

a) Isolement

I. Lors de l'isolement de la 3,4-dihydro-N¹_D-méthyl-usambarensine, nous avons remarqué que cet alcaloïde était souillé d'une autre substance alcaloïdique jaune. Nous avons tenté de les séparer à l'aide de la chromatographie sur colonne de cellulose microcristalline.

80 g de cellulose sont mis en suspension dans le solvant C de KARRER et SCHMID; méthyléthylcétone saturée d'eau + 2% de méthanol. Après climatisation de la colonne, la fraction à séparer (400 mg) dissoute dans 6 ml de solvant C, est placée au sommet de la colonne. Des fractions de 20 ml sont recueillies et analysées par chromatographie. Les fractions semblables sont rassemblées et évaporées sous vide à une température de 45°C.

Les fractions 28 à 36 contenaient l'alcaloïde jaune inconnu. Après alcalinisation à pH 11 par NaOH, l'alcaloïde est extractible par le chloroforme. La solution chloroformique est distillée sous vide et le résidu est repris par quelques gouttes de méthanol. Par addition d'éther, il y a apparition d'un précipité jaune microcristallin (18 mg). Ce précipité est soumis à deux nouvelles cristallisations. L'alcaloïde pur est recueilli (8 mg de produit jaune). (Rendement: 0,007 %).

De plus, cet alcaloïde se retrouve en quantité plus importante parmi les fractions P^I I et P^I II ne précipitant pas en milieu alcalin. (Rendement: 0,020 %).

II. Après le fractionnement des alcaloïdes quaternaires et apparentés (voir chapitre X), nous avons observé que la fraction 4 (F 4) contenait notamment un alcaloïde jaune se comportant en chromatographie de la même façon que le produit isolé à partir du 2ème groupe (voir ci-dessus).

Nous avons d'abord tenté d'obtenir cet alcaloïde après séparation chromatographique sur colonne de cellulose Whatman CC31 (cf p. 101) en utilisant le second système préconisé par KARRER et SCHMID:

système Diacétate d'éthyle, pyridine, eau 75:23:16,5. Les détails de préparation de ce type de colonne sont donnés dans le chapitre X. Malheureusement, ce système n'a pas permis d'obtenir une séparation suffisante de ce produit accompagné dans cette fraction par deux autres alcaloïdes dont l'un est élué au même moment. Les fractions contenant ces deux composés ont été réunies et concentrées sous vide. Après cette distillation, le résidu est repris par de l'eau et alcalinisé à pH 12; cette solution est extraite par du chloroforme qui prend une coloration rouge-sang marquée. La solution chloroformique est déshydratée sur sulfate sodique anhydre, filtrée et concentrée sous vide. Ce résidu de bases alcaloïdiques est alors soumis à une chromatographie sur colonne d'alumine. Le résidu a été absorbé sur 3 g d'alumine standardisée selon Bröckmann et placé au sommet d'une colonne (diamètre 1 cm) de 30 g d'alumine montée dans du chloroforme pur. On procède ensuite à l'élution par du chloroforme contenant une quantité croissante de méthanol:

100 ml	de	CHCl ₃	
100 ml	"	"	+ 1 % de CH ₃ OH
100 ml	"	"	+ 2 % " "
100 ml	"	"	+ 5 % " "
100 ml	"	"	+ 7 % " "
100 ml	"	"	+ 10 % " "
100 ml	"	"	+ 15 % " "
300 ml	"	"	+ 25 % " "

Nous avons recueilli 50 fractions de 20 ml. Ces fractions sont chromatographiées sur des plaques de Silicagel Merck à migration rapide dans le système propanol-ammoniaque officinale 8:2. Les fractions semblables sont réunies et évaporées sous vide. C'est ainsi que les fractions 22 à 50 contenaient la substance recherchée. Ces fractions sont acidifiées avec de l'acide chlorhydrique dilué dans du méthanol puis distillée à sec. Nous obtenons de la sorte 254 mg de chlorure à partir de 2.184 mg de F 4, soit un rendement de 0,020 %. Ce résidu est repris par du méthanol et soumis à une cristallisation dans un mélange méthanol-éther. Le chlorure ainsi obtenu a un P.F. de 265°C. Cet alcaloïde possédait le même spectre U.V. et le même R_f en chromatographie dans divers systèmes que l'alcaloïde isolé auparavant lors de la purification de la 3,4-dihydro-N_b¹-méthyl-usambarensine.

b) Solubilités

L'alcaloïde base présente les solubilités semblables à celles des bases anhydronium (156):

- solubilité dans l'eau, le méthanol (teinte jaune)
- solubilité dans le chloroforme (teinte rouge)

- solubilité en milieu alcalin faible (pH 8)

c) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{17}H_{16}N_2$ pour FM 248 (M^+ trouvé: 248,1302; calculé: 248,1313).

Cette formule indique l'absence d'oxygène et la présence de II insaturations (cycles et doubles liaisons).

d) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et le visible

Les spectres (effectués sur une solution méthanolique) sont semblables en milieu neutre et acide. Par contre en milieu alcalin, nous notons un déplacement caractéristique vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome).

Cet effet se rencontre également dans les spectres de toutes les bases anhydronium. Cependant aucune base anhydronium naturelle ne possède les valeurs spectrales de l'alcaloïde isolé: λ_{max} nm (log ϵ) 218(4,41), 252(3,93), 315(4,15) et 392(4,16) (voir figure n° 54). Par contre, on les retrouve dans deux produits intermédiaires dans la synthèse de la flavopérérine. (tableau 10 ci-dessous) (157,158).

TABLEAU 10

VALEURS SPECTROPHOTOMETRIQUES (U.V. et VISIBLE)

	Alcaloïde isolé	Bromure de 3-éthyl-6-7 dihydro-12 H-indolo-(2,3a)pyridocolinium (BAN, 1961)	Nitrate de 3-éthyl-6-7 dihydro-12 H-indolo-(2,3a)pyridocolinium (PRASAD et al. 1958)	Bromure de 6,7 dihydro-12 H-indolo-(2,3a)pyridocolinium (PRASAD et al. 1958)
milieu neutre et acide λ_{max} nm λ_{min} nm	218-252-315-392 239-275-345	218-253-315-395 243-275-345	213-252-316-395 243-275-345	217-252-314-383 239-274-341
milieu alcalin λ_{max} nm λ_{min} nm	221-266-358-418 250-298-380	222-267-361-422 249-295-383	222-267-360-422 249-295-383	223-264-363-420 249-294-378

* lire quinolizinium (normes I.U.P.A.C.) au lieu de pyridocolinium

On peut donc avancer que l'alcaloïde isolé possède le même chromophore (11 insaturations = 4 cycles et 7 doubles liaisons).

Le déplacement bathochromique en milieu alcalin est attribué à la formation de la base anhydronium qui peut avoir une structure quinonoïde. L'hydrogène indolique (N_a) est responsable de cette transformation car lorsque l'alcaloïde est méthylé sur N_a , il n'y a plus de déplacement bathochrome en milieu alcalin.

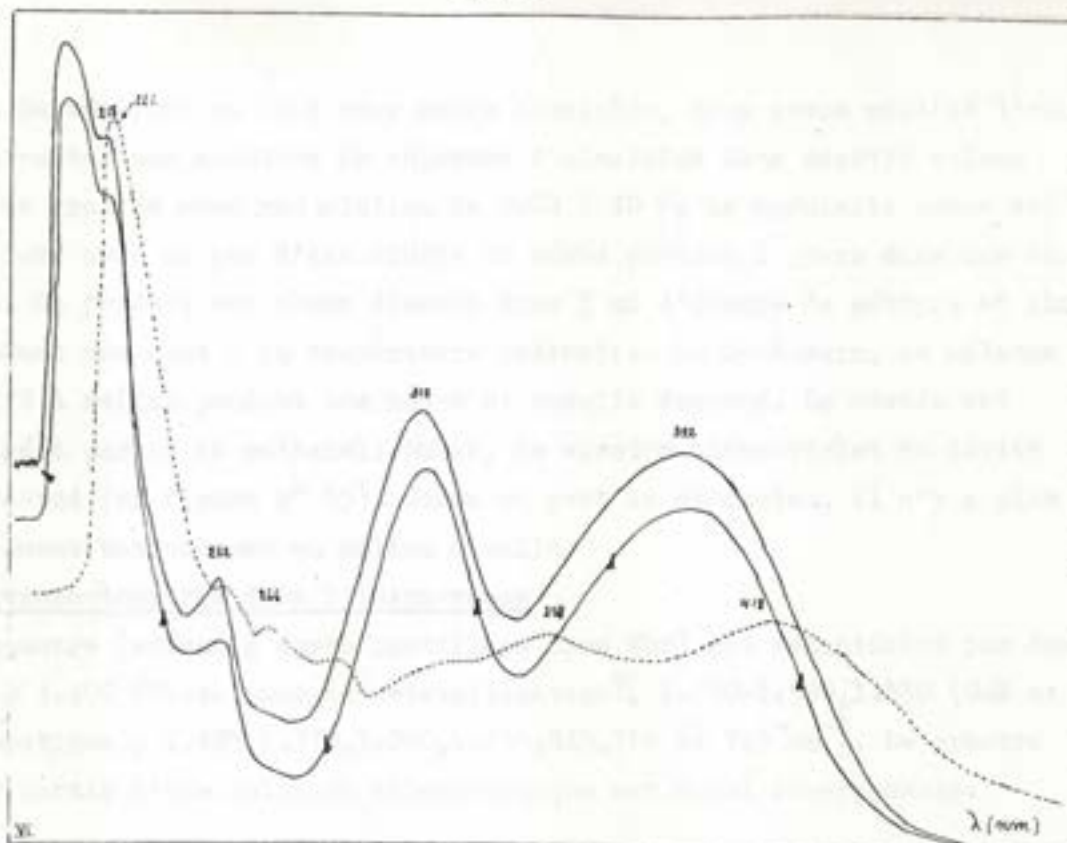


Figure n° 54

Spectres de la dihydroflavopéireirine
(—:milieu acide;----:milieu alcalin)
(—▲—▲:produit de synthèse (Prof. Y. BAN))

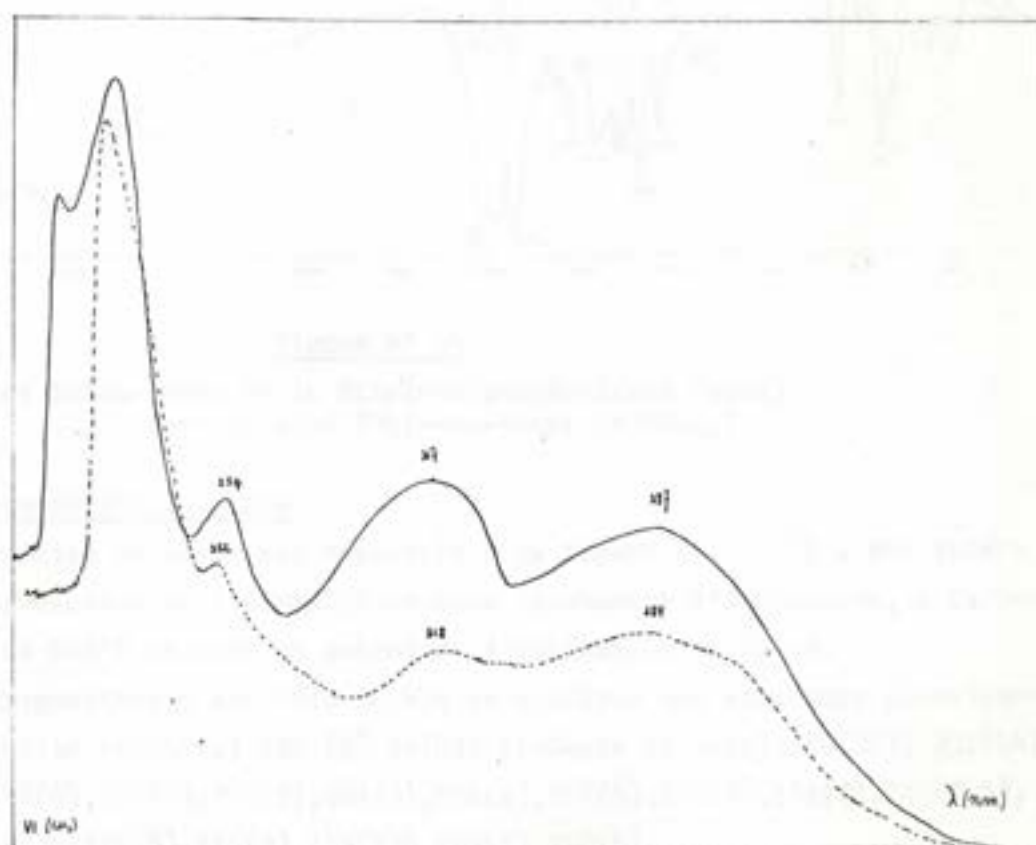


Figure n° 55

Spectres U.V. de la N-méthyl-dihydroflavopéireirine
(—:milieu neutre et acide;----:milieu alcalin)

Afin de vérifier ce fait pour notre alcaloïde, nous avons réalisé l'expérience suivante: une solution de chlorure d'alcaloïde dans un petit volume d'eau a été traitée avec une solution de NaOH à 40 %; un précipité rouge est récolté, lavé avec un peu d'eau froide et séché pendant 2 jours dans une étuve à vide. Ce produit est alors dissous dans 5 ml d'iodure de méthyle et abandonné pendant une nuit à la température ordinaire. Le lendemain, le mélange est chauffé à reflux pendant une heure et ensuite évaporé. Le résidu est cristallisé à partir du méthanol. Enfin, le spectre ultra-violet du dérivé a été effectué (cf figure n° 55). Comme on peut le constater, il n'y a plus de déplacement bathochrome en milieu alcalin.

e) Spectrophotométrie dans l'infra-rouge

Le spectre (effectué après pastillage dans KBr) est caractérisé par des bandes à ν 3.400 (OH: solvant de cristallisation?), 1.630-1.590, 1.550 (C=N et noyau aromatique), 1.425, 1.370, 1.280, 1.235, 845, 760 et 745 cm^{-1} . Le spectre réalisé à partir d'une solution chloroformique est quasi superposable.

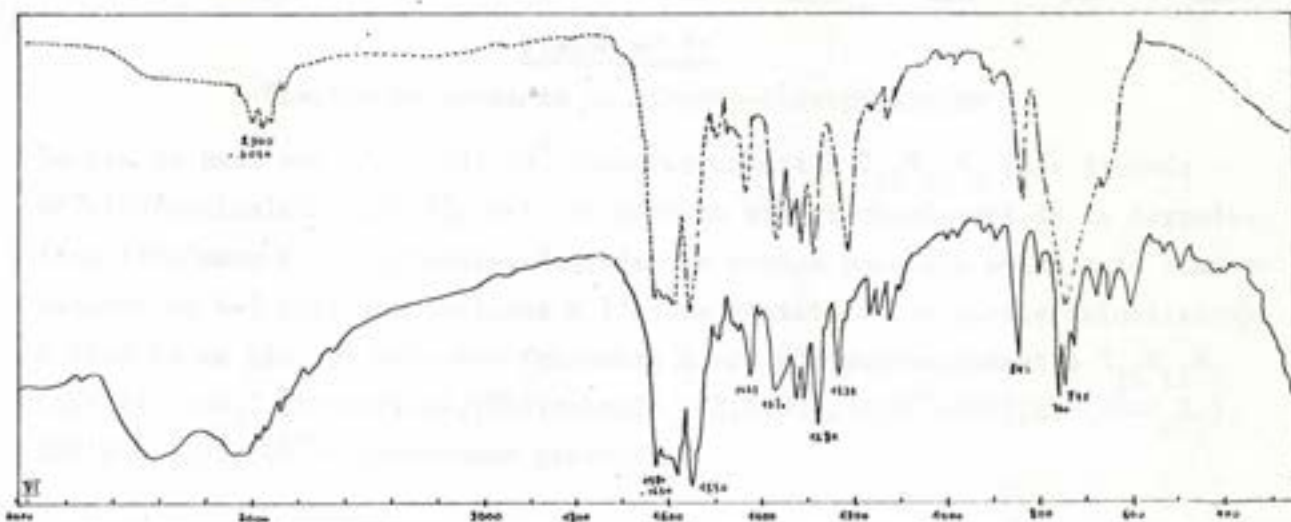


Figure n° 56

Spectre infra-rouge de la dihydroflavopéireirine (base)
(—: dans KBr; ---: dans le CHCl_3)

f) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse est reproduit à la figure n° 57. Il a été obtenu après introduction de l'échantillon dans la chambre d'ionisation, à la température de 145°C et sous un potentiel d'ionisation de 70 eV.

La fragmentation est très faible et confirme une structure aromatique. m/e (intensité relative) 248 ($M^+ - 44$), 247 (100 = pic de base), 232(22), 231(16), 219(13), 218(8), 206(6), 205(7), 204(9), 191(4), 167(5), 156(3), 154(4), 144(2,5), 143(5), 140(5), 126(5), 116(8), 115(13), 103(5), 102(5).

Le type de fragmentation se rapproche de celui de la 3,4-dihydro-indoloquinolizine (numérotation p. 98)(159).

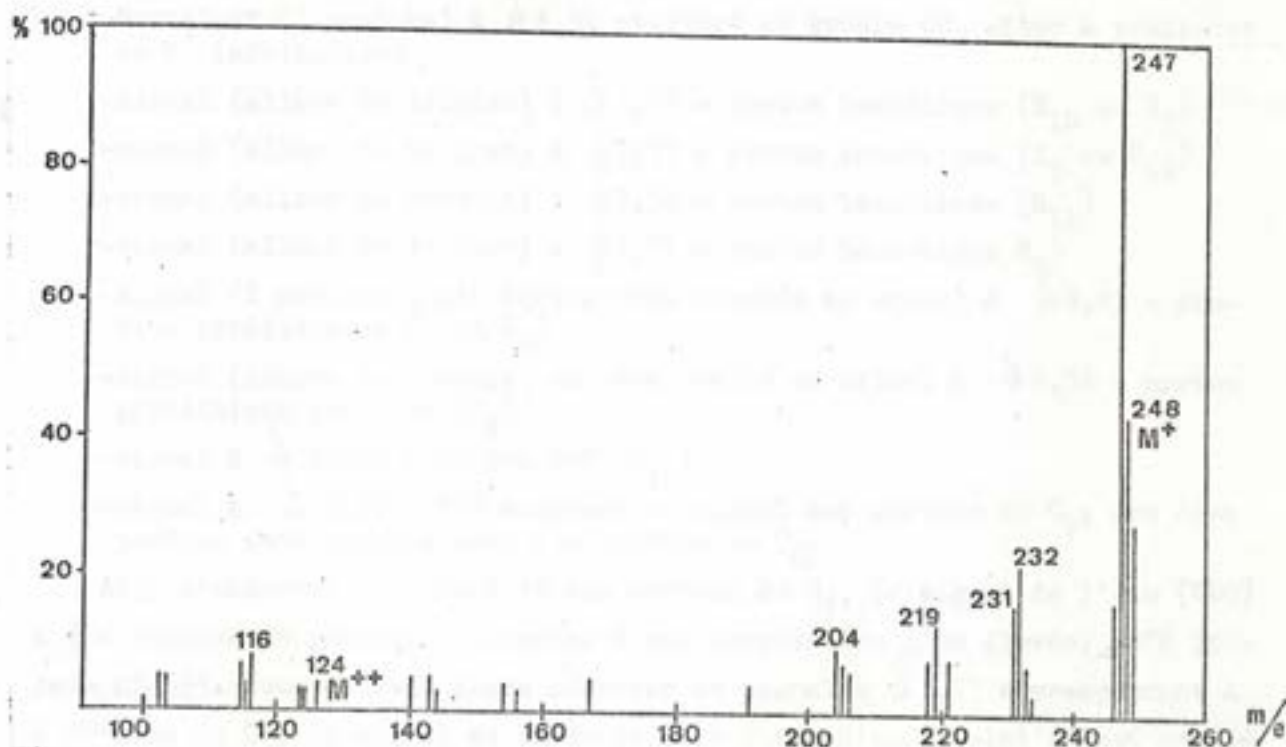
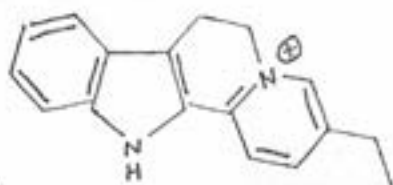


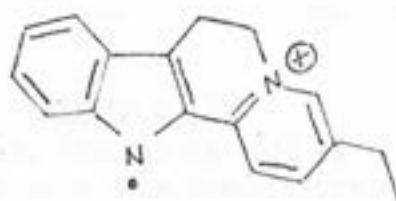
Figure n° 57

Spectre de masse de la dihydro-flavopéireirine

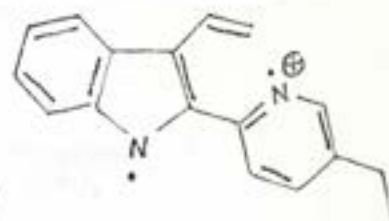
Le pic de base est l'ion 247 (M⁺-H) correspondant à C₁₇H₁₅N₂ (m/e trouvé: 247,1242; calculé: 247,1235). Cet ion résulte vraisemblablement de la dégradation d'Hofmann de la molécule, -dégradation rendue possible suite à la liaison saturée en 6-7 (liaison contigue à l'atome d'azote de la partie quinolizine). A côté de ce pic, on note des fragments à m/e 232 correspondant à C₁₆H₁₂N₂ (m/e 247 - CH₃) (trouvé: 232,1010; calculé 232,1000), 221 (M⁺-HCN), 219 (M⁺-C₂H₅), 124 (M⁺⁺), 123, 5 (M⁺-H doublement positif).



m/e 249



m/e 248



m/e 247

g) Résonance magnétique nucléaire de la 6,7-dihydroflavopéireirine (HCl)

Le spectre (p. 97) a été pris dans le DMSO-d₆ à la température ordinaire, le tétraméthylsilane servant d'étalon interne. Nous observons les signaux suivants: -triplet (3 protons) à δ 1,28 attribué au méthyle d'une chaîne éthyle
-quadruplet (2 protons) à δ 2,78 attribué au groupe CH₂ d'une chaîne éthyle

- "triplet" (2 protons) à δ 4,90 attribué au groupe CH_2 situé à proximité de N^+ (déblindage)
- signal (allure de triplet) à δ 7,18 = proton benzénique (H_{10} ou H_9)
- signal (allure de triplet) à δ 7,37 = proton benzénique (H_9 ou H_{10})
- signal (allure de doublet) à δ 7,54 = proton benzénique (H_{11})
- signal (allure de doublet) à δ 7,71 = proton benzénique (H_8)
- signal (2 protons quasi équivalents couplés en ortho) à δ 8,45 = protons pyridiniques (H_1 et H_2)
- signal (allure de singulet car non couplé en ortho) à δ 8,96 = proton pyridinique déblindé (H_4)
- signal à δ 12,89 = proton N-H (H_{12})
- signal à δ 3,27 = HDO masquant le signal des protons du C_7 ; ces deux protons sont couplés avec les protons du C_6 .

Afin d'observer le signal dû aux protons du C_7 , le signal de l'eau (HDO) a été déplacé en prenant un spectre à une température plus élevée: 80°C (figure n° 59). Nous pouvons alors observer un signal à δ 3,27 correspondant à 2 protons du C_7 ; le signal se présente sous forme d'un triplet et est couplé avec le signal situé à δ 4,90 (protons du C_6)(162).

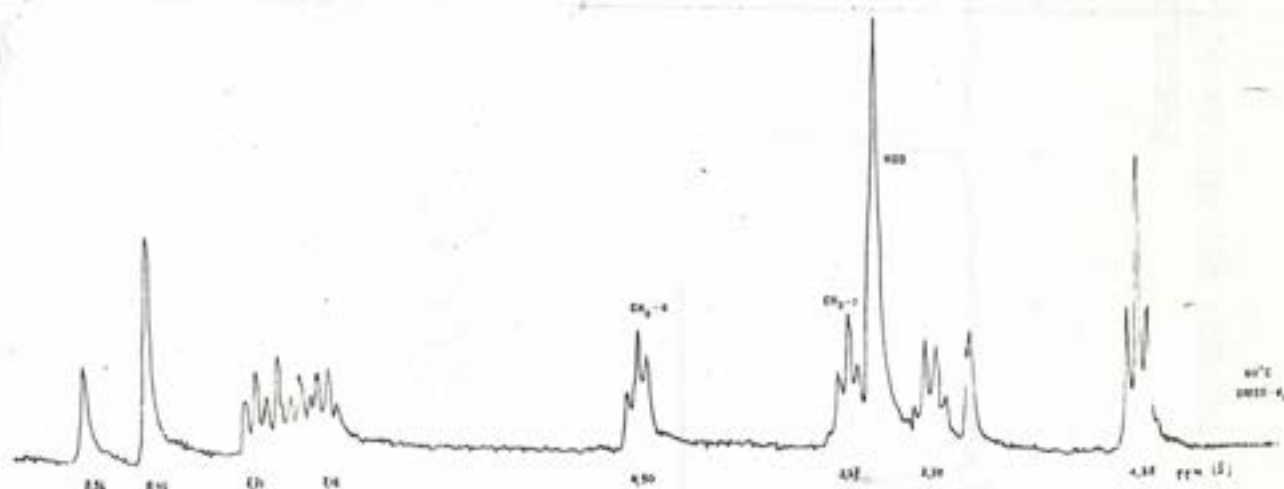


Figure n° 59

Spectre de R.M.N. (VARIAN HA 100) de la dihydroflavopereirine pris à la température de 80°C .

h) Comparaison avec le produit de synthèse

Le Professeur Yoshio BAN de l'Université de Hokkaido à Sapporo (Japon) a eu la gentillesse de nous confier un échantillon de perchlorate de 3-éthyl-6,7-dihydro-12H indolo (2,3 a) quinolizinium. Ce produit présente les mêmes spectres dans l'ultra-violet et le visible que l'alcaloïde que nous avons isolé. De plus, il possède le même comportement chromatographique dans les systèmes ci-dessous (test de l'étalon interne):

Phase stationnaire: Silicagel Merck

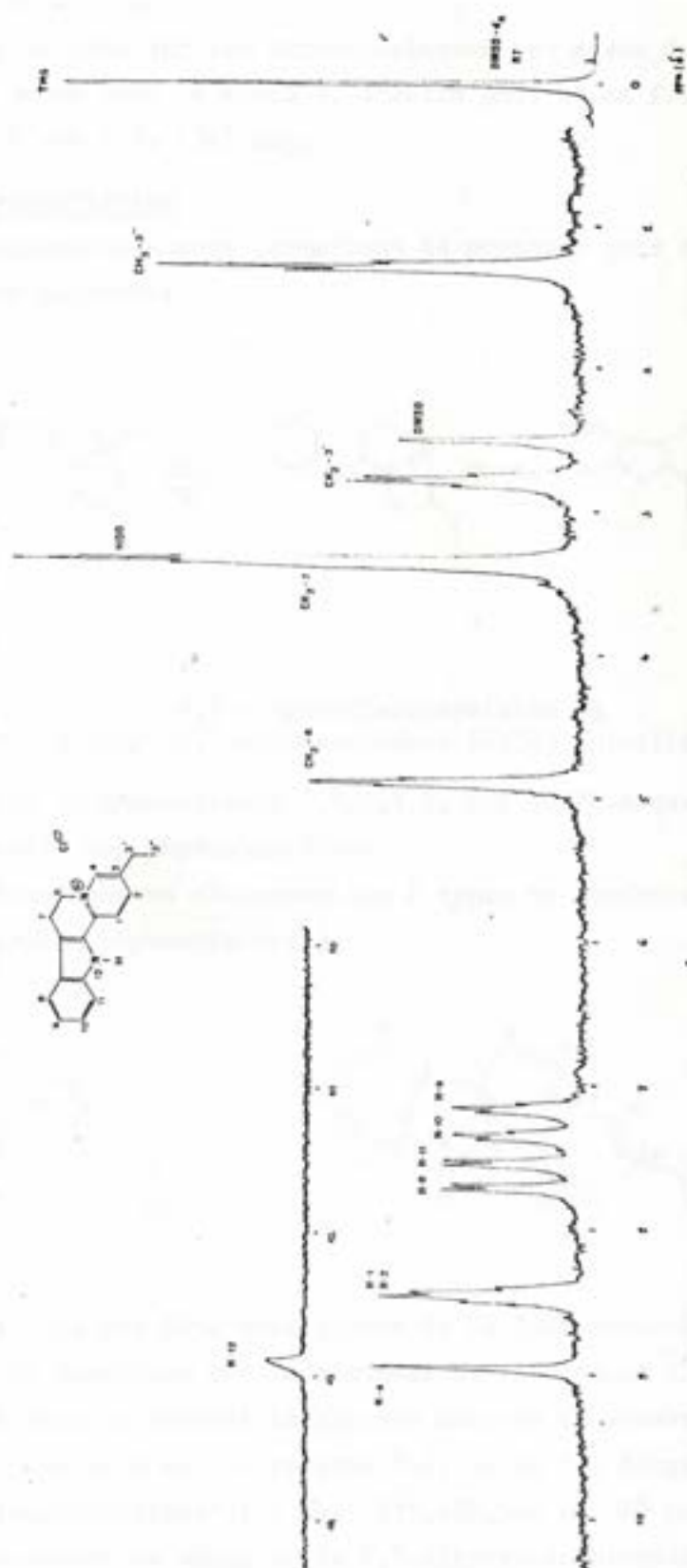


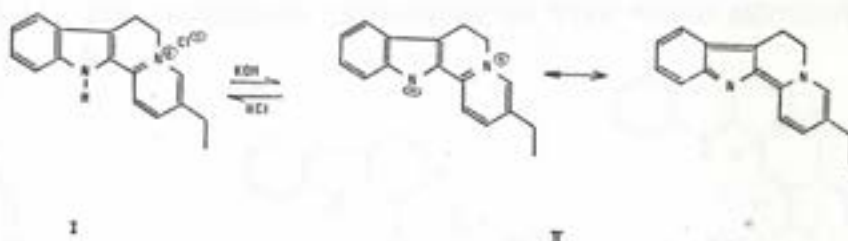
Figure n° 58
Spectre de R.M.N. (THOMSON 250 MHz) de 6,7-dihydro-flavopereirine (HCl)

- Phases mobiles: a) n-propanol-ammoniaque concentrée: 8:2 $R_f = 0,50$
 b) butanol-acide acétique-eau:4:1:1 $R_f = 0,60$
 c) acétate d'éthyle-isopropanol-ammoniaque diluée: 60:25:15
 $R_f = 0,31$

La détection de l'alcaloïde sur les chromatoplaques est aisée du fait d'une part de sa couleur jaune dans le visible, d'autre part de sa fluorescence intense en jaune vif aux U.V. (365 nm).

1) Structure et numérotation

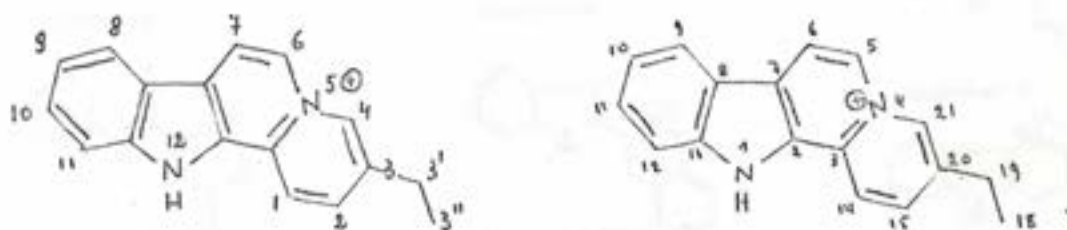
Ces diverses expériences nous permettent de proposer pour ce nouvel alcaloïde la structure suivante:



6,7 dihydroflavopéireirine ou
 3 éthyl-6,7-dihydro-indolo (2:3a) quinolizine

Nous avons suivi la nomenclature I.U.P.A.C. qui diffère quelque peu de la numérotation usuelle des phytochimistes.

Pour rappel, nous donnons ci-dessous les 2 types de numérotation (à gauche I.U.P.A.C.; à droite phytochimistes)



Ce nouvel alcaloïde est donc très proche de la flavopéireirine (160). Il est intéressant de remarquer que la synthèse de ce produit a été réalisée avant son isolement dans la nature! La liaison saturée se trouve bien dans le cycle C plutôt que dans le D car le spectre U.V. de la 3,4 dihydro-indoloquinolizine ("dihydroindolopyridocoline") (λ_{max} . 235, 292, 348 et 389 nm en milieu acide) (159) diffère nettement de celui de la 6,7-dihydro-indoloquinolizine (cf tableau 10 à droite).

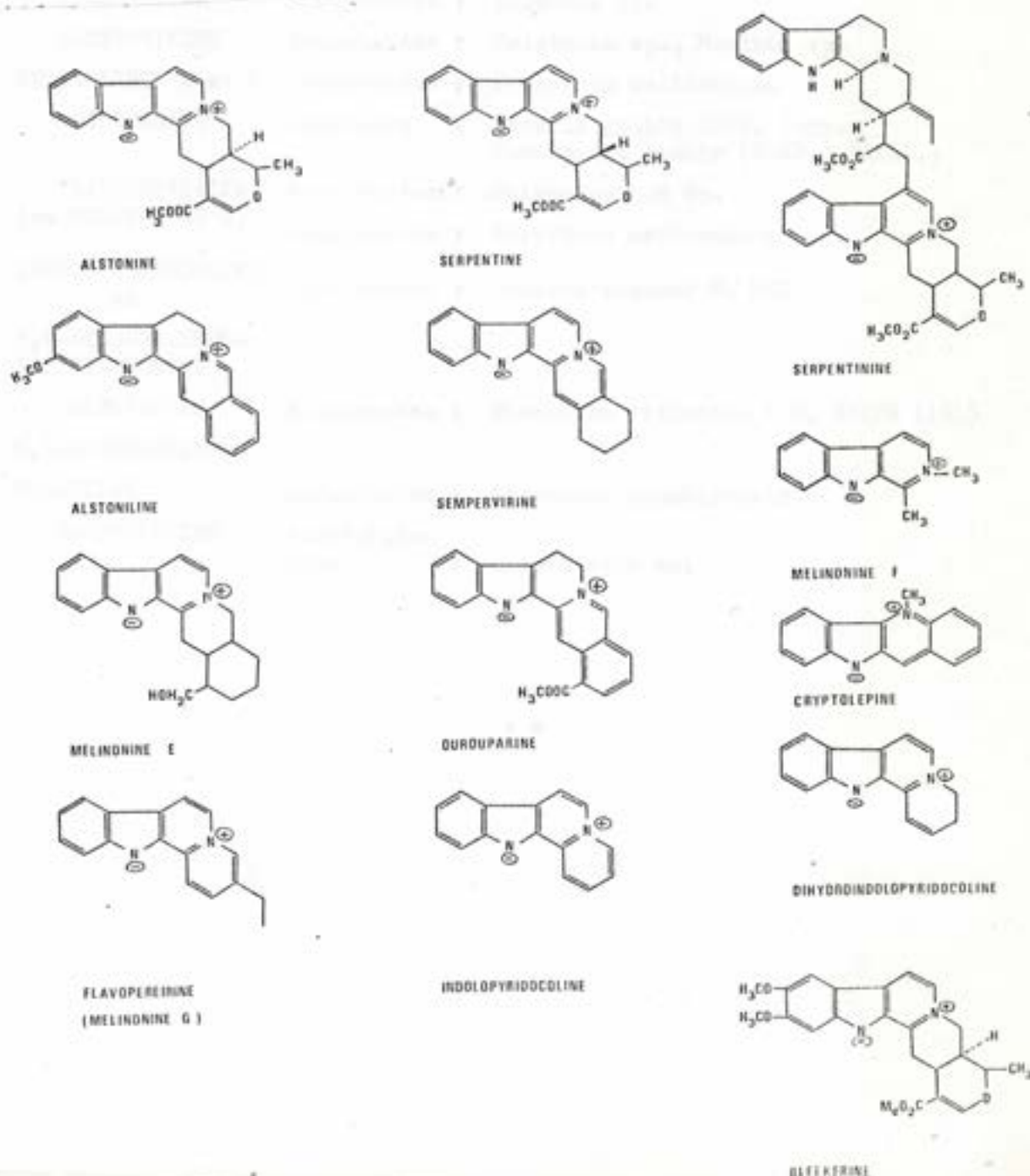
En milieu alcalin, il y a formation de la base anhydronium (II).

Les bases anhydronium ont été appelées de la sorte car elles sont les dérivés anhydres d'hydroxydes de composés aromatiques. Ces composés colorés occupent une place intermédiaire entre une forme aromatique complètement polarisée et une forme neutre à allure quinonique. Il en résulte une grande instabilité de ce type de molécules qui se caractérisent tantôt par l'existence d'un dipôle, tantôt par un benzène non aromatique. Les tendances à la formation d'un sextet aromatique d'une part et à la neutralisation des charges du dipôle d'autre part, travaillent dans des directions opposées (155,163).

3) Chimiotaxonomie

A notre connaissance, seules 13 bases anhydronium indoliques ont été isolées à ce jour. Elles sont reprises dans le tableau suivant:

TABLEAU 11: LES ALCALOÏDES INDOLIQUES DE TYPE "BASE ANHYDRONIUM"



Si on classe ces alcaloïdes d'après leur origine botanique, on constate que toutes les bases anhydronium dérivées de la β carboline ont été isolées uniquement de 3 familles: Apocynaceae, Loganiaceae et Rubiaceae dont on connaît bien la parenté chimiotaxinomique. Seule la cryptolépine (dérivée de la γ carboline) a été extraite d'une Asclépiadacée (94).

ALSTONINE	Apocynacées :	<i>Alstonia constricta</i> F. MUELL., <i>Rauvolfia</i> sp., <i>Catharanthus roseus</i>
	Loganiacées :	<i>Strychnos camptoneura</i>
SERPENTINE	Apocynacées :	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Vinca major</i> L.; <i>Rauvolfia</i> sp.
	Loganiacées :	<i>Strychnos camptoneura</i>
SERPENTININE	Apocynacées :	<i>Rauvolfia</i> sp.
ALSTONIDINE	Apocynacées :	<i>Alstonia</i> sp.
SEMPERVIRINE	Loganiacées :	<i>Gelsemium</i> sp., <i>Mostuea</i> sp.
MELINONINES E et F	Loganiacées :	<i>Strychnos melinoniana</i>
OUROUPARINE	Rubiacees :	<i>Uncaria gambir</i> ROXB. (syn.: <i>Ouroparia gambir</i> (ROXB.) BAILL.)
FLAVOPEREIRINE (ou MELINONINE G)	Apocynacées :	<i>Geissospermum</i> sp.
	Loganiacées :	<i>Strychnos melinoniana</i>
INDOLOPYRIDOCOLINE et	Apocynacées :	<i>Gonioma kamassi</i> E. MEY
3,4-DIHYDRO-INDO- LOPYRIDOCOLINE		
BLEEKERINE	Apocynacées :	<i>Bleekeria vitiensis</i> A.C. SMITH (161)
6,7-DIHYDROFLAVO- PEREIRINE	Loganiacées :	<i>Strychnos usambarensis</i>
CRYPTOLEPINE	Asclépiada- cées :	<i>Cryptolepis</i> sp.

*

* *

Chapitre X

FRACTIONNEMENT DES ALCALOÏDES QUATERNAIRES

Ce chapitre traite du fractionnement des alcaloïdes obtenus sous forme de picrates lors des procédés d'extraction relatés dans le chapitre II. Il s'agit d'alcaloïdes très polaires: bases quaternaires, bases anhydronium et peut-être alcaloïdes phénoliques (alcaloïdes du 3ème groupe).

Les fractions de picrates d'alcaloïdes ont été agitées durant 18 heures, avec de la résine AMBERLITE IRA 400 en suspension dans un mélange acétone-méthanol-eau 6:2:1. Par fraction de 10 g de picrates, nous avons utilisé 90 g d'AMBERLITE et 225 ml du mélange de solvants(165). Nous vérifions l'absence d'acide picrique dans le filtrat par chromatographie sur couche mince de Silicagel dans le système B. Nous obtenons de la sorte les chlorures d'alcaloïdes dans le filtrat. Après évaporation sous vide, le résidu est repris par du méthanol et versé sur une colonne d'alumine W 200 acide. Les alcaloïdes sont élués par le méthanol et la solution méthanolique est évaporée à sec:

La fraction P_I fournit 13,7 g de résidu

La fraction P₄ fournit 7,4 g de résidu

La fraction P'I fournit 9,9 g de résidu

La fraction P'II fournit 9,6 g de résidu

Les fractions obtenues sont chromatographiées sur papier Whatman I dans les systèmes C et D de KARRER et SCHMID. Les chromatogrammes (exemple p. 56) révèlent la similitude existant sur le plan qualitatif entre les diverses fractions; nous observons cependant que les fractions P₄ et P'II contiennent une plus grande quantité d'alcaloïdes migrant à des R_f bas. Nous avons donc réuni ces deux fractions (17 g au total) et tenté de les séparer par chromatographie sur colonne de cellulose (40) car les essais réalisés sur Silicagel et sur alumine se sont avérés négatifs ou insuffisants.

Nous avons utilisé une colonne d'un diamètre intérieur de 6 cm et d'une hauteur de 140 cm. Cette colonne est remplie par de la cellulose microcristalline Whatman CC 31 en suspension dans le solvant d'élution: méthyléthylcétone saturée d'eau contenant 2 % de méthanol. La colonne est ensuite lavée par une solution de 8-hydroxy-quinoléine solubilisée dans le solvant d'élution (5 g pour 1 kg 700 de cellulose), afin d'enlever les traces de métaux

lourds. Ensuite, la colonne est lavée pendant 40 heures, ce qui permet une climatisation valable. Après ce laps de temps, la hauteur utile de la colonne est de 110 cm, d'où un volume utile de 3.108 cm^3 (1 g de cellulose occupe quasi 2 cm^3).

Les alcaloïdes à séparer sont dissous dans un volume minimum de méthanol; cette solution est alors absorbée par 120 g de cellulose. Cette poudre est desséchée sous vide en agitant de temps à autre. Après dessiccation, la poudre est broyée au mortier et tamisée à l'aide d'un tamis Endecotts 50 mesh. Après "climatisation" 24 heures durant dans les vapeurs du solvant d'élution, la poudre est ajoutée à la colonne, tout en tassant prudemment.

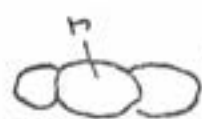
A ce moment commence l'élution des alcaloïdes par le solvant ayant servi à conditionner la colonne; cette élution se fait au goutte à goutte (robot) et en maintenant le niveau de l'éluat constant. Le débit de cette colonne était de 80 ml à l'heure. Chaque fraction éluee (100 ml) est chromatographiée et les fractions semblables sont réunies.

Le pourcentage de méthanol dans le solvant éluant a été progressivement augmenté dans les proportions ci-après:

fractions 1 à 92 :	2 %	de méthanol
92 à 104 :	3 %	" "
105 à 112 :	4 %	" "
113 à 123 :	5 %	" "
124 à 141 :	7,5 %	" "
142 à 183 :	20 %	" "
184 à 250 :	méthanol	seul

Le fractionnement des 17 g d'alcaloïdes a été le suivant:

F 1 : f 1	à 7	270 mg	1,6 %
F 2 : f 8	à 14	114 mg	0,7 %
F 3 : f 15	à 24	1268 mg	7,4 %
F 4 : f 25	à 33	2184 mg	12,8 %
F 5 : f 34	à 42	1706 mg	10 %
F 6 : f 43	à 49	743 mg	4,3 %
F 7 : f 50	à 55	662 mg	3,9 %
F 8 : f 56	à 69	923 mg	5,4 %
F 9 : f 70	à 78	506 mg	3 %
F 10 : f 79	à 82	268 mg	1,6 %
F 11 : f 83	à 87	282 mg	1,6 %
F 12 : f 88	à 95	395 mg	2,3 %
F 13 : f 96	à 111	743 mg	4,3 %
F 14 : f 112	à 121	588 mg	3,4 %
F 15 : f 122	à 141	1092 mg	6,4 %
F 16 : f 142	à 161	587 mg	3,4 %
F 17 : f 162	à 168	308 mg	1,8 %
F 18 : f 169	à 175	284 mg	1,6 %
F 19 : f 176	à 189	525 mg	3,1 %
F 20 : f 190	à 197	986 mg	5,8 %
F 21 : f 198	à 214	2152 mg	12,6 %
F 22 : f 215	à 250	716 mg	4,2 %



SYSTÈME "C_m" (212)

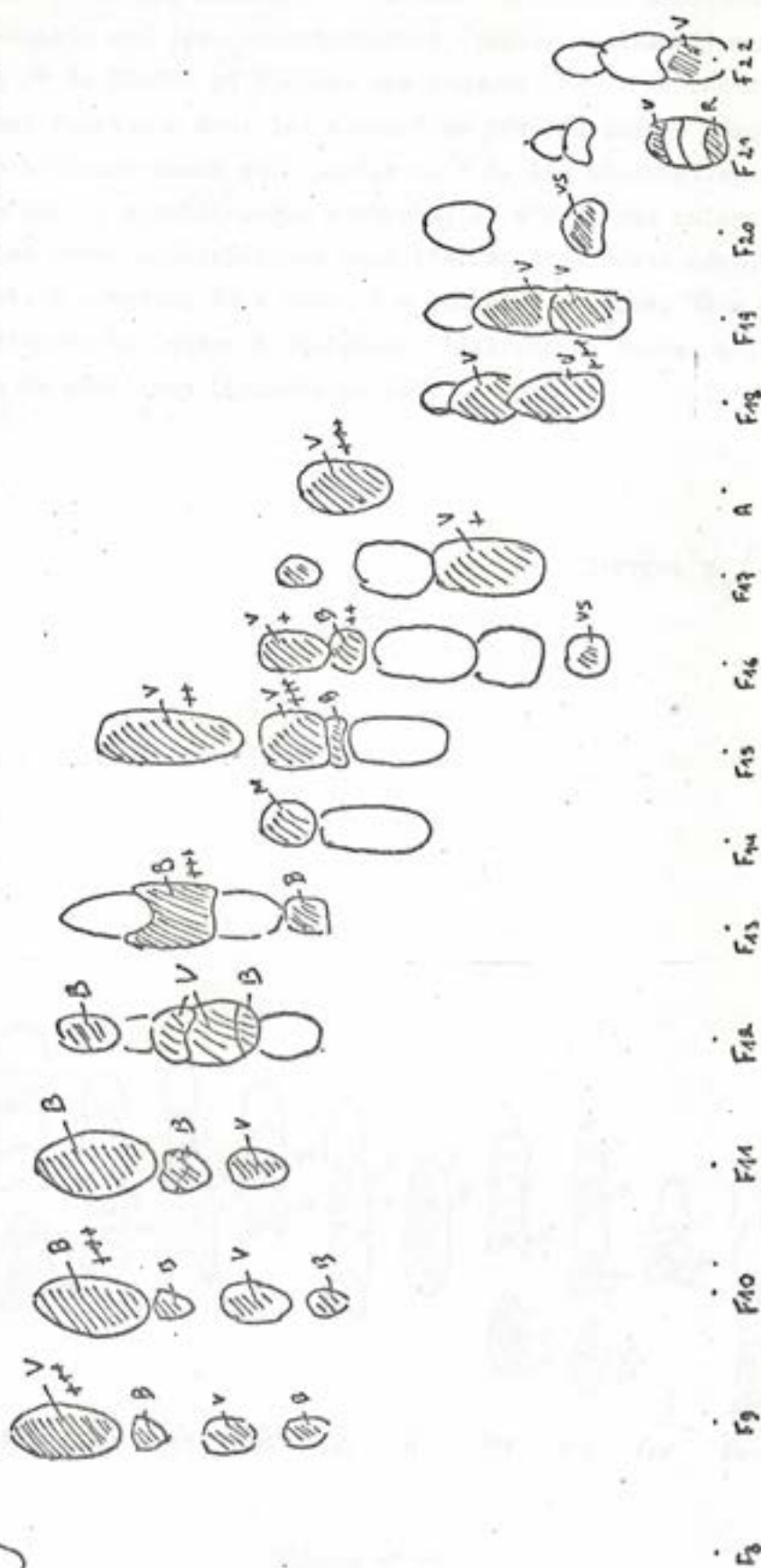


Figure n° 60 - Chromatographie descendante en continu (durée 22 heures)

La base du chromatogramme a été découpée en dents de scie pour faciliter l'écoulement du solvant

Ces diverses fractions renferment également plusieurs alcaloïdes, plus ou moins bien séparés sur les chromatogrammes (papier Whatman I) dans les systèmes "C" et "D" de KARRER et SCHMID. Les figures n° 60 et 61 montrent la complexité de ces fractions dont les alcaloïdes révélés par le réactif au sulfate cérique n'apparaissent qu'à partir de F 9. Les abréviations reprises sur ces figures ont la signification suivante: il s'agit des colorations que prennent certains spots alcaloïdiques sous l'effet du sulfate cérique: B = bleu, V = violet, M = mauve, BR = brun, R = rouge, J = jaune, VS = gris-violet, à l'exception de la lettre A désignant l'Alloferine* Roche, utilisée comme substance de référence (formule p. 110)

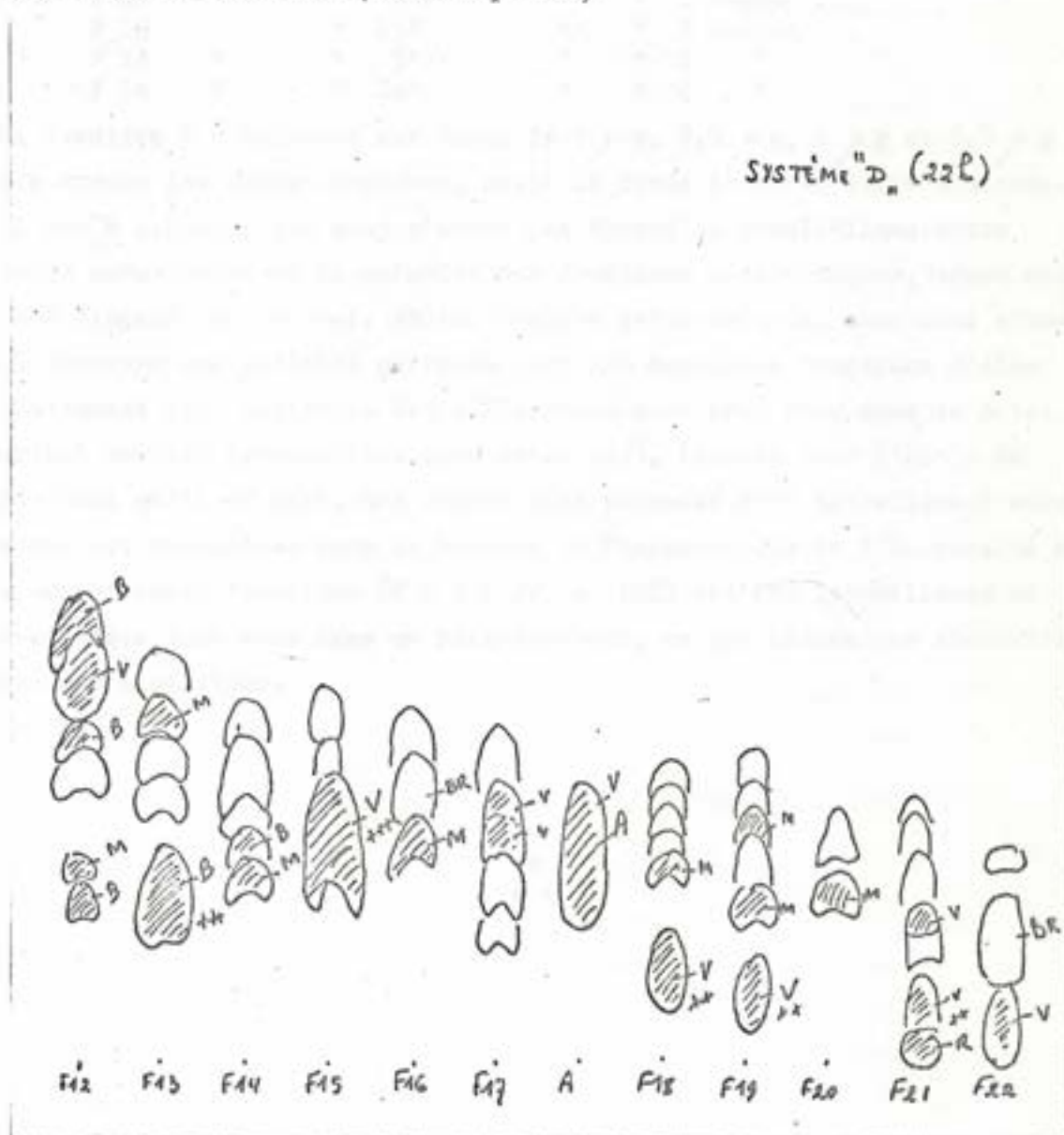


Figure n° 61

Chromatographie descendante en continu
(durée: 22 heures)

* Nous remercions vivement le Dr J. VERLY (firme Roche) pour un don généreux d'Alloferine.

Désirant étudier une fraction intéressante pouvant justifier l'activité curarisante des écorces de racines, nous avons testé chaque fraction sur la grenouille en injectant une dose de $10 \mu\text{g}$ dans le sac lymphatique ventral de l'animal. Nous avons en effet observé qu'une dose semblable d'Alloférine Roche était responsable d'une curarisation apparaissant rapidement (après 3'30") mais ne persistant que 5 à 10'. Seules les fractions suivantes furent actives:

F 9	symptômes après 3'	effet dure 5 heures
F 10	" " 5'15"	" " 2 "
F 11	" " 5'20"	" " 1 heure
F 12	" " 15'	" " 2 heures
F 13	" " 5'	" " 2 "
F 16	" " 24'	" " 4 "

La fraction F 9 injectée aux doses de $5 \mu\text{g}$, $2,5 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$ et $0,5 \mu\text{g}$ présente encore les mêmes symptômes, seule la durée d'action était diminuée.

Il est à signaler que nous n'avons pas trouvé le parallélisme entre l'activité curarisante et la polarité des fractions alcaloïdiques, comme cela avait été signalé par le Prof. WASER. D'après cette théorie, nous nous attendions à observer une activité maximale pour les dernières fractions d'élu-tion, nettement plus polaires. Ces différences sont peut être dues au maté-riel animal utilisé (grenouilles dans notre cas), (souris pour l'école de Zurich). Quoi qu'il en soit, des études plus poussées sont actuellement entre-prises sur les mammifères dans le service de Pharmacologie de l'Université de Liège. Les diverses fractions (F 1 à F 22, p. 102) ont été lyophilisées et sont conservées sous vide dans un réfrigérateur, ce qui assure une stabilité maximale des alcaloïdes.

*
* *

Chapitre XI

C-DIHYDRO-TOXIFERINE

Les essais physiologiques ont mis en évidence la grande activité de la fraction 9 (F 9). Des chromatographies de cette fraction dans les systèmes habituels laissent apparaître un spot violet intense lors de la pulvérisation par le réactif au sulfate cérrique; voir la figure n° 60. Les fractions suivantes (F 10 et F 11) contiennent également une substance alcaloïdique migrant aux mêmes Rf dans les systèmes C et D. Dans le système C cependant, ce produit est recouvert par un autre alcaloïde révélé en bleu par le réactif au sulfate cérrique; cf figure n° 60.

La fraction 9 (506 mg) a été soumise à une nouvelle séparation chromatographique sur colonne de cellulose (75 g) préparée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre précédent, à l'exception du solvant d'élution qui est le système D de KARRER et SCHMID: acétate d'éthyle-pyridine-eau 75:23:16,5. Le débit d'élution est maintenu constant: 20 ml en 34'. Chaque fraction de 20 ml est analysée par chromatographie et les fractions identiques sont à nouveau réunies:

		essais sur grenouilles
f 1 à 24	258 mg	3 μ g: pas de symptômes
f 25 et 26	22 mg	
f 27 à 58	174 mg	3 μ g: paralysie après 40"
f 59 à 73	51 mg	

Les fractions 1 à 24 ne donnent pas de réaction positive avec le sulfate cérrique; les fractions 25 et 26 contiennent un mélange d'alcaloïdes mais donnent une réaction positive avec le sulfate cérrique. Les fractions 27 à 58 contiennent la substance se colorant après pulvérisation par le dit réactif = cette substance obtenue à l'état pur est très active sur la grenouille; les symptômes de paralysie apparaissent avec une dose de 0,2 μ g mais l'effet ne dure pas.

Les fractions 59 à 73 donnent aussi une réaction positive avec le sulfate cérrique mais elles contiennent un mélange de produits.

Les fractions 27 à 58 réunies et évaporées sous vide sont reprises par du méthanol et soumises à des cristallisations en milieu méthanol-éther.

Nous obtenons de la sorte des cristaux de sel (Cl^-) d'alcaloïde.

Nous avons déjà signalé que les fractions F 10 et F 11 contenaient un alcaloïde se comportant de la même façon que celui de la fraction F 9. Pour nous en assurer, nous avons soumis ces deux fractions réunies (550 mg) auxquelles étaient jointes f25 et f26 provenant de F 9 (22 mg) à une chromatographie sur colonne de cellulose (140 g) en se servant du système D (solvant d'élution). Le débit de la colonne était de 20 ml par 30'. Chaque fraction de 20 ml est analysée et cela nous permet d'obtenir le tableau suivant.

TABLEAU 12

fractions réunies	réaction au $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	paralysie grenouille
f 1 à 37 65 mg f 38 à 42 95 mg	- coloration bleue (mélange d'alcaloïdes)	10 μ g: paralysie mais effet ne dure pas
f 43 à 58 200 mg	coloration bleue (produit pur)	
f 59 à 74 41 mg	coloration bleue (mélange de produits)	
f 75 à 78 13 mg	coloration mauve (mélange de produits)	3 μ g: paralysie
f 79 à 122 110 mg	coloration violette	

Analyse de l'alcaloïde

a) Point de fusion

Le point de fusion du sel (Cl^-) est supérieur à 350°C. Par contre, le point de fusion du picrate est de 182-184°C.

b) Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été pris en solution dans l'alcool éthylique à 50 % à l'aide d'unpolarimètre Carl ZEISS à cercle gradué à 0,01°. Nous avons obtenu un $\alpha_D = -600^\circ$. Ce pouvoir rotatoire lévogyre extrêmement élevé se retrouve aussi dans le cas de la C-dihydro-toxiférine (171), (il varie entre - 586° et - 611°).

Cette observation ajoutée au fait que cet alcaloïde possède le même point de fusion que le picrate de dihydro-toxiférine isolée du curare (169bis) nous ont incité à comparer les deux produits.

c) Dosage d'azote

Cette analyse réalisée par Mr G. DIVE, stagiaire en pharmacie dans le service du Professeur C. LAPIERE, a donné une valeur de 8,51 % pour une valeur théorique de 8,57 %, dans le cas de la dihydro-toxiférine.

* (Service du Prof. J. BOSLY)

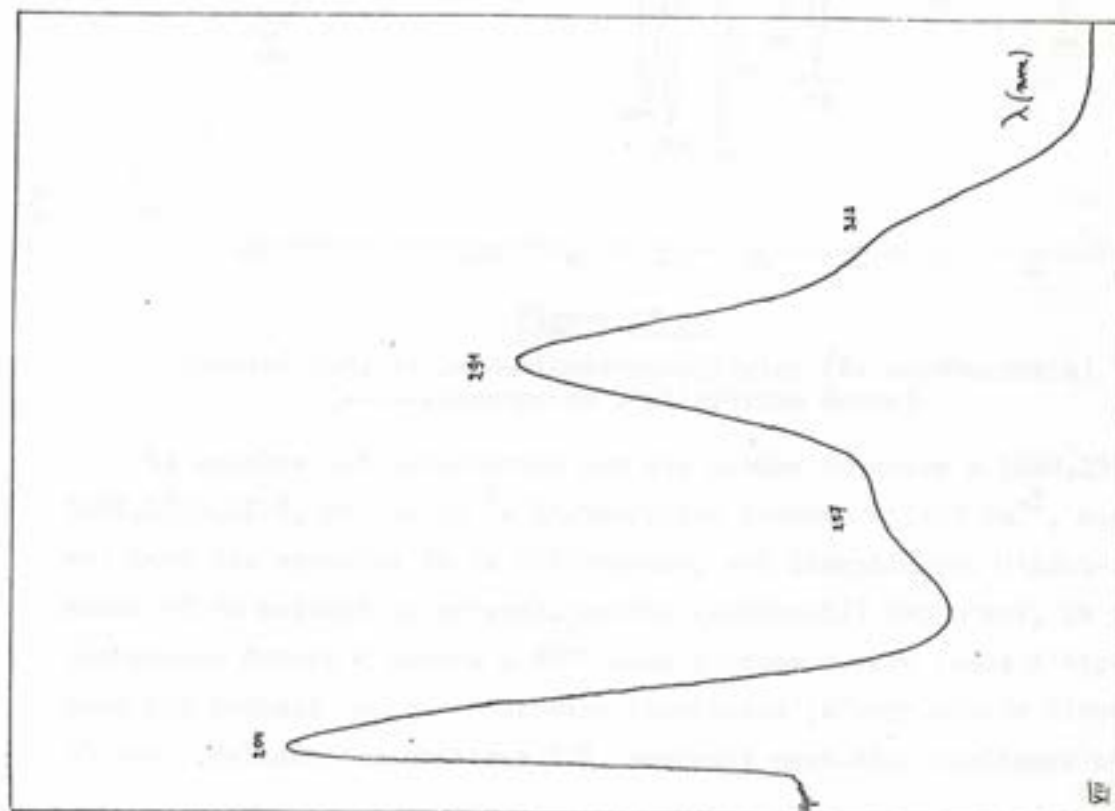


Figure n° 62

Spectre U.V. de la C-dihydro-toxiferine
isolée du *S. usambarensis*
——: milieu neutre

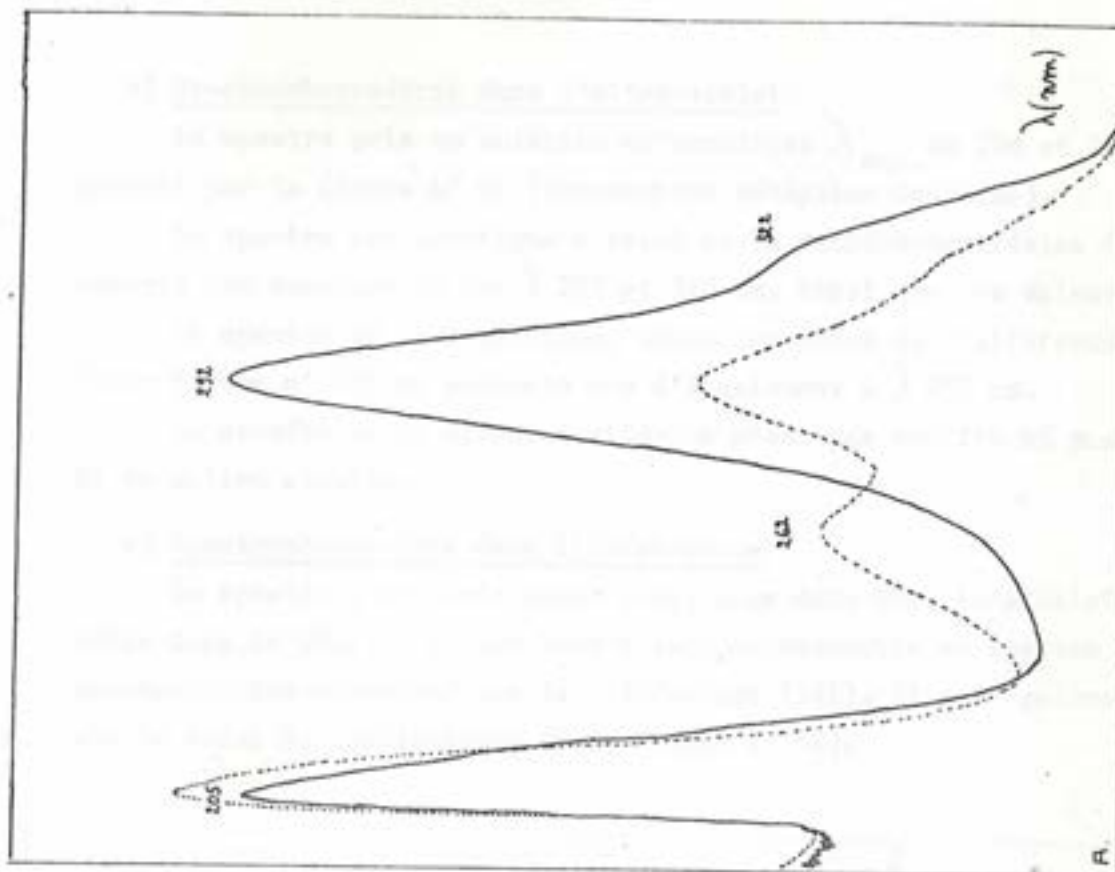


Figure n° 63

Spectre U.V. de l'Alloferine Roche (168)
——: milieu neutre
-----: milieu acide

d) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet

Le spectre pris en solution méthanolique λ_{max} nm 204 et 291 est reproduit par la figure n° 62 (chromophore méthylène-indoline).

Le spectre est identique à celui de la dihydro-toxiférine (141), y compris les épaulements aux λ 257 et 322 nm, ainsi que les valeurs ϵ .

Le spectre de la toxiférine, ainsi que celui de l'alloférine Roche (voir figure n° 63) ne présente pas d'épaulement à λ 257 nm.

Le spectre de la dihydrotoxiférine n'est pas modifié ni en milieu acide, ni en milieu alcalin.

e) Spectrophotométrie dans l'infra-rouge

Le spectre a été pris après pastillage dans KBr. (L'alcaloïde est insoluble dans le CHCl_3). Il est tout à fait superposable au spectre de la dihydro-toxiférine renseigné par la littérature (141). Il est également très proche de celui de l'alloférine (voir figure n° 64).

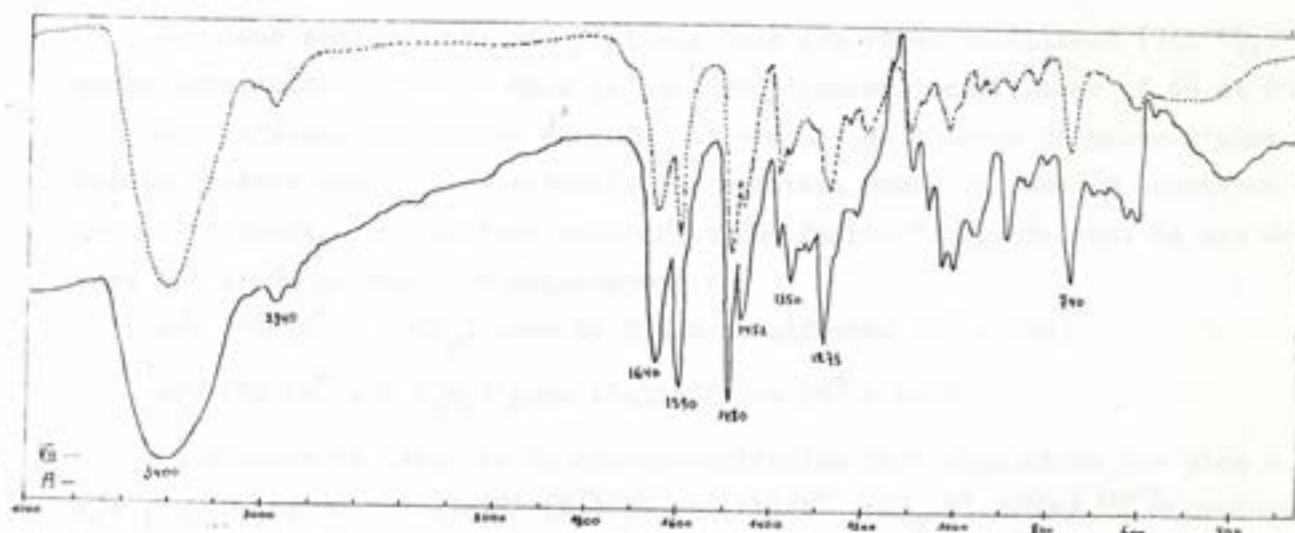


Figure n° 64

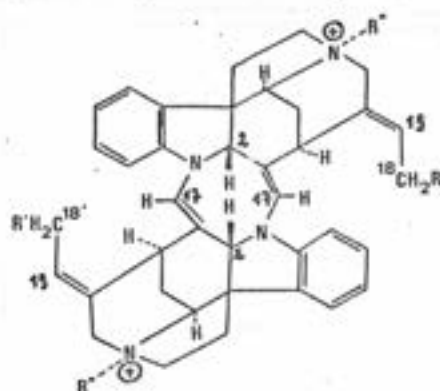
Spectre I.R. de la C-dihydro-toxiférine (*S. usambarensis*)
(-----:spectre de l'alcoaloïde isolé de F 9)

Le spectre est caractérisé par des bandes intenses à 1640, 1590, 1480, 1452, 1350, 1275, et 740 cm^{-1} . L'absorption intense à 3400 cm^{-1} , aussi observée dans les spectres de la littérature, est inexpliquée. S'agit-il d'une bande OH du solvant de cristallisation (méthanol)? Cependant, le produit déshydraté durant 2 heures à 80°C dans l'étuve à vide avant d'être pastillé dans KBr fournit encore un spectre identique! (L'hygrométrie élevée du local où sont réalisés les spectres I.R. pourrait peut-être expliquer ce phénomène).

f) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse lève toute ambiguïté au sujet de l'identité de l'alcoaloïde isolé de F 9 et de la C-dihydro-toxiférine. Nous avons d'autre

part comparé le spectre de notre alcaloïde avec celui de l'alloférine Roche, spectre qui n'avait pas été publié à ce jour.



$R = R' = H; R'' = CH_3$	C-Dihydro-toxiférine
$R = R' = OH; R'' = CH_3$	C-Toxiférine
$R = R' = OH; R'' = CH_2-CH=CH_2$	Alloférine

Les deux spectres ont été réalisés dans les mêmes conditions (240°C), après introduction directe dans la chambre d'ionisation (figures n° 65 et 66).

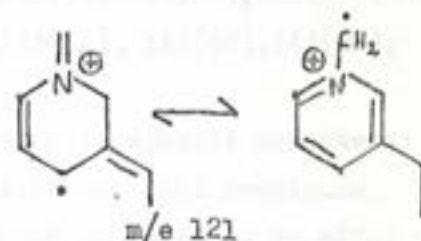
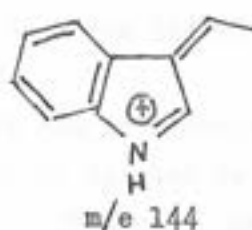
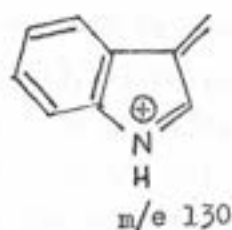
Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de spectre de masse d'alcaloïdes dimères symétriques extraits des curares. Comme on peut le constater sur les figures, les spectres présentent une faible fragmentation. Le pic de base est l'ion moléculaire déquaternarisé:

m/e 552 ($M^+ - 2 CH_3$) pour la dihydrotoxiférine ($M^+ = 582$)

m/e 584 ($M^+ - 2 C_3H_5$) pour l'alloférine ($M^+ = 666$)

Le spectre de masse de la dihydrotoxiférine fait apparaître des pics à m/e (intensité relative): 582 (M^+)(3), 566(31) ($M^+ - CH_3 - H$), 276(m/e 552⁺⁺ ou produit du clivage de l'ion 552(30), 144(30), 143(14), 130(20), 122(37), 121(38).

Les ions m/e 130, 143 et 144 contiennent l'azote indolique, tandis que les ions m/e 121 et 122 contiennent Nb et la chaîne vinylique (170):



Ce mode de fragmentation se rapproche de celui de l'akuammicine, en ce qui concerne l'ion 121 (170).

Les ions m/e 50 et 52 correspondent à CH_3Cl^{35} et CH_3Cl^{37} .

Le spectre de masse de l'alloférine fait apparaître des pics à m/e

SPECTRE DE MASSE DE LA C- DIHYDROTOXIFERINE
ISOLEE DU STRYCHNOS USAMBARENSIS

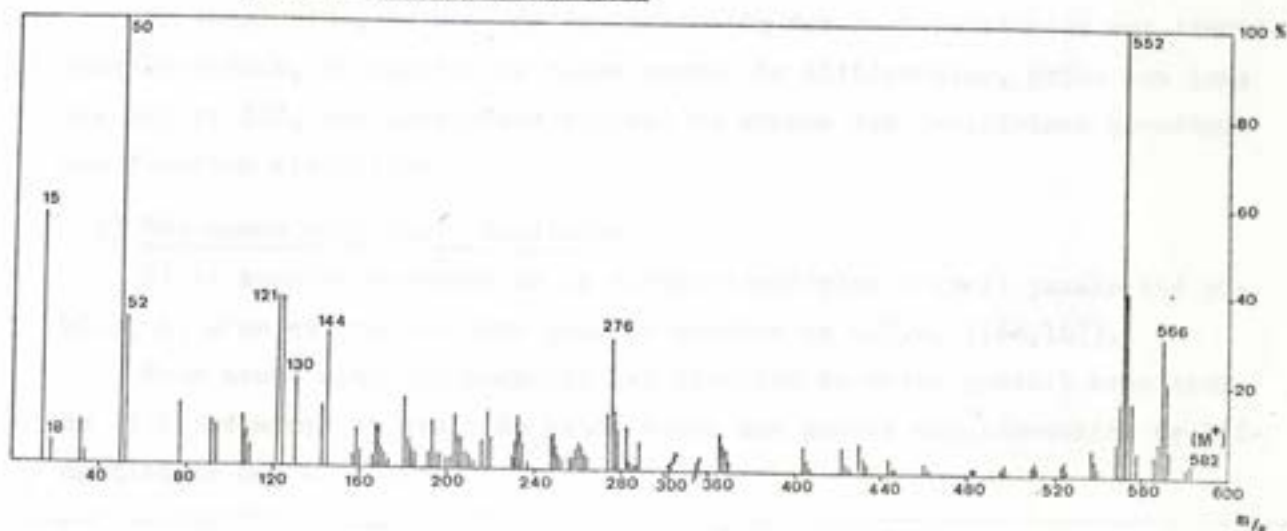


Figure n° 65

SPECTRE DE MASSE DE L'ALLOFERINE ROCHE

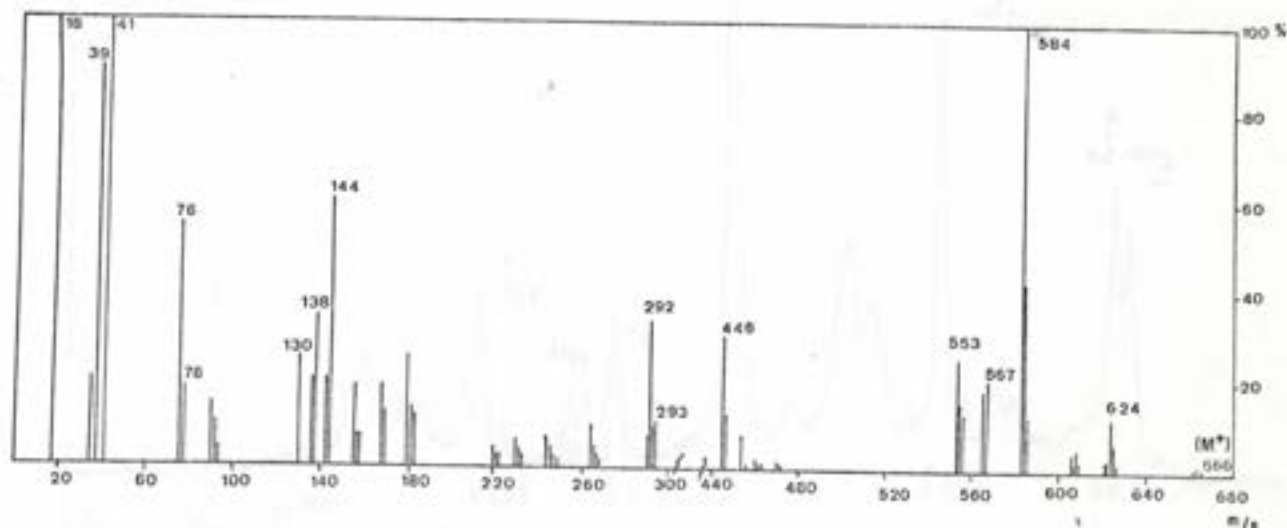


Figure n° 66

(intensité relative) 666 (M^+)(I), 624 ($M^+ - C_3H_5 - H$)(12), 584(100), 292 (m/e 584⁺⁺ ou produit de clivage de l'ion 584)(33), 292,5(10), 293(II), 144(60), 143(20), 138(34), 137(20), 130(25).

Les ions m/e 130, 143 et 144 se rencontraient déjà dans le spectre précédent; les ions m/e 121 et 122 du spectre de la dihydrotoxiférine sont remplacés par les ions m/e 137 et 138 dans le cas de l'alloferine qui possède en effet une chaîne $C = CH - CH_2OH$ au lieu de $C = CH - CH_3$.

Les ions m/e 76 et 78 correspondent à $C_3H_5Cl^{35}$ et $C_3H_5Cl^{37}$

Les ions m/e 39 et 41 proviennent du groupe allyle ($C_3H_3=39$; $C_3H_5=41$). L'ion m/e 18 provient de la fonction alcoolique absente dans la dihydrotoxiférine.

L'ion m/e 446(30) peut s'interpréter comme le résultat du départ de l'ion 138 à partir du pic de base, l'ion 584.

En conclusion, le mode de fragmentation des deux substances est identique; cependant, le spectre de masse permet de différencier, grâce aux ions m/e 121 et 122, les alcaloïdes dihydro du groupe des toxiférines possédant une fonction alcoolique.

g) Résonance magnétique nucléaire

Si le spectre de masse de la dihydrotoxiférine n'avait jamais été publié, il n'en est pas de même pour le spectre de R.M.N. (166,167).

Nous avons ainsi pu comparer les spectres de notre produit avec ceux de la littérature et avoir de cette façon une preuve supplémentaire de l'identité de cet alcaloïde.

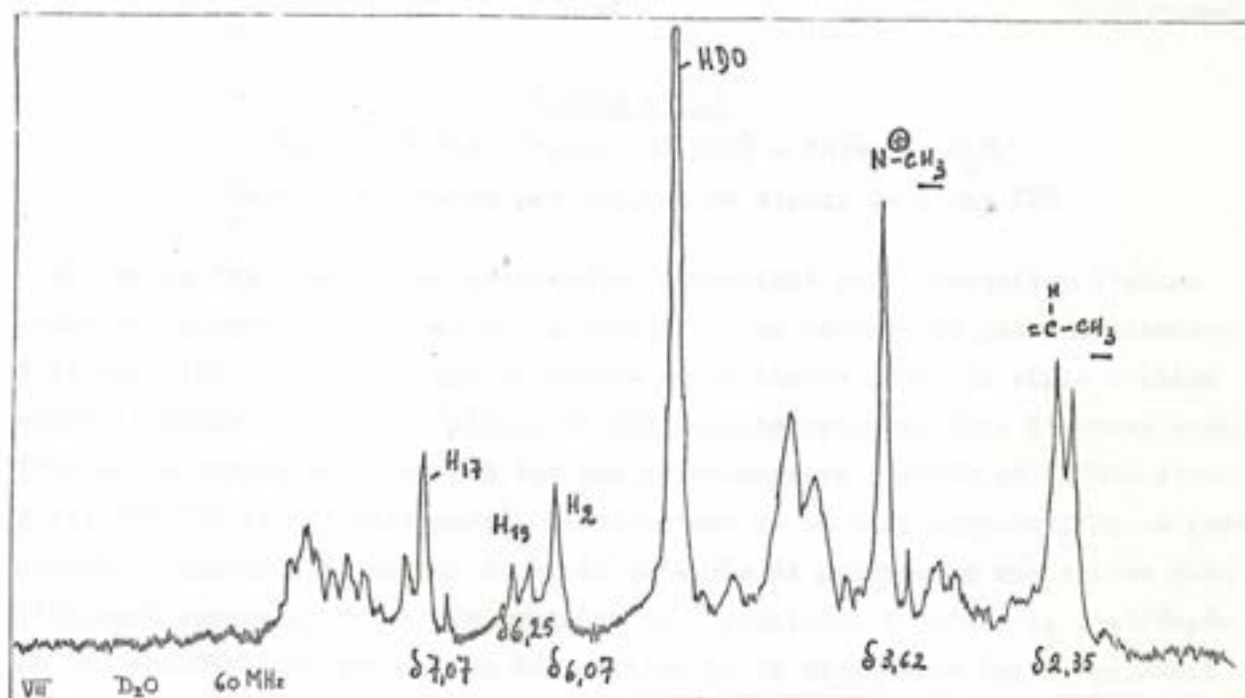


Figure n° 67

Spectre R.M.N. (60 MHz) de la dihydrotoxiférine
(isolée du *Strychnos usambarensis* (solvant: D_2O))

Ce spectre est identique à celui paru dans les références 166 et 167. Les protons C_{17} et $C_{17'}$, α -énamine sont probablement déplacés vers les champs faibles, suite à l'anisotropie de l'atome d'azote.

La figure suivante met en évidence la chaîne $-CH-CH_3$, grâce à la technique de la double irradiation, placée au niveau du signal du groupe méthyle (doublet de droite). De cette façon, le quadruplet du proton éthylidénique se transforme en singulet.

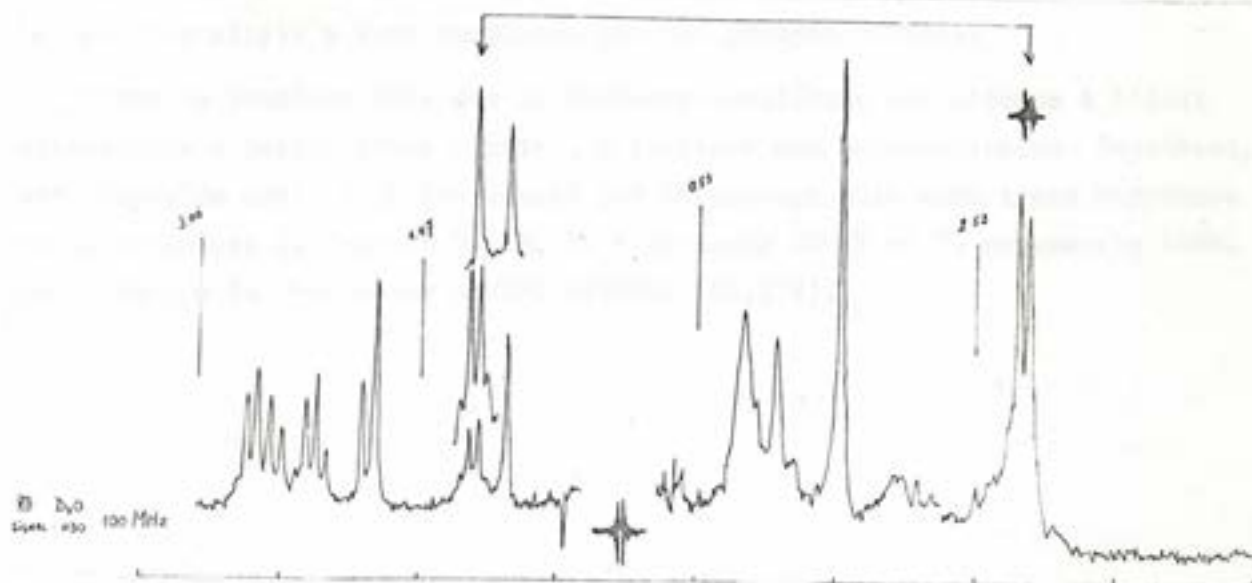
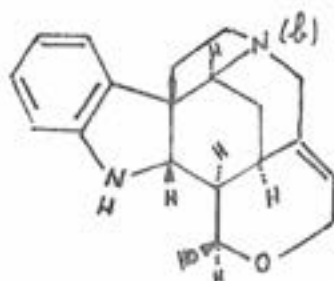


Figure n° 68

Spectre R.M.N. (Varian HA 100) - Solvant: D₂O

Valeurs exprimées par rapport au signal de l'eau HDO

h) Toutes les expériences précédentes concordent pour identifier l'alcaloïde de la fraction 9 à la C-dihydro-toxiférine découverte pour la première fois par WIELAND en 1941 dans le curare en calebasse (d'où le sigle C placé avant l'alcaloïde)(171). L'alcaloïde fut ensuite retrouvé dans d'autres échantillons de curare par d'autres équipes de chercheurs (KARRER et SCHMID d'une part; BOEKELHEIDE d'autre part). La structure de la C-dihydro-toxiférine (synonyme: C-Alcaloïde K) ne fut élucidée qu'après de nombreuses recherches dont l'élément essentiel fut l'hémisynthèse de l'alcaloïde à partir de l'aldéhyde de WIELAND-GUMLICH, produit de dégradation de la strychnine (mais également présent dans certains Strychnos sud-américains (169)).



aldéhyde de Wieland-Gumlich (ou Caracurine VII)

Quand on compare les formules de la toxiférine et de la dihydro-toxiférine, on s'aperçoit que le terme dihydro est incorrect et qu'il serait préférable d'appeler l'alcaloïde: C-désoxy-toxiférine.

La formule de la toxiférine est semblable à celle de l'alloférine (p.110). Les groupes allyle y sont remplacés par des groupes méthyle.

C'est la première fois que la C-désoxy-toxiférine est obtenue à l'état cristallisé à partir d'une plante, à fortiori non sud-américaine. Cependant, cet alcaloïde avait déjà été décelé par chromatographie dans trois *Strychnos* sud-américains: *S. froesii* DUCKE, *S. divaricans* DUCKE et *S. panamensis* SEEM. par l'équipe du Professeur MARINI-BETTOLO (94,172).

*
* *

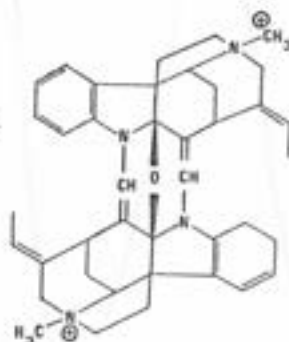
Chapitre XII

C-CURARINE

La découverte de la C-dihydro-toxiférine nous a incité à rechercher la présence de la C-curarine, alcaloïde dérivant directement de la dihydro-toxiférine, comme cela a été démontré par KARRER et SCHMID (173).

D'ailleurs, chaque fois que la C-dihydro-toxiférine a été isolée d'un curare ou d'une plante, les chercheurs identifiaient aussi la C-curarine (94).

La C-curarine se distingue de la C-dihydro-toxiférine par l'existence d'un pont (atome d'oxygène) traversant le système central diazacyclooctadiène.



C-curarine

La présence de C-curarine est facilement détectée sur les chromatogrammes car elle prend une coloration bleue intense avec le réactif au sulfate cérrique.

Les Professeurs G.B. MARINI-BEFTOLO et F. DELLE MONACHE (Rome) ont eu la gentillesse de nous envoyer un échantillon de C-curarine. Grâce à cet envoi, nous avons pu rapidement détecter dans la fraction 13 un alcaloïde se comportant de la même façon que la C-curarine de référence (test de l'étalon interne)(voir figure n° 60 et 61).

Nous avons alors procédé à l'isolement de cette substance par chromatographie préparative sur papier Whatman 3 MM dans le système D (acétate d'éthyle-pyridine-eau). L'alcaloïde recherché a été élué par le méthanol et cristallisé dans le mélange méthanol-éther.

Le spectre U.V. pris dans le CH_3OH (figure n° 69) λ_{max} nm 207, 262, 295 est superposable aux spectres de la littérature (141), ainsi qu'au spectre de la C-curarine de référence. Les intensités (ϵ) sont également identiques. Ce spectre est caractéristique du chromophore de la C-curarine.

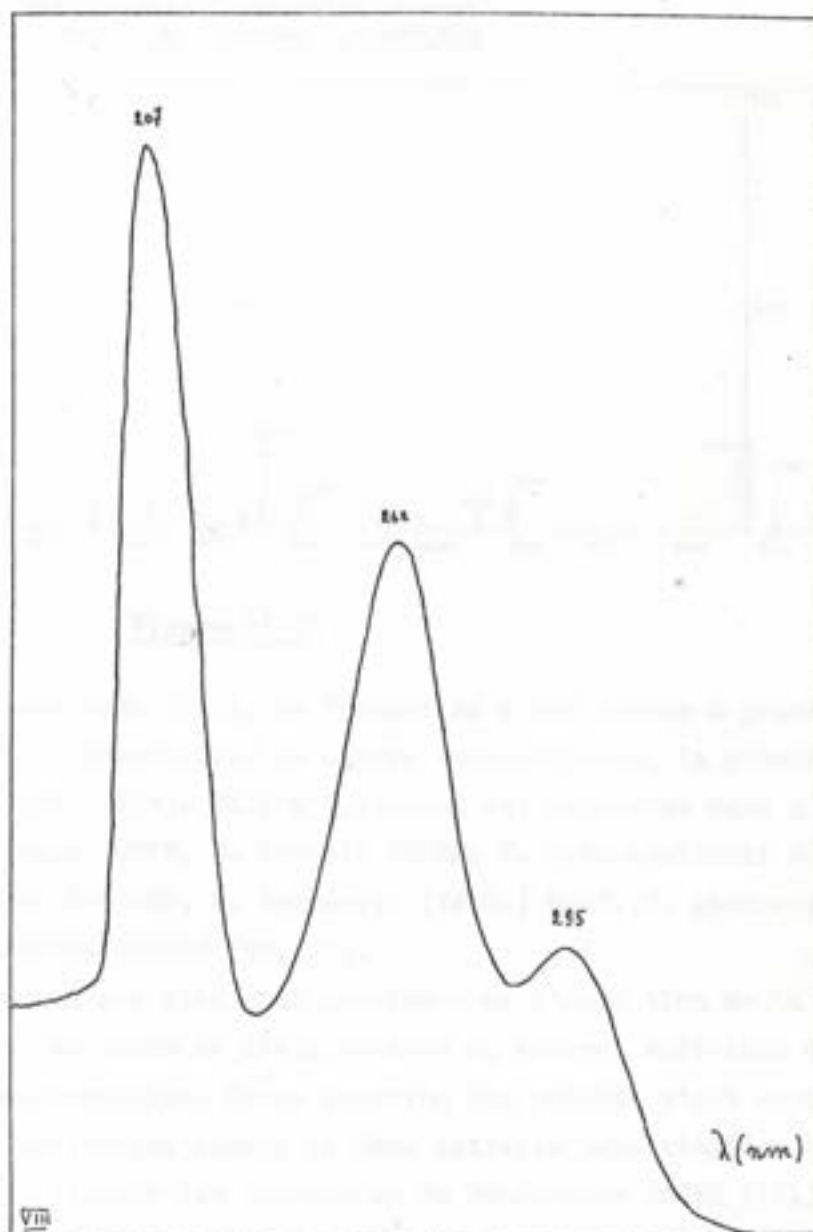


Figure n° 69

Spectre U.V. de la C-curarine isolée du *Strychnos usambarensis*

Le spectre de masse a été réalisé après introduction directe de l'échantillon dans la chambre d'ionisation à la température de 215°C et sous une tension d'ionisation de 70 eV. Le spectre reproduit dans la figure n° 70 montre un mode de fragmentation identique à celui de la dihydro-toxiférine: m/e (intensité relative) 596 (M^+)(1), 580 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}$)(10), 567(50), 566 (100 = pic de base; $\text{M}^+ - 2 \text{CH}_3$), 565(20), 458(9), 443(4), 283 (pic de 566⁺ ou produit de clivage symétrique du pic de base 566(19), 144(9), 143(6), 130(9), 122(32), 121(28).

On retrouve les ions caractéristiques des désoxy-toxiférines: m/e 121,122. Les ions m/e 50 et 52 correspondent à CH_3Cl^{35} et CH_3Cl^{37} .

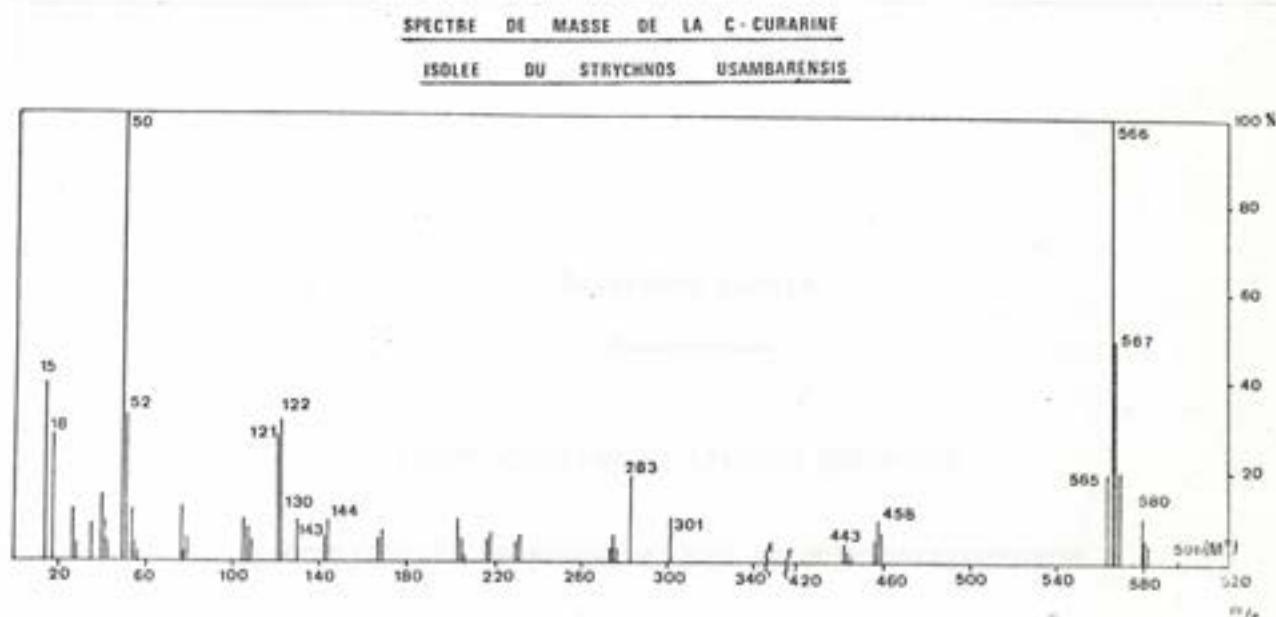


Figure n° 70

Comme nous l'avons déjà écrit, la C-curarine a été isolée à plusieurs reprises de différents échantillons de curare sud-américain, la première fois par WIELAND en 1937 (174). Elle a également été retrouvée dans divers *Strychnos* (*S. divaricans* DUCKE, *S. froesii* DUCKE, *S. mitscherlichii* RICH. SCHOMB, *S. solimoesana* KRUKOFF, *S. trinervis* (VELL.) MART., *S. gardneri* A.D.C.) par le Professeur MARINI-BETTOLO (94,175).

Il est possible que cet alcaloïde provienne de l'oxydation de la C-dihydro-toxiférine, soit au cours de l'élaboration du curare, soit lors des procédés d'isolement en laboratoire. Cette question non résolue n'est cependant pas capitale car le C-curarine aurait la même activité physiologique que la C-dihydro-toxiférine, d'après les recherches du Professeur WASER (121).

De nombreuses recherches chimiques ont été consacrées à la C-curarine. On en trouvera une synthèse dans les publications de BATTERSEY et HODSON (176).

Signalons enfin que la structure de la C-curarine vient d'être confirmée par des études de diffraction aux rayons X (196). Il a ainsi été montré que la distance entre le 2N quaternaires était de 8,5 Å, valeur très proche de la distance trouvée (8,8 Å) pour le bromure d'hexamethonium.

Quatrième partie

IDENTIFICATION DE L'ACIDE LOGANIQUE

CONSIDERATIONS BIOGENETIQUES ET CHIMIOTAXINOMIQUES

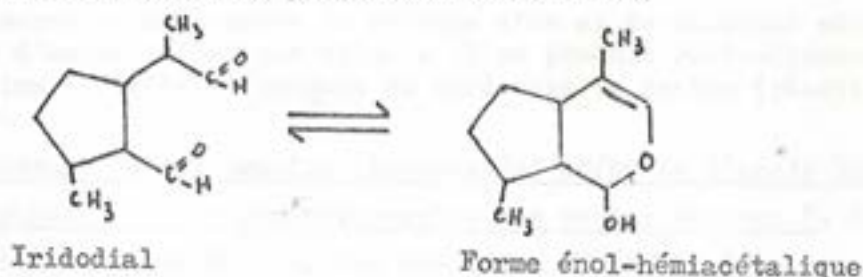
" There has been a transformation over recent years in our understanding of the ways in which terpenoid alkaloids are biosynthesized and so much ground has been covered that it is not possible in a short review to cover the field in any comprehensive way "

Pr A.R. BATTERSBY

Chapitre I

IDENTIFICATION DE L'ACIDE LOGANIQUE

L'acide loganique (ou loganosique) ainsi que la loganine (ou loganoside) font partie des iridoïdes, qui sont des produits possédant un cycle cyclopentane accolé à un cycle ^{pyrone} ~~furane~~ (191, 194). Le terme iridoïde provient de la parenté que présentent ces composés avec l'iridodial:



La loganine est un hétéroside isolé dès le siècle passé de la pulpe des fruits de Strychnos nux-vomica. La structure plane ne fut cependant établie (197) qu'en 1961 et la configuration spatiale sept ans plus tard (198). Sa mise en évidence aisée (apparition d'une coloration rouge-violacée avec l'acide sulfurique chaud) a été mise à profit pour l'identification des préparations galéniques de S. nux-vomica (par ex. Pharmacopée Belge 5e édition).

Cet hétéroside avait été recherché par le Professeur DENOËL et ses collaborateurs lors du screening sur les Strychnos du Zaïre (41). À leur étonnement, ils ne découvrirent de la loganine que dans très peu de Strychnos zaïrois mais, par contre, ils décelèrent un composé voisin qui fut appelé acide loganosique par JAMINET (178). Ce produit fut isolé en 1968 d'une gentianacée: le Swertia carolinensis (WALT) KUNTZE et récemment des fruits de S. nux-vomica par CHOUDHURY. L'acide loganique présente la même coloration que la loganine sous l'effet de l'acide sulfurique à chaud et un spectre U.V. très proche. Cependant, en chromatographie, les deux produits sont aisément séparés.

Nous avons donc recherché ces hétérosides par la technique mise au point dans le laboratoire de pharmacognosie en 1948 (41). Il était indispensable de purifier les extraits car il y avait trop de substances colorées dans l'extractif de Strychnos usambarensis, ce qui empêchait d'observer la coloration rouge-violacée qui apparaît avec l' H_2SO_4 chaud lors de la présence de ces hétérosides.

Mode opératoire suivi (d'après 41)(p. 59-60):

Dix grammes de poudre sèche d'écorce de racines sont épuisés par macération au reflux au bain-marie bouillant pendant 3 heures au moyen de 100 ml d'éthanol à 50°. Après refroidissement, la poudre épuisée est filtrée et lavée avec 50 ml d'éthanol à 50° employés en trois fois. Les extraits alcooliques sont concentrés sous vide jusqu'au départ de l'éthanol. On reprend par 100 ml d'eau distillée tiède puis on filtre. Au filtrat limpide obtenu, on ajoute 25 ml de solution d'acétate de plomb neutre et 25 ml de solution d'acétate de plomb basique. On laisse déposer pendant 15 minutes le précipité formé, on filtre et on lave avec 50 ml d'eau distillée employés en quatre fractions. Les solutions aqueuses sont réunies et traitées pendant deux heures par un courant d'acide sulfhydrique pour éliminer l'excès de plomb. Le précipité de PbS formé est filtré, lavé par 50 ml d'eau distillée employés en quatre fois et les solutions aqueuses filtrées sont réunies et évaporées au bain-marie jusqu'au volume de 10 ml.

Cette solution a été utilisée pour réaliser les essais suivants:

- A. Test global: recherche des iridoïdes par la réaction à l'acide sulfurique chaud effectuée dans une capsule de porcelaine.

Evaporer au bain-marie le mélange d'un ml de solution et de 10 gouttes d'acide sulfurique dilué = il se produit graduellement une coloration violette s'étendant du bord vers le centre (réaction positive).

- B. Recherche de la loganine (loganoside) et/ou de l'acide loganique (loganosique) par chromatographie sur papier Whatman I. Grâce à l'obligeance de MM. les Drs BISSET et CHOUDHURY (Chelsea College, University of London), nous avons pu disposer de substances de référence (loganine et acide loganique) afin de rechercher la présence de ces hétérosides dans le Strychnos usambarensis (épreuve de l'étalon interne).

Phase mobile: phase de Partridge = n-Butanol-HAc-Eau distillée 4:1:5.

Révélateurs: I. acide sulfurique à 10 % dans l'éthanol à 80°. Le chromatogramme ainsi vaporisé est placé à l'étuve à 100°C pendant quelques minutes. La loganine et l'acide loganique apparaissent sous la forme de spots rouge violacés.

- II. solution de trichlorure d'antimoine à 15 % dans le chloroforme (181). Il y a également apparition d'une coloration rouge-violette après chauffage de quelques minutes à l'étuve portée à 100°C.

De la sorte, nous notons l'absence de loganine d'une part et la présence d'acide loganique (spot à Rf 0,50)(étalon interne) et d'une autre substance révélée en bleu par les deux réactifs (substance migrant à un Rf de 0,55).

- C. Spectre U.V. du produit d'élution de la substance migrant à Rf 0,5

Nous réalisons au préalable une chromatographie préparative sur papier Whatman 3 MM dans la phase de Partridge. Après dessiccation du chromatogramme et élution à l'aide de méthanol, nous avons pris le

spectre de la substance migrant à Rf 0,5. La figure n° 71 montre un spectre correspondant à celui de la littérature (41, p. 97).

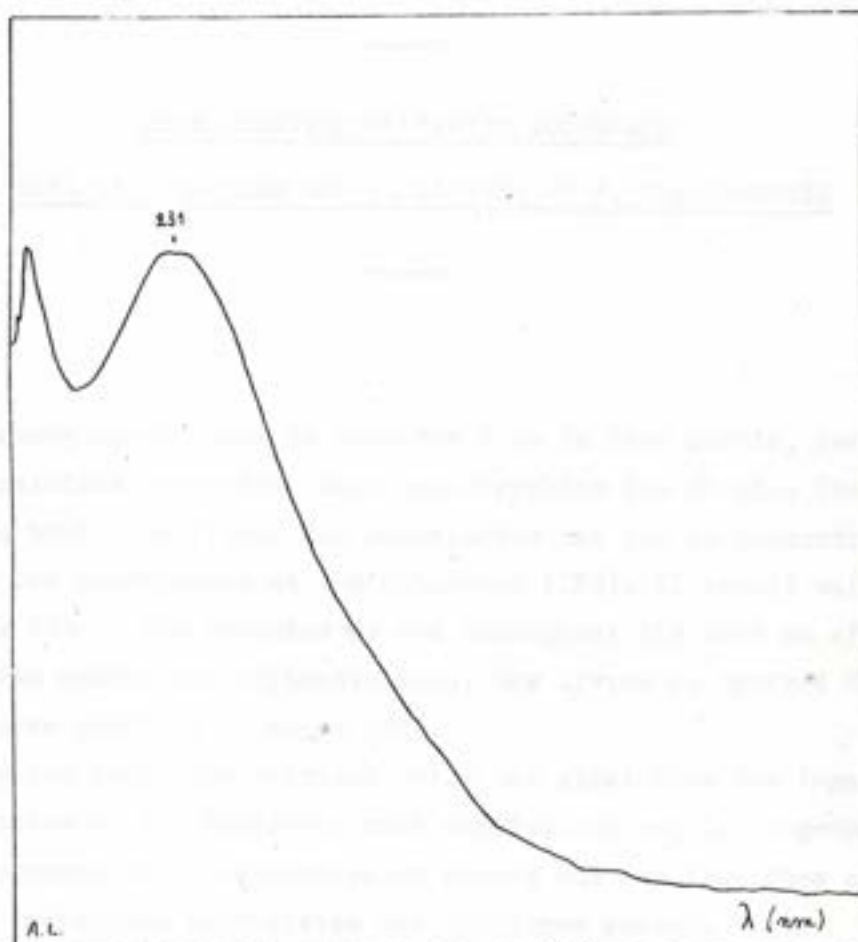
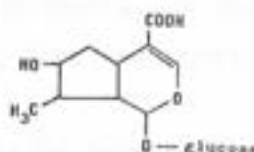


Figure n° 71 -

Spectre U.V. de l'acide loganique $\lambda_{\text{max.}}$ nm: 231 (log ϵ : 3,719)

Ces essais nous permettent de conclure à la présence d'acide loganique dont la structure a été établie en corrélation avec la structure révisée de la loganine (voir formules dans le tableau 13)

PRÉCURSEUR BIOGÉNÉTIQUE
DES ALCALOÏDES



ACIDE LOGANIQUE (ou LOGANOSIQUE)

Chapitre II

ROLE POSSIBLE DE L'ACIDE LOGANIQUE

DANS LA BIOGENESE DES ALCALOÏDES DU S. USAMBARENSIS

Nous avons montré dans le chapitre I de la 3ème partie, les différents types d'alcaloïdes rencontrés dans les Strychnos (p. 40-41). Ces types ne sont pas du tout spécifiques des Loganiacées car ils se rencontrent fréquemment parmi les Apocynacées et les Rubiacées (183). Il serait vain de reprendre dans le détail des exemples de ces analogies: ils sont en effet trop nombreux et bien connus des phytochimistes. Les livres de Manfred HESSE seront consultés avec profit à ce sujet (94).

Toutes les relations existant entre les alcaloïdes des Loganiacées, des Apocynacées et des Rubiacées sont explicables par la biogenèse des alcaloïdes, biogenèse dont les principales étapes ont été élucidées au terme de brillantes recherches poursuivies ces dernières années.

Des rapports récents établis par des spécialistes de la question viennent d'être publiés (177,180,182,190). Nous avons résumé l'essentiel de ces recherches dans les tableaux suivants qui illustrent d'une part les similitudes existant lors de la biogenèse des alcaloïdes contenus dans les 3 familles, d'autre part le rôle essentiel de la loganine (et vraisemblablement de l'acide loganique) d'où est issue la partie monoterpénique des alcaloïdes.

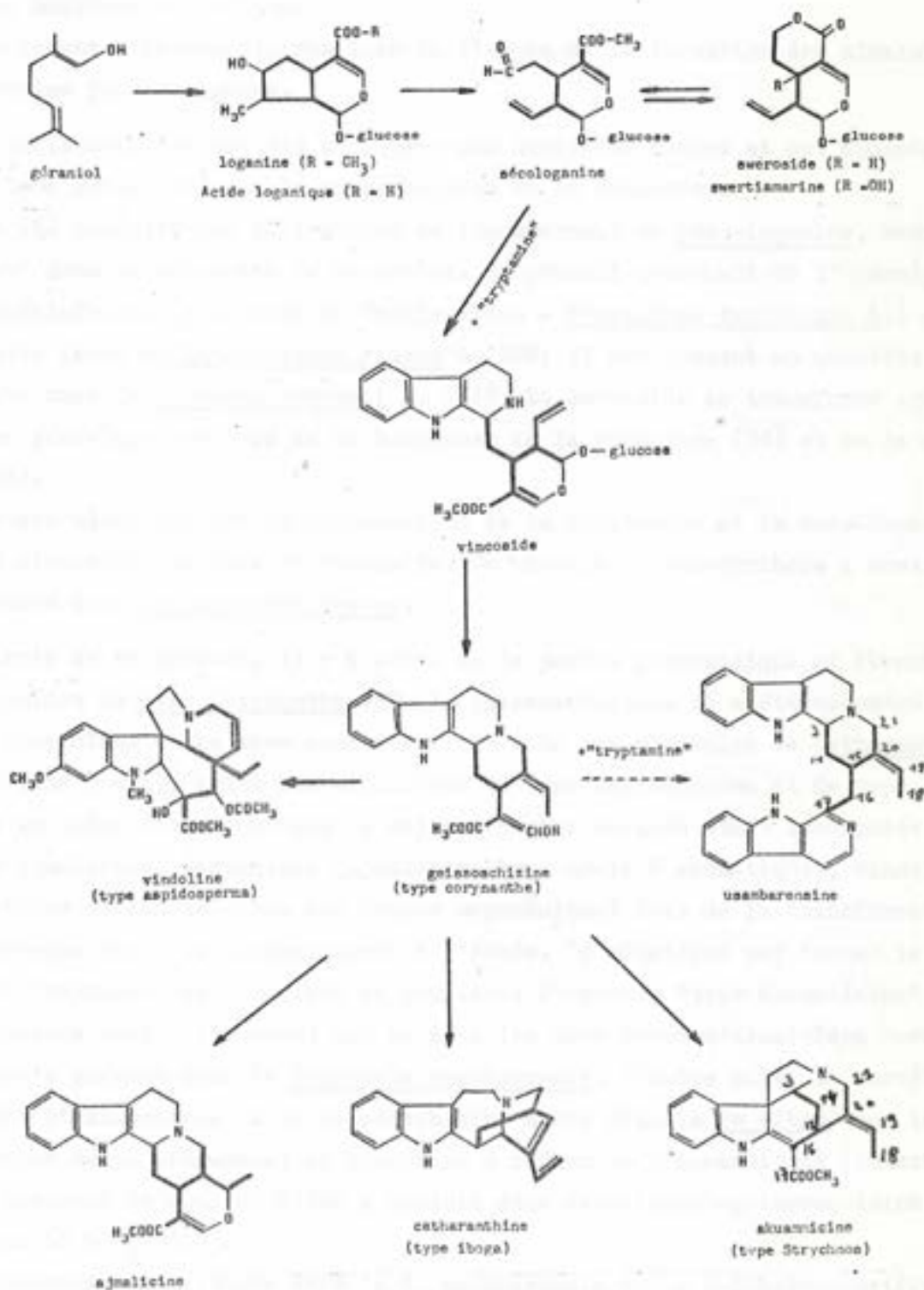
Ainsi que l'indique le tableau 13, la biogenèse des alcaloïdes indoliques résulte de la condensation d'un acide aminé (tryptophane) ou de l'amine dérivée (tryptamine) avec un monoterpénoïde (sécologanine). Les différentes étapes ont été établies après incorporation des différents produits intermédiaires marqués au C_{14} et/ou à $1'H_3$ dans des positions déterminées. (Analyse par dilution isotopique).

Le géraniol provient de deux molécules d'acide mévalonique qui sont transformées en isopentenylpyrophosphate puis en géranylpyrophosphate. Il se forme ensuite de la déoxyloganine, de l'acide déoxyloganique et au stade suivant de la loganine et de l'acide loganique.

Trois procédés ont été utilisés pour découvrir les intermédiaires biosynthétiques existant entre la loganine et les alcaloïdes indoliques:

TABLEAU 13

BIOSYNTHESE POSSIBLE DES ALCALOÏDES INDOLIQUES



- 1° préparation des substances par synthèse, afin de les tester ensuite comme précurseurs des alcaloïdes
- 2° détermination des changements de niveaux d'oxydation se passant aux différents atomes de C du squelette de la loganine, afin de comprendre les stades conduisant aux trois familles d'alcaloïdes (Corynanthe et Strychnos; Iboga; Aspidosperma). Ce procédé exige un usage intense de molécules marquées au tritium.
- 3° isolement d'intermédiaires lors de l'étude de la formation des alcaloïdes dans les jeunes plantes.

Ces trois méthodes ont été utilisées ces dernières années et ont apporté chacune leur contribution à la compréhension de la biogenèse.

Il a été démontré que la loganine se transformait en séco-loganine, composé "pivot" dans le mécanisme de biogenèse. Ce produit provenant de l'hydrolyse de la menthaifoline (glucoside du Trèfle d'eau = Menyanthes trifoliata L.) a été ensuite isolé du Catharanthus roseus G. DON; il est présent en quantité importante dans le Lonicera morrowii A. GRAY. Le swéroside se transforme également en séco-loganine lors de la biogenèse de la vindoline (34) et de la quinine (189).

Le stade ultérieur est la condensation de la tryptamine et la seco-loganine en un glucoside basique: le vincoside. Ce produit d'hémi-synthèse a ensuite été retrouvé dans Catharanthus roseus.

A partir de ce composé, il y a perte de la partie glucosidique et formation des alcaloïdes de type Corynanthe, telle la geissoschizine. Il a été démontré que les alcaloïdes de ce type apparaissaient dans les plantules de Catharanthus roseus (Vinca rosea), avant les alcaloïdes de type Aspidosperma et de type Iboga. Il a en outre été prouvé que la geissoschizine marquée était incorporée intacte en ajmalicine, serpentine (ajmalicine avec cycle C aromatique), vindoline, catharanthine et akuammicine. Les étapes se produisant lors de la transformation des différents types est actuellement à l'étude. Le mécanisme par lequel le squelette Corynanthe est converti en squelette Strychnos "type akuammicine" nous intéresse particulièrement car ce sont les deux types d'alcaloïdes rencontrés jusqu'à présent dans le Strychnos usambarensis. D'autre part, la corrélation entre l'akuammicine et la geissoschizine a été établie in vitro dans le sens inverse de la biogenèse: un chauffage à reflux de l'akuammicine (durant 20') en présence de zinc et d'HAc a produit de la descarbonyl-geissoschizine (rendement 66 %)(192).

La présence concomitante dans le S. usambarensis de la C-dihydro-toxiférine (alcaloïde de type Strychnos car dimère du type de l'akuammicine) et de l'usambarensine (alcaloïde de type Corynanthe) peut ainsi s'expliquer aisément. Les 2 types d'alcaloïdes proviennent sans doute des mêmes précurseurs biogénétiques.

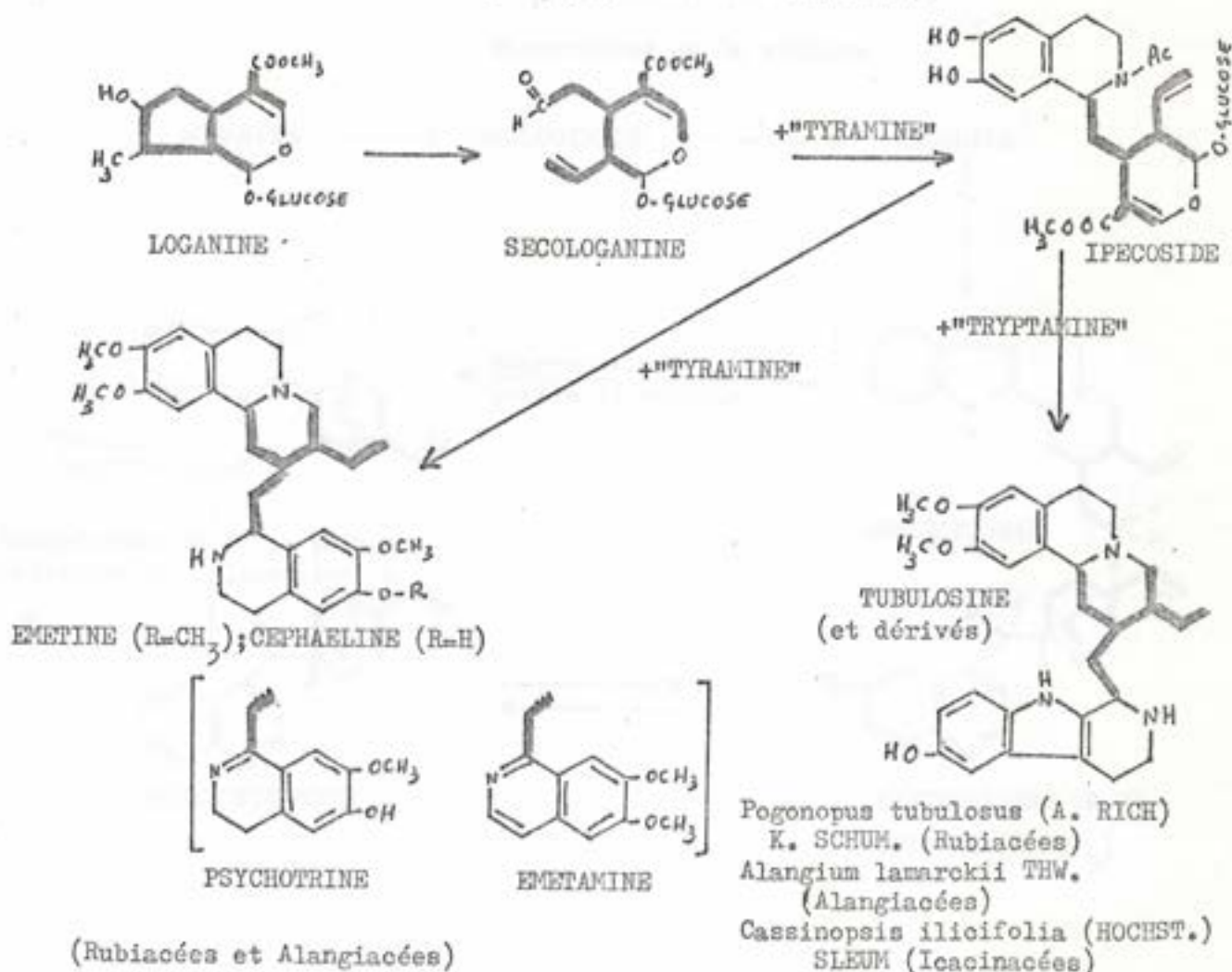
Chapitre III

CORRELATIONS ENTRE LA BIOGENESE DE L'USAMBARENSINE ET CELLE DES ALCALOÏDES DE L'IPECA (Rubiacees), DU QUINQUINA (Rubiacees) ET DES OCHROSIA (Apocynacees)

Les tableaux 14 et 15 montrent le rôle essentiel de la loganine dans la biosynthèse des alcaloïdes de l'Ipéca et du Quinquina (famille des Rubiacées). Avant cette découverte, les relations liant ces deux types d'alcaloïdes aux alcaloïdes indoliques des Apocynacées, Loganiacées et d'autres Rubiacées étaient mystérieuses.

TABEAU 14

Biosynthèse d'alcaloïdes possédant deux unités "amine"
pour une unité monoterpénique



En fin de compte, la biogenèse de l'émétine et alcaloïdes dérivés est semblable à celle d'alcaloïdes indoliques, telle l'usambarensine; la sécologanine se condense à une unité tyramine (au lieu de tryptamine) pour donner l'ipécoside (glucoside basique correspondant au vincoside). Ce composé se condense avec une seconde unité "tyramine" pour donner les différents alcaloïdes du *Cephaelis ipecacuanha* (BROT.) A. RICH - alcaloïdes retrouvés aussi dans *Alangium lamarekii* THW (Alangiacees). Lorsque l'ipécoside se condense avec une unité tryptamine, on obtient la tubulosine et autres dérivés.

Quant à la biosynthèse de la quinine (tableau 15), il est surprenant de constater le rôle de la séco-loganine qui se condense avec une unité "tryptamine" pour fournir le vincoside qui après passage en corynantheal subit un réarrangement de la partie monoterpénoïde en quinuclidine qui aboutit au produit hypothétique (tableau 15) à rapprocher de la formule de la cincho-phyllamine (tableau 16). Il se produit alors une transformation de la partie indolique en quinoline pour en arriver à la structure finale de la quinine et alcaloïdes voisins.

TABLEAU 15

Biosynthèse de la quinine

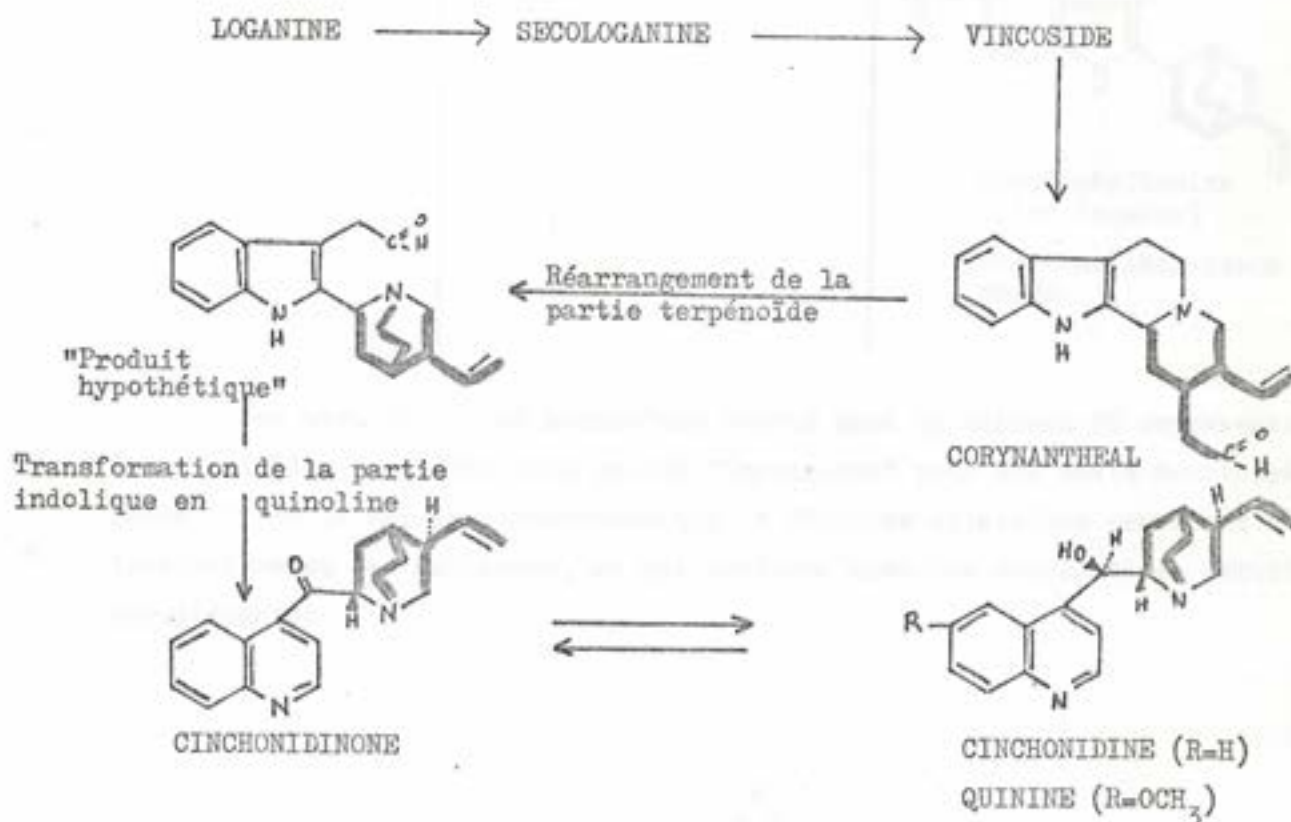
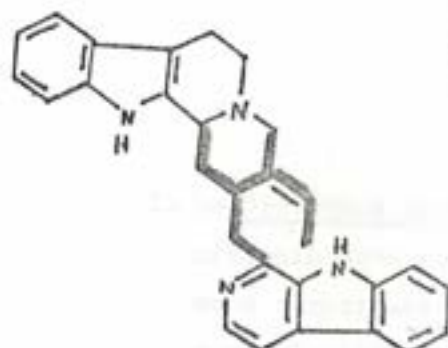


TABLEAU 16

ALCALOIDES POSSEDANT DEUX UNITES TRYPTAMINE ET UNE UNITE MONOTERPENOIDE

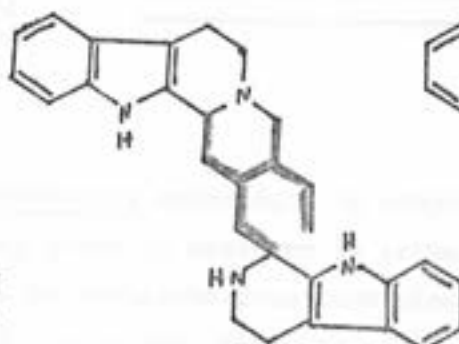
LOGANIACEES



Usambarensine
(et dérivés)

Strychnos
usambarensis GILG

APOCYNACEES



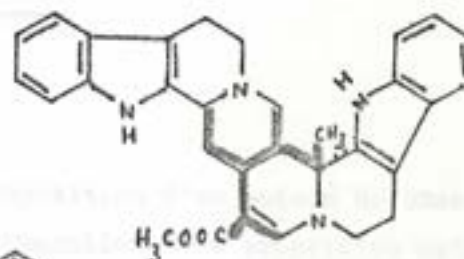
Ochrolifuanines A et B
(Stéréoisomères)

Ochrosia lifuana GUILL.
(193)(195)

Ochrosia confusa PICHON
(139)

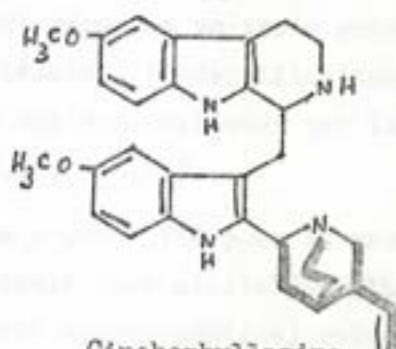
Ochrosia oppositifolia
(LAM.) K. SCHUM. (138)

RUBIACEES



Roxburghines A à E
(Stéréoisomères)

Uncaria gambir ROXB.
(184,185)



Cinchophyllamine
(et isomère)

Cinchona ledgeriana
MOENS

Les structures des alcaloïdes repris dans le tableau 16 représentent des alcaloïdes possédant deux unités "tryptamine" pour une unité monoterpénoïde. C'est le cas de l'usambarensine et d'autres alcaloïdes provenant des Apocynacées et des Rubiacées, ce qui confirme bien les corrélations étroites préexistantes.

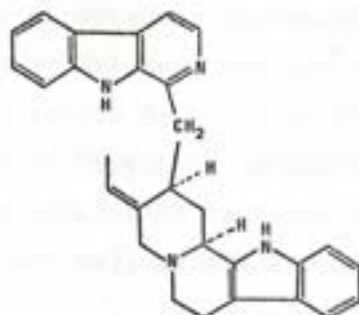
CONCLUSIONS GENERALES

1. Le Strychnos usambarensis entre dans la composition d'un poison de chasse africain dont nous avons pu observer la préparation. Les propriétés nettement curarisantes de certaines fractions alcaloïdiques permettent d'expliquer l'activité de ce poison, de telle sorte que le curare ne doit plus être considéré comme l'apanage de l'Amérique du Sud.
2. Grâce à la chromatographie combinée à un nouveau mode d'extraction utilisant la lyophilisation et évitant la dégradation de certains alcaloïdes très fragiles, nous avons pu isoler huit alcaloïdes à partir des écorces de racines de ce *Strychnos*. Ces alcaloïdes sont répartis en trois groupes (cf tableau n° 17) suivant la polarité des molécules. L'identification et la détermination de structure de ces composés ont été réalisées par le dépouillement des divers spectres (U.V., I.R., S.M., R.M.N.).
3. Alcaloïdes du 1er groupe : à côté de l'harmane - identifié pour la première fois à partir d'une Loganiacée -, nous avons isolé deux alcaloïdes d'un type nouveau (2 unités tryptaminiques et une unité monoterpénique) retrouvés dans les Apocynacées (*Ochrosia*) et les Rubiacées (*Uncaria*), familles très proches d'un point de vue chimiotaxinomique des Loganiacées.
4. Alcaloïdes du 2ème groupe: Ce groupe comprend une nouvelle base anhydronium (la dihydro-flavopéirine) et les dérivés monoquaternaires de l'usambarensine et de la 3,4-dihydro-usambarensine, alcaloïdes bis-indoliques du 1er groupe. Ces produits ont la particularité de posséder à la fois une fonction ammonium quaternaire et une fonction amine tertiaire, ce qui leur confère des propriétés spéciales au point de vue solubilité et extraction notamment.
5. Alcaloïdes du 3ème groupe : A partir de ce groupe très complexe, nous avons isolé deux bases bis-indoliques symétriques diquaternaires: la C-dihydro-toxiférine et la C-curarine, alcaloïdes hautement actifs. Ils ont été isolés auparavant des curares en Calebasses d'Amérique du Sud et repérés par chromatographie dans certains *Strychnos* américains. C'est la première fois que des molécules de ce type sont retrouvées dans un *Strychnos* africain,

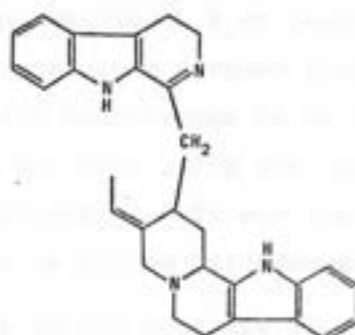
TABLEAU 17

ALCALOIDES ISOLES DU STRYCHNOS USAMBARENSIS Gilg.

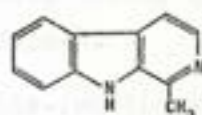
1er groupe



USAMBARENSINE

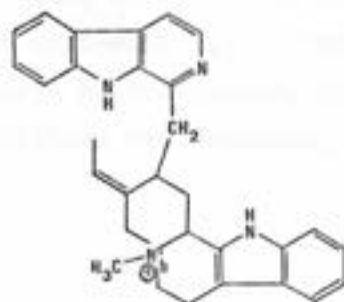


3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

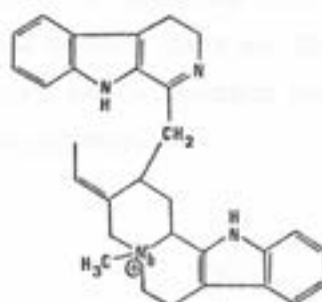


HARMALINE

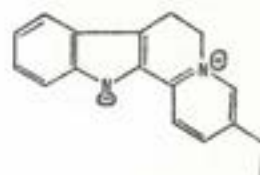
2ème groupe



N'-b-METHYL-USAMBARENSINE

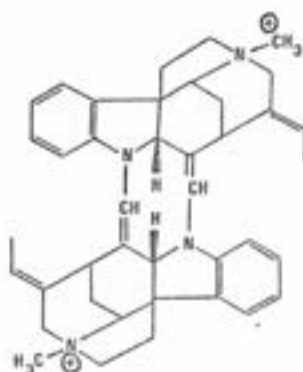


N'-b-METHYL-3,4-DIHYDRO-USAMBARENSINE

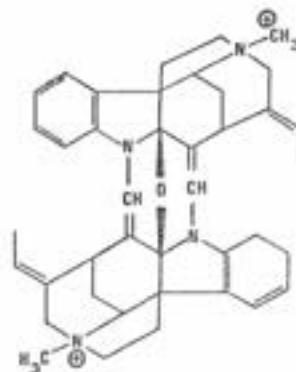


6,7-DIHYDRO-FLAVOPEREIRINE

3ème groupe

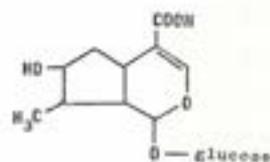


C-DIHYDRO-TOXIFERINE



C-CURARINE

PRECURSEUR BIOGENETIQUE
DES ALCALOIDES



ACIDE LOGANIQUE

dont la diversité chimique alcaloïdique est ainsi clairement démontrée.

6. Nous avons identifié en outre l'acide loganique et discuté le rôle que pouvait jouer ce produit comme précurseur biogénétique des alcaloïdes du type de l'usambarensine aussi bien que du type de la dihydro-toxiférine.
7. Les expériences pharmacologiques réalisées à ce jour (Appendice II), ont mis en évidence une activité atropinique marquée pour l'usambarensine et ont permis de vérifier l'activité curarisante de la dihydro-toxiférine isolée du *Strychnos usambarensis*, de telle sorte que cette plante contient des alcaloïdes exerçant leur activité tantôt sur les muscles lisses (usambarensine), tantôt sur les muscles striés (dihydro-toxiférine).
8. Les principaux alcaloïdes de la plante sont des dimères bis-indoliques soit asymétriques, soit symétriques dont la présence concomitante dans une même plante constitue également une observation inédite. Ils font partie du groupe le plus récent d'alcaloïdes indoliques. Ce groupe fascinant a été découvert ces dernières années dans la période dite post-résérpinique; nous serions heureux d'avoir pu apporter notre contribution - si minime soit-elle -, aux recherches menées dans ce domaine (alcaloïdes des curares en calebasses, alcaloïdes anti-tumoraux des *Catharanthus* (Vinca); alcaloïdes des *Voacanga*, *Geissospermum*...).

*
* *

APPENDICE I

PLANTES RWANDAISES SOUMISES AU SCREENING - RESULTATS

Grâce à un subside du Fonds National de la Recherche Scientifique, nous avons pu réaliser une mission d'étude au Rwanda, durant les mois de février et mars 1970 (saison des pluies). Notre travail a consisté à récolter des échantillons des espèces reprises dans ce chapitre. La plupart des échantillons proviennent de la région orientale du pays (Parc National de l'Akagera et Domaine de chasse du Mutara). Des specimens d'herbier (ANGENOT) ont été déposés en trois endroits: à l'herbarium de l'I.N.R.S. à Butare, au Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles et au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège. Grâce à l'obligeance de Mr Guy BOUXIN, botaniste, chercheur de l'I.N.R.S., nous avons pu recevoir et analyser quelques plantes de la région occidentale du pays, plus exactement de la forêt de Nyungwe. Ces échantillons étaient également accompagnés de specimens d'herbier (BOUXIN) déposés dans les mêmes endroits.

Dans ce chapitre sont reprises les descriptions très sommaires des plantes ainsi que leurs usages au Rwanda et dans d'autres régions d'Afrique (2, 3, 9 à 20). Nous avons également rappelé des recherches antérieures effectuées sur ces plantes ou des espèces voisines (21).

Les noms vernaculaires renseignés sont en kinyarwanda, l'orthographe étant celle adoptée par le Centre de linguistique de l'I.N.R.S. à Butare, dirigé par le Professeur A. COUPEZ.

Les résultats obtenus sont repris dans un tableau d'ensemble (TABLEAU 18). Seules des expériences un peu plus poussées sont reprises dans la systématique (Ipomoea cardiosperma, Anthocleista grandiflora, Strychnos innocua).

Systématique des drogues analysées

Famille des Asclépiadacées

Tylophora conspicua N.E.Br, Nom vernaculaire: IKOBOCBO

Description: liane de 2 m de haut, contenant un latex blanc

Habitat: galeries forestières des lacs de la dépression de l'Akagera

Usage: pour combattre la tuberculose (Rwanda)

Des études chimiques ont déjà porté sur d'autres espèces de Tylophora

et ont abouti à l'isolement et à la structure d'alcaloïdes doués de propriétés anti-cancéreuses: tylocrébrine et autres alcaloïdes. L'espèce rwandaise ne paraît pas posséder d'alcaloïdes.

Famille des Balanophéracées

Thonningia sanguinea VAHL. Nom vernaculaire: UMUTIMA W'ISI

Description: plante parasite de racines d'arbres et d'arbustes en y développant de gros tubercules rouges.

Usages: pour les maladies de coeur au Rwanda; contre la blennorrhagie, la dysenterie, les maux de gorge et les vers (Zaire). BOUQUET signale qu'au Congo, les parties souterraines servent à la préparation d'une tisane antidiarrhéique réputée (10).

Le screening a révélé la présence abondante de tanins catéchiques, ce qui explique l'activité de la drogue (contre la dysenterie et la diarrhée). Par contre, malgré des essais répétés, nous notons l'absence d'hétérosides cardiotoniques; aussi ne pouvons-nous expliquer l'usage rwandais de la drogue.

Famille des Balsaminacées

Impatiens niamniamensis GILG Nom vernaculaire: UMUROGORA

Description: plante herbacée gorgée d'eau, fleurs à sabot rouge-violacé.

Habitat: forêt sur sol hydromorphe, altitude: 1950 m (forêt de Nyungwe).

Usages: Au Rwanda, l'usage local de contre-poison lui a valu le nom d'UMUROGORA. En Tanzanie, le jus d'herbe est utilisé contre la malaria (13). Au Congo, la plante est utilisée sous forme de cataplasme contre les panaris, les migraines violentes et les douleurs des articulations; et en "légume" contre les affections cardiaques ou les maladies très graves dues aux attaques de sorciers ou fétiches (10). Enfin WATT signale que les racines d'Impatiens walleriana HOOK. f. seraient abortives, tandis que les tiges seraient utilisées contre les douleurs abdominales et hépatiques (18).

D'autres espèces d'Impatiens contiennent de la lawsone ainsi que des alcaloïdes non identifiés (22,23). Nos tests ont été négatifs; l'usage rwandais ne peut être expliqué, d'autant plus qu'il y a très peu de tanins.

Famille des Convolvulacées

Ipomoea cardiosepala HOCHST

Description: liane à souche ligneuse, habitant la savane

Usage: pas d'usage connu.

Nous avons recherché dans les graines la présence d'alcaloïdes indoliques du type de l'ergot et plus particulièrement dérivés de l'acide lysergique (propriétés hallucinogènes). Des recherches d'HOFMANN ont en effet abouti à l'isolement de l'amide de l'acide lysergique, de la chanoclavine, de l'ergosine et de la cycloclavine à partir de diverses espèces d'Ipomoea (graines d'Ololiuqui utilisées par les prêtres mexicains pour entrer en communication avec les dieux)(24). Nous avons utilisé la technique de GENEST (25): 1 gr de graines est dégraissée à l'éther de pétrole puis mise en contact avec 5 ml d' NH_4OH à 10 % et 5 ml d'éther (exempt de peroxydes). Le mélange est agité mécaniquement durant 30 minutes. La couche étherée est extraite à 3 reprises par H_2SO_4 0,1 N (5,3 et 2 ml). Les couches acides sont réunies, alcalinisées par l'ammoniaque et extraites par du chloroforme (20,10 et 5 ml).

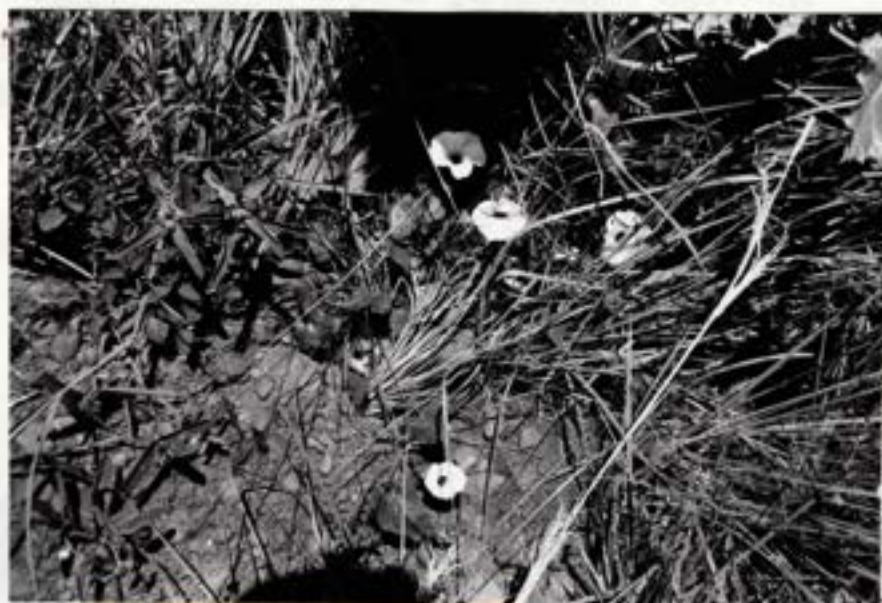


Figure n° 72

Ipomoea cardiosepala en fleurs.

Les solutions chloroformiques sont évaporées à siccité. Le résidu est repris par 0,5 ml d'éthanol. On procède alors à une chromatographie sur couche mince de silicagel, la phase mobile étant constituée d'un mélange d'acétone-pipéridine 9:1. La plaque est alors révélée par pulvérisation du réactif de VAN URK (2 gr de paradiméthylaminobenzaldéhyde, 20 ml d'HCl concentré, 80 ml d'éthanol) suivie trois minutes plus tard de la pulvérisation d'une solution à 1 % de nitrite sodique, ce qui permet de raccourcir le temps de développement de la couleur et de réduire la détérioration des spots.

Les graines d'*Ipomoea cardiosepala* ne contiennent pas d'alcaloïdes révélables par le réactif de VAN URK mais bien par le réactif de Dragendorff.

Famille des Icacinacées

Apodytes dimidiata E. NEY ex. PERNH. var. acutifolia (HOCHST ex. A. RICH)

Nom vernaculaire: UMUSIIBYA

Description: arbuste à petit arbre de 2 à 5 m de haut, fruits rouges

Habitat: savane arborescente et arbustive, bosquets sur termitières

Usages: les écorces de racines servent à préparer un enema contre les parasites intestinaux, les feuilles sont utilisées en cas d'otites (Rwanda).

A notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur ce genre.

D'autres genres de la même famille contiennent des alcaloïdes inconnus (*Gomphandra* sp., *Phytocrene* sp.) ainsi qu'un alcaloïde dimère, la désoxytubulosine dans le *Cassinopsis ilicifolia* (22,26). Des iridoïdes ont été mis en évidence dans le genre *Cantleya*.

Notre screening a permis de mettre en évidence à côté d'une faible proportion d'alcaloïdes, une abondance de tanins catéchiques, des saponosides, des leucoanthocyanes, du mucilage aussi bien dans les racines que dans les

feuilles. Une étude plus approfondie se justifierait amplement.

Famille des Légumineuses - Caesalpinoïdées

Cassia didymobotrya L. Nom vernaculaire: UMUCYUURO

Description: arbuste de 2 à 3 m de haut, à fleurs jaunes, répandu partout

Usage: c'est le purgatif le plus utilisé et le plus réputé du Rwanda.

WATT signale que les feuilles et racines sont purgatives, que des doses fortes peuvent provoquer l'avortement. Les feuilles seraient ichtyotoxiques. L'écorce de l'arbuste est utilisée pour le tannage au Kenya.

Les gousses contiendraient un alcaloïde: la casséine ($C_{33}H_{47}O_4N_3$). ANTON note la présence de flavonoïdes, des traces d'un hétéroside de physcione et d'un hétéroside d'émodol en quantité importante (27).

Le dosage des anthracéniques, suivant la technique Pharmacopée Belge 5e édition) a été réalisé sur les folioles du Cassia rwandais; nous avons obtenu un taux de 2,48 % de dérivés anthracéniques exprimés en sennosides A ou B. Cette espèce mérite l'étude approfondie actuellement en cours dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège.



Figure n° 73

Cassia didymobotrya (échantillon d'herbier)

Cassia falcinella OLIV. Nom vernaculaire: AKAANGA

Description et habitat: plante à souche ligneuse, croissant sur les dalles latéritiques situées dans la savane.

Usage: pas d'usage connu au Rwanda; HAERDI signale qu'en Tanzanie, l'herbe entre dans la préparation d'un breuvage administré en cas de danger de fausse couche.

Outre l'absence de quinones, les tests chimiques ne permettent pas de déceler de leucoanthocyanes que MELOTTE a cru mettre en évidence par réaction histochimique à l'aide d'acide sulfurique à 80 % (28). Nous notons aussi l'absence d'alcaloïdes dans notre échantillon, tandis qu' HAERDI signale leur présence dans des échantillons tanzaniens (13). D'autres Cassia contiennent des alcaloïdes: carnavaline, cassine, cassilysine....

Cassia hildebrandtii VATKE

Description et habitat: plante ramifiée à rameaux ascendants, récoltée dans un endroit rocailleux de la savane arbustive.

Usage: pas d'usage connu. Cette espèce contient un faible pourcentage de dérivés anthracéniques.

Cassia laevigata WILLD

Nom vernaculaire: UMUYOKA

Description et habitat: plante commune, cultivée autour des huttes dans tout le Rwanda

Usages: vermifuge (ascaris) chez les enfants; action purgative due aux anthraquinones.

D'après ANTON, il y aurait de 0,12 à 0,47 % d'anthranols et 1,9 % d'hétérosides. Ces résultats ne concordent pas avec les nôtres puisque nous obtenons en suivant la technique de la P.B. 5e édition, un taux de 0,16 % de dérivés anthracéniques exprimés en sennosides A ou B.

Cassia mimosoides L.

Description et habitat: plante suffrutescente de 30 à 60 cm de haut, commune, récoltée dans la savane arborescente et arbustive.

Usages: purgatif léger (peu d'anthracéniques); remède contre les éruptions faciales en Tanzanie. STANER signale qu'au Zaïre, les feuilles écrasées sont mises sur les plaies comme vulnéraire; elles seraient également douées de propriétés piscicides d'après BOUQUET.

ANTON renseigne la présence d'un flavonoïde, ainsi que de chrysophanol et du physcione à l'état libre et hétérosidique. Nos résultats confirment et complètent les siens.

Famille des Légumineuses - Mimosoïdées

Acacia brevispica HARMS Nom vernaculaire: UMUGEYO

Description et habitat: petit arbre au bord des bosquets xérophiles

Usages: antivenimeux (externe et interne) au Rwanda oriental où les serpents sont fort nombreux; par contre, il entre en Tanzanie dans la préparation d'un poison à base de Rauvolfia vomitoria (18).

Cette espèce n'a jamais été étudiée. Elle renferme du mucilage (comme tout bon acacia), des tanins catéchiques, comme l'Acacia polyacantha WILLD (15) et des alcaloïdes. D'autres espèces d'acacia sont connues pour les alcaloïdes y renfermés: N-méthyltryptamine, tyramine, hordénine, N-méthyl- β phényléthylamine. L'espèce rwandaise contenant beaucoup de tanins catéchiques, cela pourrait justifier l'emploi comme antidote.

Albizia antunesiana HARMS nom vernaculaire: UNUSEBEYA

Description et habitat: arbre de 3 à 5 m dans la savane arborescente.

Usages: les feuilles seraient antirhumatismales (Rwanda); WATT indique que l'infusé des racines est aphrodisiaque et utilisé contre la gonorrhée et que les feuilles ont des vertus contre les refroidissements.

Dans d'autres espèces d'Albizia, on a mis en évidence des saponines triterpéniques (ichtyotoxiques), des flavonoïdes, des gomme à acides uroniques

et des alcaloïdes.

L'espèce rwandaise est riche en flavonoïdes, leucoanthocyanes et tanins catéchiques.

Dichrostachys cinerea WIGHT et ARN ssp. cinerea

Nom vernaculaire: UMUYEBE

Description: arbuste à petit arbre épineux dont les fleurs sont en épis de deux couleurs mauve à la base, jaune sur l'autre partie

Habitat: savane arborescente et arbustive

Usages: le *Dichrostachys* jouit de multiples emplois en médecine traditionnelle africaine: les racines seraient antirhumatismales et analgésiques (Rwanda); elles sont utilisées contre les morsures de serpents, les maux de dents, la blennorrhagie et la syphilis; elles seraient également aphrodisiaques et diurétiques.

Dans une autre espèce de *Dichrostachys*, on a mis en évidence la présence d'un acide aminé soufré ainsi que des propriétés antibiotiques justifiant l'usage signalé par KERHARO au Sénégal contre la furonculose (14).

Signalons enfin que HAERDI dans son screening sur des plantes tanzaniennes n'avait pas trouvé d'alcaloïdes dans le *Dichrostachys cinerea*, alors que nous avons obtenu une réaction positive nette pour les écorces de racines.

Famille des Légumineuses - Papilionoïdées

Sesbania sesban (L.) MERRILL Nom vernaculaire: UMUNYEGENYEGE

Description et habitat: arbre situé près des marais et des lacs

Usages: la racine est utilisée contre la malaria et les maux de tête (Rwanda); la plante est utilisée contre la gonorrhée et la syphilis (Afrique Orientale). En Afrique Occidentale, contre la fièvre et comme vermifuge.

Les anthocyanes ont été décelés dans les fleurs, des protéines et des alcaloïdes dans les graines. D'autre part, WATT signale des saponines dans d'autres espèces (18, 21).

Famille des Liliacées

Kniphofia grantii BAKER

Description: plante herbacée à rhizome de 3 cm de diamètre, jaune orange en coupe; feuilles à la base de la hampe florale (60 à 120 cm de hauteur); fleurs rouge orange.

Habitat: tourbière en pente dans des marais de la forêt de Nyungwe (altitude: 2300 m).

Usages: les rhizomes séchés sont réduits en poudre qui est prise. WATT signale que le *Kniphofia aloides* MOENCH. sert à préparer un enema administré lors de menstrues douloureuses. La plante a donné des tests antibiotiques positifs. D'autre part, le *Kniphofia sarmentosa* KUNTH. est un anti-douleur et entrerait dans des rites d'initiation.

THOMSON indique que la rhéine a été découverte dans les graines de *Kniphofia aloides*. L'espèce rwandaise permet d'obtenir une réaction de BORNETRAGER

positive. Cette plante justifierait également un examen approfondi.

Famille des Loganiacées

Anthocleista grandiflora GILG

Nom vernaculaire: UMUHANURA-NTARE

Synonyme: Anthocleista zambesiaca BAKER (29)

Description: grand arbre de 15 à 20 m de haut; présence de racines échasses jusqu'à 1,5 m du sol

Habitat: forêt sur sol humide (forêt de Nyungwe altitude 2000 à 2500 m)

Usages: au Rwanda, les feuilles et les racines seraient actives contre la folie (11). WATT signale l'usage de la plante contre la malaria et les vers. LEEUWENBERG note l'emploi contre les fièvres ("Fever tree") (29). Les autres espèces d'Anthocleista sont renseignées pour les mêmes propriétés; c'est ainsi que BOUQUET signale que les espèces du Congo sont utilisées comme fébrifuges et purgatifs. Il en est de même pour l'A. nobilis G. DON du Gabon et de Sierra Leone (10,12,15,17) et l'A. schweinfurthii GILG de Tanzanie (13) ainsi que pour les espèces de Côte d'Ivoire (30) et de Madagascar (20). Enfin les fruits d'A. schweinfurthii sont réputés piscicides en Afrique Equatoriale (16).

Un brevet britannique a été déposé en 1966 concernant la préparation d'extraits d'A. nobilis et d'A. madagascariensis BAK. (31). Ces extraits possèdent multiples activités physiologiques telles que des effets antispasmodiques, une action vasodilatatrice, un effet hypotenseur marqué ainsi que des activités parasympatholytiques et neurotoniques. Les principes actifs n'ont pas été isolés.

Bien que les Anthocleista occupent une place importante dans la pharmacopée traditionnelle africaine, peu d'études leur ont été consacrées. A partir de l'Anthocleista procera LEPRIEUR ex BUREAU ont été isolées la swertia-marine (7) (hétéroside séco-iridoïde) et l'anthocleistine (saponine triterpénique) (32).

Un screening poussé a été réalisé sur les feuilles et pétioles d'Anthocleista grandiflora, en collaboration avec MM. J. CROMMEN et ONG HUY, étudiants en pharmacie. Si nous notions l'absence d'alcaloïdes et de loganoside, la présence de saponines (indice mousse et réaction de LIEBERMANN) et d'acides aminés était manifeste. Des chromatographies sur silicagel ont confirmé la présence de plusieurs saponines. En ce qui concerne les acides aminés, nous avons utilisé les techniques classiques combinées de la chromatographie bidimensionnelle et de la chromatographie-électrophorèse (33). Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence l'acide glutamique, la tryptamine et le tryptophane.

Une étude plus approfondie a alors été entreprise sur les écorces de la même espèce par l'un de nos collègues, Mr CHAPELLE qui a isolé deux seco-iridoïdes: l'érythrocentaurine et le swéroside, hétéroside voisin de la swertia-marine (37).

Il est intéressant de remarquer que l'Anthocleista grandiflora ne parvient pas à synthétiser des alcaloïdes, bien qu'il possède les matériaux de

base: acides aminés indoliques (tryptophane et tryptamine) et glucoside monoterpénique: le swéroside dont le rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes indoliques est bien connu (34).

Seuls des essais pharmacologiques pourraient nous renseigner sur les principes actifs responsables de l'activité de la drogue (hétérosides?, saponosides?, acides aminés?, extractif total?, ou autres constituants échappant aux essais réalisés jusqu'à présent?).

Strychnos innocua DEL.

Description et habitat: arbre rabougri de 4 à 6 m de haut, à gros fruits lisses et verts; localisé dans la savane arbustive. Le Strychnos innocua est une des trois espèces de Strychnos les plus fréquentes d'Afrique avec le Strychnos spinosa et le Strychnos usambarensis (35).

Usages: pas d'emploi médicinal au Rwanda. La plante a cependant des usages dans d'autres régions d'Afrique. C'est ainsi que BISSET, dans son étude détaillée de l'ethnobotanique des Strychnos africains, signale que les racines sont utilisées au Soudan comme antidote des morsures de serpents ainsi que comme fébrifuge, au Zaïre (Katanga) contre les maux d'yeux des enfants, en Tanzanie contre les douleurs stomacales et les vers, au Mali et en Haute-Volta contre les anthrax, les hémorragies de la grossesse, contre la tuberculose et comme stimulant (9).

Les études chimiques antérieures ont porté sur les alcaloïdes tertiaires. Les résultats obtenus par BISSET et PHILLIPSON suggèrent la présence d'icajine, vomicine et N-oxy-strychnine dans les parties aériennes (36). Auparavant, d'autres chercheurs avaient signalé la présence de faibles quantités d'alcaloïdes tertiaires dans les feuilles et les fruits (30,38). Dans son screening pharmacologique de différentes espèces de Strychnos africains, SANDBERG a testé des extraits alcooliques de feuilles, branches et racines de Strychnos innocua. Seul l'extractif brut de racines a permis d'observer un léger effet de décontraction musculaire (39).

Nous avons entrepris une analyse plus poussée des écorces de racines, seul organe ayant donné une réaction alcaloïdique positive dans notre screening.

Extraction des écorces de racines du Strychnos innocua

2 kgr d'écorce réduite en poudre sont extraits à 3 reprises par l'eau et ensuite à 3 reprises par du méthanol froid (chaque fois 10l autotal). Les extraits sont évaporés séparément sous vide à une température de 40 à 45°C jusqu'à un volume de 300 ml. Les solutions sont alors réunies (600 ml), additionnées d'une quantité double d'eau (1 l. 200) et agitées durant deux heures. Après filtration des résines, le filtrat est concentré sous vide jusqu'à 500 ml. Cette solution est alcalinisée par du carbonate sodique et épuisée successivement par l'éther et le chloroforme dans des extracteurs liquide/liquide. Les solutions éthero-chloroformiques réunies sont concentrées (500 ml) et extraites par six fois 50 ml d'HCl 2N. Les solutions acides sont réalcalinisées par du carbonate sodique et extraites à nouveau par l'éther et le chloroforme. Les liqueurs extractives sont desséchées sur sulfate sodique anhydre et évaporées à siccité: fraction d'alcaloïdes tertiaires 0,025 %.

Après l'extraction des alcaloïdes tertiaires, la solution aqueuse est acidifiée à pH 5 par HCl et additionnée d'une solution saturée d'acide picrique. On obtient de la sorte un précipité de picrates d'alcaloïdes quaternaires qui sont recueillis, dissous dans un minimum d'acétone-eau (9:1) et passés sur résine échangeuse d'ions (Amberlite IRA 400). De cette façon, nous avons obtenu 200 mgr de chlorures d'alcaloïdes quaternaires, soit un rendement de 0,01 %. Ces alcaloïdes quaternaires se comportent en chromatographie comme ceux du Strychnos usambarensis. Ils présentent des colorations bleues, mauves sous l'action du réactif au sulfate cérrique et du réactif à l'aldéhyde cinnamique (40). Injectés dans le sac lymphatique ventral de grenouilles d'un poids moyen de 30 gr, ils déterminent l'apparition d'une paralysie très marquée et parfois la mort. Le corps devient flasque, mou et ne réagit plus aux excitations extérieures. A la dose de 100 µg, la paralysie dure une heure; à la dose de 50 µg, la paralysie dure dix minutes. Quant à la fraction d'alcaloïdes tertiaires, elle contient plusieurs alcaloïdes migrant lors de chromatographies à des Rf différents des alcaloïdes dont nous disposons (strychnine, brucine, icajine, vomicine, holstiine, autres alcaloïdes de Strychnos icaja et de Strychnos usambarensis; seule la génostrychnine se comportait de la même façon que l'un d'entre eux. La fraction d'alcaloïdes tertiaires du S. innocua donne une réaction à l'hydrostrychnine, nettement positive.

En conclusion, le Strychnos innocua contient malgré son nom des alcaloïdes tertiaires et quaternaires actifs. Ce qui étonne, c'est la différence de concentration avec d'autres espèces dont le Strychnos usambarensis, qui contient 100 fois plus d'alcaloïdes. Il faut cependant faire remarquer que les écorces de racines du S. innocua sont très épaisses et gorgées d'amidon, tandis que celles du S. usambarensis ne forment qu'une mince pellicule brun-rougeâtre. (cf. chapitre V de la deuxième partie)

Strychnos lucens BAKER Nom vernaculaire: UMUHONO

Description et habitat: arbuste de quelques mètres, lianeux aux extrémités, croissant dans les bosquets

Usages: les fruits sont également comestibles au Rwanda. Les racines servent à combattre l'ankylostomiase en Tanzanie.

Les screenings de DENOËL, BISSET et SANDBERG ont fait apparaître la pauvreté alcaloïdique du Strychnos lucens (41,36 et 39). Nos résultats confirment les leurs; nous n'avons décelé des alcaloïdes que dans les écorces de racines.

Strychnos usambarensis GILG nom vernaculaire: UMUHOKO

Description et habitat: arbres de 5 à 10-15 m de haut, peuplant des forêts xéro-mésophiles aux abords des lacs.

Usages: les écorces de racines du S. usambarensis entrent au Rwanda dans la préparation d'un poison de flèche à activité curarisante.

Le screening nous a confirmé l'extrême richesse alcaloïdique de cette plante par rapport aux autres plantes de la récolte. L'étude approfondie de la plante a été exposée précédemment.



Figure n° 74

Strychnos usambarensis en fleurs

Famille des Ménispermacées

Cissampelos mucronata A. RICH nom vernaculaire: UMUHAANDA

Description et habitat: liane se développant dans les galeries forestières au bord des lacs.

Usages: au Rwanda, la racine est utilisée durant la grossesse. En Tanzanie, la racine sert de vermifuge (13); au Sénégal, les racines sont employées contre les maux de ventre (14); au Nigéria, les racines jouiraient de propriétés diurétiques, antipyrétiques, emménagogues et antispasmodiques. Dans ce dernier cas, la drogue serait administrée sous forme de macéré aux enfants et de décocté aux adultes (15); OLIVER rapproche cette espèce du Cissampelos nareira L., source de curare en Amérique du Sud. Cette assertion a été confirmée par l'isolement à partir de racines de Cissampelos mucronata de la d-isochondrodendrine (42).

L'échantillon rwandais ne contient pas d'alcaloïdes dans les feuilles.

Famille des Olacacées

Ximenia caffra SOND nom vernaculaire: UNUSAASA

Description et habitat: arbuste épineux situé dans les savanes; les fruits sont comestibles.

Usages: les racines sont utilisées contre les maux de tête, la fièvre et les diarrhées (Rwanda). Au Zaïre, l'infusé de feuilles est astringent en gargarisme.

Le screening révèle la présence à côté de dérivés cyanogénétiques, de tanins catéchiques en abondance, d'anthocyanes et leucoanthocyanes qui justifient l'activité astringente de la drogue.

Famille des Oléacées

Olea africana MILL

nom vernaculaire: UMUZEENZE

Description et habitat: arbre de savane arborescente dans les bosquets sur termitières.

Usages: les feuilles sont réputées fébrifuges (Rwanda); les racines sont utilisées contre les rhumatismes; l'infusé de feuilles sert de lotion pour les yeux tandis que le décocté sert de gargarisme contre la diphtérie et les maux de tête. Les feuilles seraient aussi taenifuges et peut être narcotiques selon WATT (18).

Il faut rapprocher l'olivier africain de l'europpéen qui possède également des vertus fébrifuges, astringentes et antirhumatismales. On se rappellera que l'olivier européen contient des glucosides tel l'oleoeuropéine (iridoïde) et que l'on vient de mettre en évidence des alcaloïdes du quinquina (cinchonidine et autres) dans les feuilles de l'Olea europea L. (21b) et de la jasmimine dans l'Olea paniculata R. Br. (21).

Famille des Renonculacées

Clematis hirsuta PERR et GUILL

nom vernaculaire: UMUKAAMBA

Description et habitat: buisson lianeux dans la savane arbustive

Usages: les feuilles servent d'abortif; à faible dose, elles sont utilisées contre les rhumatismes; elles entrent également dans un remède contre la lèpre (Rwanda). WATT signale d'autre part que les feuilles et les racines contiennent un principe essentiel inhalé contre les maux de tête (18).

Aucune étude chimique n'a été consacrée à cette espèce. Par contre, des hétérosides flavoniques et autres (renonculine, anémone) ainsi que des saponosides ont été isolés à partir d'autres espèces de Clematis. L'espèce rwandaise contient également des saponosides.

Famille des Rhamnacées

Rhamnus staddo A. RICH

nom vernaculaire: UMUNYARUGOONDO

Description: arbuste buissonnant de quelques mètres, à écorce crevassée, recouverte de lichens

Habitat: bosquets sur termitières dans la savane

Usage: contre la constipation (Rwanda).

Les Rhamnus sont bien connus pour leurs principes anthracéniques. Cette espèce n'ayant jamais été étudiée, une de nos collègues, Melle POURVEUR, en réalise actuellement l'étude approfondie aussi bien des anthracéniques que des flavonoïdes. Signalons aussi que l'étude micrographique des écorces a été réalisée préalablement par MELOTTE et DENOËL (43).

Famille des Rosacées

Parinari curatellifolia PLANCH ex BENTH ssp mobola (OLIV.) R.A. GRAHAM

Nom vernaculaire: UMUNAZI

Description et habitat: arbre de savane, à port de pommier; fruits comestibles à goût agréable.

Usages: les racines ont des propriétés antirhumatismales (Rwanda); en Tanzanie, l'espèce est dite vermifuge (13); WATT signale que l'écorce de racine possède un colorant brun-rouge utilisé par les habitants de l'île de Zanzibar (18).

Notre screening révèle une abondance de tanins catéchiques, leucoanthocyanes et anthocyanes justifiant l'usage de Zanzibar.

Famille des Rubiacées

Rytigynia sp. herbier BOUXIN n° 470 et n° 886

Nom vernaculaire: UMUSHABARARA

Description: arbuste à petit arbre de 6 à 7 m de haut, à fleurs blanches et fruits verts

Habitat: forêt de Nyungwe (forêt sur crête, altitude 2450 m)

Usages: contre les coliques et les vers (Rwanda). Les feuilles de Rytigynia schumannii ROBYNS sont antirhumatismales et utilisées contre la pleurésie (18). Les racines et les feuilles de Rytigynia oligacantha ^(M.A.) seraient aphrodisiaques (13).

Nous n'avons pu déceler dans cette espèce la présence d'alcaloïdes, pourtant fréquents chez les Rubiacées. Par contre, nous notons la présence des stéroïdes (réaction de LIEBERMANN violette).

Famille des Rutacées

Fagara chalybea ENGL. nom vernaculaire: INTARE Y IRUUNGU

Description: arbre dont le tronc est couvert d'épines recourbées vers le bas; feuilles à odeur de citronnelle

Habitat: la savane arborescente

Usages: les écorces de racines sont vermifuges (Rwanda). En Tanzanie, elles sont utilisées contre les enflures et les tumeurs, et comme vomitif dans les fièvres; un décocté sert de gargarisme à effet tonique.

Les Fagara ont déjà fait l'objet de plusieurs études ayant abouti à l'isolement de dérivés flavoniques et coumariniques, d'huiles essentielles et d'alcaloïdes quaternaires dérivés de l'aporphine. Le Fagara chalybea est actuellement étudié en Ecosse (44). Cette espèce est l'espèce la plus riche en alcaloïdes qui ait été soumise à notre screening, exception faite du Strychnos usambarensis.

Famille des Santalacées

Osyris wightiana WALL ex WIGHT nom vernaculaire: UMUSHEESHE

Description et habitat: arbuste buissonnant dans les galeries forestières.

Usages: l'essence contenue dans le bois se substitue à celle du bois de Santal (Santalum album L.) en Tanzanie; les feuilles servent de vermifuge (tas-nias) au Rwanda. La racine est utilisée au Kenya contre la blennorragie et les rhumatismes (17,18).

Le bois d'Osyris contient 4 à 5 % d'essence dont l'odeur rappelle l'essence de Vetiver. Nos essais ont décelé la présence d'alcaloïdes en quantité appréciable dans les feuilles. Auparavant des alcaloïdes ont déjà été isolés

des plantes d'un autre genre: *Thesium* sp. (thésine, thésinicine, thésinine).

L'Osyris wightiana mériterait une étude approfondie.

Famille des Simarubacées

Harrisonia abyssinica OLIV. nom vernaculaire: UMUFATAANGWE

Description et habitat: arbuste épineux dans les bosquets sur termitières, les racines sont très amères.

Usages: les racines sont utilisées contre le gonflement des testicules; elles auraient une action rubéfiante ainsi qu'oxyuricide et ascaricide; les feuilles sont utilisées contre les hémorroïdes, elles sont un antidote contre les morsures de serpents et servent à préparer un onguent pour les abcès.

La présence de tanins peut expliquer l'utilisation contre les hémorroïdes ainsi que comme antidote. Nous avons d'autre part décelé des alcaloïdes dans les écorces de racines. Des alcaloïdes avaient déjà été signalés dans d'autres espèces d'*Harrisonia* ainsi que dans d'autres genres: *Brucea* et *Picrasma* (canthin-6-one et dérivés)(22,26).

Famille des Solanacées

Solanum dasycarpum THONN nom vernaculaire: IGITOOORWA

Description: plante épineuse commune près des habitations de l'est rwandais
Usages: les racines provoqueraient la diarrhée chez les enfants (Rwanda); au Zaïre, le jus des feuilles serait purgatif pour les enfants et utilisé contre les maux de ventre et les douleurs gastro-intestinales des adultes.

Solanum indicum L. ssp *indicum* THONN (BITTER). s.l.

Nom vernaculaire: UMUCUUCU

Description et habitat: plante commune à tout le Rwanda

Usages: les fruits servent contre la toux et les maux de gorge (Rwanda); les feuilles sont utilisées en Afrique orientale contre les démangeaisons et la teigne ainsi que contre les troubles urinaires (18). OLIVER décrit l'espèce diurétique, légèrement narcotique, pouvant provoquer le délire et causer des empoisonnements (nausées, maux de tête, crampes).

Cette espèce étant commune en Inde, elle a déjà fait l'objet de recherches: on y a mis en évidence la présence de glucoalcaloïdes: solanine, solanidine, solasodine (18,26).

Solanum renschii VATKE nom vernaculaire: UMUKARISHYA

Description et habitat: buisson sarmenteux au bord des lacs de la dépression de l'Akagera

Usage: fruits contre les vers intestinaux (Rwanda).

Le screening a décelé la présence en quantité appréciable de glucoalcaloïdes stéridiques. Cette espèce n'ayant jamais été étudiée et étant facilement récoltable, devrait faire l'objet de recherches plus approfondies.



Figure n° 75

Solanum renschii en fruits

Solanum taitense VATKE

nom vernaculaire: UMUKARISHYA

Description et habitat: suffrutex épineux au bord des bosquets sur termitières

Pas d'usage connu au Rwanda.

En conclusion, les premières recherches entreprises sur les plantes rwandaises démontrent l'intérêt de la poursuite de recherches dans ce domaine suivant les deux orientations qui ont guidé notre prospection,

- d'une part, selon les remèdes utilisés en médecine traditionnelle (Thonningia, Impatiens, Apodytes, Acacia, Albizia, Dichrostachys, Sesbania, Anthocleista, Ximenia, Olea, Clematis, Parinari, Osyris, Harrisonia)

- d'autre part, suivant les affinités botaniques avec des espèces dont l'activité a déjà été démontrée (Cassia, Rhamnus, Solanum, Ipomoea, Tylophora, Cissampelos, Fagara, Rytigynia et Strychnos). Ces dernières plantes ont été sélectionnées parmi les genres et espèces déjà signalés dans les travaux concernant la flore rwandaise (45).

TABLEAU 18
Résultats du "Screening" phytochimique

Famille	Genre	Espèce	Organes étudiés	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins catéchiques	Quinones	Observations
Asclépiadacées	Tylophora	conspicua	feuilles	-	++	+	-	
Balanophéracées	Thonningia	sanguinea	éc. tubercules	-	-	+++	-	+ anthocyanes et leucoanthocyanes
Balsaminacées	Impatiens	niamniensis	herbe	±	-	+	-	LIBERMANN: col. bleue
Convolvulacées	Ipomoea	cardiosopala	graines	+				R. de VAN URK: négative
Icacinacées	Apodytes	dimidiata	feuilles éc. racines	- +	+++ -	+++ +++	- -	+ Saponosides (Indice mousse: 1.000) + mucilage + leucoanthocyanes
Légumineuses Caesalpinoïdées	Cassia	didymobotrya	feuilles fruits	- -	++ +	++ -	+++ +++	+ mucilage
		falcinella	feuilles	-	+++	+++	-	
		hildebrandtii	feuilles	-	-	-	++ ++	+ stérols (R. de LIBERMANN)
		laevigata	feuilles	-	+++	++	+	
Légumineuses Mimosoïdées	Acacia	brevispica	feuilles	++	++	++	-	+ mucilage + leucoanthocyanes
	Albizia	antunesiana	feuilles	-	+++	+++	-	+ leucoanthocyanes

Famille	Genre	Espèce	Organes étudiés	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins catéchiques	Quinones	Observations
Légumineuses Mimosoïdées	Dichro- tachys	cinerea	éc. racines	++	traces	-	-	
Légumineuses Papilionoïdées	Sesbania	sesban	éc. racines	-	-	+++	-	+ leucoanthocyanes
Liliacées	Kniphof- lia	grantii	rhizomes	-	-		+++	
Loganiacées	Antho- cleista	grandi- flora	feuilles pétioles	- -	- -	+ ++	- -	saponosides (indice mousse: 900) } LIEBERMANN: rouge violet + acides aminés et amines
	Strychnos	innocua	feuilles éc. racines	-	+++	traces	-	
		lucens	feuilles éc. racines	+ -	- +	- traces	- -	
		usambaren- sis	feuilles éc. troncs éc. racines	+++ ++ +++	- ++ -	- - -	- - -	
Menispermacées	Cissampelos	mucronata	feuilles	-	traces	+++	-	+ leucoanthocyanes

Famille	Genre	Espèce	Organes étudiés	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins catéchiques	Quinones	Observations
Olacacées	Ximenia	caffra	éc. racines	-	-	+++	-	+ dérivés cyanogénétiques + anthocyanes et leucoanthocyanes
Oléacées	Olea	africana	feuilles	-	+	traces	-	
Renonculacées	Clematis	hirsuta	feuilles	-	traces	++	-	+ saponosides
Rhamnacées	Rhamnus	staddo	feuilles éc. troncs	- -	+++ +	+ -	++ ++	+ leucoanthocyanes
Rosacées	Parinari	curatellifolia ssp mobola	éc. racines	-	-	+++	-	+ anthocyanes et leucoanthocyanes
Rubi- cées	Rytigynia	sp.	éc. troncs	-	-	+	-	LIEBERMANN: violet
Rutacées	Fagara	chalybea	feuilles éc. racines	- +++	- -	- +	- -	+ mucilages et huile essentielle
Santalacées	Osyris	wightiana	feuilles	++	+++	+++	-	+ leucoanthocyanes
Simarubacées	Harrisi- nia	abyssinica	feuilles éc. racines	- +	++ -	+++ +++	- -	+ tanins galliques, mucilage, leucoanthocyanes + mucilage anthocyanes et leucoanthocyanes
Solanacées	Solanum	dasyphyllum indicum renschii taitense	feuilles feuilles feuilles feuilles	++ ++ +++ +	- - - -	traces - - -	- - - -	LIEBERMANN: positif (glucoalcaloïdes stéridiques)

APPENDICE II

ESSAIS PHARMACOLOGIQUES REALISES SUR LES ALCALOÏDES ISOLES DU S. usambarensis

Introduction

Le curare en calebasse (p. 28), bien que plus actif que le tubocurare et la tubocurarine en dérivée, avait été abandonné au profit de cette dernière car on ne parvenait pas à isoler des principes actifs suffisamment purs, démunis d'effets secondaires indésirables. Les techniques chromatographiques permirent à KARRER et SCHMID d'isoler à partir des curares en calebasse certains alcaloïdes hautement actifs (C-toxiférine et C-curarine) qui furent expérimentés sur l'homme par le Prof. WASER, en même temps que l'alloférine, produit d'hémi-synthèse très proche de la toxiférine.

Le résumé de ces recherches a été repris récemment (121): il s'en dégage les conclusions suivantes:

- les alcaloïdes des Strychnos exercent une activité curarisante plus marquée que les autres agents curarisants naturels ou synthétiques, ce qui permet l'injection d'une dose plus faible de principes actifs
- ces alcaloïdes sont doués d'une haute sélectivité; ils n'exercent pas de dépression sensible de la pression sanguine, ni de bronchoconstriction, ni de libération d'histamine
- l'action prolongée de la toxiférine (1 à 2 h de curarisation exercée par une dose de 2 mg chez un adulte de 70 kg) justifie l'emploi de cet alcaloïde dans le traitement du tétanos
- l'action courte de l'aloférine (ou alcuronium) (15 à 20 minutes de curarisation exercée par une dose de 5 à 10 mg chez un adulte de 70 kg) est indiquée pour de nombreuses interventions chirurgicales. Ce qui incita la firme Roche à lancer ce produit sur le marché international
- la pyridostigmine antagonise ces curarisants en quelques minutes.

Essais réalisés sur le S. usambarensis

L'activité curarisante de fractions brutes d'alcaloïdes quaternaires a été démontrée par le Prof. M. GOFFART (Service de Physiologie de l'Université de Liège) (p. 25-26). Les alcaloïdes purs ont été soumis à diverses expériences dans le Service de Pharmacologie de notre Université.

Le Dr A. DRESSE, Agrégé de Faculté, a entrepris en collaboration avec M. B. NZENGU, des expériences concernant l'activité atropinique et curarisante de certains alcaloïdes. Ces expériences ne sont pas terminées mais elles ont permis jusqu'à présent d'obtenir les résultats ci-après, qui nous ont été aimablement transmis par leur auteur: § I.

D'autre part, M. J. GERARDY, Pharmacien, Asistant dans le même Service, a réalisé une expérience montrant in vitro l'activité inhibitrice de la Monoamine-oxydase (M.A.O.) des alcaloïdes contenant une partie harmane ou harmalane dans leurs structures. L'activité I.M.A.O. de ces produits est en effet bien connue (voir § II).

§ I. Action atropine-like et curarisante de différents alcaloïdes extraits du *Strychnos usambarensis*

Introduction

Une action antagoniste éventuelle de l'usambarensine et ses 3 dérivés ainsi que de la 6,7-dihydro-flavopéirine vis-à-vis du carbachol a été recherchée en utilisant l'iléon isolé de rat. Les mêmes extraits plus une fraction contenant de la dihydro-toxiférine ont été utilisés pour rechercher une action curarisante éventuelle.

Méthodes

I. L'action atropinique des différents extraits a été recherchée en étudiant leur effet sur les contractions de l'iléon de rat provoquées par l'addition de doses croissantes de carbachol (courbes cumulatives de VAN ROSSUM (200)). Les contractions sont enregistrées sur papier enfumé au moyen d'un levier isotonique.

II. L'action curarisante de ces différents extraits est étudiée par stimulation du nerf sciatique de rat anesthésié au Nembutal (30 mg/kg). Paramètre de stimulation: ± 1 volt, 0,1 msec., 1 stimulation toutes les 10 secondes. Les contractions du muscle tibial antérieur sont enregistrées au moyen d'une jauge de contrainte (FTA 10) sur un enregistreur Hewlett-Packard. La pression artérielle du rat est également enregistrée.

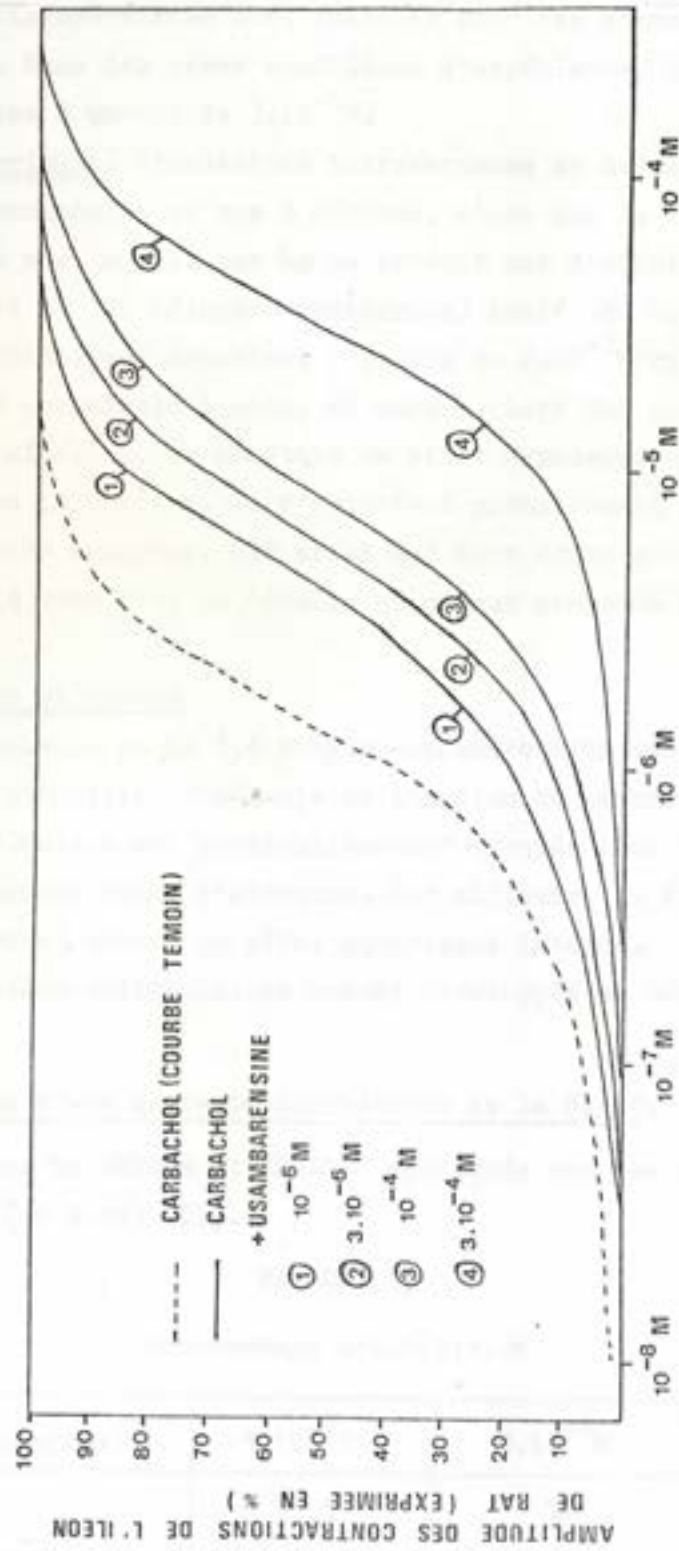
Nous remercions le Prof. M. GOFFART qui nous a aimablement prêté la table Palmer nécessaire à la réalisation de ces expériences.

Résultats

I. Action atropinique. L'usambarensine exerce une activité inhibitrice de type atropinique à partir d'une concentration 10^{-6} M. L'effet augmente proportionnellement à la dose jusqu'à une concentration de 10^{-4} M.

Pour une concentration de $3 \cdot 10^{-4}$ M, la 3,4-dihydro-usambarensine produit une inhibition compétitive comparable à celle que l'on obtient avec une

ACTION ATROPINIQUE DE L'USAMBARENSINE



concentration de $3.10^{-6}M$ d'usambarensine. Par contre, les dérivés méthylés et la 6,7-dihydro-flavopéirine sont inactifs pour des concentrations allant jusqu'à $3.10^{-4}M$. Dans les mêmes conditions d'expérience, l'atropine exerce une action inhibitrice à partir de $3.10^{-6}M$.

II. Effet curarisant. L'injection intraveineuse de doses croissantes des alcaloïdes (usambarensine et ses 3 dérivés, ainsi que la 6,7-dihydro-flavopéirine) jusqu'à une μ mol. par kg ne produit pas d'effet curarisant. Par contre, l'extrait n° 700 (dihydro-toxiférine) isolé du *S. usambarensis* provoque un effet inhibiteur important à partir de $2.10^{-7}M/kg$. Il s'agit là d'un effet curarisant comparable à celui du curare. Lors des premières injections de la dihydro-toxiférine, on constate un effet hypotenseur qui diminue avec la répétition des injections. Il s'agit fort probablement d'une action libératrice d'histamine endogène. Cet effet est bien connu pour le curare et devrait être étudié avec plus de détails en ce qui concerne la dihydro-toxiférine.

III. Conclusion et résumé

L'usambarensine et la 3,4 dihydro-usambarensine exercent un effet antagoniste de type compétitif vis-à-vis de l'action du carbachol sur l'iléon isolé de rat. Cette action est particulièrement marquée pour l'usambarensine qui agit quantitativement comme l'atropine. Par ailleurs, la fraction n° 700 (dihydro-toxiférine) exerce un effet curarisant intense.

Ces résultats préliminaires seront développés et détaillés ultérieurement.

§ II. Recherche d'une activité inhibitrice de la M.A.O.

Méthode: Technique de SNYDER et HENDLEY appliquée sur des cerveaux de rats broyés (in toto)(201).

TABEAU 19

Pourcentage d'inhibition

Quantité d'alcaloïde:	$3.10^{-5}M$	$3.10^{-6}M$	$10^{-6}M$
Usambarensine	53,5	10	0
3,4-dihydro-usambarensine	67	II	0
N ¹ -méthyl-usambarensine	88,5	--	0
Harmaline FLUKA	--	67	20
Harmaline FLUKA	--	80	74
Harmine FLUKA	--	41	30
Harmol FLUKA	--	45	40
Harmalol FLUKA	--	93	22

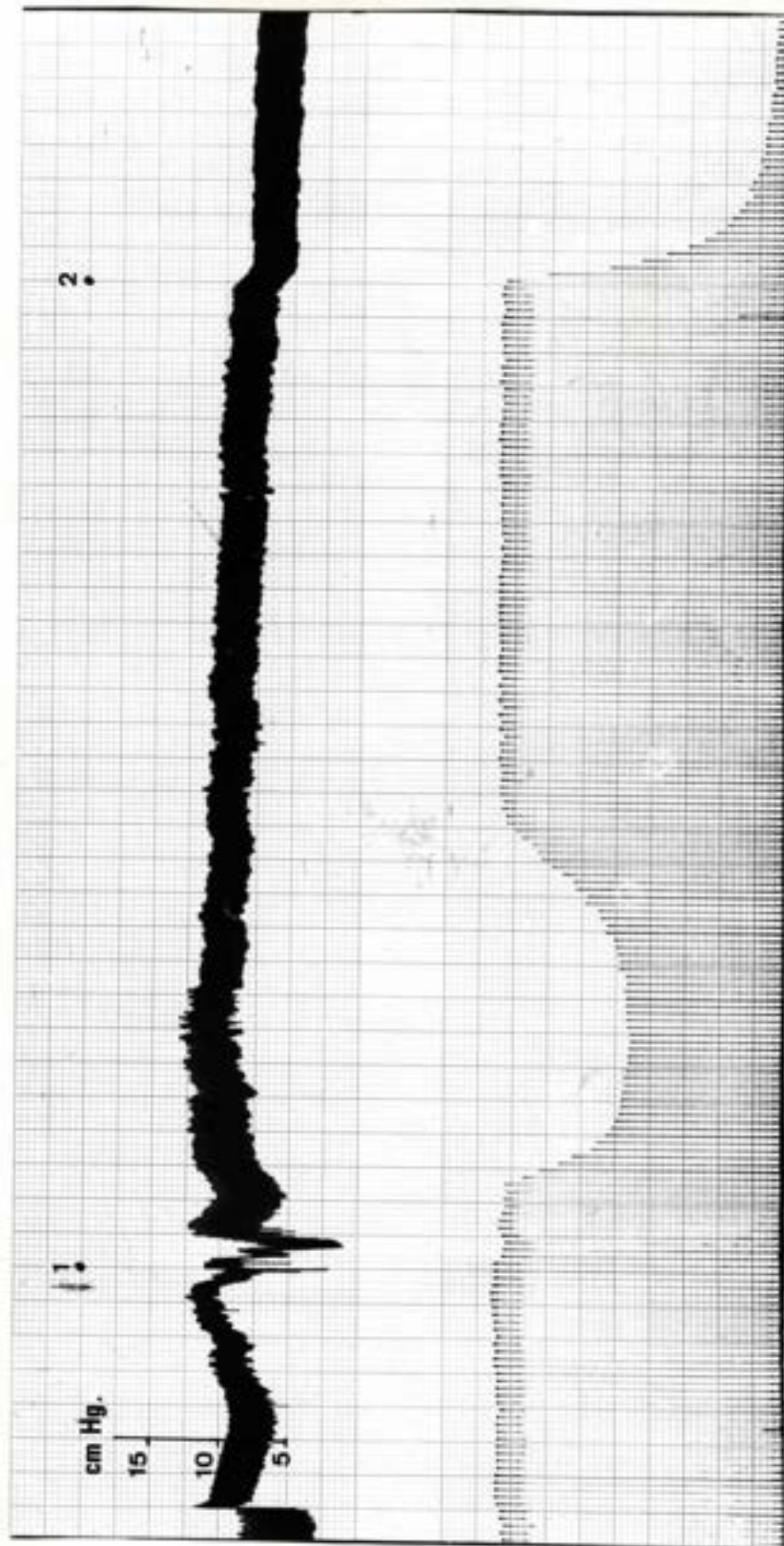


Figure n° 76

Action curarisante de la dihydro-toxiférine

Légende: a) partie supérieure: pression artérielle du rat anesthésié enregistrée à la carotide,

b) partie inférieure: contraction du tibia antérieur par stimulation du nerf sciatique (± 1 volt, 0,1 msec., 1 stimulation toutes les 10 sec.)

L'injection intraveineuse de dihydro-toxiférine (200 nM/kg) produit une diminution de la pression artérielle et surtout une inhibition importante de la contraction musculaire. Ces phénomènes s'accompagnent d'un arrêt respiratoire. Une seconde injection de 400 nM/kg produit une inhibition complète de la contraction

BIBLIOGRAPHIE

1. Institut National de Recherche Scientifique (I.N.R.S.) Butare - République Rwandaise. Publication n° 9. Rapport pour les années 1965 à 1970 (1971).
2. LESTRADE (A.) - La médecine indigène au Rwanda; lexique des termes médicaux français-rwanda - Acad. Roy. Sci. Colon. Bruxelles (1955).
3. DURAND (J.M.) - Les plantes bienfaisantes du Rwanda et du Burundi 3ème édition (1966).
4. FARNSWORTH (N.R.) - J. Pharm. Sci. 55, 225 (1966).
5. SANDBERG (F.) - Pharmacological Screening of Medicinal Plants - Printed at the Government Press-Colombo (Ceylan)(1967).
6. DENOËL (A.) - Bull. Soc. Pharm. Lille, 7 (1972).
7. KOCH (M.) - Gentianine et Swertiamarine de l'Anthocleista procera LEPRIEUR ex BUREAU (Loganiacées) - Thèse de Doctorat - Université de Paris (1965).
8. STAHL (E.) - Thin-Layer Chromatography - A Laboratory Handbook. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1041 p. (1969).
9. BISSET (N.G.) - Lloydia 33, 201 (1970).
10. BOUQUET (A.) - Féticheurs et Médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville) Mémoire n° 36 - O.R.S.T.O.M. Paris (1969).
11. BOUXIN (G.) - Communications personnelles (1970 à 1972).
12. GASSITA (J.N.) - Recherches sur quelques plantes médicinales du Gabon - Thèse de Doctorat en Pharmacie - Paris (1968).
13. HAERDI (F.) - Die Eingeboren Heilpflanzen des Ulanga-Distriktes Tanga-nyikas (Ostafrika) - Acta tropica, Suppl. 8, 3-274 (1964).
14. KERHARO (J.) et ADAM (J.G.) - Les plantes médicinales, toxiques et magiques des Miominka et des Socé des Iles du Saloun (Sénégal) - Acta Tropica, Suppl. 8, p. 279-334 (1964).
15. OLIVER (B.) - Medicinal Plants in Nigeria - Nigerian College of Arts, Science and Technology -Ibadan (1960).
16. SANDBERG (F.) - Etude sur les plantes médicinales et toxiques d'Afrique Equatoriale - Cahiers de la Maboké, Paris 2, 5 à 49 (1965).
17. STANER (P.) et BOUTIQUE (R.) - Matériaux pour l'étude des plantes médicinales indigènes du Congo Belge - Mém. Inst. Roy. Colon. Belge - Sect. Sci. Nat. Méd. 8° 5(6), 1-228 (1937).

18. WATT (J.M.) et BREYER-BRANDWIJK (M.G.) - The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa - 2nd Ed. - Livingstone Ltd, Edinburgh and London (1962).
19. GITHENS (T.S.) - African Handbooks: 8. Drug Plants of Africa - University of Pennsylvania Press, The University Museum, Philadelphia (1948-49).
20. POISSON (J.) et coll. - *Annls Pharm. Franç.* 30, 241 (1972).
- 21a. Chemical Abstracts
- 21b. SCHNEIDER (G.) et KLEINERT (W.) - *Naturwissenschaften*, 58, 524 (1971).
22. WILLAMAN (J.J.) et LI (H.L.) *Lloydia*, 33, Suppl. 3A (1970).
23. THOMSON (R.H.) - Naturally Occurring Quinones - 2nd Edition (734 p.) Academic Press - London and New York (1971).
24. HOFMANN (A.) - *La Recherche*, 239 (1970).
25. GENEST (K.) - *J. Chromatogr.*, 19, 531 (1965).
26. RAFFAUF (R.F.) - A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containing Plants. Wiley Interscience - New York-London-Sydney-Toronto (1970)
27. ANTON (R.) - Contribution à l'étude chimique qualitative de quelques espèces du genre *Cassia* L. - Thèse de Doctorat - Université de Strasbourg (1968)
28. MELOTTE (R.) - *La Cellule*, 69, 137 (1972).
29. LEEUWENBERG (A.J.M.) - *Acta Bot. Neerlandica*, 10, 1 (1961).
30. BOUQUET (A.) - Les Loganiacées de Côte d'Ivoire et leurs alcaloïdes (Note préliminaire) O.R.S.T.O.M. Adiopodoumé (1963).
31. ORSYMONE, S.A. (V. LAPON) - Brevet Britannique I, 029, 056 (11 mai 1966).
32. TAYLOR-SMITH (R.B.), *Tetrahedron*, 21, 3721 (1965).
33. DANZE (J.M.), DENOËL (A.) et GUYAUX-LAMBERTY (J.) - *J. Pharm. Belg.* (n-s), 23, 3 (1968).
34. INOUE (H.), UEDA (S.) et TAKEDO (Y.), *Tetradron Lett.* 3453 (1968).
35. LEEUWENBERG (A.J.M.) - The Loganiaceae of Africa VIII - *Strychnos* III, *Meded. Landb. Hoogsch. Wageningen, Nederland* (1969).
36. BISSET (H.G.) et PHILLIPSON (J.D.), *Lloydia*, 34, 1 (1971).
37. CHAPPELLE (J.P.) - *Phytochemistry*, 12 (sous presse) (1973).
38. MATHIS (C.) et DUQUENOIS (P.) - *Annls Pharm. Franç.* 21, 17 (1963)
39. SANDBERG (F.), LUNELL (E.) et RYRBERG (K.J.) - *Acta Pharm. Suecica*, 79 (1969).
40. SCHMID (H.), KERRLE (E.) et KARRER (P.) - *Helv. Chim. Acta*, 35, 1864 (1952).
41. DENOËL (A.), JAMINET (F.), DETILLEUX (G.), VAN SUMSEN (M.) et MERVEILLE (L.) - Contribution à l'étude chimique des *Strychnos* du Congo Belge - Ministère des Colonies, Direction de l'Agriculture, Bruxelles (1953) (208 p.).
42. FERREIRA (M.A.), PRISTA (L.N.), ALVES (A.) et ROQUE (A.S.) - *Garcia Orta* 13, 395 (1965).

43. MELOTTE (R.) et DENOËL (A.) - J. Pharm. Belg. 26, 31 (1971).
44. CALDERWOOD (J.M.) et FISH (F.) - J. Pharm. Pharmac. 21, 1265 (1969);
FISH (F.) et WATERMAN (P.G.) - Phytochemistry, 11, 3007 (1972).
45. TROUPIN (G.) Etude phytocénologique du Parc National de l'Akagera et
du Rwanda oriental - Publication n° 2 de l'I.N.R.S. à
Butare (Rwanda)(1966).
46. PERROT (E.) et VOGT (E.) - Poisons de flèches et poisons d'épreuve -
Vigot Frères - Paris (1913).
47. LEWIN (L.) Die Pfeilgifte - G. REIMER-Berlin (1894); J.A. BARTH-Leip-
zig (1923).
48. BISSET (N.G.) - Annales Bogorienses (Indonesia) 2, 193 (1957).
49. BISSET (N.G.) - Annales Bogorienses (Indonesia) 4, 145 (1961)
50. BISSET (N.G.) - Planta Med. 2, 143 (1962).
51. BISSET (N.G.)-Annales Bogorienses, 3, 105 (1958); *ibid.*, 4, 65 (1961).
52. BISSET (N.G.) - Lloydia, 29, 1 (1966); BISSET (N.G.) et WOODS (M.C.),
Lloydia, 29, 172 (1966).
53. BISSET (N.G.) et LEEUWENBERG (A.J.M.) - Lloydia, 31, 208 (1968).
54. LEVI-STRAUSS (C.) - Tristes tropiques, Plon, Paris, (1955).
55. OSISIUGU (I.U.W.), Afric. J. Pharm. Pharmaceut. Sciences, 2, 137 (1972).
56. BOUQUET (A.) - J. Agr. Trop. Bot. Appl., 14, 359 (1967).
57. RAYMOND (W.D.) - Tanganyika Notes and Records, 23, 49 (1947).
58. HAEZAERT (J.) - Bull. Agric. Congo Belge, 105 (1959).
59. KERHARO (J.) et BOUQUET (A.) - Acta Tropica, 193 (1949).
60. HUTTEL (W.) - Revue de paludisme et de médecine tropicale, 8-9, 249
(1950-51).
61. HALL (I.C.) et WHITEHEAD (R.W.) - J. of infectious diseases, 41, 51
(1927).
62. PORTERES (R.) - Bull. Com. et Hist. Scient. de l'Afrique Occidentale
Française, 18, 128 (1935).
63. SANTESSON (C.G.) - Arkiv för Botanik, 27A, 1 (1935).
64. SANTESSON (C.G.) - Ethnos, 4, 86 (1936).
65. SANTESSON (C.G.) - Etnologiska Studier 8, 137 (1939).
66. SANTESSON (C.G.) - Ethnos, I, 29 (1939).
67. KAZIENDE (L.) - Notes Africaines, 18, 9 (1943).
68. MOUCHET (J.) - Notes Africaines, 29, 12 (1946).
69. KIRK (R.) - Sudan Notes and Records, 27, 127 (1946).
70. LUSSY (P.K.) et CAP (O.F.M.) - Acta Tropica, 135 (1947).
71. GOODWIN (A.J.) - S. Afr. J. Sci., 41, 429 (1945).
72. DE WILDEMAN (E.) A propos des médicaments antilépreux d'origine végé-
tale III. Les plantes utiles du genre Strychnos -
Inst. Royal Colon. Belge, Sect. Sci. Nat. Méd. 8°, 13
(5), 105 p. (1946).
73. STANLEY (H.M.) - A travers le continent mystérieux - Hachette, Paris,
(1879).

74. WEISS (M.) - Die Volkerstämme im Norden Deutsch-Ostafrikas, Berlin (1910).
75. BRAUN (K.) - Angewandte Botanik, 14, 511 (1932).
76. FORD (J.) et HALL (R. de Z.), Tanganyika Notes and Records, 24, 3(1947).
77. WOLANSKI (E.) - Acad. Roy. Sci. Outremer - Bull. Séances - Bruxelles, 2, 550 (1968).
78. ORZALESI (G.), MEZZETTI (T.), ROSSI (C.) et BELLAVITA (V.) - Planta Med. 19, 30 (1970-71).
79. VAN DER VIJVER (L.M.) et GERRITSMA (K.W.) - Phytochemistry, 12, 230 (1973).
80. DELLE MONACHE (F.), CORIO (E.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - Ann. Ist. Super. Sanita, 190 (1967).
81. WIELAND (T.) et MERZ (H.) - Berichte, 85, 731 (1952).
82. ANGENOT (I.), DENOËL (A.) et GOFFART (M.) - J. Pharm. Belg. (n.s.), 25, 73 (1970).
83. BÜLBRING (E.) - Brit. J. Pharmacol., I, 38 (1946).
84. DENOËL (A.), JAMINET (F.), PHILIPPOT (E.) et DALLEMAGNE (M.J.) - Arch. Intern. Physiol., 59, 341 (1951).
85. BOVET (D.), BOVET-NITTI (F.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - Curare and curare like agents (478 p.), Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton (1958).
86. SANDBERG (F.), LUNELL (E.) et HYRBERG (K.J.) - Acta Pharm. Suecica, 6, 79 (1969).
87. GULLIVER (P.H.) - Tanganyika Notes and Records, Dar-es-Salam n° 52, 61 (1959).
88. Mc INTYRE (A.R.) - Curare: its history, nature and clinical use. Chicago, Illinois (240 p.), (1947).
89. KREIG (M.) - La médecine verte - Plon (1968).
90. VELLARD (J.) - Histoire du curare - Gallimard (1965).
91. MARINI-BETTOLO (G.B.) "Alcaloïdes quaternaires des Strychnos et curares" - Conférence donnée à l'Institut A. Gilkinet (Liège) - Journée Scientifique du 16 mars 1969.
92. LEEUWENBERG (A.J.M.) - Communication personnelle (1970).
93. METCALFE (C.R.) et CHALK (L.) - Anatomy of the Dicotyledons - Vol. II (p. 925-933) Oxford (1950).
94. HESSE (M.) - Indolalkaloïde in Tabellen, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, vol. I (1964); vol. II (1968).
95. PELLEPIER (S.W.) - Chemistry of the Alkaloids - Van Nostrand Reinhold Co, New-York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne (795 p.), (1970).
96. BISSET (N.G.) et PHILLIPSON (J.D.) - J. Pharm. Pharmacol. 23, 244 S. (1971).
97. HART (N.K.), JOHNS (S.R.), LAMBERTON (J.A.), SUARES (H.) et SUMMONS (R.E.) - Aust. J. Chem. 24, 1741 (1971).
98. MARINI-BETTOLO (G.B.), CIASCA (M.A.), GALEFFI (C.), BISSET (N.G.) et KRUKOFF (B.A.), Phytochemistry, 11, 381 (1972).

99. IWATAKI (I.) et COMIN (J.) - Tetrahedron 27, 2541 (1971).
100. GALEFFI (C.), CIASCA-RENDINA (M.), MIRANDA DELLE MONACHE (E.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - Il Farmaco (n.s.), 26, 1100 (1971).
101. ANGENOT (L.) - "Les alcaloïdes du Strychnos usambarensis GILG du Rwanda" - Conférence présentée lors du Colloque international "Progrès récents en Sciences botaniques" (Sart Tilman) Liège - 6 au 11 septembre 1971 - J. Pharm. Belg. 26, 585 (1971).
102. KOCH (M.) et PLAT (M.) - Compt. Rend. 273, C, 753 (27 septembre 1971).
103. KOCH (M.), GARNIER (J.) et PLAT (M.) - Annls. Pharm. Franç. 30, 299 (1972).
104. SANDBERG (F.), VERPOORTE (R.) et CRONLUND (A.) - Acta Pharm. Suecica 8, 341 (1971).
105. BISSET (N.G.) - Lloydia, 35, 95 (1972).
106. GAZET du CHAPELIER (G.) - Annls. Pharm. Franç. 6, 35 (1948).
107. MULLER (H.), HESSE (M.), WASER (P.), SCHMID (H.) et KARRER (P.) - Helv. Chim. Acta 48, 320 (1965).
108. ROSSI CARTONI (C.), CARPI (A.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - Lloydia 33, 279 (1970).
109. WINTERFELD (E.) - Liebigs Ann. Chem 745, 23 (1971).
110. PHILLIPSON (J.D.) et BISSET (N.G.) - Phytochemistry, 11, 2547 (1972).
111. SCOTT (A.I.) - Interpretation of the Ultraviolet spectra of Natural Products, Pergamon Press (1964) p. 172-179 et 287-303.
112. KAMLET (M.J.) - Organic Electronic Spectral Data, Vol. I (1946-1952), Interscience, New York (1960).
113. NAKANISHI (K.) - Infra-red Absorption Spectroscopy - ^{Practical} Rankodo Co Ltd Tokyo (1964).
114. Mc KILLOP (A.) - An Introduction to the Chemistry of the Alkaloids- Butterworths, London (1969).
115. BUDZIKIEWICZ (H.), PAKRASHI (S.C.) et VORBRUGGEN (H.) - Tetrahedron, 20, 399 (1964).
116. Committee on Publications of the I.U.P.A.C. - J. Amer. Chem. Soc. 82, 5545 (1960).
117. TROJANEK (J.) et BLAHA (K.) - Lloydia 29, 149 (1966).
118. BLACK (P.J.), BROWN (R.D.) et HEFFERMAN (M.L.) - Aust. J. Chem. 20, 1305 et 1325 (1967).
119. CROW (W.D.), HANCOX (N.C.), JOHNS (S.R.) et LAMBERTON (J.A.) - Aust. J. Chem. 23, 2489 (1970).
120. JORDAAN (A.), DU PLESSIS (L.M.) et JOYNT (V.P.) - J. of the South Afr. Chem. Inst. 21, 22 (1968).
121. GORMAN (A.), HESSE (M.), SCHMID (H.), WASER (P.G.) et HOPFF (W.H.) - The Alkaloids-Vol. I - Specialist Periodical Reports - The Chemical Society, London (1971), p. 200-333.
122. SPITELLER (G.) et SPITELLER-FRIEDMANN (M.) - Monatsch. Chem. 94, 779 (1963).

123. BUDZIKIEWICZ (H.), DJERASSI (C.) et WILLIAMS (D.H.) - Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry - Vol. I Alkaloids, Holden Day, San Francisco (1964).
- 123bis. BUDZIKIEWICZ (H.), DJERASSI (C.) et WILLIAMS (D.H.) - Mass Spectrometry of Organic Compounds, Holden Day, New York (1967).
- 124a. OGNJANOV (I.), PYUSKYULEV (B.), BOZJANOV (B.) et HESSE (M.) - Helv. Chim. Acta 50, 754 (1967).
- 124b. KUTNEY (J.P.) et BROWN (R.T.) - Tetrahedron 22, 321 (1966).
- 124c. KHAN (Z.M.), HESSE (M.) et SCHMID (H.) - Helv. Chim. Acta 50, 625 (1967).
125. Mc ISAAC (W.M.), HO (B.T.), ESTEVEZ (V.) et POWERS (D.) - J. Chromatogr. 31, 446 (1967).
126. JANOT (M.M.) - Tetrahedron 14, 113 (1961).
127. IRIE (H.), ISHIZUKA (K.), KAWASHIMA (S.), MASAKI (N.), OSAKI (K.), SHINGU (T.) et UYEO (S.) - Chem. Commun., 871 (1972).
128. DASTOOR (N.J.), GORMAN (A.A.) et SCHMID (H.) - Helv. Chim. Acta 50, 213 (1967).
129. WENKERT (E.) et ROYCHAUDHURI (D.K.) - J. Amer. Chem. Soc. 78, 6417 (1956).
- 130a. BOHLMANN (F.) - Berichte 92, 1798 (1959).
- 130b. YUNUSOV (T.K.) et autres. - Khimija Prirodnich Soedinnij, 200 (1972).
131. WENKERT (E.) et BRINGI (H.V.) - J. Amer. Chem. Soc. 81, 1474 (1959).
132. TRAGER (W.F.), PHILLIPSON (J.D.) et BECKETT (A.H.) - Tetrahedron 24, 2681 (1968).
133. PHILLIPSON (J.D.) et SHELLARD (E.J.) - J. Chromatogr. 31, 427 (1967).
134. USKOKOVIC (M.), BRUDERER (H.), VON PLANTA (C.), WILLIAMS (T.) et BROSSI (A.) - J. Amer. Chem. Soc. 86, 3364 (1964).
135. ROSEN (E.) et SHOOLERY (J.N.) - J. Amer. Chem. Soc. 83, 4816 (1961).
136. ANGENOT (L.) et BISSET (N.G.) - J. Pharm. Belg. 26, 585 (1971).
137. MURRAY (D.G.), SZAKOLCAI (A.) et Mc LEAN (S.) - Can. J. Chem. 50, 1486 (1972).
138. PEUBE-LOCOU (N.), KOCH (M.), PLAT (M.) et POTIER (P.) - Phytochemistry 11, 2109 (1972).
139. BRUNETON (J.) et CAVE (A.) - Phytochemistry 11, 2618 (1972).
140. RAYMOND-HAMET - Compt. Rend., 232A, 507 (1951).
141. NEUSS (N.) - Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids - Lilly Research Laboratories - Indianapolis U.S.A. (1964).
142. RIETH (R.) - Ann. 120, 247 (1861).
143. HESSE (O.) - Berichte, 11, 1542 (1878).
144. FISHER (O.) - Berichte 18, 400 (1885); 22, 637 (1889); 30, 2481 (1897); 38, 329 (1905).
145. SPÄTH (E.) - Monatsch. Chem. 40, 351 (1919); 41, 401 (1920).
146. NEU (R.) - Arzneimittelforschung 4, 601 (1954); 6, 94 (1956).
147. POUSETT (J.L.), BOUQUET (A.), CAVE (André), CAVE (Adrien) et PARIS (R.) - Compt. Rend., Paris 272c, 665 (1971).

148. FERREIRA (M.A.), ALVES (A.C.) et PRISTA (L.N.) - *Garcia Orta*, 11, 477 (1963); C.A. 62, 4323 (1965).
149. BACHLI (E.), VAMVACAS (C.), SCHMID (H.) et KARRER (P.) - *Helv. Chim. Acta* 40, 1167 (1957).
150. HOLUBEK (J.) et STROUF (O.) - *Spectral Data and Physical Constants of Alkaloids* - Heyden and Son Ltd - London (1965 à 1972).
151. LARDOT (M.) - *Alcaloïdes du Gambeya lacourtiana* - Thèse de doctorat en sciences, U.L.B. Bruxelles (1971).
152. LUTOMSKI (J.), KOWALEWSKI (Z.) et DROST (K.) - *Herba Polonica*, 13, 103 (1967); C.A. 68, 112163r (1968).
153. NAKANO (T.) et COROTHIE (E.) - *Phytochemistry* 7, 891 (1968).
- 154a. HESSE (M.) - *Fortschr. Chem. Forschung* 8, 608 (1967).
- 154b. KHAN (Z.M.), HESSE (M.) et SCHMID (H.) - *Helv. Chim. Acta* 48, 1957 (1965).
- 154c. KEUFER (J.) - *Bull. Soc. Chim. France*, p. 109 (1950).
155. ARMIT (J.W.) et ROBINSON (R.) - *J. Chem. Soc.* 127, 1604 (1925).
156. SCHWARZ (H.) et SCHLITTLER (E.) - *Helv. Chim. Acta* 34, 629 (1951).
157. BAN (Y.) et SEO (M.) - *Tetrahedron* 16, 5 (1961).
158. PRASAD (K.B.) et SWAN (G.A.) - *J. Chem. Soc.*, 2024 (1958).
159. KASCHNITZ (R.) et SPITELER (G.) - *Monatsch. Chem.* 96, 909 (1965).
160. JAKOT (M.M.), GOUTAREL (R.), LE HIR (A.) et BEJAR (L.O.) - *Ann. Pharm. Franç.* 16, 38 (1958).
161. SAINSBURY (M.) et WEBBS (B.) - *Phytochemistry* 11, 2337 (1972).
162. POTTS (K.T.), KANAOKA (M.), CRAWFORD (T.H.) et THOMAS (S.W.) - *J. Heterocycl. Chem.* 1, 297 (1964).
163. PAOLINI (L.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - *Nature*, 41 (1957).
164. JEWERS (K.), MANCHANDA (A.H.) et JENKINS (P.N.) - *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1393 (1972).
165. BARTLETT (M.F.), KORZUN (B.), SKLAR (R.), SMITH (A.F.) et TAYLOR (W.I.) - *J. Org. Chem.* 28, 1445 (1963).
166. BOEKELHEIDE (V.), CEDER (O.), CRABB (T.), KAWAZOE (Y.) et KNOWLES (R.N.) - *Tetrahedron Lett.*, 1 (1960).
167. GRDINIC (M.), NELSON (D.A.) et BOEKELHEIDE (V.) - *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3357 (1964).
168. Alloférine = Brevet international U.S. patent Office 3,080,073 déposé par A. FÜRST-A. BOLLER et H. ELS (firme HOFFMAN-LA ROCHE).
169. BERLAGE (F.), BERNAUER (K.), Von PHILIPSBORN (W.), WASER (P.), SCHMID et KARRER (P.) - *Helv. Chim. Acta* 42, 394 (1959).
- 169bis. BERNAUER (K.), BERLAGE (F.), Von PHILIPSBORN (W.), SCHMID (H.) et KARRER (P.) - *Helv. Chim. Acta* 42, 201 (1959).
170. BUDZIKIEWICZ (H.), WILSON (J.M.), DJERASSI (C.), LEVY (J.), LE MEN (J.) et JANOT (M.M.) - *Tetrahedron* 19, 1265 (1963).
171. WIELAND (H.), BAHR (K.) et WITKOP (B.) - *Annalen*, 547, 156 (1941).
172. PELLICCIARI (R.), DELLE MONACHE (F.), REVES (N.L.), CASINOVI (C.G.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - *Ann. Ist. Super. Sanita* 2, 411 (1966).

173. BERNAUER (K.), SCHMID (H.) et KARRER (P.) - *Helv. Chim. Acta*, 40, 1999 (1957).
174. WIELAND (H.), KONZ (W.) et SONDERHOFF (R.) - *Annalen*, 527, 160 (1937).
175. DELLE MONACHE (F.), CORIO (E.) et MARINI-BETTOLO (G.B.) - *Ann. Ist. Super. Sanita* 3, 190 (1967).
176. BATTERSEY (A.R.) et HODSON (H.F.) dans "The Alkaloids" vol. 8 edited by MANSKE (R.H.F.) (1965) p. 515-576; "The Alkaloids" vol. 11 edited by MANSKE (R.H.F.) (1968) p. 189-204.
177. BATTERSEY (A.R.) dans "The Alkaloids" vol. I - Specialist Periodical Reports - The Chemical Society - Burlington House London (1971) p. 31 à 47).
178. JAMINET (F.) - *Lejeunia* 15, 23 (1951).
179. COSCIA (C.J.) et GUARNACCIA (R.) - *Chem. Commun.* 138 (1968).
180. FRANCIS (M.J.O.) dans "Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry" - edited by T.W. Goodwin - Academic Presse (1971) London and New York, p. 29-51.
181. WIEFFERING (J.H.) - *Phytochemistry* 5, 1053 (1966).
182. STAUNTON (J.) dans "The Alkaloids" vol. 2 - Specialist Periodical Reports- The Chemical Society- Burlington House London (1972) p. 1-32.
183. ANGENOT (L.) et DENOËL (A.) - *Planta Med.* 21, 96 (1972).
184. CISTARO (C.), MERLINI (L.), MONDELLI (R.) et NASINI (G.) - *Chem. Commun.* 785 (1972).
185. RIESNER (H.) et WINTERFELD (E.) - *Chem. Commun.* 786 (1972).
186. BATTERSEY (A.R.) et HALL (E.S.) - *Chem. Commun.* 793 (1969).
187. BATTERSEY (A.R.) et GREGORY (B.) - *Chem. Commun.* 134 (1968).
188. BATTERSEY (A.R.) et HALL (E.S.) - *Chem. Commun.* 194 (1970).
189. INOUE (H.), UEDA (S.) et TAKEDA (Y.) - *Tetrahedron Lett.* 407 (1969).
190. BATTERSEY (A.R.) - *Biochem. Soc. Sympos.* n° 29, 157 (1970).
191. STICHER (O.) - *Pharm. Acta Helvetiae* 44, 453 (1969).
192. HINSHAW (W.B.), LEVY (J.) et LE MEN (J.) - *Tetrahedron Lett.* 995, (1971).
193. PEUBE-LOCOU (N.), KOCH (M.), PLAT (M.) et POTIER (P.) - *Compt. Rend.*, 273, 905 (1971).
194. PLOUVIER (V.) et FAVRE-BONVIN (J.) - *Phytochemistry* 10, 1697 (1971).
195. PEUBE-LOCOU (N.), KOCH (M.), PLAT (M.) et POTIER (P.) - *Annls Pharm. Franç.* 30, 775 (1972).
196. JONES (N.D.) et NOWACKI (W.) - *Chem. Commun.* 805 (1972).
197. SHETH (K.), RAMSTAD (E.) et WOLINSKY (J.) - *Tetrahedron Lett.* 394 (1961).
198. INOUE (H.), YOSHIDA (T.) et TOBITA (S.) - *Tetrahedron Lett.* 2945 (1968).
199. BOUQUET (A.) - *Plantes Médicinales du Congo-Brazzaville - Uvariopsis, Pauridiantha, Diospyros...* - Travaux de l'O.R.S.T.O.M. n° 13 (1972) p.59.
200. VAN ROSSUM (J.M.) - *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 143, 240 et 299 (1963).
201. SNYDER (S.H.) et HENDLEY (E.D.) - *J. Pharmacol. Exp. Thé.*, 163, 386 (1968).