

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE
SERVICE DE PHARMACOGNOSIE
(Dir. : Prof. A. DENOËL)

NOUVELLES RECHERCHES SUR LES ALCALOÏDES DES STRYCHNOS AFRICAINS

par

Luc ANGENOT

Pharmacien

Docteur en Sciences Pharmaceutiques

Premier Assistant à l'Université

Mémoire présenté
à l'Académie Royale de Médecine de Belgique
en réponse à une question
posée par la V^e Section
(Concours ordinaire 1974-1976)

Déposé en décembre 1976

REMERCIEMENTS

Que Monsieur le Professeur DENOËL, Chef du Service auquel nous appartenons, accepte nos remerciements les plus sincères pour la confiance et les encouragements qu'il n'a jamais cessé de nous témoigner durant ces dernières années.

En pharmacognosie, les recherches phytochimiques ne pouvant s'épanouir que dans l'interdisciplinarité, nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidé dans la réalisation de ce mémoire, et en particulier:

- Monsieur le Professeur C.L. LAPIERE pour ses avis éclairés sur la Recherche en général et la stéréochimie des molécules en particulier;
- Messieurs les Professeurs J. BOSLY et F. JAMINET pour leur intérêt à des recherches dont ils furent naguère des pionniers.
- Monsieur le Docteur N.G. BISSET (Chargé de cours à l'Université de Londres) et Monsieur D. CARTER (Mass Spectrometry Service, Univ. London) pour la réalisation des spectres de masse, et leur amicale attention à notre programme de recherches.
- Monsieur J. DENOËL (Directeur du Centre de R.M.N.), qui a assuré la prise des spectres ^1H et ^{13}C , malgré le temps d'utilisation très revendiqué des appareils.
- L'équipe du Service de Cristallographie (Dir.: Professeur J. TOUSSAINT), qui s'est empressée de soumettre aux rayons X les cristaux que nous leur proposons.
- Messieurs les Professeurs G. DUYCKAERTS, M. RENSON et Monsieur le Docteur C. HOUSIER, qui ont facilité la prise de spectres (I.R. et C.D.) dans leurs laboratoires.

*
* *

PLAN DU TRAVAIL

		Pages
	<u>INTRODUCTION</u>	1
Chapitre I	<u>BOTANIQUE et Ethnobotanique</u>	
I.1	Généralités	2
I.2.a.	Les poisons de chasse, de pêche et d'ordalies	2
I.2.b.	"Pharmacopée" traditionnelle africaine	3
I.3.	Choix des espèces à étudier en priorité	5
Chapitre II	<u>ISOLEMENT et IDENTIFICATION DES ALCALOÏDES</u>	
II.1.	Progrès récents dus aux techniques analytiques	8
II.2.	Diversité chimique des Strychnos africains	9
II.2.a.	Les alcaloïdes indoliniques	10
II.2.b.	Les alcaloïdes indoliques	15
Chapitre III	<u>PHARMACOLOGIE DES ALCALOÏDES DES STRYCHNOS</u>	
III.1.	Principes convulsivants	20
III.2.	Principes paralysants et curarisants	21
III.3.	Activités d'autres alcaloïdes des Strychnos	23
III.4.	Conclusions	24
Chapitre IV	<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u> (Recherches personnelles récentes sur le <u>S. usambarensis</u>)	
IV.1.	Généralités	26
IV.2.	Akagérine (alcaloïde des racines)	28
IV.3.	Extraction des alcaloïdes tertiaires des feuilles	33
IV.4.A.	Strychnofoline	37
IV.4.B.	Isostrychnofoline	42
IV.5.	Usambaridines et dérivés	45
IV.5.A.	Usambaridine "Vi"	46
IV.5.B.	Usambaridine "Br"	50
IV.5.C.	18,19 Dihydro-usambaridines	53
IV.5.D.	Strychnobaridine	54
IV.6.A.	Strychnopentamine	56
IV.6.B.	Iso-strychnopentamines A et B	60
IV.7.	Strychnophylline	63
IV.8.A.	Usambarine	66
IV.8.B.	18,19 Dihydro-usambarine	73
	<u>CONCLUSIONS</u>	77
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	79

NOUVELLES RECHERCHES SUR LES ALCALOÏDES DES STRYCHNOS AFRICAÏNS

par

Luc ANGENOT

Docteur en Sciences Pharmaceutiques

INTRODUCTION

Il pourrait paraître étonnant que des recherches chimiques et pharmacologiques soient encore consacrées aux représentants du genre *Strychnos*, soumis depuis deux siècles à de nombreuses investigations. Cependant, quand on fait un bilan, on constate rapidement que le sujet n'est guère épuisé. Ce qui explique la nouvelle vague d'intérêt que suscite l'étude des *Strychnos* et plus particulièrement celle des *Strychnos* africains. Depuis quelques années, en effet, ces végétaux sont examinés dans les laboratoires de plusieurs universités européennes (Uppsala, Londres, Paris, Rome, Leyde et Liège). Les causes de ce regain d'intérêt seront envisagées dans les chapitres suivants. Le premier d'entre eux établira que peu d'espèces ont été jusqu'à présent étudiées; le second chapitre traitera de la diversité chimique des principes actifs dont les structures sont plus facilement établies que par le passé; nous envisagerons ensuite les effets pharmacologiques que l'on peut espérer découvrir pour ces nouvelles molécules. Pour clore ce travail, une partie expérimentale relatera l'isolement et la détermination de structure d'une dizaine de nouveaux alcaloïdes.

Chapitre I. BOTANIQUE et ETHNOBOTANIQUE

I.1. Les Strychnos appartiennent à la famille des Loganiaceae qui comprend 28 genres, couvrant de 550 à 600 espèces d'herbes, arbrisseaux, lianes et arbres croissant dans les régions tropicales et sous-tropicales du globe. Le genre le plus important de cette famille est sans conteste le genre Strychnos LINNE, puisqu'avec environ 200 membres, il représente à lui seul, le tiers des espèces.

En ce qui concerne plus particulièrement les Strychnos africains, 300 noms avaient été proposés dans la littérature, la plupart au début du siècle par BAKER, DE WILDEMAN et GILG, ensuite plus récemment par DUVIGNEAUD. Au terme d'une revision taxinomique détaillée (1), le botaniste néerlandais LEEUWENBERG a ramené leur nombre à 75.

De cette façon, il est maintenant permis de travailler des plantes soigneusement identifiées, ce qui rend possible l'exploitation des résultats obtenus.

I.2.a. Les poisons de chasse, de pêche et d'ordalies

L'utilisation la plus remarquée des Strychnos est sans doute leur incorporation dans les poisons de chasse: qu'il s'agisse des "curares" sud-américains ou des "ipohs" asiatiques (2,3,4). Pour l'Afrique, c'est à la fin du siècle passé que l'on apprit l'emploi du "m'boundou" (Strychnos icaja BAILLON) lors des épreuves judiciaires pratiquées en Afrique Centrale (Congo, Zaïre, Gabon, République Centre-Africaine) ainsi que dans la préparation de poisons de flèches principalement du Haut-Ituri au Zaïre (5,6,7).

Récemment, nous avons observé au Rwanda, dans le Sud-Est du Parc de l'Akagéra, que les Banyambo choisissaient les racines et les feuilles du Strychnos usambarensis GILG pour préparer leur poison de chasse, de la même façon que les curares sud-américains, c'est-à-dire par simple extraction aqueuse, suivie d'une concentration par ébullition (8). L'intérêt majeur que présente l'étude des poisons de flèches pour la pharmacologie, la toxicologie et la thérapeutique est évident et il n'est pas nécessaire de le développer dans ce travail (9).

Signalons de plus que les fruits de certaines espèces (S.* aculeata SOLERED.; S. camptoneura GILG et BUSSE, S. icaja BAILL.; S. potatorum L.f.; S. samba DUVIGN. et S. spinosa LAM.) ont été utilisés comme piscicides. Cette activité est attribuée aux saponines et alcaloïdes mais les principes actifs n'ont pas encore été isolés.

Il convient encore de ne pas oublier les nombreux accidents éventuellement mortels observés lors de la consommation de fruits non comestibles de Strychnos.

Enfin, certaines espèces, quand elles sont mélangées à la nourriture ou à un appât, servent à préparer des poisons destinés à éliminer un adversaire ou un animal dangereux.

I.2.b. "Pharmacopée" traditionnelle africaine

La révision botanique a ouvert la voie à une recherche des données ethnobotaniques. Cet inventaire est, aux dires de son auteur, le chercheur britannique BISSET (10), très incomplet, car il fournit beaucoup moins de renseignements pour les espèces forestières que pour celles de savanes qui sont évidemment des endroits beaucoup plus accessibles aux enquêteurs.

Cette réserve faite, on constatera que les racines représentent la partie de la plante la plus utilisée (40 %) dans les

remèdes connus. Viennent ensuite les feuilles (27 %) et enfin les écorces de troncs et les fruits (16 %). Les parties souterraines servent surtout à préparer les médicaments destinés à l'usage interne (macérés, décoctés, infusés), tandis que les feuilles sont plutôt utilisées en usage externe (cataplasmes, poudres). A ce propos, les "screenings" réalisés démontrent que les feuilles renferment moins de principes actifs alcaloïdiques que les racines: ce qui pourrait expliquer l'empirisme des indigènes. Nous avons repris et traduit de l'excellente revue du Dr BISSET, le tableau I relatant tantôt les types de maladies soignées par les médicaments à base de Strychnos, tantôt les vertus de ces plantes. Les chiffres indiquent le nombre de citations rencontrées dans la littérature.

Tableau I

maladies vénériennes; aphrodisiaque; abortif	19
maladies stomacales et intestinales	14
maladies pulmonaires	11
alexipharmaque (contre les morsures de serpents)	10
fébrifuge (anti-malaria)	10
vermifuge	9
analgésique	9
cicatrisant	8
troubles oculaires	8
émétique	7
troubles oto-rhino-laryngologiques	6
purgatif	5
anti-épileptique	4

Il est vraisemblable qu'une partie seulement de ces propriétés soit imputable aux alcaloïdes car, en effet, les Strychnos ne sont pas dépourvus de saponines, flavonoïdes, acides-phénols, iridoïdes et autres dérivés qui peuvent contribuer aux propriétés recherchées.

Ceci est d'autant plus vrai que certains des *Strychnos* utilisés sont dépourvus d'alcaloïdes ou n'en renferment que de très faibles quantités. A ce propos, on consultera les résultats des recherches préliminaires ("screenings") cités ci-après ainsi que notre travail consacré au *Strychnos innocua* DEL. (11).

I.3. Choix des espèces à étudier en priorité

Seules quelques espèces ont fait l'objet d'une étude de leurs alcaloïdes (*S. icaia* BAILL., *S. henningsii* GILG, *S. splendens* GILG, *S. camptoneura* GILG et BUSSE, *S. usambarensis* GILG, *S. dolichothyrsa* GILG) et, dans ces espèces, certaines parties n'ont pas été étudiées, par exemple, les racines de toutes les espèces précitées, à l'exception du *S. usambarensis*.

La plupart du temps, ce sont précisément les racines qui renferment la plus grande quantité d'alcaloïdes; or elles ont été négligées dans les "screenings", principalement ceux effectués à partir d'échantillons d'herbier. Ce ne fut cependant pas le cas de la première étude systématique des *Strychnos* africains, qui fut réalisée à Liège, au cours des années 1948 à 1953, dans le laboratoire de Pharmacognosie auquel nous appartenons et que dirigeait déjà le Prof. DENOËL (12).

A cette époque, l'Institut de Pharmacie de Liège a collaboré à une expédition envoyée au Congo belge en vue de prospecter des plantes à vocation thérapeutique. Cette expédition subsidiée par l'I.R.S.I.A. et dirigée par les Professeurs BACQ et DUVIGNEAUD a récolté de nombreux *Strychnos* dont certains échantillons importants existent toujours. Malheureusement, l'identification botanique laissa à désirer: c'est ainsi que certaines espèces différentes portaient le même nom et qu'une même espèce se vit attribuer différents noms! Nous avons réexaminé les échantillons conservés dans le laboratoire sur la base des

critères récents établis pour la classification des *Strychnos* (1), de telle sorte que cet examen complète les identifications réalisées sur les exemplaires d'herbier du botaniste belge DUVIGNEAUD par le botaniste néerlandais LEEUWENBERG. Nous pouvons de la sorte apporter les rectifications suivantes aux noms des espèces effectivement étudiées à cette époque. Si 13 espèces avaient été bien identifiées (il s'agit des *S. aculeata* SOLERED., *S. angolensis** GILG, *S. coccu- loides* BAK., *S. densiflora* BAILL., *S. gossweileri** EXELL, *S. icaja** BAILL., *S. innocua* DEL., *S. malchairii** DE WILD, *S. mitis* S. MOORE, *S. phaeotricha* GILG, *S. pungens** SOLERED., *S. samba* DUVIGN., *S. varia- bilis** DE WILD), les autres, par contre, cèdent leur nom de la façon décrite dans le tableau 2.

Tableau 2

<u>Nouvelle dénomination remplaçant</u>	<u>la dénomination initiale</u>
<i>S. campicola</i> GILG	<i>S. brunneonigricans</i> nov. sp. DUVIGN.
<i>S. congolana</i> GILG	<i>S. lecomtei</i> A. CHEVAL
<i>S. henningsii</i> * GILG	<i>S. holstii</i> GILG <u>var. reticulata</u> (BURTT and DAVY) DUVIGN. <u>f. conden- sata</u> DUVIGN.
<i>S. johnsonii</i> HUTCH et M.B. MOSS	<i>S. goniodes</i> DUVIGN.
<i>S. kasengaensis</i> DE WILD	<i>S. ngounyensis</i> PELLEGRIN
<i>S. longicaudata</i> * L.	<i>S. brevicymosa</i> DE WILD. 786 B
<i>S. lucens</i> BAK.	<i>S. milneredheadii</i> DUVIGN. et STAQUET
<i>S. memecyloides</i> S. MOORE	<i>S. cordatifolia</i> DUVIGN.
<i>S. phaeotricha</i> GILG	<i>S. thyrsiflora</i> MILDBR.
<i>S. potatorum</i> L.f.	<i>S. stuhlmanii</i> GILG
<i>S. scheffleri</i> * GILG	<i>S. volubilis</i> DUVIGN.
	<i>S. subaquatica</i> DE WILD
<i>S. spinosa</i> LAM.	<i>S. lokua</i> RICH.
<i>S. usambarensis</i> * GILG	<i>S. fernandiae</i> H 786 A DUVIGN. et H 5
(Herbiers examinés ultérieurement par D. LEEUWENBERG)	<i>S. micans</i> S. MOORE <i>S. stenura</i> ?

Parmi les 25 espèces récoltées à cette époque, il n'y en avait que 10 - renseignées par un astérisque - qui renfermaient au moins 0,5 % d'alcaloïdes dans une partie de la plante, le plus souvent l'écorce des racines. De plus, il n'y en a que trois qui aient livré une partie de leurs secrets: il s'agit des S. henningsii, S. icaja et S. usambarensis. Une quatrième espèce, le S. variabilis, est en cours d'étude dans le laboratoire. Nous espérons que les 6 autres seront d'ici peu examinées car nous avons remarqué la stabilité alcaloïdique de plusieurs *Strychnos* africains dont nous avons pu comparer des échantillons récoltés soit en 1948 soit en 1971 (cas des S. variabilis et usambarensis); ce phénomène de stabilité dans les tissus végétaux secs, alors que les alcaloïdes isolés sont instables en solution, a également été observé dans le cas du S. icaja à propos d'échantillons récoltés au Gabon à la fin du siècle passé (34).

Ces dernières années, d'autres études préliminaires systématiques ont été réalisées à l'étranger,

- par BOUQUET dans les laboratoires français de l'O.R.S.T.O.M. (13 à 18)
- par BISSET et PHILLIPSON à Londres (19) et
- par SANDBERG et ses collaborateurs en Suède (20 à 23).

Elles concernent des espèces dont l'identification botanique est assurée et elles ont permis soit de confirmer les résultats antérieurs soit de déceler des espèces douées de propriétés le plus souvent paralytiques.

Les résultats de toutes ces enquêtes ethnobotaniques, chimiques et pharmacologiques permettent de choisir, parmi les espèces récoltées, celles qu'il convient d'étudier en priorité.

Chapitre II. ISOLEMENT et IDENTIFICATION DES ALCALOIDES

II.1. Progrès récents dus aux techniques analytiques

Avant l'avènement de la chromatographie et des techniques spectrales, les travaux phytochimiques réalisés sur les Strychnos étaient tellement laborieux qu'ils monopolisèrent les efforts de plusieurs générations de chercheurs.

Un premier exemple démontrera le prodigieux intérêt des techniques chromatographiques qui permettent la séparation de mélange complexes de produits à structure parfois très voisine.

Depuis le début du 19ème siècle, on savait que des espèces de Strychnos entraient dans la préparation de certains poisons sud-américains (curares enalebasses et en pots); par contre, il fallut attendre le milieu de ce siècle, c'est à dire l'application de la chromatographie à l'étude de ces poisons pour enfin isoler les principes actifs purs. Ce fut l'oeuvre des professeurs WIELAND de Francfort, KARRER et SCHMID de Zurich. Les structures de tous les principes curarisants ne sont néanmoins pas encore élucidées car les Strychnos et les poisons qui en découlent renferment très souvent plusieurs dizaines d'alcaloïdes dont il est très malaisé d'obtenir la séparation en quantités permettant une étude ultérieure (structure-activité).

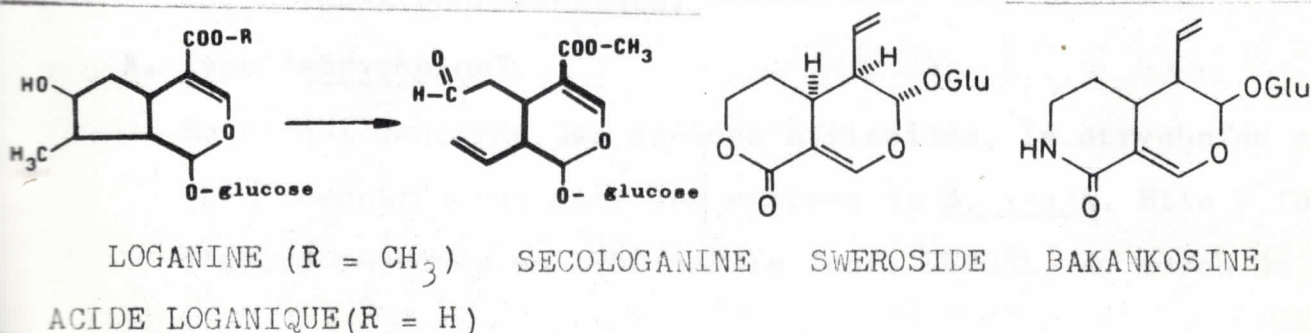
Un autre exemple illustrera les progrès réalisés précisément dans la détermination de structure. C'est ainsi que PELLETIER et CAVENTOU isolèrent en 1818 et 1819 la strychnine et la brucine de diverses drogues asiatiques: la noix-vomique (graines de S. nux-vomica L.), la fève de St Ignace (graines de S. ignatii BERG.) et le bois de couleuvre (racines de S. nux-vomica ou S. lucida R. Br., ou S. wallichiana STEUD)!

Or, la structure de ces alcaloïdes ne fut élucidée qu'en 1947, au terme de recherches menées indépendamment l'une de l'autre par l'anglais ROBINSON et l'américain WOODWARD. Quelques années plus tard, les preuves de ces structures furent apportées par une étude cristallographique aux rayons X, et par synthèse.

A titre de comparaison, la structure de la strychnopentamine (voir fin du travail) a été établie moins de trois mois après l'isolement de quelques cristaux du produit. Si de tels progrès peuvent être enregistrés, c'est grâce à l'éclosion et au développement des techniques modernes d'identification structurale: spectrophotométrie dans l'ultra violet, le visible et l'infra-rouge, spectrométrie de masse à haute résolution, résonance magnétique nucléaire, diffraction aux rayons X; cette dernière technique n'est toutefois applicable qu'aux produits cristallisés dans des systèmes déterminés.

II.2. Diversité chimique des Strychnos africains

Les alcaloïdes isolés jusqu'à présent contiennent quasi tous, un noyau indolique. En addition à cette partie dérivée de l'acide aminé tryptophane, via la tryptamine, ils possèdent une partie non indolique, qui est le plus souvent constituée d'une unité à 9 ou 10 atomes de carbone; cette unité monoterpénique est fournie par des glucosides iridoïdes du type de la loganine et de l'acide loganique fréquemment rencontrés dans les Strychnos (24).



Les molécules azotées rencontrées dans ces plantes ne proviennent cependant pas exclusivement de ces acides aminés. On a en effet extrait du S. madagascariensis POIR., un glucoside séco-iridoïde azoté: la bakankosine, correspondant à la formule du swéroside où un atome d'oxygène est remplacé par une amine secondaire (25). Ce glucoside azoté est à rapprocher de la gentianine isolée non seulement à partir des gentianes mais aussi de divers Anthocleista (Loganiaceae) où il a été prouvé que la gentianine était en fait un artéfact, qui se formait en milieu ammoniacal à partir de la swertiamarine, autre séco-iridoïde (26). A ce propos, il convient de citer les alcaloïdes du type de l'angustine (voir ci-après) dont le troisième atome d'azote est inclus dans la partie terpénique de la molécule et dont il a été prouvé qu'un meilleur taux d'isolement était obtenu quand on basifiait la solution d'extraction par l'ammoniaque (27).

Avant d'entreprendre la classification des différents types d'alcaloïdes, nous tenons à préciser que nous ne citerons pas tous les alcaloïdes isolés dans chaque type; nous insisterons surtout sur ce qui a été publié après la parution, en 1971, d'un long article consacré aux alcaloïdes des *Strychnos* (19).

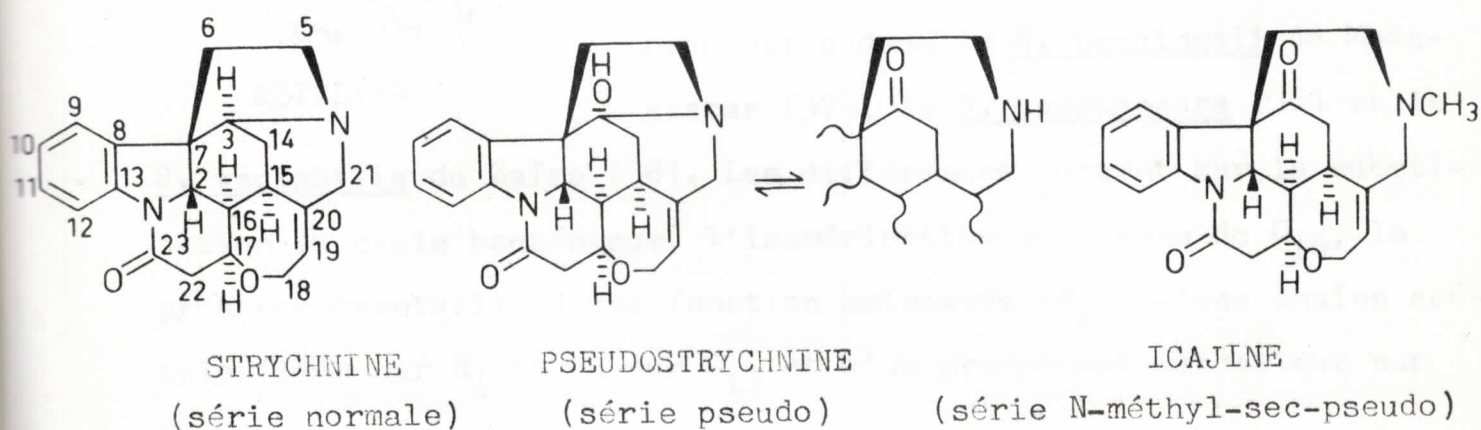
II.2.a. Les alcaloïdes indoliniques ou les variations sur le thème de la strychnine

Ces alcaloïdes sont spécifiques du genre *Strychnos*. C'est la raison pour laquelle nous commencerons par en examiner les principaux représentants;

A. Type "strychnine"

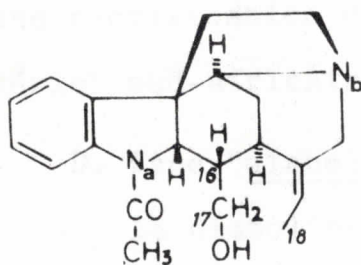
En ce qui concerne les espèces africaines, la strychnine n'a été rencontrée que dans les racines du S. icaja. Elle y fut d'abord détectée en 1950 par le Prof. DENOËL, au moyen de la

chromatographie sur papier et de la réaction de MALAQUIN-DENIGES (28); elle fut ensuite isolée par le Prof. SANDBERG, en même temps que la 12-hydroxy-strychnine, douée de la même activité (29). Notons que la brucine est absente de ces racines et qu'elle n'a pas encore été extraite d'un *Strychnos* africain.



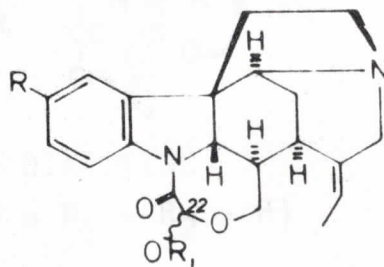
Les alcaloïdes des feuilles et des fruits renferment, outre la pseudostrychnine, uniquement des alcaloïdes de la série N-méthyl-pseudo. Les trois premiers furent isolés à Liège et sont entrés dans la littérature sous le nom du chercheur qui les avait découverts: il s'agit des alcaloïdes A, B et C de JAMINET (30); leurs structures furent élucidées plus tard par Mr BISSET (31).

L'alcaloïde A était en fait un mélange cristallisé contenant une quantité équimoléculaire d'icajine et de vomicine; l'alcaloïde B était la 19-20- α -époxy-15 hydroxy novacine et l'alcaloïde C de la 19-20- α -époxy-novacine. Douze autres alcaloïdes de la même série furent ensuite isolés par Mr BISSET. Ils diffèrent des précédents par la position des substituants sur les C_{10} , 11 et 12 du cycle aromatique l'absence ou la présence d'une fonction alcoolique sur le C_{15} et d'un groupe époxy entre C_{19} et C_{20} (31 à 34).

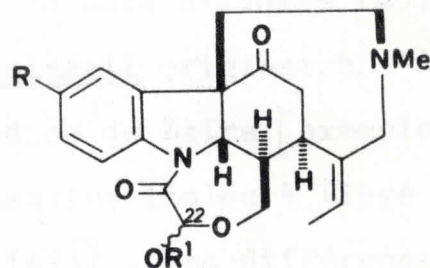
B. Type "rétuline"

RETULINE

La rétuline a été isolée à Liège par Mr BOSLY, à partir du S. henningsii (S. holstii) du Zaïre (35). Elle vient d'être retrouvée dans le S. camptoneura de la Côte d'Ivoire (36). Des alcaloïdes très proches ont été rencontrés dans le S. henningsii de Madagascar (37), le S. camptoneura (36) et le S. variabilis du Zaïre (38). Les différences portent sur la substitution du cycle benzénique, l'isomérisation au niveau de C_{16} , la présence éventuelle d'une fonction aminoxyde (N_b), d'une chaîne acétyle fixée sur N_a et ou sur O_{17} et d'un groupement alcoolique sur C_{18} .

C. Type "tsilanine"TSILANINE ($R = H$ - $R_1 = CH_3$)

(série normale)

HOLSTIINE ($R = H$ - $R_1 = H$)

(série N-méthyl-sec. pseudo)

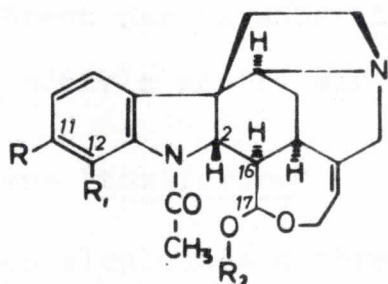
Les alcaloïdes de ce type n'ont été décelés que dans le S. henningsii. La tsilanine a été isolée du "tsilanimboana" nom malgache de ce Strychnos (39). Ses dérivés ne diffèrent que par un substituant méthoxy sur le cycle benzénique et/ou un hydroxyle méthylé ou non sur le C_{22} . On retrouve les mêmes dérivés dans la série N-méthyl-pseudo. Le premier alcaloïde de ce groupe est l'holstiine, isolée aussi à Liège par Mr BOSLY, en même temps que l'holstiline (35).

Leurs structures ont été publiées récemment, en même temps qu'une rectification de celle de la rindline, isolée cette fois de matériel sud-africain (40).

D. Type "diaboline"

La diaboline a d'abord été trouvée dans le S. diabolii SANDW., espèce américaine. On l'a ensuite rencontrée dans d'autres espèces américaines et asiatiques.

En Afrique, la diaboline fut extraite du S. henningsii sud-africain et récemment du S. potatorum, la seule espèce de *Strychnos* qui pousse sur deux continents, en l'occurrence l'Asie et l'Afrique (41).



DIABOLINE

(R = R₁ = R₂ = H)

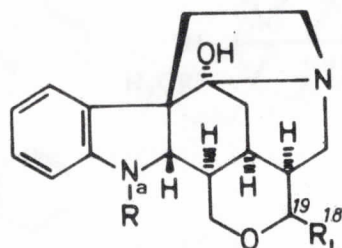
Des alcaloïdes de structure très proche ont été isolés du S. angolensis (44), du S. malacoclados CH. WRIGHT de la Côte d'Ivoire (43) et du S. henningsii originaire d'Afrique du Sud ou du Zaïre [exemple de la condensamine isolée à Liège par Mr BOSLY (42)]. Les différences

touchent la substitution sur le cycle benzénique et l'hydroxyle de C₁₇. Quelques alcaloïdes déshydrogénés au niveau des C₂ et C₁₆ sont également présents et, dans ces rares cas, nous sommes en présence du type "akuammicine" dont le principal représentant est le principe actif du Picralima nitida (STAPF) Th. et HEL. DUR. (Apocynaceae).

E. Type "spermostrychnine"

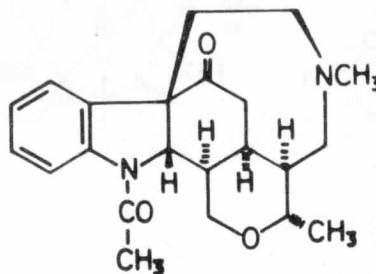
Cet alcaloïde isolé du S. psilosperma F.U. MUELL originaire d'Australie, appartient à la série normale, tandis que les

alcaloïdes extraits du matériel africain (S. splendens GILG de Côte d'Ivoire) n'appartiennent pas à cette série mais aux séries "pseudo" et "N-méthyl.sec. pseudo" (45-46).



STRYCHNOSPLENDINE

(série pseudo)

(R = H R₁ = β -CH₃)

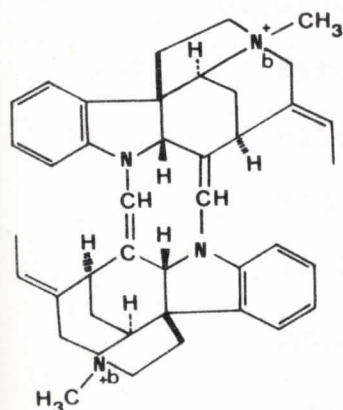
ISOSPLENDINE

(série N-méthyl.sec.pseudo)

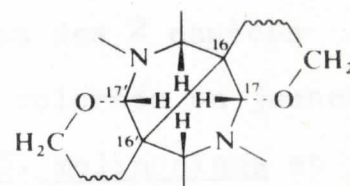
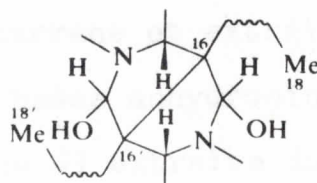
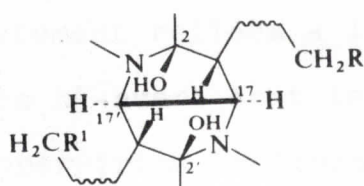
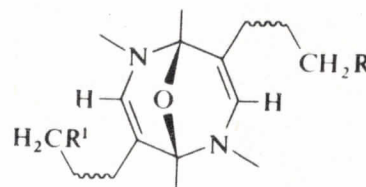
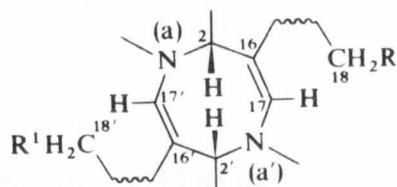
Plusieurs alcaloïdes de la série "pseudo" ont été rencontrés; ils diffèrent par la substitution sur N_a, ainsi que la stéréoisomérisation du méthyle greffé sur le C₁₉ du cycle tétrahydropyranique.

F. Type "toxiférine"

Ces alcaloïdes dimères symétriques n'avaient été trouvés que dans les espèces américaines de Strychnos (47). Les principes actifs des "curares" sont les dérivés munis de 2 fonctions ammoniums quaternaires dont l'étude chimique et pharmacologique a surtout été réalisée à Zurich. Nous avons pu démontrer, grâce à la collaboration du Laboratoire de Pharmacologie (Prof. A. DRESSE) de l'Université de Liège, que les principes hautement curarisants du S. usambarensis du Rwanda étaient de ce type (C-dihydro-toxiférine, C-curarine, C-calebassine) (48 à 50). Ces alcaloïdes diffèrent entre eux par la substitution au niveau du cycle central diazacyclooctadiène de la dihydro-toxiférine. Des bases ditertiaires apparentées et leurs dérivés-N_b-mono et di-oxy viennent d'être isolées du S. dolichothyrsa



C-DIHYDROTOXIFERINE



MODIFICATIONS DU CYCLE CENTRAL

(R et R₁ = H et/ou OH)

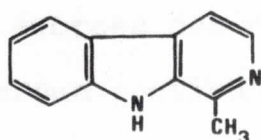
du Cameroun. Par contre, les bases quaternaires sont absentes dans cette espèce (51).

II.2.b. Les alcaloïdes indoliques

Ces alcaloïdes ne sont pas spécifiques du genre *Strychnos* et leur découverte en nombre de plus en plus grand dans ce genre élargit le cadre des prospections à entreprendre d'un point de vue pharmacologique. Ces résultats présentent de plus un grand intérêt en chimiotaxinomie car ils établissent les relations étroites entre les familles végétales des Loganiaceae, des Apocynaceae et des Rubiaceae.

A. Groupe "β-carboline"

L'alcaloïde tertiaire le plus simple décelé dans un *Strychnos*



HARMANE

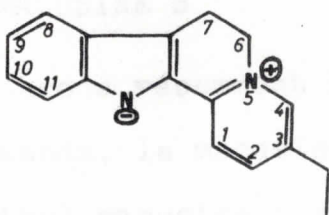
est l'harmane, que nous avons isolé des écorces de racines du *S. usambarensis*. L'harmane a déjà été rencontré dans de nombreuses familles dont

les Passifloraceae et les Rubiaceae (52). La base ammonium quaternaire correspondante (mélinonine F) avait, au préalable été trouvée dans les écorces de racines du *S. melinoniana* BAI

d'Amérique du Sud.

B. Groupe "indoloquinolizine"

Etroitement reliées à l'harmane et extraites des 2 espèces citées ci-avant sont les bases anhydronium colorées en jaune: flavopéréirine (mélinonine G) extraite du S. melinoniana et la 6,7-dihydroflavopéréirine que nous avons isolée du S. usambarensis (53).

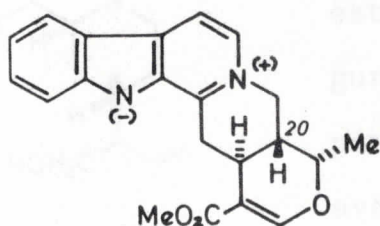


6,7-DIHYDRO-FLAVOPEREIRINE

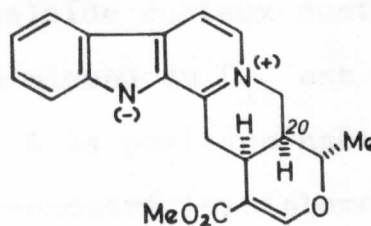
La flavopéréirine a d'abord été trouvée dans le "pao pereira", nom brésilien d'une espèce de Ceissospermum (Apocynaceae). Ces alcaloïdes possèdent seulement 7 atomes de carbone dans la partie non tryptaminique.

Ils proviennent peut-être d'une dégradation d'un alcaloïde dimère.

C. Groupe "ajmalicine"

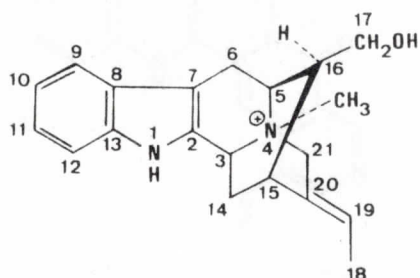


SERPENTINE



ALSTONINE

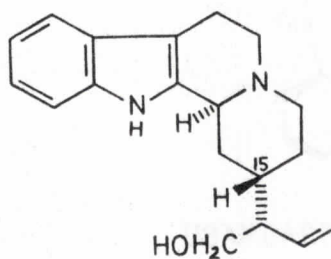
Les écorces des racines et des tiges du S. camptoneura du Cameroun contiennent ces deux bases anhydronium isomères au niveau du C₂₀ (54). Ces alcaloïdes avaient été trouvés précédemment dans les Alstonia et les Rauwolfia (Apocynaceae). Un alcaloïde voisin, la mélinonine A, est un alcaloïde monoquaternaire de S. melinoniana déjà cité.

D. Groupe "sarpagine"

MACUSINE B

Du S. toxifera ROB. SCHOM, récolté en Amérique du Sud où il est utilisé par la tribu des Macusi pour préparer leur "curare", ont été isolées les macusines A, B et C, ammoniums quaternaires d'alcaloïdes bâtis sur le squelette de la sarpagine, alcaloïde bien connu des Rauwolfia (Apocynaceae).

Nous avons récemment isolé, toujours à partir du S. usambarensis du Rwanda, la macusine B et deux nouveaux produits très voisins: O-méthyl-macusine B et O-méthyl-19-20 dihydro-macusine B (55). La base tertiaire, la nor-macusine B, vient d'être identifiée dans le S. malacoclados de la Côte d'Ivoire (51).

E. Groupe "vallesiachotamine"

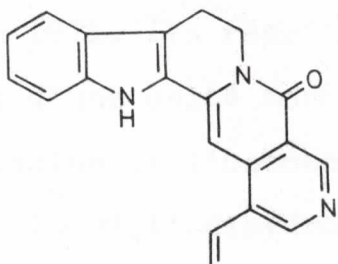
ANTIRRHINE

Les feuilles de S. camptoneura renferment notamment de l'antirrhine et son dérivé ammonium quaternaire (56). L'antirrhine est cet alcaloïde curieux dont la configuration au niveau du C₁₅ est inversée par rapport à la position habituelle. Il avait été rencontré initialement dans les Antirrhéa (Rubiaceae) et ensuite dans les

Rhazya (Apocynaceae).

F. Groupe "angustine"

L'angustine est une des trois pyridino-indolo-quinolizidinones extraites récemment du S. angustiflora BENTH. (Extrême-Orient) (57). Elle a été isolée en faible quantité des feuilles du S. camptoneura et détectée par chromatographie dans plusieurs



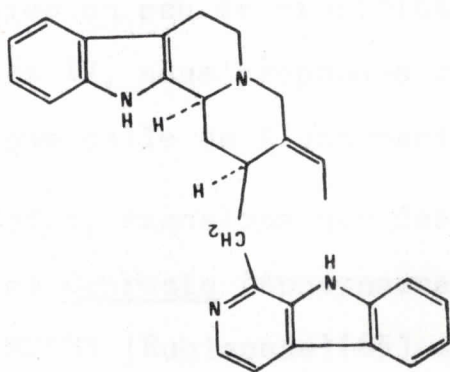
ANGUSTINE

autres espèces de *Strychnos*, mais aussi de *Mitragyna*, de *Nauclea* et d'*Uncaria* (Rubiaceae) (27). L'angustine représente les alcaloïdes tri-azotés, dérivés probablement d'une unité indolique couplée à une unité séco-iridoïde du style de la gentianine.

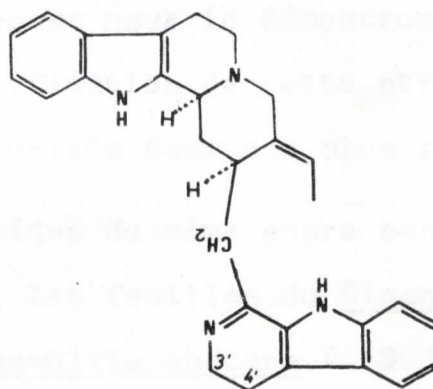
Bien que ces alcaloïdes soient également présents dans les extraits travaillés en

absence d'ammoniaque, leur concentration augmente lorsqu'on remplace le carbonate sodique par l'ammoniaque. La camptoneurine du *S. camptoneura* est un autre alcaloïde tri-azoté dont la structure n'est pas établie (36)

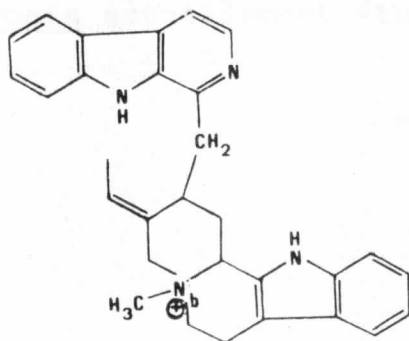
G. Groupe "usambarensine"



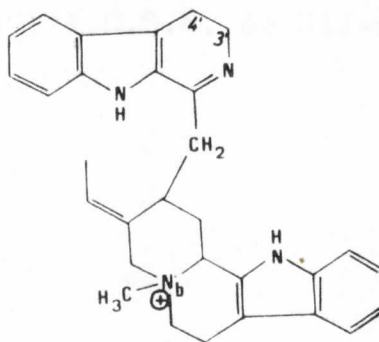
USAMBARENSINE



3',4'-DIHYDRO-USAMBARENSINE



N_b-METHYL-USAMBARENSINE



N_b-METHYL-3',4'-DIHYDRO-USAMBARENSINE

L'usambarensine et ses dérivés sont des alcaloïdes dimères asymétriques que nous avons isolés des racines du S. usambarensis en 1971. Ils résultent de la combinaison de 2 unités tryptaminiques et d'une unité monoterpénique (58,59). En 1974, la configuration absolue de l'usambarensine a été confirmée aux rayons X (62) et celle de la 3',4'-dihydro-usambarensine établie par une synthèse réalisée au Japon (63).

A côté des bases ditertiaires, les formes "hybrides" (où seule la partie corynane des molécules dimères est quaternarisée) sont quantitativement plus importantes et elles expliquent les difficultés d'extraction rencontrées précédemment (12).

Une base voisine, l'usambarine, a été isolée en France, à partir des feuilles du même *Strychnos* (60); sa structure ayant été établie avec un peu de précipitation, comme nous le démontrons dans le chapitre IV, nous proposons une rectification de cette structure, ainsi que celle de l'usambaridine, publiée deux ans plus tard (61).

Enfin, signalons que des alcaloïdes du même genre sont présents dans les Ochrosia (Apocynaceae)(64), les feuilles du Cinchona ledgeriana MOENS (Rubiaceae)(65) et du Rauwolfia obscura K. SCHUM. (Apocynaceae)(66).

L'usambarensine elle-même serait présente dans les feuilles d'un Ochrosia actuellement étudié à l'I.C.S.N. de Gif-sur-Yvette (67)

*
* *

Chapitre III. PHARMACOLOGIE DES ALCALOÏDES DES STRYCHNOS

III.1. Principes convulsivants

Le modèle en est la strychnine, poison tétanisant dont les symptômes sont bien connus des médecins et des pharmaciens. A dose élevée, sa toxicité est mise à profit pour éliminer des animaux nuisibles (rats, loups, renards...). A dose modérée, c'est un tonique, utilisé en thérapeutique, car il augmente le tonus des muscles du squelette. La façon dont la strychnine exerce son activité n'est pas encore éclaircie de façon définitive et cet alcaloïde constitue toujours un réactif pharmacologique utilisé par les neurophysiologistes dans l'exploration du système nerveux central, notamment dans les études des analeptiques, telles la picrotoxine et la bicuculline, antagonisant l'acide γ -amino-butyrique (GABA). SANDBERG et KRISTIANSON ont comparé les doses léthales et convulsivantes moyennes de plusieurs alcaloïdes de Strychnos (68); ce qui se traduit par les résultats exprimés dans le tableau 3.

Tableau 3

	<u>LD 50</u>	<u>CD 50'</u>
STRYCHNINE	0,47	0,42
12-HYDROXY-STRYCHNINE	0,55	0,54
β -COLUBRINE	8,70	8,28
BRUCINE	60	55
GENOSTRYCHNINE	80	78,7
PSEUDOSTRYCHNINE	1,21	1,10
ICAJINE	60	46
VOMICINE	74	42
DIABOLINE	200 (CD20)	

Doses léthales (LD50) et convulsivantes (LD50) moyennes exprimées

La lecture du tableau fait apparaître la toxicité élevée de la strychnine et de la 12-hydroxystrychnine, extraites des racines du S. icaja et de la pseudostrychnine des feuilles de cette même espèce. Les alcaloïdes de la série N-méthyl pseudo (icajine, vomicine) sont cent fois moins actifs. Quant à la diaboline, elle ne semble pas aussi toxique que son nom l'indique, puisque la dose de 200 mg/Kg ne tue qu'un animal d'expérience sur cinq.

Les "screenings" pharmacologiques cités précédemment ont révélé que les Strychnos africains à propriétés tétanisantes étaient rarissimes et que seul le S. icaja possédait ces propriétés de façon nette. D'autres contiennent un mélange de principes convulsivants et paralysants; la plus grande partie enfin ne manifeste que des effets paralysants (12, 20 à 23). Il convient donc de rectifier la littérature où les Strychnos africains sont assimilés aux Strychnos asiatiques. C'est ainsi que PELLETIER dans un ouvrage important publié récemment divise catégoriquement les Strychnos en américains à propriétés curarisantes d'une part, et en asiatiques et africains à propriétés tétanisantes, d'autre part (69)!

III.2. Principes paralysants et curarisants

Dans la zone orientale de la forêt amazonienne et dans la savane du Matto Grosso, les tribus indiennes préparent le curare au moyen de divers Strychnos. Les principes actifs de ces plantes sont des alcaloïdes dimères symétriques diquaternaires insolubles dans le chloroforme mais très solubles dans l'eau. Ces alcaloïdes interviennent à la jonction neuro-musculaire, en entrant en compétition avec l'acétylcholine pour les récepteurs situés sur les plaques motrices. Ils ont été assez peu utilisés en thérapeutique. Néanmoins, ils ont servi de modèle pour l'hémisynthèse de l'Alloférine (Alcuronium^R)

qui présente de nombreux avantages sur la d-tubocurarine.

Jusqu'en 1973, ces alcaloïdes bis-indoliques diquaternaires n'avaient jamais été rencontrés dans une plante croissant en dehors de l'Amérique tropicale. C'est alors que nous avons pu démontrer que les principes responsables de la toxicité des écorces de racines du S. usambarensis du Rwanda étaient de ce type (48 à 50).

Cependant, ce n'était pas la première fois que l'on entendait parler de *Strychnos* curarisant africain. En 1951, déjà, lors de l'étude de systématique des *Strychnos* congolais, le Professeur DENOËL et ses collaborateurs avaient isolé du S. angolensis une fraction alcaloïdique brute à action curariforme vraie sur le chat (70). Cette fraction étant soluble dans le chloroforme en milieu ammoniacal ne ressemble pas aux alcaloïdes diquaternaires classiques insolubles dans ces conditions. Par manque de matériel végétal, les recherches durent être interrompues à cette époque.

Le problème de ces principes paralysants solubles dans le chloroforme a rebondi lors des screenings réalisés en Suède. Ceux-ci ont en effet permis de déceler de nombreuses espèces de *Strychnos* à principes myorelaxants se trouvant plutôt dans la phase chloroformique que dans la phase aqueuse (20 à 23). S'agit-il d'alcaloïdes tertiaires paralysants qui évoqueraient les alcaloïdes tertiaires des Erythrina (Leguminosae) ou encore d'alcaloïdes monoquaternaires ("hybrides" ou non) légèrement solubles dans le chloroforme ou enfin de traces d'alcaloïdes diquaternaires très actifs entraînés dans la phase chloroformique? La question n'est pas résolue car aucun principe actif n'a été isolé et identifié à ce jour.

III.3. Activités d'autres alcaloïdes des Strychnos

- III.3.1. La macusine B (LD50 = 53 mg/Kg) a une action pharmacologique qui ressemble à celle des alcaloïdes de l'ergot de seigle (71). Elle bloque les récepteurs α -adrénergiques et stimule tant in vivo qu'in vitro les récepteurs β ; elle bloque partiellement la réponse de la pression sanguine du chat à la tyramine. C'est de plus un inhibiteur compétitif de la sérotonine sur l'iléon de cobaye.
- III.3.2. La diaboline est le constituant majeur des alcaloïdes du S. potatorum qui provoquent une hypotension chez le chien. Cette hypotension est attribuée d'une part à une action centrale et d'autre part, à un effet dépressif sur le coeur. Les alcaloïdes secondaires potentialiseraient l'action hypotensive de la diaboline (72).
- III.3.3. L'alstonine et la serpentine sont douées de propriétés hypotensives et adrénolytiques. L'alstonine a d'abord été rencontrée dans Alstonia constricta F. MUELL (Apocynaceae) connu comme fébrifuge et antimalarique. Quant à la serpentine, elle fut isolée du Rauwolfia serpentina BENTH. utilisé comme sédatif et hypotenseur. C'est lors de la découverte des propriétés de la réserpine que ces alcaloïdes ont été étudiés d'un point de vue pharmacologique (73).
- III.3.4. L'usambarensine agit sur les muscles lisses, en diminuant les effets du carbachol sur l'iléon isolé de rat. Ces propriétés antagonistes de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques sont quantitativement inférieures à celles de l'atropine: alcaloïde non indolique des

Solanaceae (49,50).

III.3.5. L'harmane et les alcaloïdes contenant une partie harmane ou harmalane dans leurs structures (usambarensine et dérivés) possèdent une activité inhibitrice de la monoamine-oxydase (M.A.O.)(48).

III.4. Conclusions

Les résultats relatés ci-avant démontrent que les Strychnos ne doivent pas seulement être étudiés en fonction de leurs actions convulsivantes et/ou curarisantes mais doivent également être situés dans le cadre plus général des alcaloïdes indoliques qui ont fourni à la matière médicale quelques-uns des plus beaux succès de l'après-guerre et dont nous rappelons ci-après les plus importants:

- la réserpine pour son action sédatrice et hypotensive
- la vincalécoblastine et la tabernamine (74), pour leurs actions antitumorales et cytotoxiques
- la raubasine (tétrahydroserpentine) et la vincamine pour leur activation de la circulation périphérique, notamment cérébrale.

Outre ces propriétés, il conviendrait de rechercher une activité contre la dysenterie amibienne, dans le cas des dérivés de l'usambarensine, qui présentent une analogie de structure étonnante avec les alcaloïdes isoquinoléiniques de l'ipéca (Rubiaceae) formés de deux unités "tyramine" et d'une unité monoterpénique.

Enfin, les usages renseignés en ethnobotanique devraient être envisagés car l'empirisme des indigènes est loin d'être toujours empreint de superstition, comme d'aucuns se l'imaginent.

Néanmoins, le principal écueil à un vaste screening pharmacologique consistera souvent en la faible quantité d'alcaloïdes obtenus dans les laboratoires universitaires où les chercheurs ne disposent pas d'un équipement industriel qui leur permettrait d'obtenir des rendements suffisants.

*

* * *

Chapitre IV. PARTIE EXPERIMENTALE

Recherches personnelles récentes
sur le S. usambarensis

IV.1. Généralités

- Les chromatographies analytiques en couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de Silicagel GF 254 MERCK.
- Les chromatographies préparatives ont été réalisées sur des plaques 20 x 40 cm préparées au laboratoire (75 g de Silicagel PF 254 MERCK pour 2 plaques d'1 mm d'épaisseur; 50 à 60 mg de fraction alcaloïdique à purifier sont déposés sur une plaque).
- Les colonnes chromatographiques remplies secundum artem de l'adsorbant choisi (Gel de silice 60 ou alumine standardisée selon BROCKMANN) et conditionnées suivant les techniques classiques sont reliées au collecteur de fractions RADIRAC LKB, type 3402 B. Le siphon le plus souvent utilisé est celui de 15 ml. Chaque fraction est ensuite testée en CCM.
- Les solvants utilisés sont des produits pour analyse MERCK, afin de préserver au maximum les alcaloïdes.
- Les points de fusion sont observés au microscope à plaque chauffante Arthur THOMAS.
- Les spectres dans l'ultra-violet (U.V.) ont été réalisés sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 124, en solution méthanolique, sous un cm d'épaisseur.
- Les spectres dans l'infra-rouge (IR) ont été tracés tantôt à l'aide d'un BECKMAN IR 20A (Service du Prof. RENSON), tantôt à l'aide d'un PERKIN-ELMER INFRACORD (Service du Prof. DUYCKAERTS) après pastillage dans KBr.
- Les spectres de masse ont été déterminés sur un AEI MS 902 à haute résolution muni du système d'introduction directe, sous un potentiel d'ionisation de 70 eV à des températures de 200 à 240°C (Mass Spectrometry Intercollegiate Research Service, School of Pharmacy, University of London).
- Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été pris au Centre de R.M.N. soit sur un VARIAN HA 100 (^1H) soit sur BRUKER HFX90 (^1H et ^{13}C), après dissolution de

l'alcaloïde dans le deutérochloroforme (CDCl_3) additionné éventuellement de quelques gouttes de CD_3OD pour solubiliser certains échantillons trop polaires. Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (ppm) par rapport à l'hexadiméthylsilane (HMDS) ou le tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme étalon interne de référence.

- Les courbes de dichroïsme circulaire (CD) ont été réalisées en solution méthanolique à l'aide d'un appareil JASCO ORD/UV5 (Service du Prof. DESREUX).
- Les études cristallographiques ont été effectuées au moyen d'un diffractomètre à quatre cercles HILGER-WATTS (Service du Prof. TOUSSAINT).
- Les calculs ont été résolus avec l'ordinateur IBM du Centre de Calcul de l'Université de Liège.

IV.2. L'AKAGERINE

a) Obtention

L'akagérine est un alcaloïde tertiaire extrait de racines récoltées en mars 1970, lors de la mission que nous avons effectuée dans le Parc de l'Akagera au Rwanda. Cet alcaloïde fut baptisé de la sorte, car le *S. usambarensis* est particulièrement abondant dans certaines régions du Parc National de l'Akagera.

Auparavant, nous avons isolé, à partir de racines récoltées en juillet 1969, trois alcaloïdes tertiaires: l'harmane, l'usambarensine et le dérivé 3'-4' dihydro (52,58).

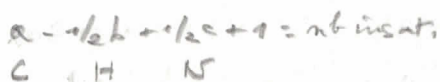
Par contre, l'akagérine n'était présente qu'en traces dans le lot de 1969. Cet alcaloïde montre donc une variation saisonnière de son taux, phénomène qui a déjà été observé dans le cas de nombreux autres alcaloïdes présents dans divers genres végétaux.

Les racines ont été extraites de la façon décrite précédemment (48,59) et les alcaloïdes tertiaires ainsi obtenus ont été soumis à une chromatographie sur colonne d'alumine et élués par de l'éther auquel nous ajoutons progressivement de 1 à 2% de méthanol. Le collecteur RADIRAC n'étant pas disponible à cette époque, des fractions de 20 ml ont été recueillies manuellement, et ensuite testées par CCM. Les tubes 73 à 98 renfermaient 334 mg d'akagérine et les tubes 99 à 120 fournissent 362 mg d'un mélange d'akagérine et d'usambarensine, que nous avons séparées par chromatographie préparative dans le système I (acétate d'éthyle: 90; isopropanol: 8; ammoniacale conc.: 2).

L'alcaloïde purifié de la sorte cristallise dans l'hexane en petits cubes dont le point de fusion est de 188°C et le Rf de 0,50 en CCM dans le système précité.

b) Formule brute

La formule brute, obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution, correspond à $C_{20}H_{24}N_2O_2$ (mes.: 324,1837; calc.: 324,1829). Cette formule indique la présence de 10 insaturations (82).



c) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge

Le spectre ultra-violet (fig. n° 1) présente des maxima à 204, 227, 276, 283 et 293 nm. Il n'y a pas de modification sensible en milieu acide ou alcalin. Ces valeurs correspondent au chromophore indolique (89).

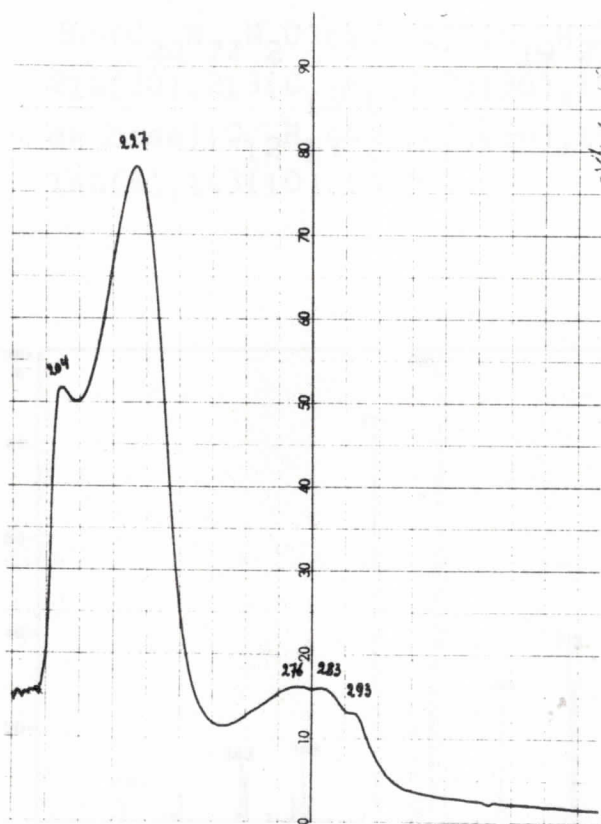


Figure n° 1

Spectre U.V. de l'akagérine

Le spectre infra-rouge (fig. n° 2) est caractérisé par des bandes à ν 3450, 3050, 2930, 2850, 2700, 1680 (carbonyl insaturé), 1628, 1445, 1370, 1350, 1305, 1295, 1280, 1200, 1180, 1100, 1085, 1050, 1030, 965, 930, 890, 835, 770, 742 cm^{-1} .

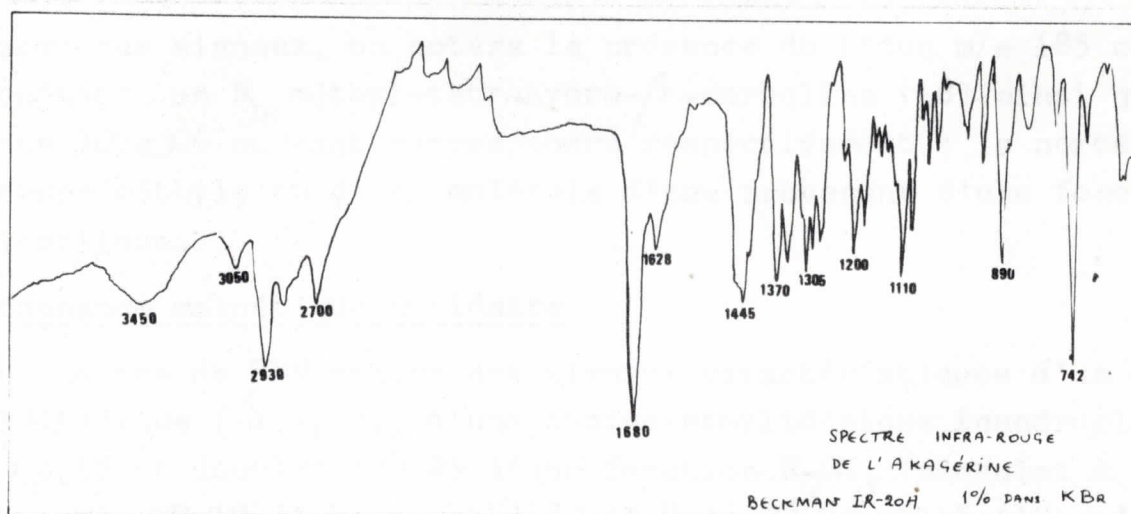


Figure n° 2

Spectre IR de l'akagérine

d) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse (figure n° 3) réalisé à 180°C fait apparaître des pics à m/e (intensité relative) = 324 (M^+), (51), 309(9), 306($C_{20}H_{22}N_2O$)(44), 277($C_{19}H_{21}N_2$)(21), 263(13), 241(14), 223(13), 214(30), 213($C_{13}H_{13}N_2O$)(36), 198($C_{13}H_{12}NO$)(27), 186(11), 185(100-pic de base)($C_{12}H_{13}N_2$), 184(56), 183(28), 180(18), 172(13), 171(80), 156(11), 144(8), 143(10), 130(6).

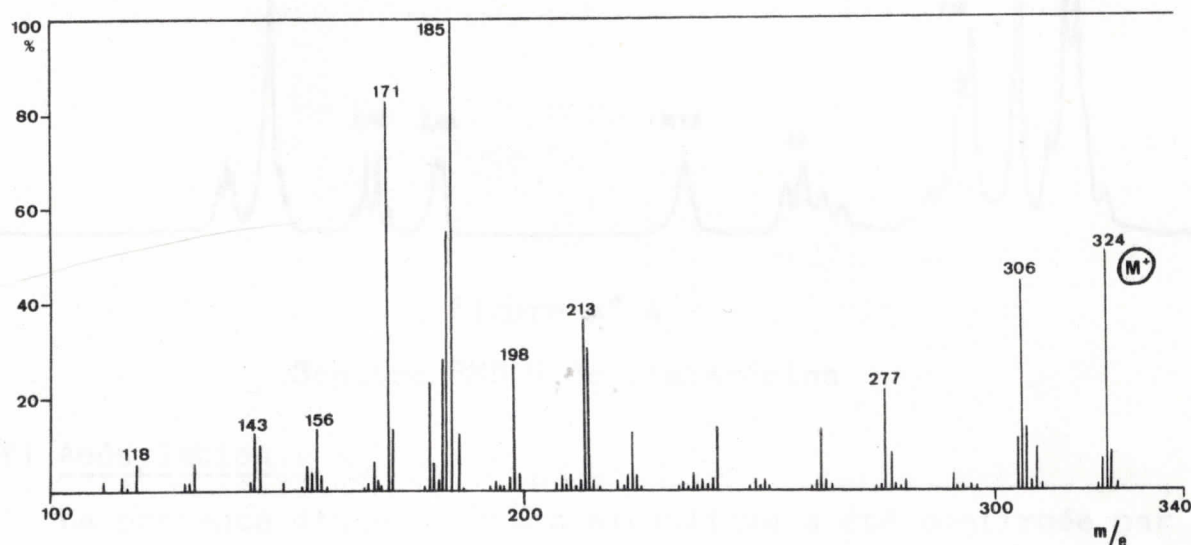


Figure n° 3

Spectre de masse de l'akagerine

Parmi ces signaux, on notera la présence de l'ion m/e 185 correspondant à un N_b méthyl-tetrahydro- β -carboline (48) ainsi que les ions 309 et 306 pouvant correspondre respectivement à la perte d'un groupe méthyle et d'une molécule d'eau provenant d'une fonction alcoolique.

e) Résonance magnétique nucléaire

Le spectre de RMN montre des signaux caractéristiques d'un proton aldéhydique (δ , 9,19), d'une chaîne ethylidénique (quadruplet à δ 6,45 et doublet à δ 2) d'une fonction $N-CH_3$ (singulet à δ 2,33 δ (ppm) = 9.19 (1 H; s. ou d J = 1 Hz) ($-C \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} H$) - 6,45 (1H, q. J = 14 Hz, J_2 = 7 Hz) 6,02 (1 H. d. J = 4 Hz) 4,45 (1 H, m. OH/NH - échangé par D_2O) 3,8-2 (massif de protons aliphatiques), 2,33 (3H.s.) 2.00 (3 H, d. J = 7 Hz), 7,38-7 (massif de protons aromatiques).

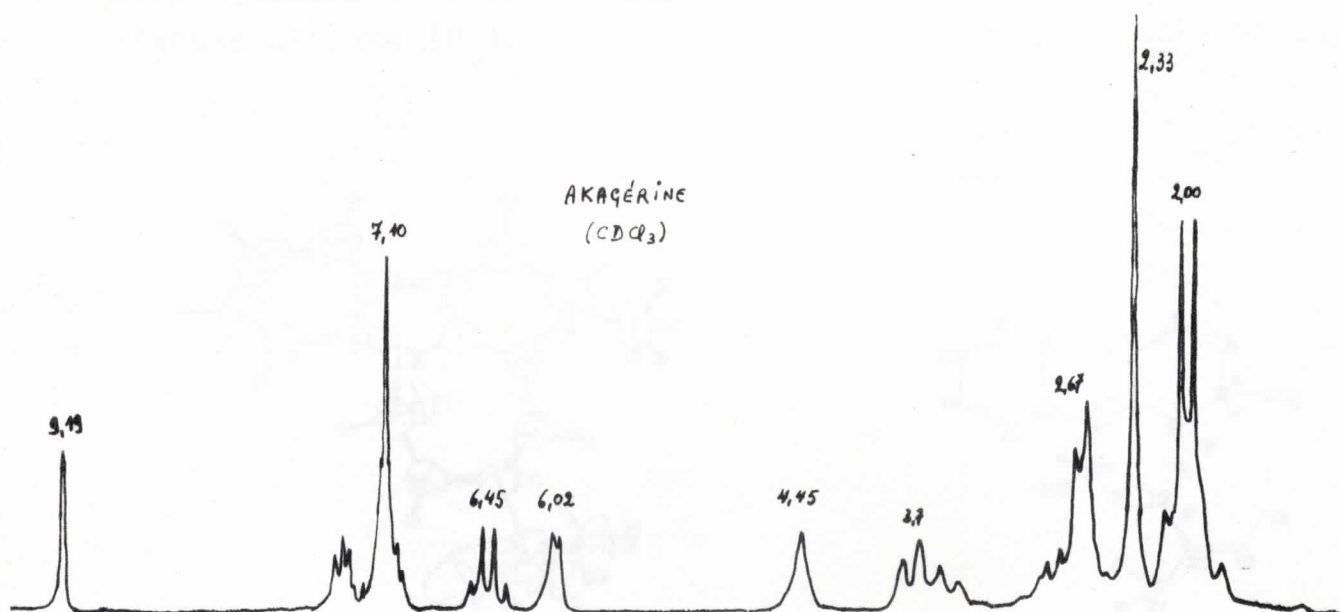


Figure n° 4

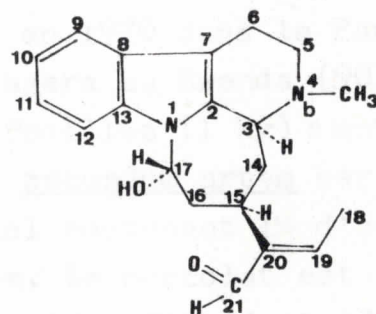
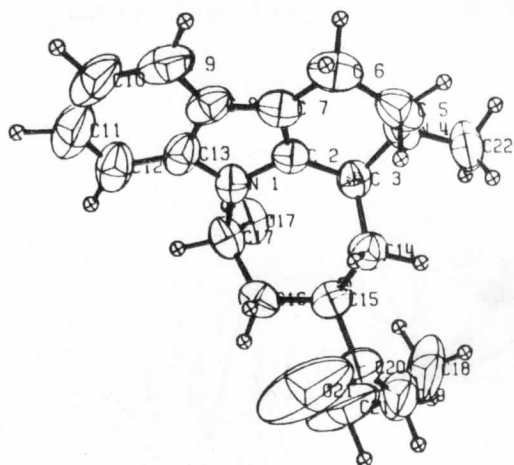
Spectre RMN¹H de l'akagérinef) Acétylation

La présence d'une fonction alcoolique a été confirmée par la formation d'un dérivé acétylé par contact à température ordinaire de l'alcaloïde en solution dans un mélange anhydride acétique-pyridine. Le produit acétylé montre les bandes dites "acétate" à 1730 et 1260 cm⁻¹ dans les spectres I.R. et δ 3,1 ppm (singulet correspondant à 3 protons) dans le spectre RMN¹H. Ce dernier spectre permet de constater la disparition du signal échangeable par D₂O qui peut dès lors être attribué à un OH. De plus, le signal situé à δ 6.02 étant déplacé à δ 5,66, dans le spectre du produit acétylé, peut dès lors être decerné à l'H porté par le carbone de la fonction alcoolique.

g) Etude cristallographique

L'étude cristallographique a permis de confirmer les résultats précédents et d'établir la configuration relative de l'akagérine (75,76). L'échantillon choisi (0,1 x 0,2 x 0,5 mm) avait cristallisé dans le système tétragonal (P 4₁2₁2 ou 4₃2₁2); 8 molécules forment la cellule unitaire de dimensions a = b = 9.255 Å; c = 42.165 Å.

La cohésion de cette structure résultait surtout d'une liaison hydrogène entre l'OH alcoolique et la paire d'électrons libres de l'atome d'azote (N_4).



Vue stéréoscopique de l'akagérine

Formule plane de l'akagérine

h) Conclusions

L'akagérine est donc un alcaloïde tétracyclique possédant un cycle perhydroazépine couplé à une tétrahydro- β -carboline par une liaison originale $N_1 - C_{17}$, qui n'avait jamais au préalable été trouvée dans un alcaloïde indolique. L'analyse cristallographique a de plus permis de détecter un rapport "cis" entre H_3 , H_{15} , OH_{17} et la paire d'électrons libres de N_4 . La numérotation figurant sur les formules dessinées dans tout ce rapport est conforme à la convention des phytochimistes (79).

L'examen des modèles stéréochimiques formés par la condensation de la N_b -méthyl-tryptamine et d'une unité monoterpénique dérivée de l'acide loganique, a montré que la configuration α de l' H_{15} agréait avec l'hypothèse biogénétique des alcaloïdes (80,81). L'akagérine dont nous avons établi la structure l'année dernière, vient d'être rencontrée dans le S. camptoneura (77) et le S. elaeocarpa GILG (78). Le dérivé O_{17} -méthyl-akagérine est présent dans le S. dale DE WILDEMAN.

La pharmacologie de l'akagérine n'a pas encore été étudiée à Liège. Néanmoins, à des doses de 50 mg/Kg, cet alcaloïde provoque chez les souris des convulsions cloniques du type de celles produites par l'icajine (77).

IV.3. EXTRACTION DES ALCALOÏDES TERTIAIRES DES FEUILLES

Les alcaloïdes des feuilles dont nous décrirons l'isolement ne requrent un nom qu'après leur analyse. Cependant, pour la facilité de l'exposé, nous les appellerons déjà de cette façon dans les lignes qui suivent.

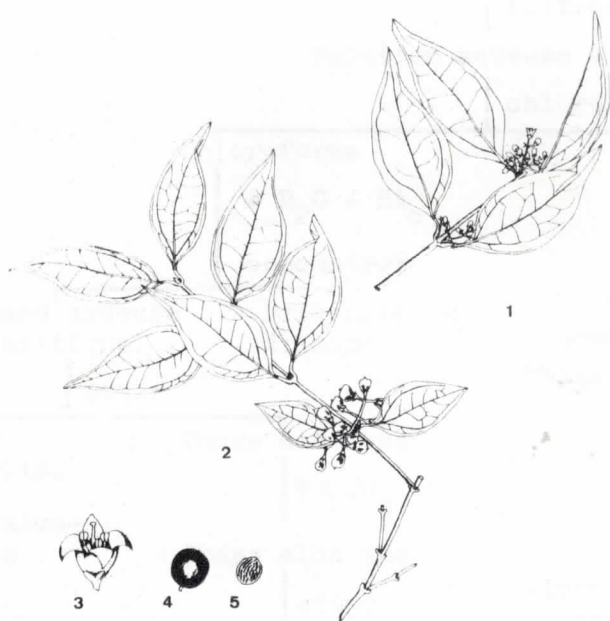


Figure n° 5

Rameau fleuri de S. usambarensis

Les feuilles étudiées avaient été récoltées lors de notre mission en 1970 dans le Parc de l'Akagera au Rwanda (90).

Les feuilles (1 kg) sont percolées secundum artem par du méthanol contenant 1% d'acide acétique. Le percolat est concentré sous vide, filtré et additionné d'un volume égal d'eau. Le méthanol restant est distillé et la solution aqueuse est alors soumise à diverses extractions (voir tableau 4).

a) par le chloroforme en milieu acide

La solution chloroformique, concentrée au rotavapor, est réagitée avec une solution

acétique. Le chloroforme est évaporé complètement, ce qui provoque la migration des alcaloïdes dans la phase aqueuse acide. Beaucoup d'impuretés précipitent et sont de la sorte éliminées par filtration. La phase acétique est alors extraite par l'éther, qui enlève d'autres impuretés non alcaloïdiques. La phase aqueuse est ensuite alcalinisée par du carbonate sodique et à nouveau extraite par l'éther, qui extrait cette fois des alcaloïdes, principalement l'usambarine et la 18,19 dihydro-usambarine, qui sont séparés par chromatographie préparative sur couche de Silicagel dans le système: acétate d'éthyle = 96; isopropanol 4; ammoniacque conc. 2.

Tableau 4

Schéma d'extraction des feuillesS. usambarensis (1.000 g feuilles)

Percolation

10 l CH_3OH - 1% $\text{CH}_3\text{-COOH}$

Solution méthanolique acide

+ H_2O

concentrer

filtrer

Solution aqueuse acide

chloroforme

Chloroforme

+ H_2O + HA_c

concentrer

phase aqueuse
acétiquePrécipité
éliminé

ether

ether
impuretés
sans alca-
loïdes

Phase acétique

 Na_2CO_3

Phase alcaline

ether

ether

concentrer

Extrait (500 mg)

Alcaloïdes non
oxygénés

USAMBARINE

18,19 DIHYDRO-USAMBARINE

Solution aqueuse

 Na_2CO_3

Solution alcaline

chloroforme

Phase alcaline

acidifier (pH 5)

+ acide picri-
que
filtrerPicrates d'alcaloïdes
très polaires

chloroforme

concentrer

Extrait (3.100 mg)

Alcaloïdes phénoliquesséparés par chromato-
graphie sur colonne
(tableau 5)

STRYCHNOFOLINE

ISOSTRYCHNOFOLINE

USAMBARIDINES

18,19 DIHYDRO-USAMBARIDINE

STRYCHNOBARIDINE

STRYCHNOPENTAMINE

ISOSTRYCHNOPENTAMINES A et B

STRYCHNOPHYLLINE

b) par le chloroforme en milieu alcalin

L'alcalinisation de la phase aqueuse provoque un précipité abondant, qui forme une émulsion spectaculaire quand on agite cette solution en présence de chloroforme. Ce phénomène avait déjà été observé et expliqué lors de l'extraction des écorces de racines de ce même *Strychnos* (48-59). Après séparation, la phase chloroformique est lavée à l'eau distillée, déshydratée sur du sulfate sodique anhydre et concentrée sous vide. L'extrait obtenu (3.100 mg) est soumis à une séparation qui est effectuée sur une colonne chromatographique d'alumine, reliée à un collecteur de fractions; ces fractions sont testées par CCM analytique et groupées suivant les constituants décelés (tableau 5). L'élution a été réalisée par du chloroforme auquel on ajoute progressivement de 0,5 à 5% de méthanol.

Tableau 5

f 1-5	traces	
6-17	217 mg	STRYCHNOPENTAMINE et isomères
18-57	246 mg	STRYCHNOPENTAMINE, STRYCHNOPHYLLINE et isomères
58-89	49 mg	STRYCHNOPENTAMINE et isomère
90-147	102 mg	STRYCHNOPENTAMINE + USAMBARIDINE "Vi"
148-355	488 mg	USAMBARIDINE "Vi"
< 356-466	260 mg	USAMBARIDINES "Vi et Br"
467-586	255 mg	USAMBARIDINES et dérivés dihydro; STRYCHNOBARIDINE et ISOSTRYCHNOFOLINE
587-664	212 mg	STRYCHNOFOLINE et isomère
665-840	595 mg	STRYCHNOFOLINE
841-900	725 mg	Alcaloïdes et impuretés polaires non encore étudiés

Les alcaloïdes ainsi séparés ne sont pas formés lors des procédés de purification car on les retrouve dans une teinture de feuilles. Les fractions obtenues dans le tableau 5 ont été séparées par chromatographie à l'échelle préparative sur silicagel en utilisant l'un des systèmes suivants:

système I: acétate d'éthyle:90-isopropanol:8-ammoniac aque conc.:2
 " II 96 4 1

système III: acétate d'éthyle:100-isopropanol:2-ammoniaque conc.:1
 " IV: acétate d'éthyle saturé d'ammoniaque concentrée
 + vapeurs d' NH_3

Les bandes alcaloïdiques repérées aux U.V. courts sont éluées par du méthanol et purifiées par passage dans une solution bouillante d'hexane. Les produits sont enfin cristallisés dans l'éthanol absolu placé ou non au réfrigérateur.

*
 * *

IV.4. STRYCHNOFOLINE et ISOSTRYCHNOFOLINE

IV.4.A. La strychnofoline est une poudre blanche, cristallisant en prismes dans l'éthanol absolu. Son point de fusion est de 175°C et son Rf de 0,46 dans le système I. L'alcaloïde est en outre révélé par les réactifs classiques des phénols (GIBBS et surtout le sel du bleu solide B (Echtblau salz B. MERCK) qui produit une coloration pourpre stable sur les plaques chromatographiques].

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{30}H_{34}N_4O_2$ (M^+ trouvé: 482,2670; calc 482,2680). Cette formule indique la présence de 16 insaturations et de 2 atomes d'oxygène dont au moins un semble engagé dans une fonction phénolique.

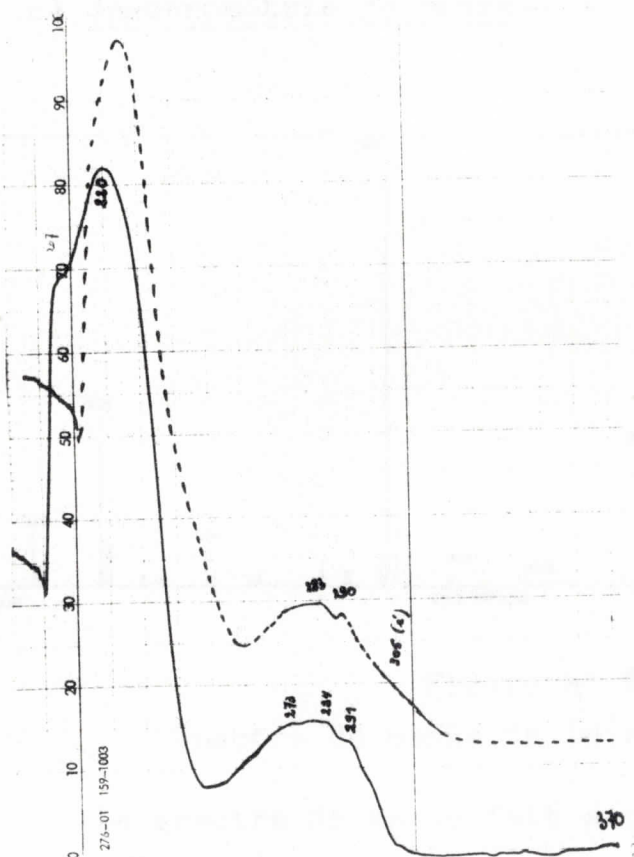
b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge

Figure n° 6

Spectres U.V. de la strychnofoline

(—:milieu neutre:---milieu alcalin)

Le spectre ultra-violet (figure n° 6), réalisé dans le méthanol, présente des maxima à 273,279,283 et 290 nm; ce qui correspond au chromophore indolique.

Ce spectre est peu modifié en milieu acide; en milieu alcalin, on observe l'apparition d'un épaulement à 305 nm.

Le spectre infra-rouge réalisé en PERKIN-ELMER est caractérisé par des bandes inscrites sur la figure n° 7. Ce spectre est caractéristique d'un alcaloïde indolique non substitué, d'une part, et d'une bande C=O apparaissant à 1695 cm d'autre part, et d'une chaîne vinylo à 916 cm⁻¹.

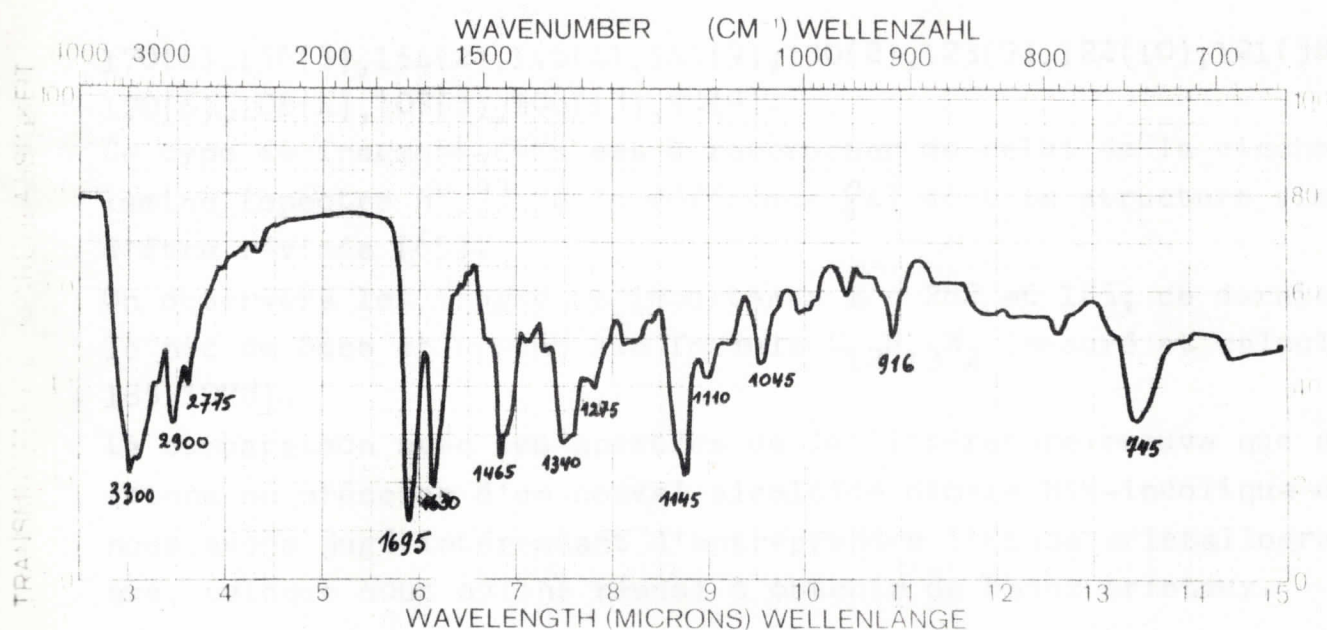


Figure n° 7
Spectre I.R. de la strychnofoline

c) Spectrométrie de masse

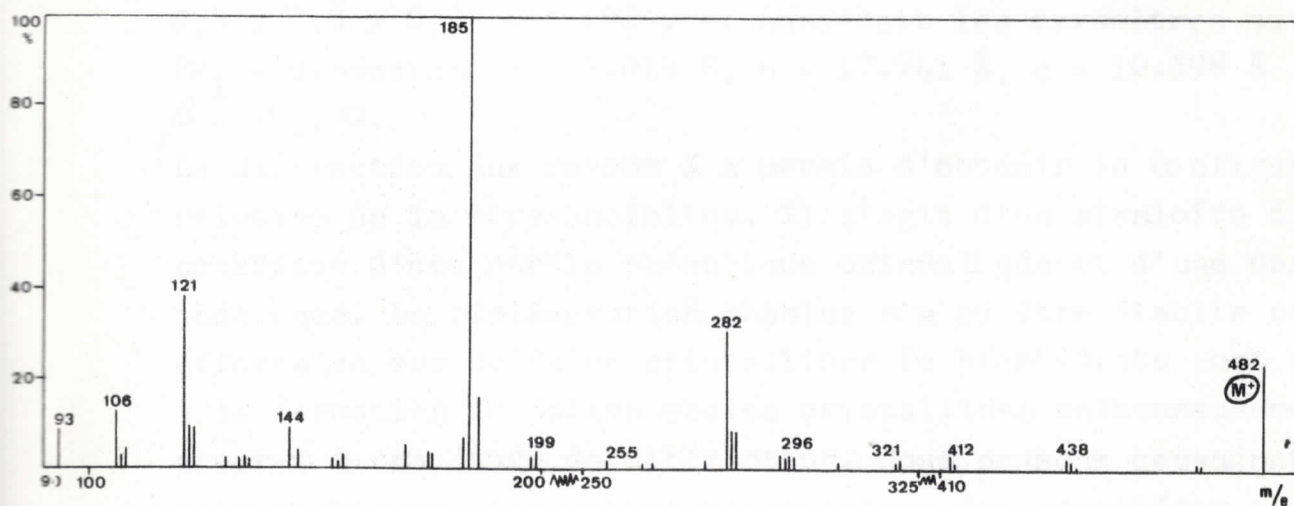


Figure n° 8
Spectre de masse de la strychnofoline

Le spectre de masse fait apparaître des pics à m/e (intensité relative):

482(23), 467(1), 439(1), 438(1), 412(2), 321(1), 320(1), 307(1), 297(2), 296(2), 295(2), 294(2,5), 284(8), 283(8), 282(30), 277(2), 265(1), 263(1), 255(2); 199(3,5), 198(2,5), 186(16), 185(100), 184(3), 176(4), 175(3),

170(6), 156(3), 154(2), 146(4), 144(9), 130(2), 123(9), 122(10), 121(38), 120(6), 108(4), 107(3), 106(13), 93(9).

Ce type de fragmentation est à rapprocher de celui de la cinchophyllamine (spectre n° 73 de la référence 84) dont la structure vient d'être révisée (65).

On observera les fragments importants m/e 282 et 185; ce dernier est le pic de base et répond à la formule $C_{12}H_{13}N_2$ (mesuré et calculé: 185,1078).

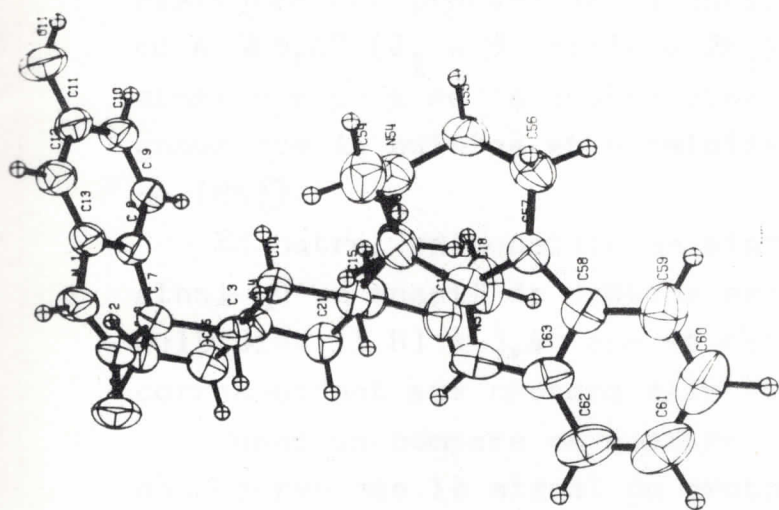
La comparaison avec les spectres de la littérature prouva que nous étions en présence d'un nouvel alcaloïde dimère bis-indolique dont nous avons jugé intéressant d'entreprendre l'étude cristallographique, puisque nous avons réussi à obtenir de beaux cristaux.

d) Etude cristallographique

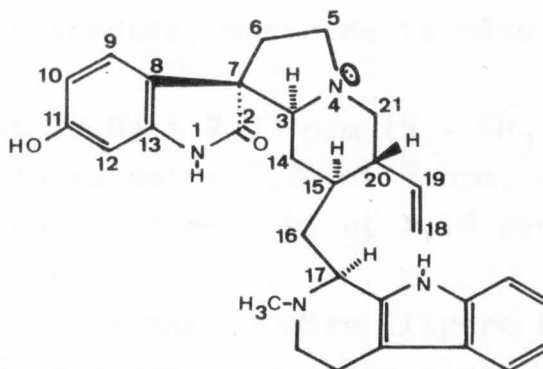
Des cristaux monocliniques ont été obtenus par évaporation lente de la base en solution éthanolique.

Lors de la détermination de structure, il est apparu dans la maille quatre molécules de solvant (éthanol) pour deux molécules d'alcaloïdes. L'échantillon retenu pour l'étude mesurait $0,3 \times 0,3 \times 0,35 \text{ mm}^3$ (92), et possédait les paramètres suivants: $P2_1$ - dimensions $a = 9.019 \text{ \AA}$, $b = 17.941 \text{ \AA}$, $c = 10.598 \text{ \AA}$
 $\beta = 99,690$.

La diffraction aux rayons X a permis d'obtenir la configuration relative de la strychnofoline. Il s'agit d'un alcaloïde dimère constitué d'une partie phénolique oxindolique et d'une partie indolique. La configuration absolue n'a pu être établie car nos efforts en vue de faire cristalliser le bromhydrate ont abouti à la formation de jolies macles cristallines malheureusement impropres à une étude de diffraction. Nous pensons cependant pouvoir appliquer l'hypothèse biogénétique des alcaloïdes indoliques (80) au cas de la strychnofoline, d'autant plus que l'usambarenine dont le bromhydrate a permis l'établissement de sa configuration absolue (62) respecte cette hypothèse. Dans ce cas, suivant les règles de CAHN, INGOLD et PRELOG bien connues (83), nous trouvons une configuration 3S, 4R, 7S, 15S, 17S et 20R pour la molécule de strychnofoline.



VUE STEREOSCOPIQUE
DE LA STRYCHNOFOLINE



STRYCHNOFOLINE

e) Résonance magnétique nucléaire

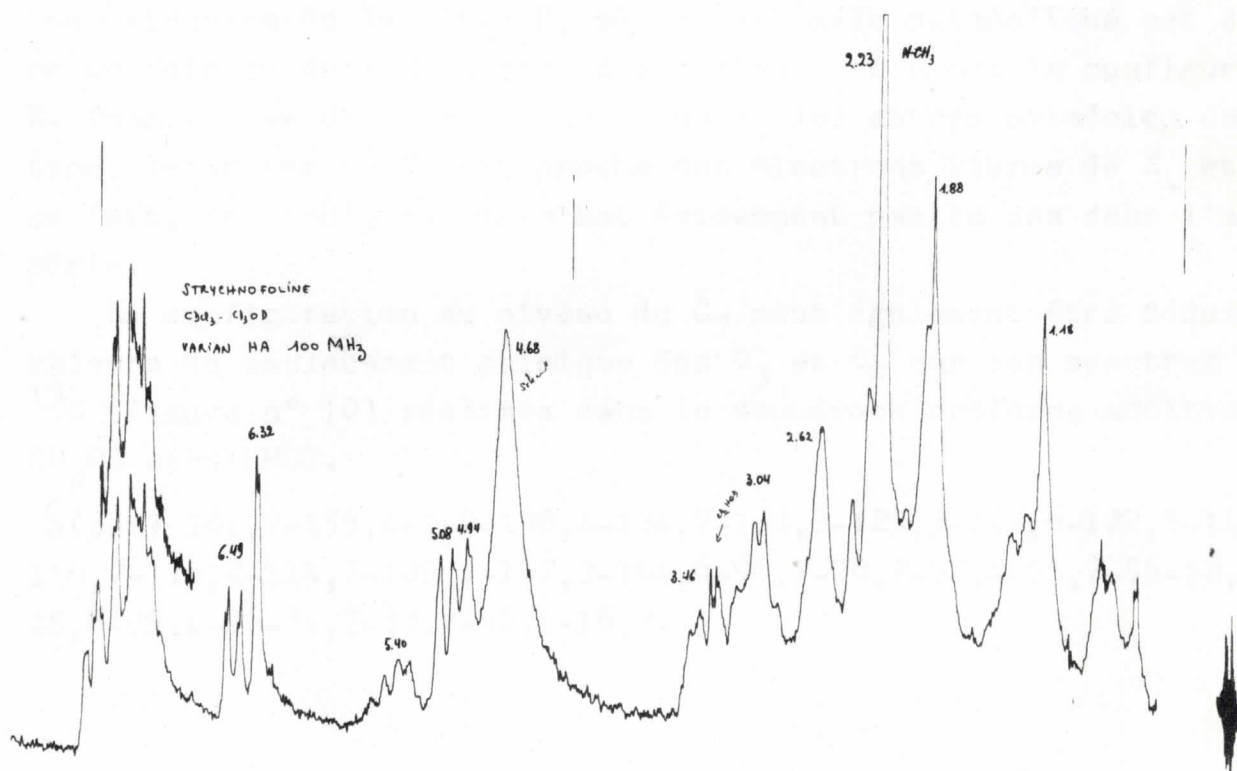


Figure n° 9

Spectre RMN¹H de la strychnofoline (CDCl₃-CD₃OD)

Le spectre (figure n° 9) permet d'observer les signaux caractéristiques des protons de la partie oxindolique phénolique, H_{10} : dd à δ 6,49 ($J_1 = 8 \text{ Hz}$; $J_2 = 2H_3$) et H_{12} (d à δ 6,32 - $J = 2 \text{ Hz}$), ainsi que ceux de la chaîne vinyle entre 5,4 et 4,94 ppm (mêmes signaux que la quinine et alcaloïdes apparentés, munis de la même chaîne (85)).

En outre, on constate un singulet (3 H) à 2,33 ppm ($N - CH_3$), ainsi qu'un massif de protons aromatiques entre 7,26 et 7 ppm, un multiplet (1 H) à 3,46 ppm et des signaux entre 3,04 et 1,18 ppm correspondant aux protons aliphatiques. *S. et al.*

Quand on compare ce spectre à celui de son isomère (figure n° 11) on observe que le signal du proton H_9 résonne à un champ plus faible que le signal du proton correspondant de l'isostrychnofoline. Ce phénomène avait déjà été observé pour d'autres alcaloïdes oxindoliques et il permet de distinguer les oxindoles au niveau de l'atome de carbone spiro (C_7). Rappelons que les isomères de la série A où le carbonyle oxindolique est situé au dessous du plan des cycles C et D ont la configuration S (exemple de la strychnofoline) tandis que les oxindoles de la série B, où le carbonyle oxindolique est situé cette fois au dessus du plan des cycles C et D, ont la configuration R. Dans le cas de la strychnofoline et des autres oxindoles de ce type, le proton du C_9 est proche des électrons libres de N_4 et de ce fait, déblindé, ce qui n'est évidemment pas le cas dans l'autre série.

La configuration au niveau du C_7 peut également être déduite des valeurs de déplacement chimique des C_3 et C_9 sur les spectres de ^{13}C (figure n° 10) réalisés dans le deutérochloroforme additionné de CD_3OD et d'HMDS.

δ (ppm) 181,7-155,4-140-138,4-134,7-133,3-125,3-123,6-122,5-119,3-116,7-115,2-114,2-109,5-107,3-104,6-96,7-70,2-57,4-55,7-55-52,3-46-45,8-39,4-36-34,7-33,6-30,1-16,7.

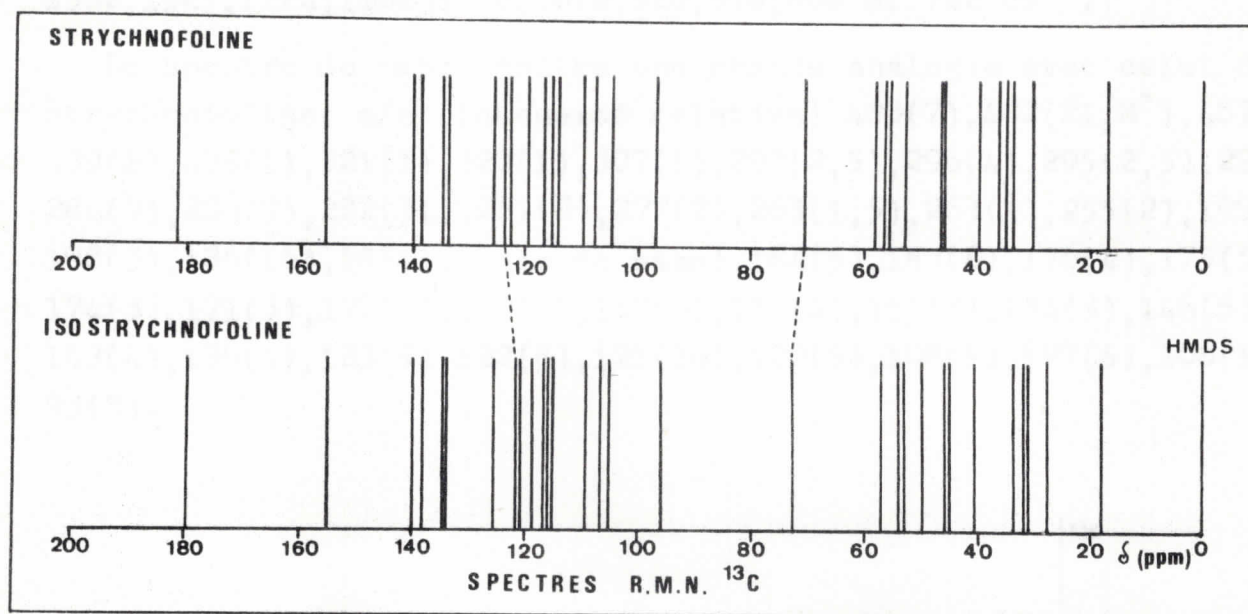


Figure n° 10

Ce spectre confirme les résultats antérieurs. Parmi les 30 signaux observés (30C), il y en a 17 qui sont situés au-dessus de 90 ppm et qui correspondent à des carbones insaturés et 13 en dessous de 90 ppm qui signalent les carbones saturés.

Le signal à 181,7 ppm correspond à une amide cyclique et dans notre cas à l'oxindole.

Le signal à 155,4 ppm est le signal de la liaison = C-O phénolique

Quand on compare les spectres de la figure n° 10 à ceux de la rhynchophylline et de l'isorhynchophylline (86), on constate que la strychnofoline présente la même configuration que l'isorhynchophylline (7S) car les signaux des C_3 et C_9 sont à des valeurs plus distantes, l'une de l'autre (70,2 et 123,6 ppm) que dans le cas de l'isostrychnofoline (autre alcaloïde isolé des feuilles) où les mêmes carbones sont situés à 72,6 et 121 ppm.

IV.4.B. Le second alcaloïde, l'isostrychnofoline, est une poudre blanche microcristalline dont le P.F. est de 182°C. Il possède un Rf de 0,23 dans le système I et est également révélé en pourpre par le sel de bleu solide B. Il a été isolé en moins grande quantité que la strychnofoline. Le spectre ultra-violet est identique à celui de la strychnofoline.

Le spectre infra-rouge, pris sur BECKMAN, ne montre pas de

différences importantes: ν 3230, 2910, 1705, 1690, 1632, 1610, 1500, 1470, 1382, 1325, 1224, 1162, 1110, 1010, 920, 850, 800 et 742 cm^{-1} .

Le spectre de masse montre une grande analogie avec celui de la strychnofoline: m/e (intensité relative) 483(7), 482(21, M^+), 467(1), 439(1), 438(1), 321(1), 320(1), 307(1), 297(2,5), 296(4), 295(2,5), 294(3), 284(7), 283(9), 282(31), 281(8), 277(2), 265(1,5), 263(1), 255(2), 199(4), 198(3), 186(16), 185(100 pic de base), 184(5), 183(8), 176(4), 175(5), 174(3), 171(3), 170(6), 169(4), 157(3), 156(4), 155(3), 154(3), 146(5), 144(8), 143(4), 130(4), 123(8), 122(8), 121(36), 120(5), 108(5), $107(5)$, 106(13), 93(8).

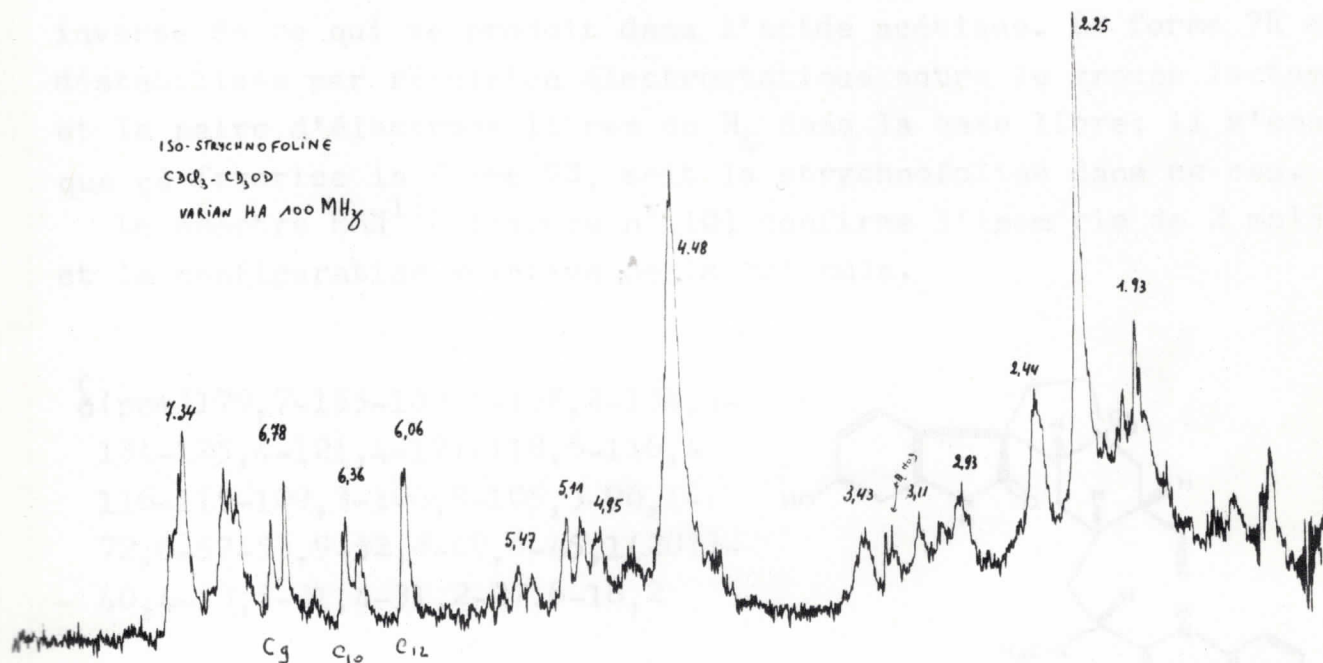


Figure n° 11
Spectre RMN¹H de l'isostrychnofoline

La seule différence notable entre les spectres de RMN des 2 isomères se situe dans la partie aromatique où le signal du C₉ (doublet à δ 6,78 ppm $J = 8\text{ Hz}$) apparaît à un champ plus élevé que le massif de protons aromatiques.

Dans le cas de la strychnofoline, le doublet de l'azote (N_4) crée un champ asymétrique au voisinage de H₉ et il en résulte un déplacement du signal de ce proton vers les champs faibles. Inversément, cela indique une position de la liaison 2-7 "syn" par rapport au doublet électronique de N_4 , dans le cas de l'isostrychnofoline et que l'épimérisation entre les 2 molécules est située au niveau du C₇.

Cette supposition a été confirmée par les expériences classiques d'épimérisation des alcaloïdes oxindoliques (86,87).

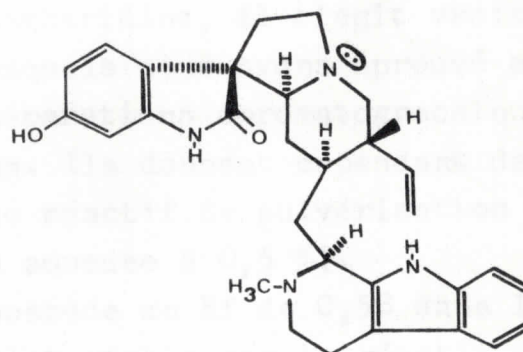
On sait que dans l'acide acétique, les alcaloïdes oxindoliques chauffés à reflux sous azote forment préférentiellement (80%) les isomères à configuration 7R.

Dans cette configuration, la fonction lactane est "syn" par rapport au doublet libre de l'azote, par formation d'une liaison hydrogène entre le carbonyle et le proton de l'acide conjugué qui stabilise la forme protonée; c'est ainsi que l'isostrychnofoline prédomine en ce milieu.

Par contre dans la pyridine, chauffée à reflux sous azote, il y a formation préférentielle du dérivé "anti" (7S) et ce par un phénomène inverse de ce qui se produit dans l'acide acétique. La forme 7R est déstabilisée par répulsion électrostatique entre le groupe lactame et la paire d'électrons libres de N₄ dans la base libre; il s'ensuit que ça favorise la forme 7S, soit la strychnofoline dans ce cas.

Le spectre RMN¹³C (figure n° 10) confirme l'isomérisie de 2 molécule et la configuration relative de la molécule.

δ (ppm) 179,7-155-139,8-138,2-134,4-
134-125,4-121,4-121-118,6-116,4
116-115-109,3-106,8-105,3-96,1-
72,6-57-53,9-52,8-49,6-45,1(20?)-
40,4-33,5-31,4-31,2-27,6-18,2



ISOSTRYCHNOFOLINE

C'est la première fois que des alcaloïdes oxindoliques sont signalés dans une espèce de Strychnos. Les alcaloïdes oxindoliques représentent environ 5% des alcaloïdes indoliques connus. Ils ont été isolés de Gelsemium sempervirens AIT. (Loganiacées) et des Mitragyna, Pseudocinchona, Uncaria (Rubiaceae) et Aspidosperma, Catharanthus, Rauwolfia et Vinca (Apocynaceae) dont les similitudes chimiotaxinomiques sont ainsi renforcées.

IV.5. USAMBARIDINES ET DERIVES

L'usambaridine répond à la formule brute $C_{30}H_{34}N_4O$. Elle a été isolée pour la première fois par KOCH et al. des feuilles du S. usambarensis de la Côte d'Ivoire (61). Une structure lui fut attribuée par comparaison de ses spectres, et surtout du spectre de masse, avec ceux de l'usambarine isolée par la même équipe (60). De cette façon, la même erreur de structure que celle relevée pour l'usambarine (voir IV.8) fut effectuée à propos de l'usambaridine.

Si nous avons pu isoler et identifier 14 alcaloïdes des feuilles du S. usambarensis, à partir d'une quantité moins importante de feuilles que celles dont disposaient KOCH et al. qui ne parvinrent à isoler que 2 alcaloïdes en quantité minimale, c'est sans doute dû au choix des solvants.

En effet, l'éther choisi par l'équipe française est un très mauvais solvant des alcaloïdes phénoliques particulièrement nombreux dans les feuilles de ce Strychnos.

Parmi la série d'alcaloïdes isolés à Liège, deux présentent la même formule brute que l'usambaridine, il s'agit vraisemblablement d'isomères, pour lesquels nous avons éprouvé beaucoup de difficultés lors des séparations chromatographiques, tant leurs Rf restaient proches. Ils donnent cependant des colorations différentes avec le réactif de pulvérisation au sel de Bleu solide B (solution aqueuse à 0,5 %).

L'alcaloïde le plus abondant possède un Rf de 0,58 dans le système I et est coloré en violet stable par le réactif précité. Nous l'avons expérimentalement baptisé "usambaridine Vi". L'autre possède un Rf de 0,52 dans le même système; par contre il ne donne qu'une coloration violette fugace sous l'effet du sel de Bleu solide B et cette coloration vire très rapidement au brun orange stable.

Pour cette raison, nous l'avons appelé "usambaridine Br".

IV.5.A. Usambaridine "Vi" (SUF 40)

Cet alcaloïde se présente sous la forme d'une poudre blanche de P.F. 180-182°C.

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{30}H_{34}N_4O$ (mes.: 466,2749; calc.: 466,2733). Cette formule indique la présence de 16 insaturations et d'un oxygène engagé dans une fonction phénolique.

b) Spectrométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge

Le spectre ultra-violet (figure n° 12) présente dans le

méthanol des maxima à 225, 280, 290 nm et un épaulement à 312 nm.

En milieu acide, on observe un léger effet hypsochrome (maxima à 220 et 273 nm); par contre, en milieu alcalin, on observe un effet bathochrome (maximum à 330 nm) traduisant la fonction phénolique.

Le spectre infra-rouge (figure n° 13) est caractérisé par la disparition de la bande C=O mais on note toujours la présence des bandes attribuées à l'indole (1630, 1589 et 1450 cm^{-1}), au benzène ortho-disubstitué (745 cm^{-1}), et à une chaîne vinyle (920 cm^{-1}).

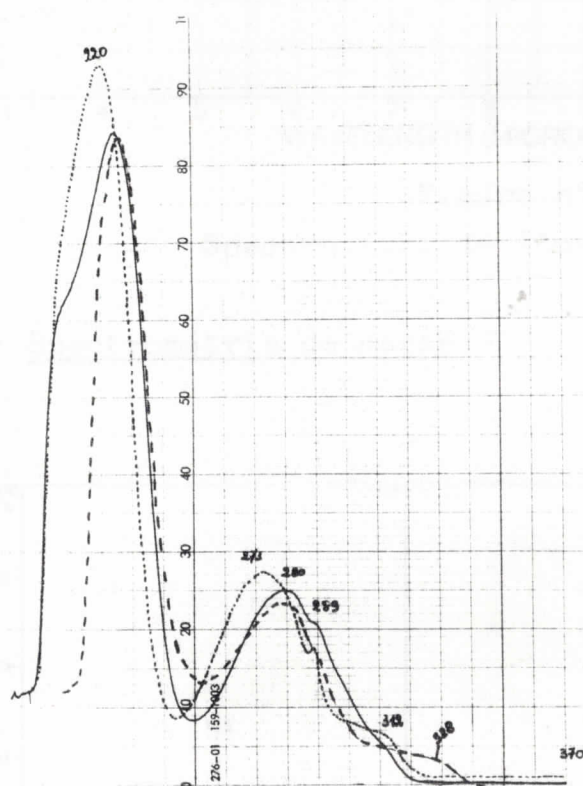


Figure n° 12

Spectres U.V.

de l'usambaridine "Vi"

(—:milieu neutre;---:milieu acide;---:milieu alcalin)

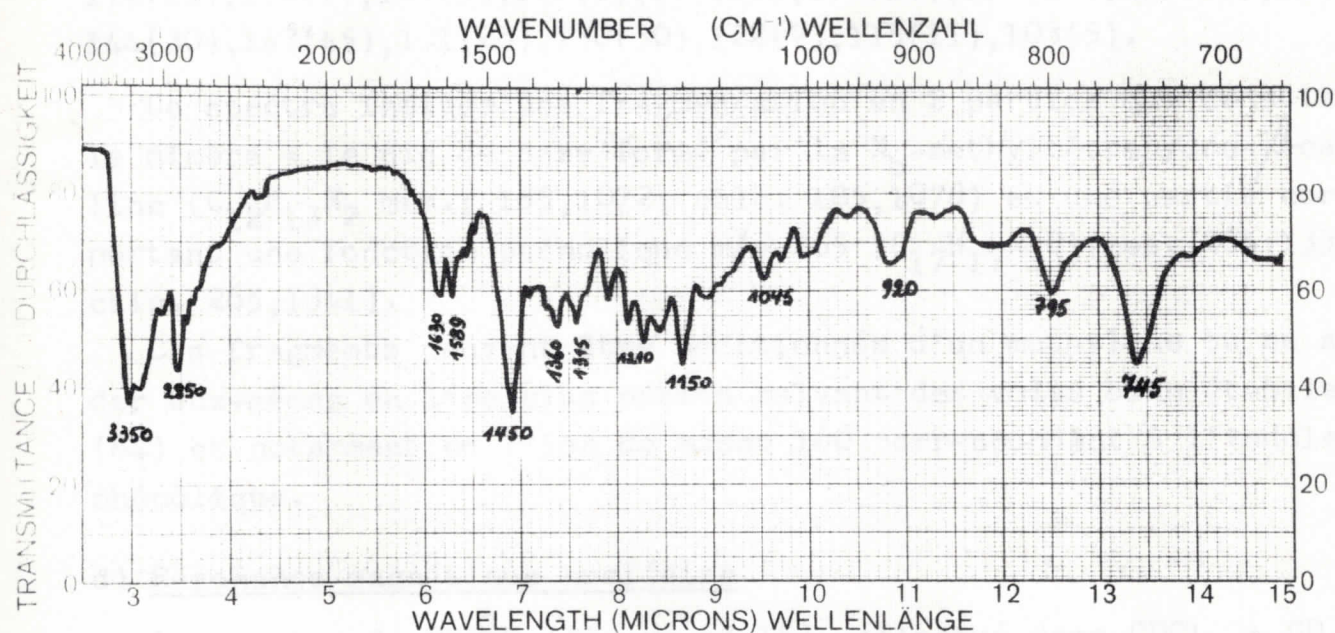


Figure n° 13
Spectre I.R. de l'usambaridine "Vi"

c) Spectrométrie de masse

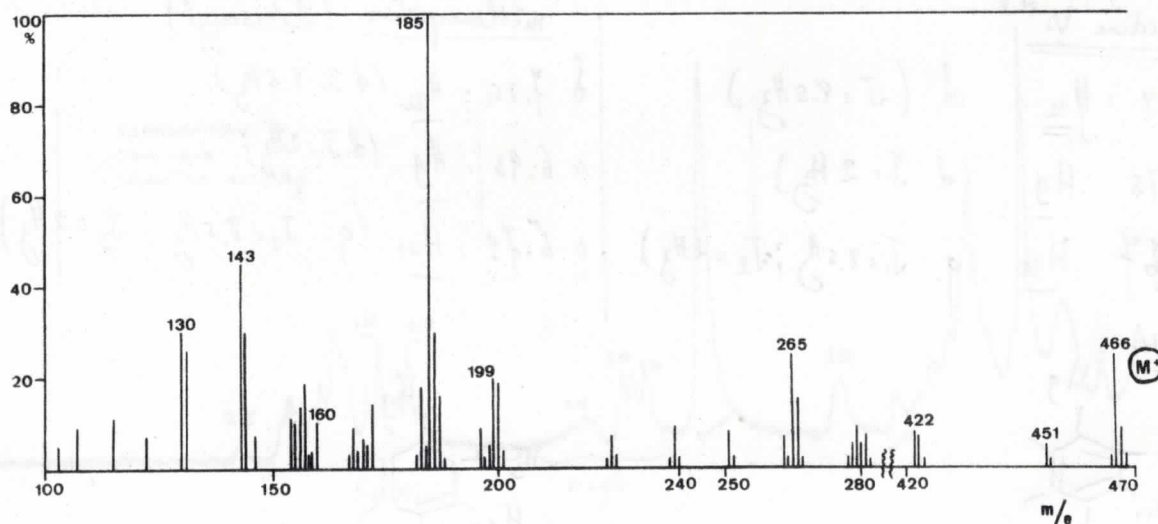


Figure n° 14
Spectre de masse de l'usambaridine "Vi".

m/e (intensité relative) 467(9), 466(25)(M⁺), 451(5), 422(8), 320(1), 281(7), 280(5), 279(9), 278(5), 266(15), 265(25), 263(7), 251(8), 239(9), 225(7), 200(19), 199(20), 196(8), 187(16), 186(30), 185(100), 183(18),

172(13), 170(7), 169(3), 168(9), 160(10), 157(19), 156(12), 155(10), 154(11), 144(30), 143(45), 131(26), 130(30), 122(7), 115(11), 103(5).

Ce spectre indique une fragmentation en 2 parties qui constituent le dimère = le pic de base formé par la N_b-méthyltétrahydro- β -carboline (C₁₂H₁₃N₂ mes.: 185,1072; calc. 185,1078) et une partie corynane portant une fonction phénolique m/e 265 (C₁₇H₁₇N₂O) (mes. 265,1338; calc. 265,1341).

Ces fragments peuvent être additionnés d'un méthylène ou se scinder eux-mêmes en ions plus petits suivant des voies bien établies (84) et notamment en l'ion de masse 160 correspondant à l'indole phénolique.

d) Résonance magnétique nucléaire

Le spectre de RMN¹H (figure n° 15), effectué dans CDCl₃ + CD₃OD, laisse clairement apparaître la présence d'une chaîne vinyle (signaux entre 5,46 et 4,98 ppm) que l'on retrouve dans la strychnofoline. On remarque également le singulet de 3 protons (N-CH₃) à 2,39 ppm.

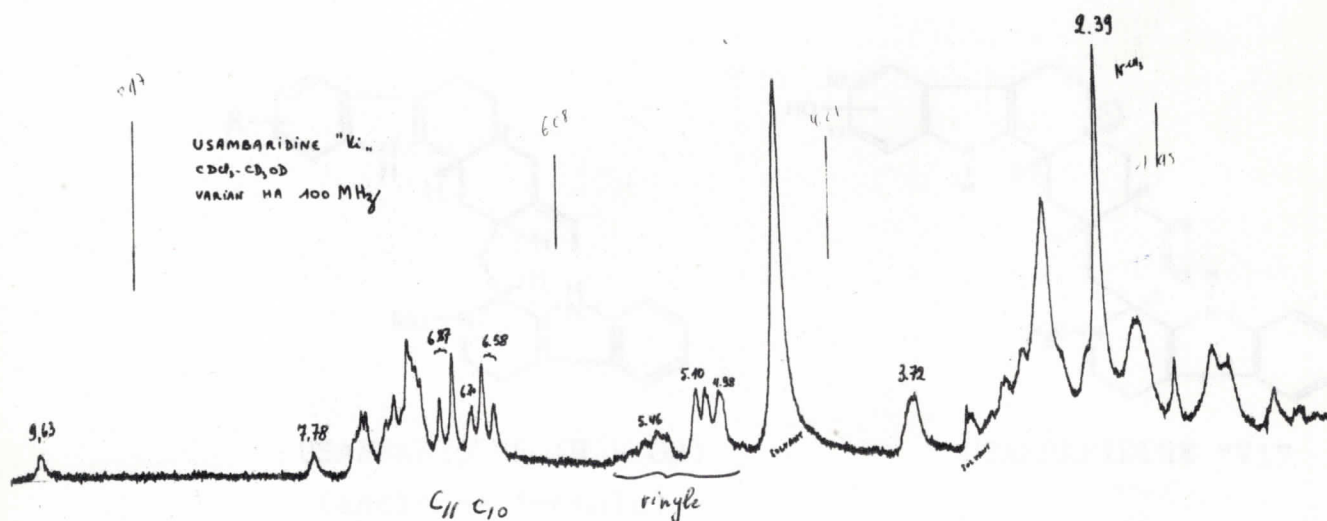


Figure n° 15
Spectre RMN¹H de l'usambaridine "Vi"

δ (ppm) 9,63 (OH/NH)-7,78(OH/NH)-7,44-7 (massif de protons aromatiques)-6,87(d?J = 9Hz)-6,70-6,58(d?J = 9 Hz)-5,46 à 4,98 (chaîne vinyle)-3,72 (m.1H)-2,8 à 1.26 (protons aliphatiques) 2.33 (s. 3H-N-CH₃)

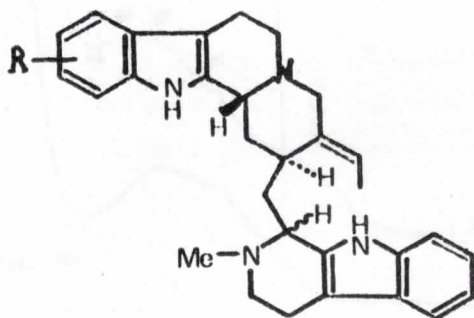
Il n'est pas aisé de désigner le carbone porteur de la fonction phénolique. Nous avons pris le spectre de la sérotonine, porteur d'un phénol situé sur le C_{10} et constaté que le signal du proton du C_{12} (d.J = 9Hz) était à un champ plus élevé δ 6,87 que les signaux des protons portés par le C_9 (singulet à δ 7,24) et C_{11} (doublet à δ 7,4 ppm).

Le spectre ^{13}C confirme la structure de l'usambaridine: 18 signaux étant situés en dehors des carbones saturés, soit au dessus de 90 ppm le signal à 148,1 ppm indique le carbone porteur de l'oxygène phénolique. Les déplacements chimiques sont calculés par rapport à l'HMDS.

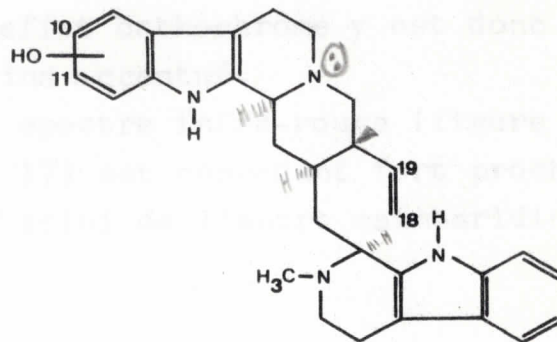
δ (ppm) 148,1-137,8-134,6-133,7(2C)-129,4-125,9-125,1-119,6(2C)-117,3-115,95(2C)-109,6(2C)-105,4-104,5-100,9-59-57,8-56,6-51-48-47-45,4-40-34-32,1-19,5-18.

e) Conclusions

Sur la base des spectres réalisés, nous pouvons rectifier la formule de l'usambaridine (61) en remplaçant la chaîne éthylidénique, absente dans les alcaloïdes des feuilles que nous avons isolés, par une chaîne vinyle.



USAMBARIDINE (R = OH)
(ancienne formule)



USAMBARIDINE "Vi"

D'autres expériences tenteront de préciser la stéréochimie de l'usambaridine "Vi" et la position exacte de la fonction phénolique sur le cycle aromatique.

*raisonnablement,
→ sur C_{10} .*

IV.5.B. Usambaridine "Br" (SUF30)

L'usambaridine se présente sous forme d'une poudre blanche microcristalline, jaunissant rapidement. Son point de fusion est de 186°C.

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution a prouvé l'isomérisie des deux produits, soit $C_{30}H_{34}N_4O$ (mes.: 466,2735; cal. 466,2733).

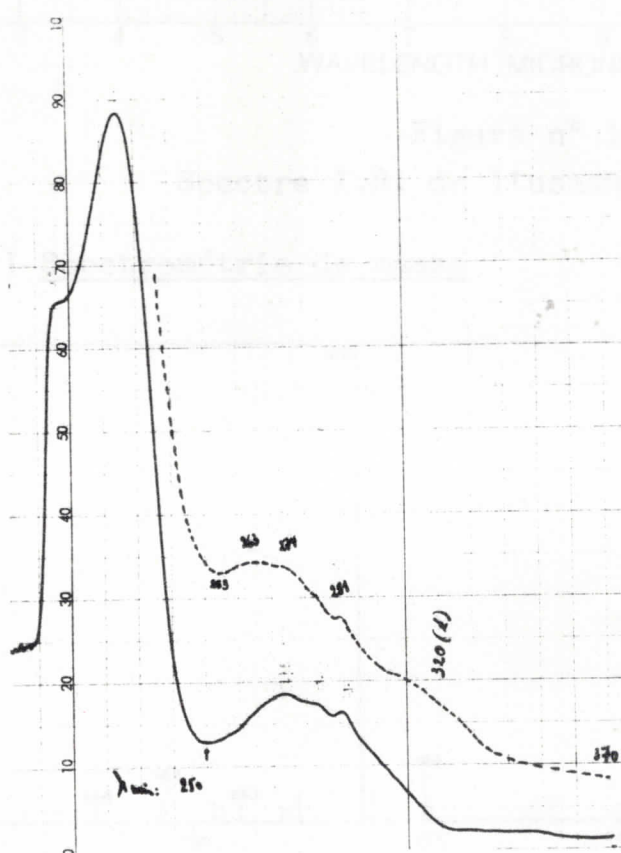
b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et le visible

Figure n° 16

Spectres U.V. de l'usambaridine "Br"

(—:milieu neutre;---:milieu alcalin)

Le spectre ultra-violet réalisé dans le méthanol présente des maxima à 205,225,274,283 et 290 nm et un épaulement à 305 nm.

Il laisse donc apparaître de petites différences avec le spectre de la figure n° 13.

Les différences se retrouvent aussi en milieu alcalin, où l'on observe des maxima à 217,263,274 et 290 nm ainsi qu'un épaulement à 320 nm. L'effet bathochrome y est donc moins accentué.

Le spectre infra-rouge (figure n° 17) est cependant fort proche de celui de l'autre usambaridine.

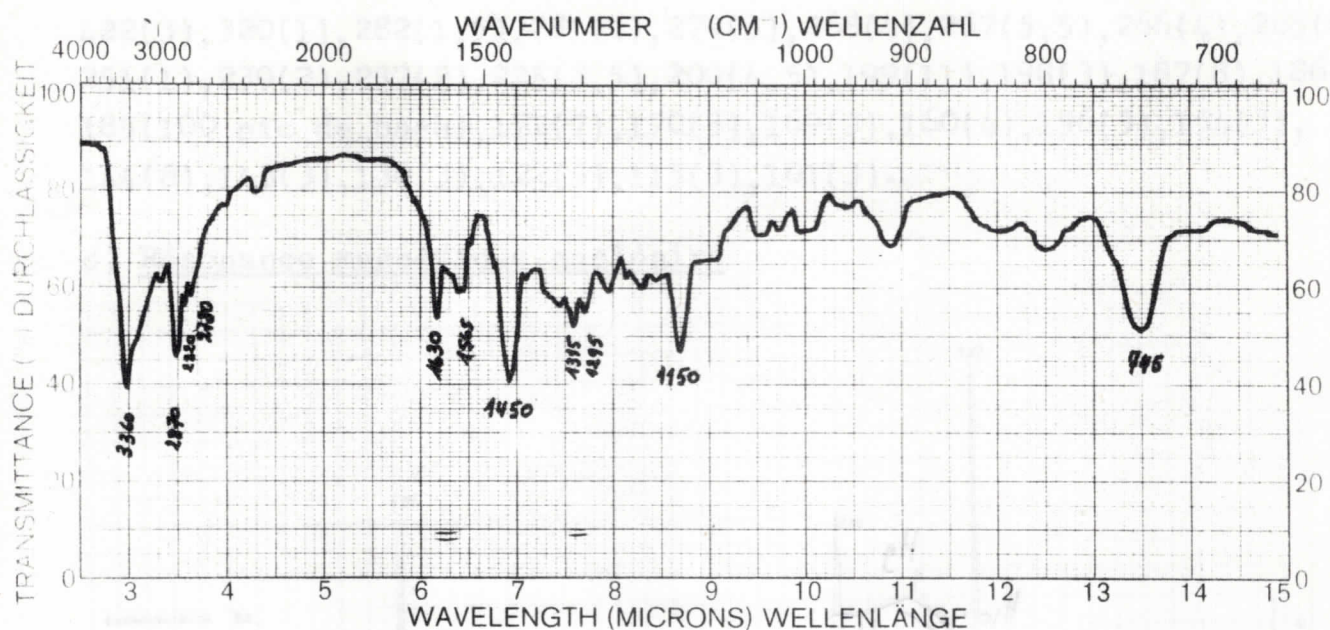


Figure n° 17
Spectre I.R. de l'usambaridine "Br"

c) Spectrométrie de masse

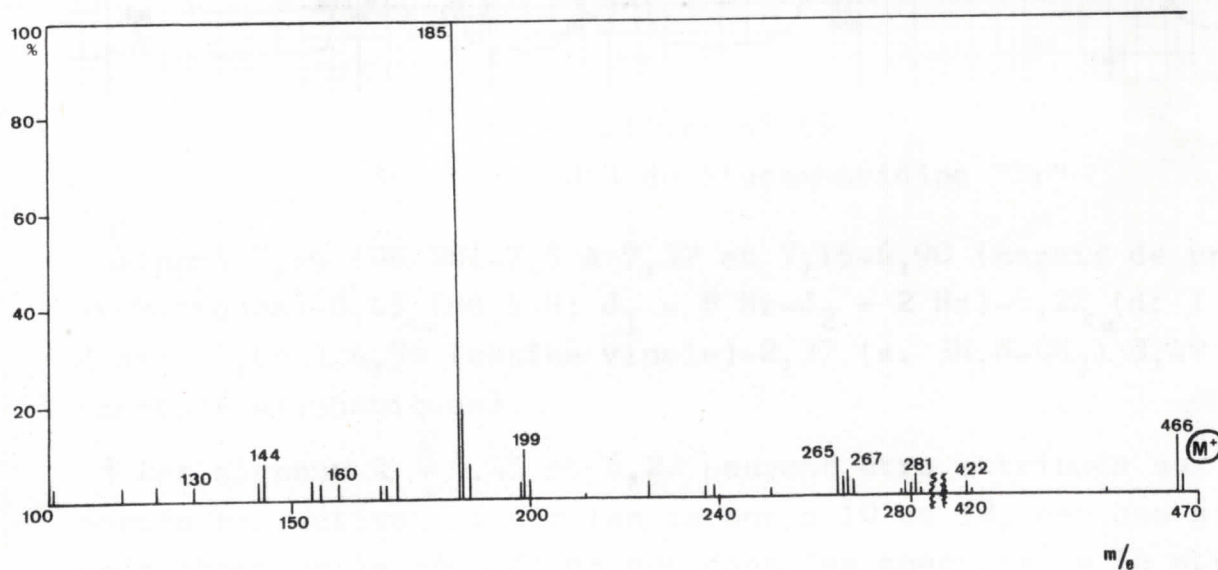


Figure n° 18
Spectre de masse de l'usambaridine "Br"

Le spectre de masse (figure n° 18) montre un type de fragmentation semblable à celui observé dans le cas de l'usambaridine "Vi" (figure n° 15). Seules les intensités sont différentes dans ce sens qu'elles sont beaucoup plus faibles comme on peut en juger: m/e (intensité relative): 467(4), 466(12) (M⁺), 451(1), 423(1,5),

422(3), 320(1), 282(1,5), 281(4), 279(3), 268(4), 267(5,5), 266(4), 265(8), 251(1), 239(2), 237(2), 225(3,5), 200(4,5), 199(11), 198(3), 187(8), 186(19), 185(100 pic de base), 172(7), 170(3), 169(3), 160(4), 156(3), 154(3), 144(8), 143(3), 130(3), 122(3), 115(3), 101(3).

d) Résonance magnétique nucléaire

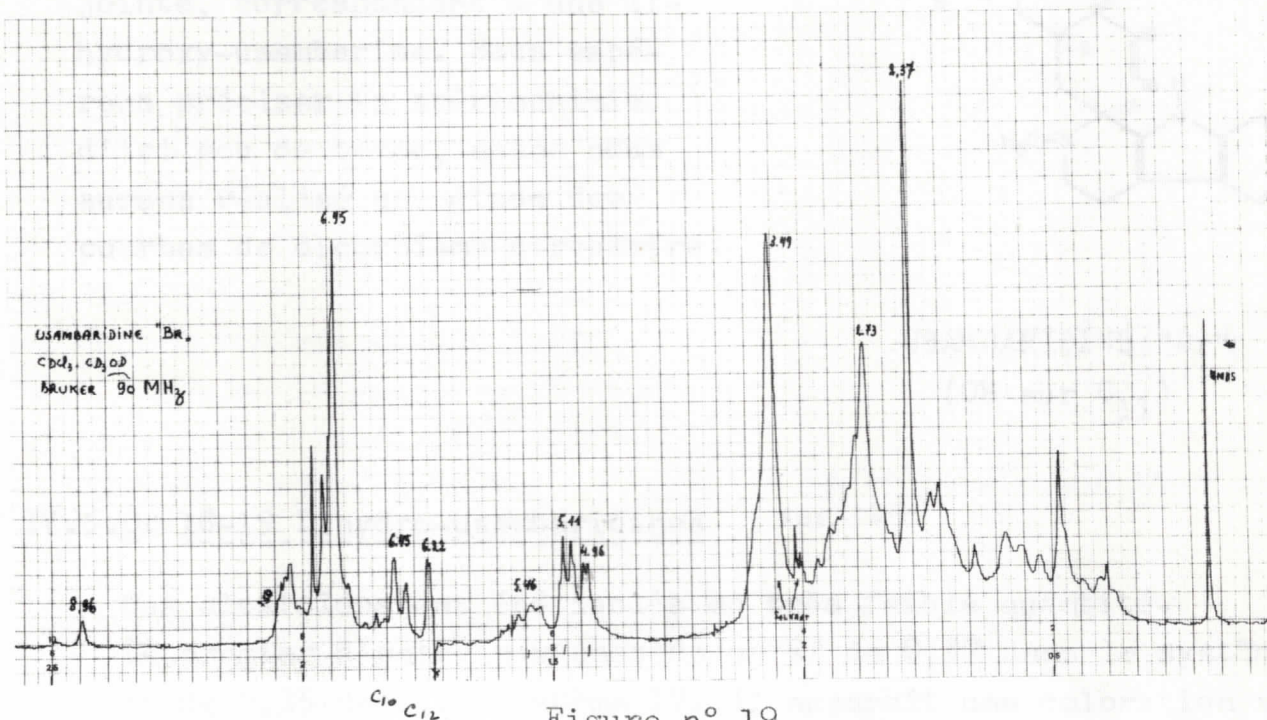


Figure n° 19
Spectre RMN¹H de l'usambaridine "Br"

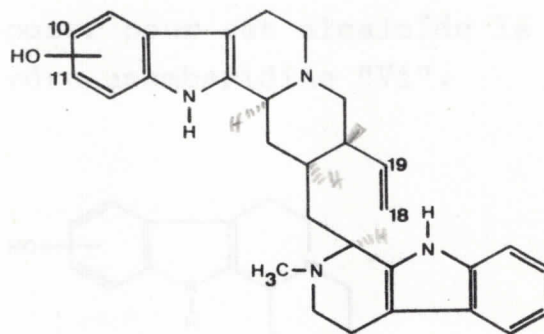
δ (ppm) 8,96 (OH/NH)-7,5 à 7,37 et 7,15-6,90 (massif de protons aromatiques)-6,45_{C₁₀} (dd 1 H; $J_1 = 8$ Hz- $J_2 = 2$ Hz)-6,22_{C₁₂} (d: 1 H; $J = 2$ Hz)- 5,46 à 4,96 (chaîne vinylo)-2,37 (s. 3H, N-CH₃) 3,49 à 0,80 (protons aliphatiques).

* Les signaux à δ 6,45 et 6,22 peuvent être attribués aux protons portés respectivement par les carbones 10 et 12, car ces signaux se présentent de la même façon que dans les spectres de la strychnofoline (figure n° 9) et de l'isostrychnofoline (figure n° 11) où le phénol est situé sur le carbone 11.

Le spectre de l'usambaridine "Br" se différencie donc nettement dans sa partie "aromatique" du spectre de l'usambaridine "Vi" (figure n° 16); on notera de plus la disparition du signal situé à δ 3,72.

e) Conclusions

Ces différents spectres nous permettent de proposer pour l'usambaridine "Br" la structure ci-jointe, correspondant à une 11-hydroxy-usambarine. Nous espérons préciser la stéréochimie d'ici peu de temps, quand nous aurons réalisé une étude des courbes de dichroïsme circulaire.



USAMBARIDINE "Br"
(OH sur C₁₁)

IV.5.C. 18-19 Dihydro-usambaridines

sur 15A

Ces alcaloïdes ont été isolés en très faible quantité.

Le premier d'entre eux possède un R_f de 0,37 dans le système I et de 0,35 dans le système IV. Il apparaît une coloration violette stable quand on le révèle en CCM par le sel de Bleu solide B. Son point de fusion est de 178 à 180°C.

Son spectre ultra-violet est superposable à celui de l'usambaridine "Vi".

Le spectre de masse est également identique, exception faite de l'ion moléculaire et des pics de la partie corynane qui sont déplacés de 2 unités de masse, à partir de m/e 267 jusque 468 (M⁺)(C₃₀H₃₆N₄O).

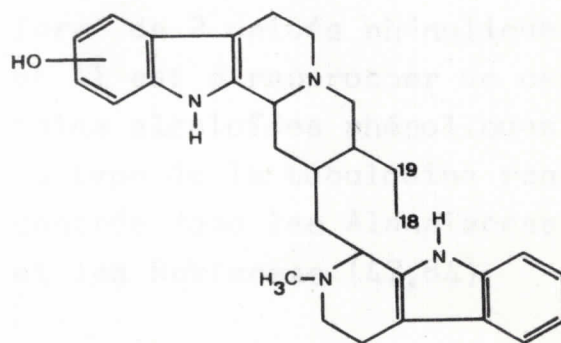
m/e (intensité relative): 469(3), 468(10)(M⁺), 452(1), 424(1), 322(1), 283(3), 282(1), 281(1); 280(1), 270(4), 269(6), 268(3), 267(9), 241(4), 239(3), 213(1), 200(3), 199(6), 198(2), 187(6), 186(16), 185(100), 184(3), 183(4), 172(3), 171(2), 170(3), 169(2), 168(2), 160(4), 156(3), 155(2), 154(3), 146(1,5), 144(8), 143(2), 130(2), 124(4), 123(2), 121(2), 115(2), 105(5).

Le fragment de masse 267 correspond à la partie corynane phénolique munie d'une chaîne éthyle au lieu de vinyle (C₁₇H₁₉N₂O) mes. 267,1488; calc.: 267,1497).

Le spectre de RMN^1H dans le CHCl_3 est identique à celui de l'usambaridine "Vi", excepté la disparition de la chaîne vinyle (absence des signaux entre 5.5 et 5 ppm), remplacée par une chaîne éthyle.

Ces analyses nous permettent de proposer pour cet alcaloïde la structure correspondant à la 18-19 dihydro-usambaridine "Vi".

L'alcaloïde dihydrogéné en 18-19 de l'usambaridine "Br" semble exister aussi dans la plante mais en très faible quantité. (SUF15C)
Il possède un R_f de 0,37 dans le système I et de 0,30 dans le système IV. Il donne les mêmes réactions de coloration que l'usambaridine "Br" quand on le soumet à l'action du sel de Bleu solide B et présente les mêmes spectres U.V.



18-19 dihydro-usambaridine

IV.5.D. Strychnobaridine (SUF15B)

Un autre alcaloïde situé comme les dihydro-usambaridines à un R_f de 0,37 dans le système I donne une coloration violette stable avec le sel de Bleu solide B. Il possède par contre un R_f de 0,18 dans le système ~~III~~ IV et un point de fusion de 170°C .

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à la même formule que la strychnofoline $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_2$ (mes. 482,2707; calc. 482,2680).

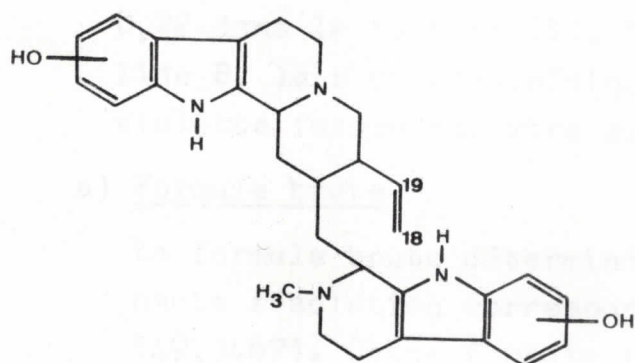
Les spectres U.V. et de RMN sont comparables à ceux de l'usambaridine "Vi". On notera, d'autre part, les signaux de la chaîne vinyle sur le spectre de RMN^1H .

Le spectre de masse est différent de celui de la strychnofoline et de l'isostrychnofoline mais montre une fragmentation comparable à celle observée dans le cas de l'usambaridine. On notera cependant l'apparition de pics importants à m/e 201 correspondant à un fragment $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ (mes.: 201,1033; calc. 201,1028) c'est à dire à une N-méthyl-tetrahydro- β -carboline phénolique et à m/e 187.

m/e (intensité relative): 482(17-M⁺), 468(9), 466(5), 451(2), 438(3), 422(2), 336(2,5), 322(2), 296(11), 284(7), 283(6), 282(8), 269(6), 268(10), 267(17), 266(11), 265(14), 240(2), 239(8), 238(11), 202(9), 201(60), 200(8), 199(17), 187(15), 186(22), 185(100), 184(9), 183(11), 160(13), 144(14), 143(11), 124(7), 123(22), 105(82).

Cet alcaloïde, que nous avons baptisé strychnobaridine, est donc

formé de 2 unités phénoliques et il est à rapprocher de certains alcaloïdes phénoliques du type de la tubulosine rencontrée dans les Alangiaceae et les Rubiaceae (47,84)



STRYCHNOBARI DINE

*
* *

IV.6. STRYCHNOPENTAMINE ET ISOMERES

IV.6.A. Strychnopentamine *SUF 60*

La strychnopentamine est une poudre blanche cristallisant en prismes dans l'éthanol absolu placé au réfrigérateur. Son point de fusion est de 246-248°C. En C.C.M., il possède un Rf de 0,72 dans le système I, de 0,66 dans le système II et de 0,22 dans le système III. Soumis à l'action de sel de Bleu solide B, le spot alcaloïdique laisse apparaître une coloration violette fugace qui vire au brun-orangé stable.

a) Formule brute

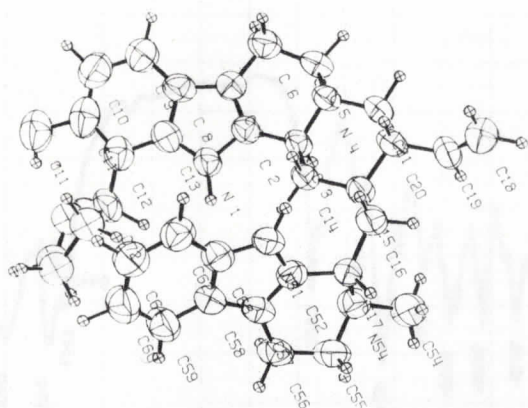
La formule brute déterminée par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{35}H_{43}N_5O$ (mes. 549,3485; calc. 549,3467). Cette formule indique la présence de 17 insaturations, ainsi que celle plus surprenante de 5 azotes. Ce fait n'ayant jamais été signalé à notre connaissance (47,91) nous avons jugé intéressant d'entreprendre l'étude cristallographique de ce composé.

b) Etude cristallographique

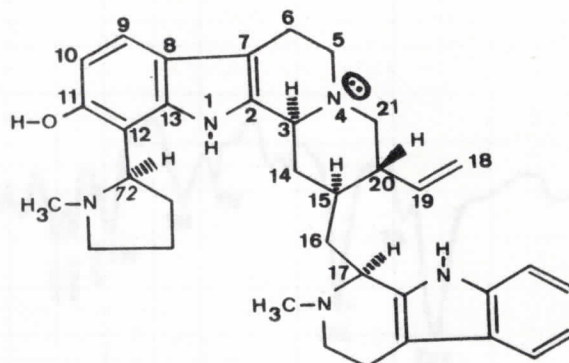
L'alcaloïde a cristallisé au cours de l'évaporation lente d'une solution éthanolique placée au réfrigérateur.

Les cristaux obtenus sont du système tétragonal, groupe spatial $P4_12_12$ avec $a = b = 13.895 \text{ \AA}$ et $c = 36.105 \text{ \AA}$. Ces cristaux contiennent 3,5 molécules d'eau par molécule de strychnopentamine, (28 molécules d'eau pour 8 molécules de strychnopentamine dans la maille). Par contre, on ne trouve pas de trace d'éthanol (93).

Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence inédite d'une méthylpyrrolidine greffée sur le cycle benzénique de la partie corynane de la molécule qui est de plus phénolique. La configuration absolue de la partie corynane est identique d'une part à celle de la strychnofoline que nous venons d'isoler de la même plante et, d'autre part, à celle de l'isocinchophyllamine obtenue à partir des feuilles de Quinquina (Cinchona ledgeriana MOENS, Rubiaceae).



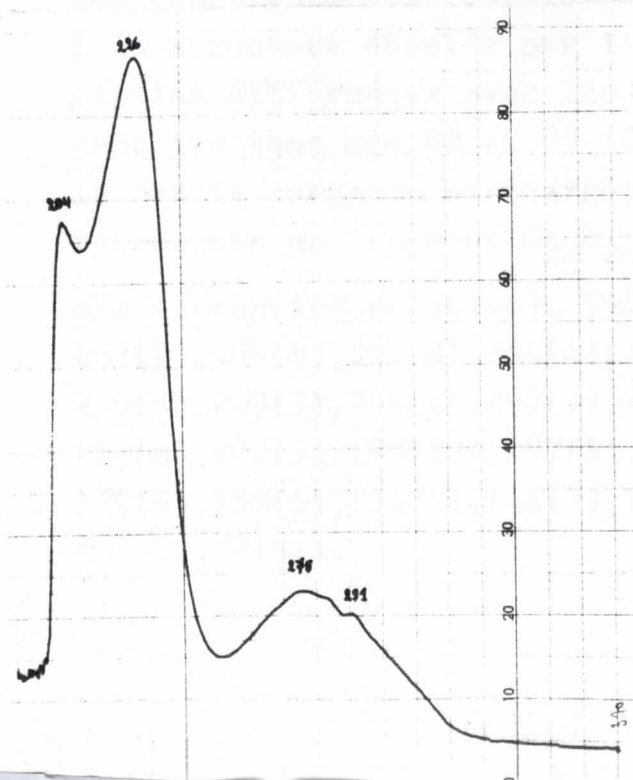
STRYCHNOPENTAMINE
(Vue stéréoscopique)



STRYCHNOPENTAMINE

La strychnopentamine appartient donc à la série "normale" et présente la configuration stéréochimique suivante: 3S, 4R, 15S, 17S, 20R et 72 R. Le numéro 72 a été attribué au carbone asymétrique du cycle pyrrolidinique. La configuration R est l'inverse de celle que l'on observe dans le cas de la proline ($C_5H_9NO_2$), de la nicotine ($C_{10}H_{14}N_2$) et de la brévicolline ($C_{17}H_{19}N_3$) qui sont d'autres bases naturelles possédant un cycle pyrrolidinique (83).

c) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge



Le spectre ultra-violet, effectué en solution méthanolique, présente des maxima à 204, 226, 275, 283 et 291 nm ainsi qu'un épaulement à 305 nm.

Il n'y a pas de modification sensible en milieu acide ou alcalin.

Figure n° 20
Spectre U.V. de la
strychnopentamine

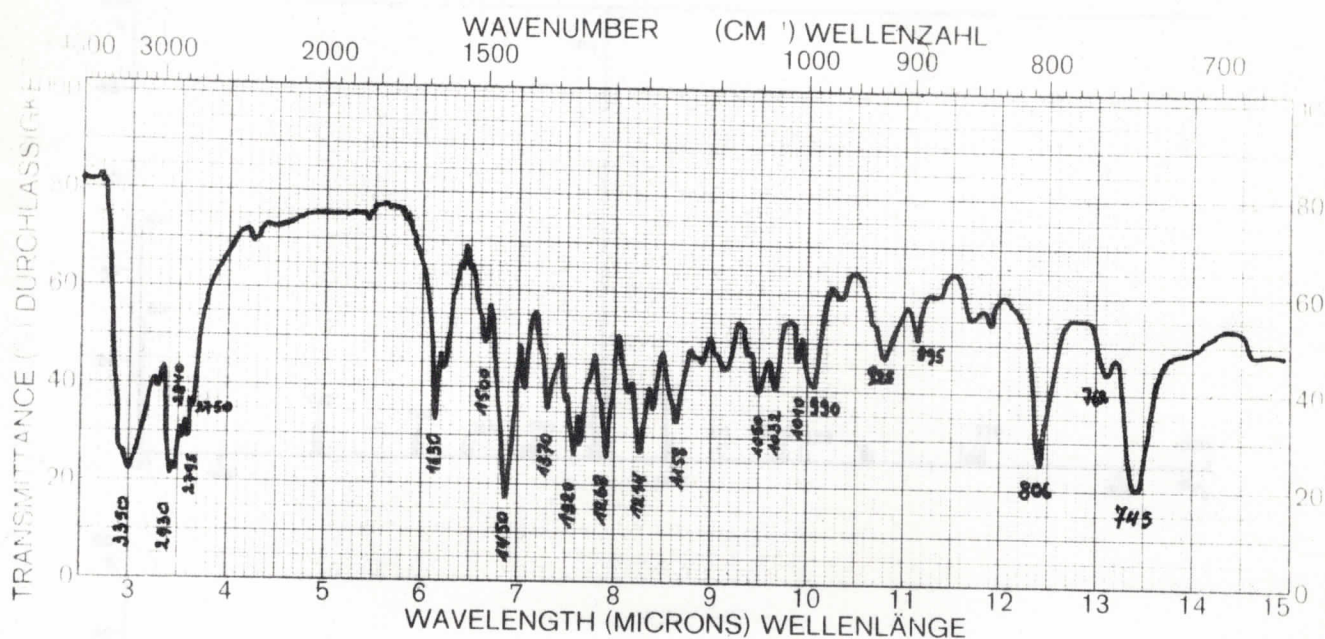


Figure n° 21

Spectre I.R. de la strychnopentamine

Le spectre infra-rouge est caractérisé par des bandes à $\checkmark$ 3350, 2930, 2840, 2795, 2750 (bandes de BOHLMANN), 1630, 1500, 1450, 1370, 1320, 1268, 1214, 1158, 1050, 1032, 1010, 990, 925, 895, 806, 762, 745 (benzène ortho disubstitué) cm^{-1} .

d) Spectrométrie de masse

Les renseignements fournis par le spectre de masse correspondent à la structure décelée par l'étude cristallographique. Les principales différences avec les molécules précédentes consistant dans les ions m/e 82 et 83 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{N}$) et 348 à 364 correspondant à la partie corynane surchargée d'une méthylpyrrolidine. L'ion 348 représente un fragment $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$ (mes.: 348,2087; calc.: 348,2076) m/e (intensité relative): 550(10), 549(24- M^+), 534(1), 506(2), 505(3), 467(2), 466(6), 365(2), 364(4), 351(7), 350(8), 349(5), 348(8), 320(3), 270(5), 269(3), 268(4), 267(3), 266(2), 265(4), 244(4), 243(4), 225(5), 211(4), 200(5), 199(13), 187(5), 186(18), 185(100), 184(5), 183(12), 170(5), 156(5), 154(5), 144(7), 143(5), 130(2), 123(4), 122(10), 121(6), 83(30), 82(51).

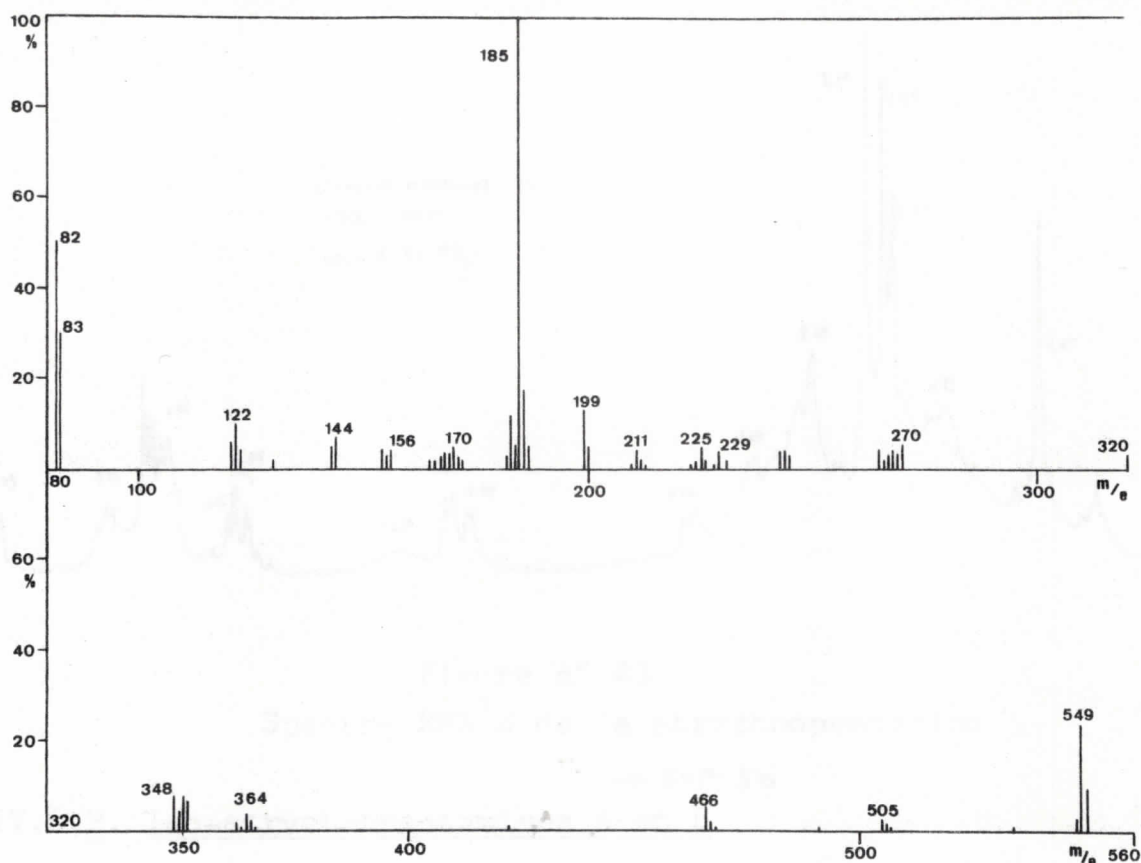


Figure n° 22
Spectre de masse de la strychnopentamine

e) Résonance magnétique nucléaire

Le spectre de résonance magnétique nucléaire ^1H permet d'observer les signaux de la chaîne vinylique, ainsi que les singulets correspondants aux 2 amines méthylées (à δ 2,31 et 2,21 ppm). Le signal à δ 8,09 est déplacé par la chaleur vers les champs plus élevés (δ 7,8) et peut dès lors être attribué à un groupe OH ou NH.

Nous ne disposons pas de suffisamment de strychnopentaminé pour réaliser le spectre ^{13}C car les installations actuelles du Centre de RMN de l'Université de Liège exigent un minimum de 100 mgr pour la réalisation du spectre de molécules de ce type.

Autrement dit, nous n'aurions pu établir cette structure sans avoir recours aux rayons X.

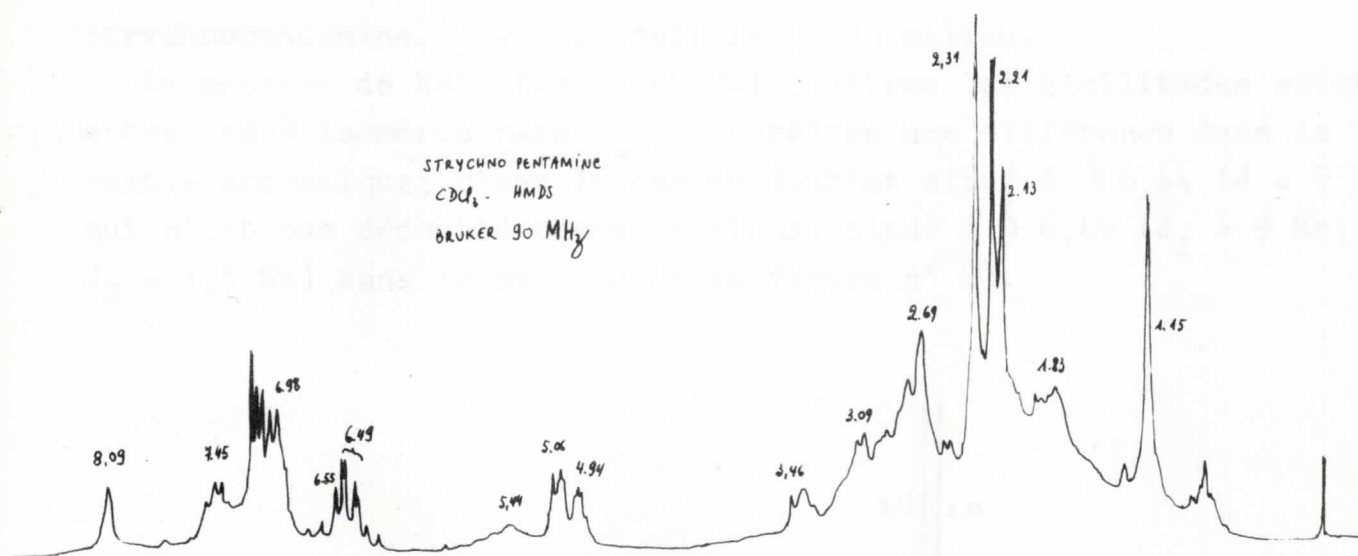


Figure n° 23
Spectre RMN¹H de la strychnopentamine

→ SUP 50

IV.6.B. Iso-strychnopentamines A et B

L'isostrychnopentamine "A" se présente sous forme d'une poudre blanche microcristalline. Elle possède un R_f de 0,66 dans le système I, de 0,60 dans le système II et de 0,16 dans le système III, et fournit les mêmes colorations que la strychnopentamine quand on révèle des plaques chromatographiques par la solution de sel de Bleu solide B. Son point de fusion est de plus identique.

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond également à C₃₅H₄₃N₅O (mesuré: 549,3480; calculé: 549,3467). Le spectre de masse montre d'ailleurs la même fragmentation reprise ci-après:

m/e(intensité relative) = 550(14), 549(32-M⁺), 534(1), 506(1'), 505(3), 467(2), 466(6), 365(2), 364(5), 351(11), 350(13), 349(5), 348(11), 270(8), 269(5), 268(4), 267(4), 266(2), 265(5), 244(5), 243(5), 200(4), 199(18), 187(4), 186(18), 185(100), 184(6), 183(15), 170(4), 169(3), 156(3), 154(3), 144(10), 143(4), 130(2), 122(10), 83(34), 82(66).

L'ion de masse 350 correspond à C₂₂H₂₈N₃O (mesuré: 350,2218; calculé: 350,2232) soit la partie corynane additionnée de la partie pyrrolidinique

Le spectre ultra-violet est tout à fait identique à celui de la strychnopentamine, quel que soit le pH du milieu.

Le spectre de RMN (figure n° 24) confirme les similitudes existant entre les 2 isomères mais fait apparaître une différence dans la partie aromatique; c'est le cas du doublet situé à δ 6,44 ($J = 9$ Hz) qui n'est pas dédoublé comme le signal situé à δ 6,49 ($J_1 = 9$ Hz; $J_2 = 1,5$ Hz) dans le spectre de la figure n° 23.

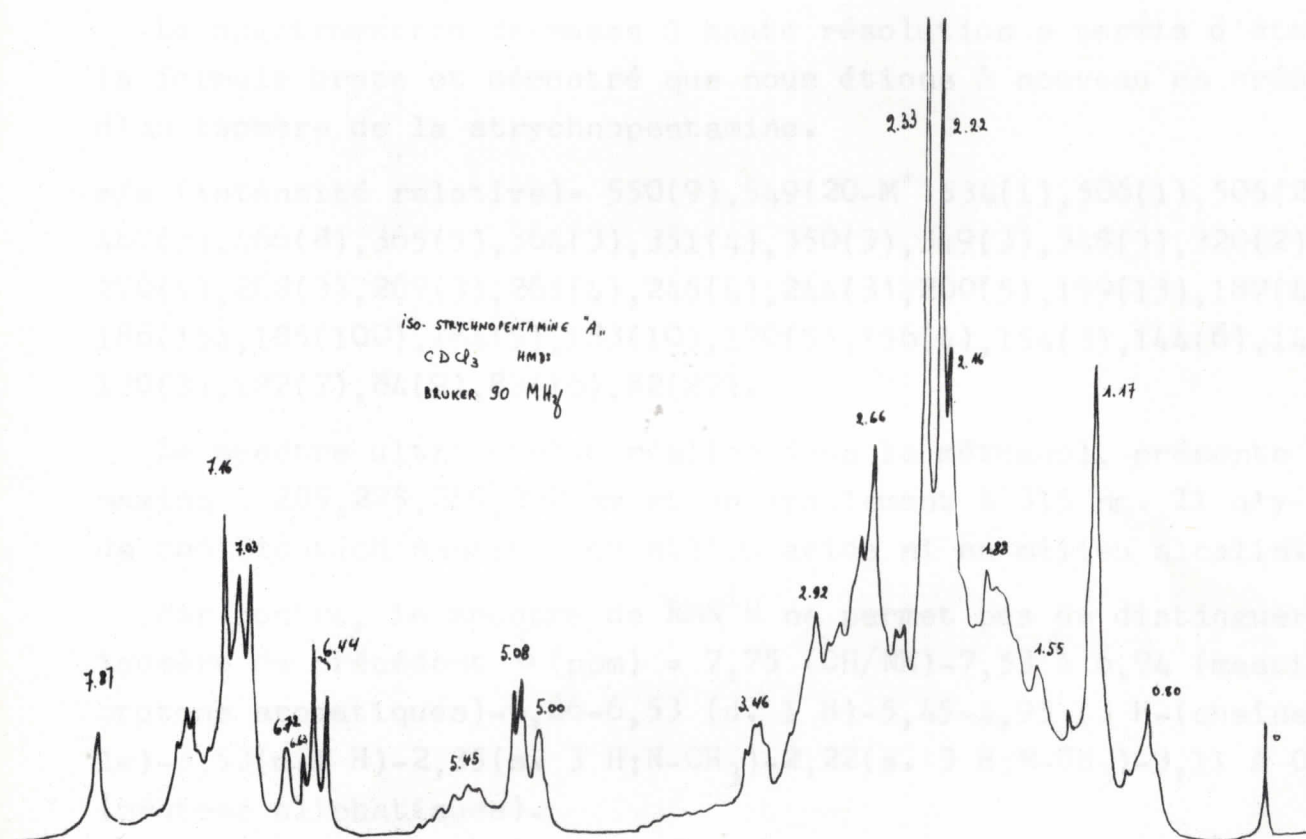


Figure n° 24
Spectre RMN¹H de l'isostrychnopentamine "A"

δ (ppm): 7,87 (OH/NH car déplacé par la chaleur à 7,78)-7,42 à 7 massif de protons aromatiques, 7,03 (d 1 H; d; $J = 9$ Hz)-6,72 (OH/NH car déplacé par la chaleur)-6,61(?)-6,44(1 H, d; $J = 9$ Hz)-5,45 à 5,00 (chaîne vinyle)-3,46 (m - 1 H)-2,33 et 2,22 (2 N - CH₃)-2,92 à 0,80 (forêt de protons aliphatiques)

Cette modification spectrale permet de supposer que l'isomérisation intervient au niveau du cycle aromatique sur lequel sont greffés la fonction phénolique et la méthylpyrrolidine. Nous espérons que

des recherches ultérieures, notamment de dichroïsme circulaire, permettront de préciser la stéréochimie de la molécule.

SUF80

L'isostrychnopentamine "B" possède par contre un Rf de 0,78 dans le système I, de 0,77 dans le système II et de 0,28 dans le système III. Nous n'avons pu l'isoler qu'en traces amorphes dont le point de fusion apparaît à 205°C. En CCM, il donne une coloration violette stable avec le sel du Bleu solide B.

La spectrométrie de masse à haute résolution a permis d'établir la formule brute et démontré que nous étions à nouveau en présence d'un isomère de la strychnopentamine.

m/e (intensité relative) = 550(9), 549(20-M⁺) 534(1), 506(1), 505(2,5), 467(3), 466(8), 365(5), 364(3), 351(4), 350(3), 349(3), 348(3), 320(2), 270(4), 268(3), 267(3), 265(4), 245(4), 244(3), 200(5), 199(13), 187(4), 186(15), 185(100), 184(5), 183(10), 170(5), 156(4), 154(3), 144(6), 143(5), 130(3), 122(7), 84(9), 83(16), 82(27).

Le spectre ultra-violet réalisé dans le méthanol, présente des maxima à 205, 225, 280, 292 nm et un épaulement à 315 nm. Il n'y a pas de modification sensible en milieu acide ni en milieu alcalin.

Par contre, le spectre de RMN¹H ne permet pas de distinguer cet isomère du précédent δ (ppm) = 7,75 (OH/NH)-7,53 à 6,94 (massif de protons aromatiques)-6,66-6,53 (d. 1 H)-5,45-4,95 (3 H-(chaîne viny-le)-3,53(m.1 H)-2,35(s. 3 H;N-CH₃)-2,22(s. 3 H;N-CH₃)-3,11 à 0,8 (protons aliphatiques).

*
* *

IV.7. STRYCHNOPHYLLINE *SUF 70*

La strychnophylline se présente sous la forme d'une poudre blanc-jaunâtre de P.F. 216°C.

Elle possède un Rf de 0,75 dans le système I, de 0,73 dans le système II et de 0,30 dans le système III et est révélée en pourpre stable par la solution de sel de Bleu solide B.

a) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{35}H_{43}N_5O_2$ (mes., 565,3440; calc.: 565,3416), ce qui montre une grande affinité avec les formules des strychnopentamines.

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge

Le spectre ultra-violet, réalisé dans le méthanol, présente des maxima à 205,225,275 et 290 nm; en milieu alcalin, ces maxima sont peu déplacés (225,274,283 et 290 nm) mais on notera un épaulement à 310 nm.

Le spectre infra-rouge est caractérisé par des bandes à 3.400,2930,2840,2795,1715,1595,1440,1390,1275,1190,1158,1050,1010,926 et 740 cm^{-1} . On relèvera surtout la bande intense à 1715 cm^{-1} (bande C = O) qui était absente dans le spectre I.R. des strychnopentamines.

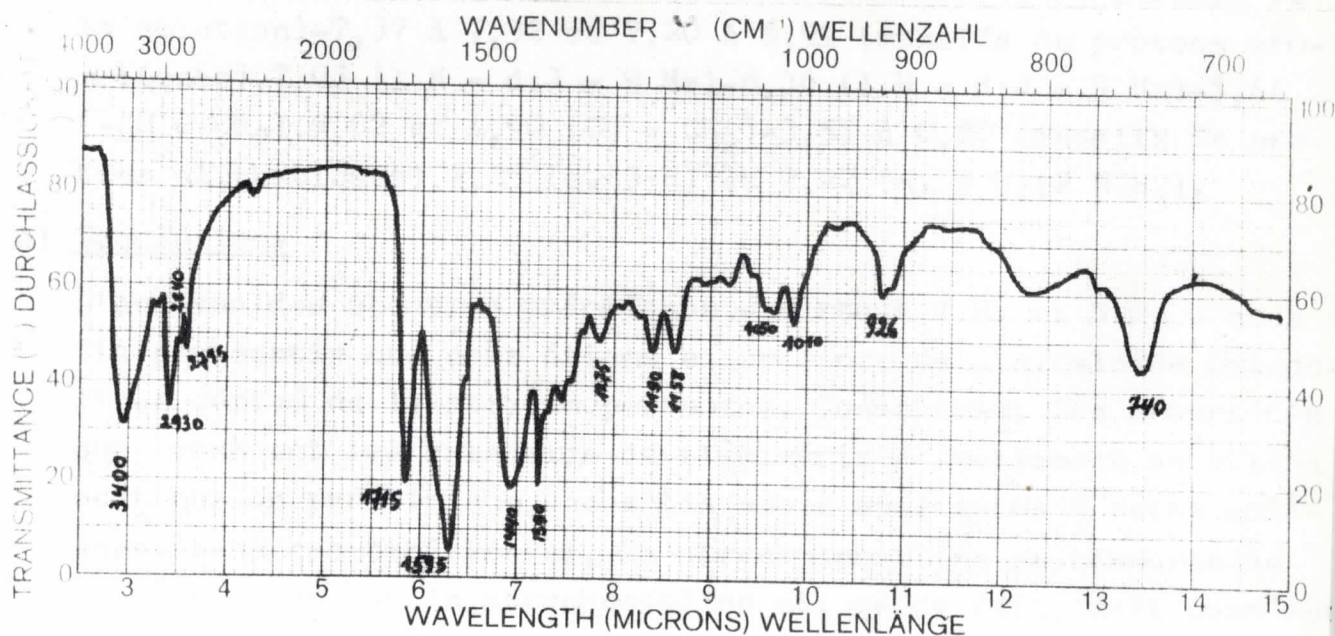


Figure n° 25
Spectre I.R. de la strychnophylline

c) Spectrométrie de masse

Le spectre de masse dont les valeurs sont données ci-après, laisse apparaître une fragmentation semblable à celle observée dans les strychnopentamines; les pics de la partie "corynane" sont cependant déplacés de 16 unités de masse vers la droite, soit d'un atome d'oxygène supplémentaire, comme l'indique l'analyse à haute résolution de l'ion m/e 365 ($C_{22}H_{27}N_3O_2$ = mes. 365,2082; calc. 365,2103).

m/e (intensité relative): 566(10), 565(25. M^+), 521(1), 483(1), 482(4), 467(2), 466(6), 366(5), 365(20), 364(3), 321(3), 282(6), 281(5), 278(4), 277(5), 267(4), 266(3), 265(6), 245(8), 244(5), 233(5), 232(18), 200(4), 199(8), 186(16), 185(100 = pic de base), 184(6), 183(15), 182(13), 170(10), 169(5), 168(4), 167(5), 156(6), 155(5), 154(6), 144(12), 143(6), 130(6), 123(5), 122(23), 121(48), 83(60), 82(100).

Ce spectre laisse également apparaître une similitude avec celui de la strychnofoline, notamment par les pics importants à m/e 282 et m/e 121.

d) Résonance magnétique nucléaire

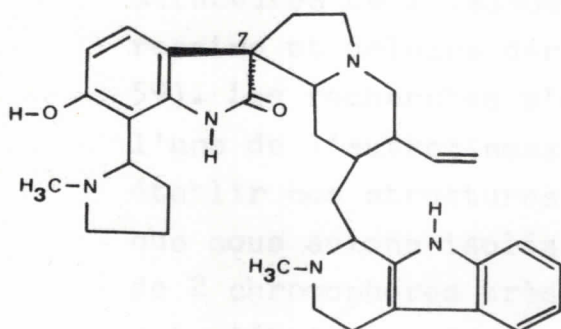
Le spectre de RMN¹H dans le $CDCl_3$ permet d'observer les signaux de la chaîne vinyle, des méthyles fixés sur les atomes d'azote, les 2 protons aromatiques de la partie corynane:

δ (ppm) 8,98-8,85-7,60 (OH/NH car déplacés par le chauffage de la solution)-7,37 à 7,32 et 7,20 à 6,91 (massifs de protons aromatiques), 7,03 (1 H = d; J = 9 Hz)-6,36 (1 H = d; J = 9 Hz)-5,44 ($-\underline{CH} = CH_2$), 5,02 et 4,90 ($CH = \underline{CH_2}$)-3,55 à 0,80 (massifs de protons aliphatiques), 2,25 (s. 3 H) et 2,22 (s. 3 H)(2 NCH_3).

e) Conclusions

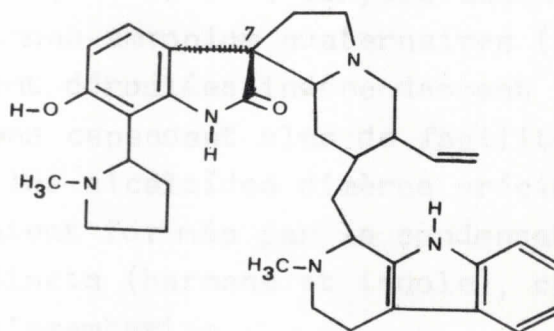
L'analyse des spectres précédents - surtout I.R. et S.M. - nous fit pressentir que nous étions en présence de l'alcaloïde oxindolique dérivé de la strychnopentamine. Connaissant les propriétés que possèdent les oxindoles de s'épimériser facilement en milieu acétique ou pyridinique, nous les avons appliquées à cette molécule. Dans ces expériences, la strychnophylline se comporte de la même façon que la strychnofoline et, de ce fait, doit posséder la configuration 7S. L'épimère 7R. existe également dans la

plante mais en proportion très très faible. Nous l'avons uniquement décelé en CCM où il donne la même coloration pourpre que les autres alcaloïdes oxindoliques phénoliques, sous l'effet d'une pulvérisation de la solution de sel de Bleu solide B. En CCM, dans le système acétate d'éthyle:92;isopropanol:10;ammoniaque conc. 3, l'épimère 7S possède un Rf de 0,88, tandis que l'épimère 7R se situe au Rf de 0,62.



STRYCHNOPHYLLINE (7S)

SUF 70



ISO-STRYCHNOPHYLLINE (7R)

(en traces dans les feuilles)

SUF 75

La stéréochimie des autres centres asymétriques de ces nouvelles molécules n'a pas encore été précisée, ces alcaloïdes ayant été identifiés ces dernières semaines de 1976.

*
* *

IV.8. USAMBARINE et DERIVE DIHYDRO

IV.8.A. Usambarine

a) Historique

L'usambarine est un alcaloïde isolé des feuilles de S. usambarensis par MM. KOCH et PLAT (60). Sa structure fut publiée deux semaines après que nous ayons rendu publiques les structures de l'usambarensine, de la 3'-4'dihydro-usambarensine et de leurs dérivés mono-ammonium quaternaires (58, 59). Les recherches s'étaient déroulées indépendamment l'une de l'autre; nous avons cependant plus de facilité à établir nos structures car les alcaloïdes dimères précités que nous avons isolés, étaient formés par la condensation de 2 chromophores très distincts (harmane et indole), ce qui n'était pas le cas de l'usambarine.

Notre hypothèse structurale fut ensuite confirmée par une étude cristallographique du bromhydrate d'usambarensine, d'une part (62), et par la synthèse de la 3'-4'dihydro-usambarensine, réalisée au Japon, d'autre part (63). C'est à cette occasion que les chercheurs japonais nous firent savoir que la structure de l'usambarine n'était pas correcte car ses spectres ne coïncidaient pas avec les spectres des 4 stéréoisomères obtenus par synthèse. Le laboratoire français ne disposant plus d'échantillon de l'alcaloïde, avait envoyé au Japon les spectres du produit. C'est de cette façon que nous reçûmes les spectres des différents produits ainsi que des échantillons des "usambarines" synthétiques. Nous avons tenu à introduire dans ce mémoire, les lettres reçues du Japon car ce sont elles qui nous ont incité à entreprendre l'étude des alcaloïdes contenus dans les feuilles du S. usambarensis.

Nous devons tout d'abord faire remarquer qu'aucun des échantillons de synthèse n'a été décelé dans les extraits de feuilles du S. usambarensis du Rwanda (forme arborescente) ou du Zaïre (forme lianeuse) [S. fernandiae H 786 A récolté en 1948 (12)]. On ne les retrouve pas davantage dans les extraits de racines, de tiges ou de fruits récoltés par nos soins au Rwanda.

NAGOYA UNIVERSITYDEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
CHIKUSA, NAGOYA, JAPAN

December 5, 1974

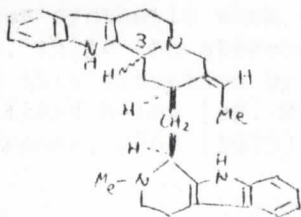
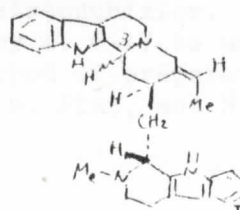
Dr. Luc Angenot
Institut de Pharmacie
Universite de Liege
rue Fusch 5, B-4000
Liege,
Belgique

Dear Dr. Angenot:

We have synthesized 3',4'-dihydrousambarensine this year and, the result will be soon published.
I am very grateful for your kindness of providing us with a valuable sample of the alkaloid, without which the identification could not be performed.

Enclosed you will find our manuscript on the synthesis and stereochemistry of the alkaloid. By our synthesis the stereochemistry of the alkaloid is unambiguously proved, since the intermediate used in the synthesis of 3',4'-dihydrousambarensine possesses the definite stereochemistry at C-3, C-15, and the ethylidene methyl (we have also carried out the synthesis of geissoschizine, the result of which will appear in Chem. Commun.).

As you suspect the stereochemistry of usambarine cited in your Ph.D. dissertation, the structure of usambarine is not correct: we synthesized the following four compounds, I, II, III, and IV, none of which was identical with natural usambarine.

I : 3 α -HII: 3 β -HIII: 3 α -HIV : 3 β -H

Finally I would like to express my cordial thanks to you for natural 3',4'-dihydrousambarensine.

Sincerely yours,

Kiyoyuki Yamada
Associate Professor of Chemistry

NAGOYA UNIVERSITY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
CHIKUSA, NAGOYA, JAPAN

June 4, 1975

No.1

Dr. Luc Angenot
 Institut de Pharmacie,
 Faculté de Médecine,
 Université de Liège,
 Rue Fusch, 5
 B-4000, Liège
 Belgium

Dear Dr. Angenot:

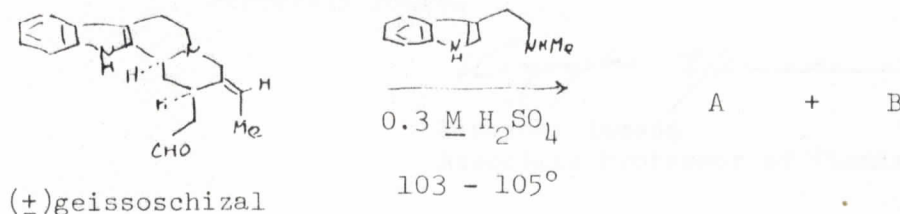
Thank you for your May 20 letter and the reprints: it was really nice to hear from you again. I owed much to you regarding our synthetic work on dihydrousambarensine, the result of which will soon appear in J. Org. Chem.

As I wrote you in my letter dated on December 5, 1974, we synthesized four stereoisomers, which were tentatively named ($\pm$)"usambarine"-A, ($\pm$)"usambarine"-B, ($\pm$)"epi-usambarine"-C, and ($\pm$)"epi-usambarine"-D, and none of them was identical with natural "usambarine" (by comparison of the nmr spectral data provided by Prof. M. Koch).

It was unfortunate that Prof. Koch could not supply me with the sample of natural usambarine owing to the very limited amount of natural usambarine available in the Koch's laboratory at that time; instead Prof. Koch sent me the copies of ir (solid state), nmr, and mass spectra of natural usambarine; I am enclosing those copies of the spectra obtained from Prof. M. Koch.

As you see, the nmr spectrum provided from Prof. Koch was not identical with any of the spectra of the synthetic A, B, C, and D.

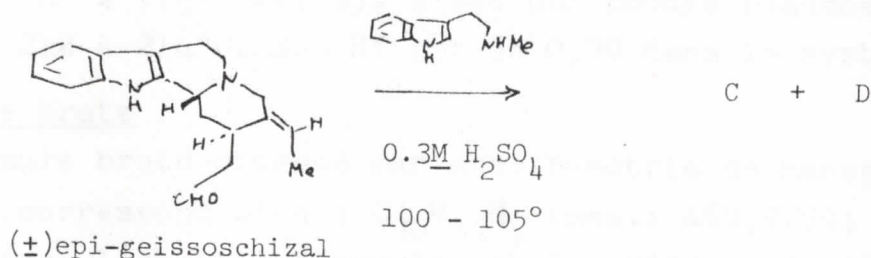
Regarding the stereostructures of our synthetic four compounds, the stereochemistry at C-3, C-15, and the ethylidene group is definitely established (cf. our synthetic work on ($\pm$)geissoschizine, the reprint of which is enclosed), while the stereochemistry at C-17 is unknown: you can understand this situation by the method of preparation of these four compounds outlined below [cf. M. Koch, M. Plat, and N. Preaux, Bull. Soc. Chim. France, 2868 (1973)].



NAGOYA UNIVERSITY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
CHIKUSA, NAGOYA, JAPAN

No.2



Since the amount of our synthetic four stereoisomers is limited, I am enclosing very small amount of each compound for preliminary chromatographic comparison; A(0.3 mg), B(1 mg), C(1.3 mg), D(1 mg). I hope that these samples would be useful for chromatographic comparison. However, if you find a promising stereoisomer and wish to compare more exactly, I can supply you with some additional amount. Those four stereoisomers were synthesized about fifteen months ago, I was afraid that they were partly decomposed: therefore, I have checked the purity of these samples yesterday by thin layer chromatography, the results of which are illustrated in this letter. As the tlc patterns show, decomposition took place to some extent, but I believe that these samples would still be useful for the purpose of chromatographic comparison: you will notice that the sample of "usambarine"-B is contaminated with a small amount of "usambarine"-A (I am sorry for the incomplete separation of B from A).

For your convenience of comparing your natural alkaloids with our synthetic stereoisomers by spectral means, I am enclosing spectral copies (ir, uv, nmr, and mass) of each synthetic compound: I hope that these spectral copies would also be useful for your comparison purpose.

It is my great pleasure that the result of our synthetic effort as to usambarine would be useful for your work, because our synthetic work merely proved the error of the structure elucidation of usambarine reported by Koch's group.

I sincerely hope that your work will be fruitful in the future.

Sincerely yours,

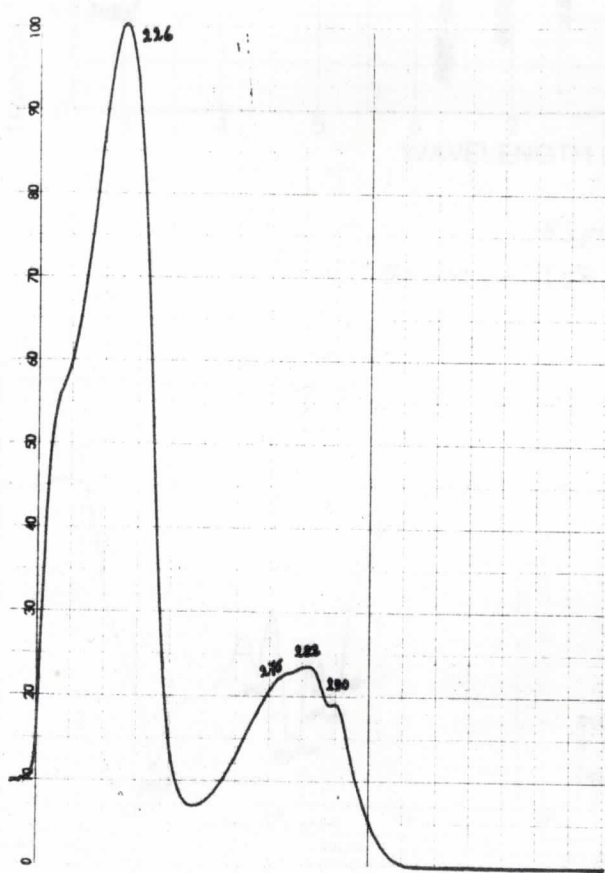
Kiyoyuki Yamada
Associate Professor of Chemistry

b) Obtention

L'usambarine est un alcaloïde isolé de la façon décrite dans le tableau n° 4 (voir IV. 3). C'est une poudre blanche dont le P.F. est de 212 à 214°C. Son Rf est de 0,90 dans le système I.

c) Formule brute

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond bien à $C_{30}H_{34}N_4$ (mes.: 450,2794; calc.: 450,2783) et indique l'absence d'oxygène et la présence de 16 insaturations.

d) Spectrophotométrie ultra-violette et infra-rouge

Le spectre ultra-violet montre des valeurs conformes à celles renseignées précédemment (60), c'est à dire des maxima à 226,275,282 et 290 nm, et un minimum à 247 nm.

En milieu acide, les valeurs sont très légèrement déplacées (maxima à 272,278 et 288 nm) minimum à 241 nm. Il n'y a pas de modification en milieu alcalin.

Le spectre infra-rouge (figure n° 27) est caractérisé par des bandes à 3425,3055,2930,2840,2795,2780,1595,1450,1370,1322,1268,1238,1158,1120,1105,1050,1010,918 et 740 cm^{-1} .

Figure n° 26

Spectre U.V. de l'usambarine

chaîne vinyle. Signalons d'autre part que le spectre présente bien des bandes de BOHLMANN à $2750-2800\text{ cm}^{-1}$, alors que les auteurs français avaient noté leur absence dans leur publication démunie des figures (60):

e) Spectrométrie de masse

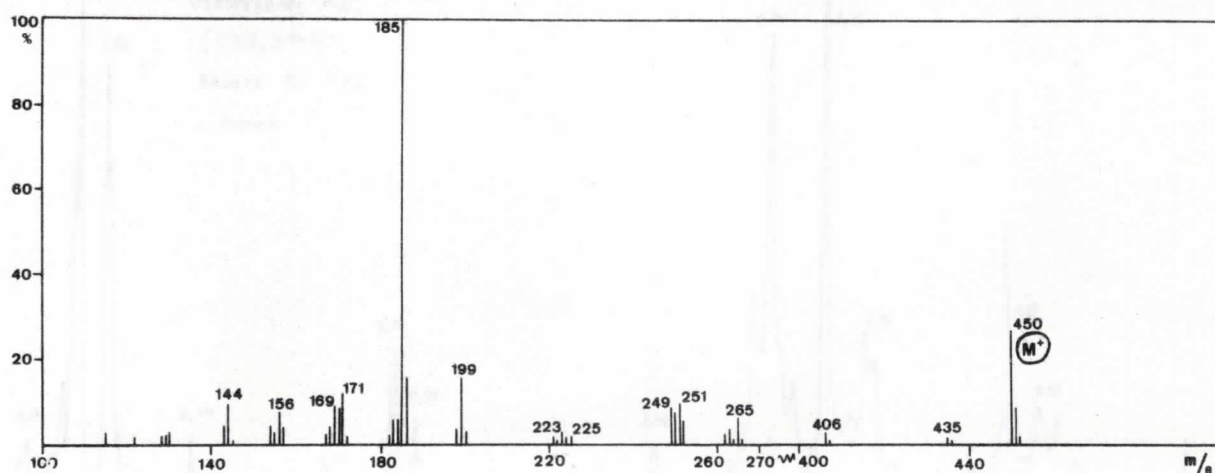


Figure n° 29

Spectre de masse de l'usambarine

Le spectre de masse est identique à celui fourni par KOCH et il laisse apparaître des pics à m/e (intensité relative)
 451(9), 450(27-M⁺), 436(1), 435(2), 407(1), 406(3), 392(<1), 368(<1),
 266(1), 265(6), 264(1), 263(3), 262(3), 252(6), 251(10), 250(7), 249(9),
 224(2), 223(3), 222(1), 221(2), 200(3), 199(16), 198(4), 186(16), 185(100),
 184(6), 183(6), 182(2), 172(2), 171(12), 170(7), 169(9), 168(5), 157(4),
 156(7), 155(3), 154(4), 144(10), 143(4), 130(3).

d) Résonance magnétique nucléaire

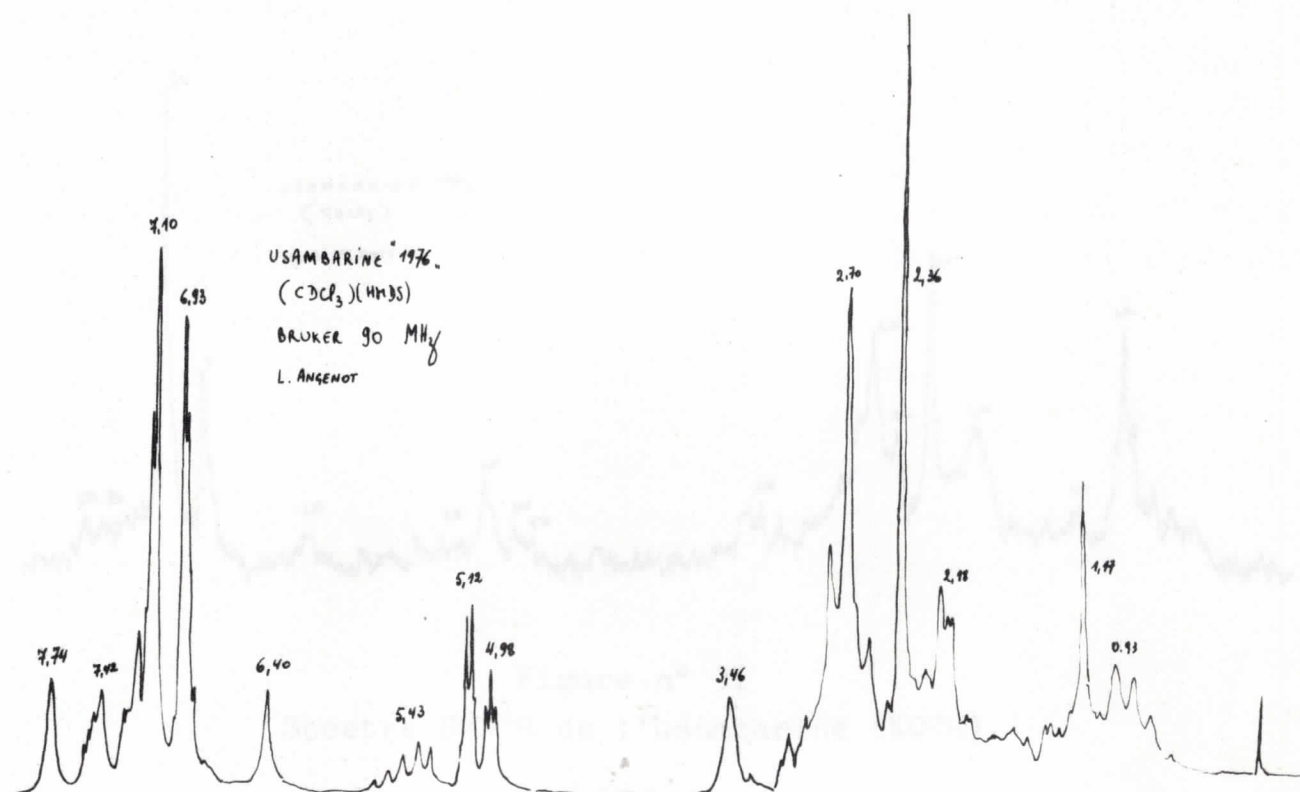
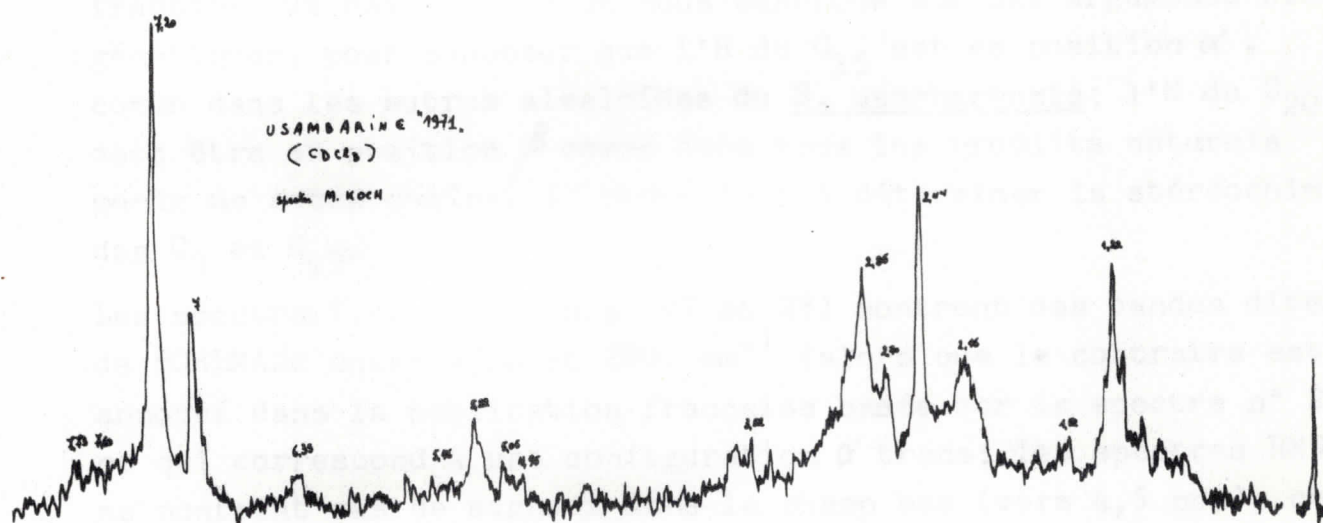


Figure n° 30
Spectre RMN¹H de l'usambarine

δ (ppm) = 7,74 et 6,40 (OH/NH car déplacés par chauffage) - 7,5 à 6,85 (protons aromatiques) - 5,43 à 4,98 (chaîne vinylique) - 3,46 (1 H) - 3,07 à 0,70 (protons aliphatiques) - 2,36 (N-CH₃).

Le spectre de RMN permet d'observer sans ambiguïté la présence d'une chaîne vinylique, déjà pressentie dans le spectre I.R. Les investigateurs français avaient cependant opté pour une chaîne éthylidénique. Or, il leur aura fallu beaucoup d'intuition pour déceler les signaux d'une telle chaîne dans le spectre de RMN qu'ils avaient obtenu et que nous reproduisons dans la figure n° 31. Il faut dire à leur décharge que les alcaloïdes munis d'une chaîne vinylique n'ont pas été souvent rencontrés dans le genre *Strychnos*, à la différence des alcaloïdes à chaîne éthylidénique qui y sont fréquents. Seule en effet, à notre connaissance, la mélinonine B, isolée du *S. melinoniana* BAILLON, possède cette chaîne vinylique (95). Les alcaloïdes de ce type sont par contre assez répandus dans les Gelsemium (Loganiacées), les Cinchona, Corynanthe et Mitragyna.

(Rubiacées) et Catharanthus (Apocynacées).

f) Stéréochimie

En ce qui concerne la stéréochimie, à défaut d'une étude de diffraction aux rayons X, nous nous baserons sur des arguments biogénétiques, pour supposer que l'H du C_{15} est en position α , comme dans les autres alcaloïdes du S. usambarensis; l'H du C_{20} doit être en position β comme dans tous les produits naturels munis de cette chaîne. Il reste donc à déterminer la stéréochimie des C_3 et C_{17} .

Les spectres I.R. (figures n° 27 et 28) montrent des bandes dites de BOHLMANN entre 2750 et 2800 cm^{-1} (alors que le contraire est annoncé dans la publication française basée sur le spectre n° 28: ce qui correspond à une configuration α trans; les spectres RMN ne montrent pas de signaux dans le champ bas (vers 4,5 ppm), ce qui est en accord avec la configuration 3 α trans. Quant à la configuration de l'H du C_{17} , elle est proposée également α et donc identique à celles de la strychnopentamine et de la strychnofoline, déterminées par rayons X.

En effet, la courbe de dichroïsme circulaire est superposable à celle de l'ochrolifuanine B (94). Le profil de cette courbe est le résultat de la superposition de 2 effets Cotton positifs dus à la configuration S des H situés sur les carbones 3 et 17.

Quand l'H du C_{17} est dans la configuration R, il y a soustraction d'un effet Cotton négatif à partir de l'effet Cotton positif dont l'amplitude est supérieure.

Qu'il nous soit encore permis de signaler une erreur dans la référence (94) où on associe les configuration 3 α H et 3 R, d'une part, 3 β H et 3 S, d'autre part, alors que c'est l'inverse 3 α H = 3 S et 3 β H = 3 R en réalité.

*
* *
*

IV.8.B. 18,19-Dihydro-usambarine

Le dernier alcaloïde envisagé dans ce travail se présente également sous la forme d'une poudre microcristalline blanche. Son point de fusion est de 204-206°C. En CCM, il se caractérise par un Rf de 0,80 dans le système I et il n'est pas révélé par les réactifs des phénols. Il est également présent dans les écorces de tiges du S. usambarensis du Rwanda.

a) Formule brute et spectrométrie de masse

La formule brute déterminée par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{30}H_{36}N_4$ (mes.: 452,2944; calc.: 452,2940), ce qui indique la présence de 15 insaturations et l'absence d'oxygène. Le spectre de masse fait de plus apparaître une grande analogie avec le spectre de l'usambarine (figure n° 29).

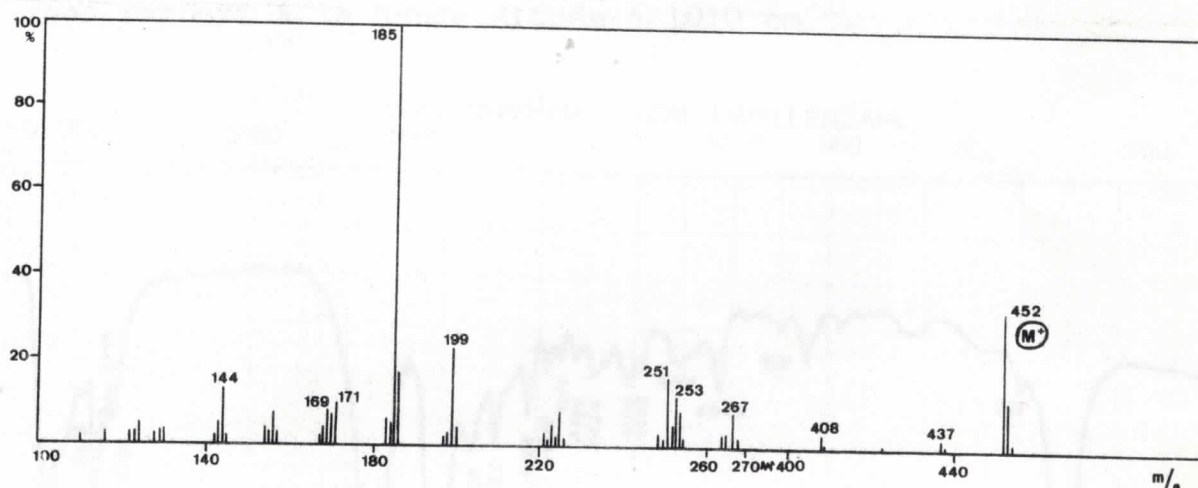


Figure n° 32

Spectre de masse de la 18,19-DIHYDRO-USAMBARINE

m/e (intensité relative) = 453(12), 452(33-M⁺), 438(1), 437(3), 423(< 1), 409(1), 408(3), 322(1), 268(2), 267(8), 265(3), 264(3), 254(8), 253(12), 252(5), 251(17), 250(2), 249(3), 225(8), 223(5), 221(3), 200(4), 199(23), 198(3), 186(17), 185(100), 184(5), 183(6), 171(10), 170(7), 169(8), 156(7), 154(4), 144(13), 143(5), 130(3), 124(5), 123(3), 122(2), 115(3), 110(2).

On observera le mode de fragmentation classique des alcaloïdes de ce type: m/e 437 (M-15), 408 (M-44) ($C_{28}H_{30}N_3$) (mes. 408,2446;

calc. 408,2440), 267 (partie corynane possédant 2 unités de masse supplémentaires par rapport au même fragment dans le spectre de l'usambarine) et 185 (partie N-méthyl-tetrahydro- β -carboline -C₁₂H₁₃N₂, mes. 185,1076; calc. 185,1079).

L'analyse de ces spectres nous fait penser que l'alcaloïde de PM 452 est en fait de l'usambarine possédant une chaîne latérale saturée.

b) spectrophotométrie dans l'ultra-violet et l'infra-rouge

Le spectre ultra-violet, réalisé dans le méthanol en milieu neutre acide ou alcalin, est identique à celui de l'usambarine.

Le spectre infra-rouge (figure n° 33) est caractérisé par des bandes à $\checkmark$ 3400, 3055, 2930, 2840, 2790, 1595, 1440, 1360, 1322, 1268, 1238, 1214, 1190, 1160, 1120, 1105, 1010, 920, 742 cm⁻¹.

Ce spectre est quasi identique à celui de l'usambarine (figure n° 27) mais on notera toutefois l'absorption faible à 920 cm⁻¹, par rapport à la bande située à 1010 cm⁻¹.

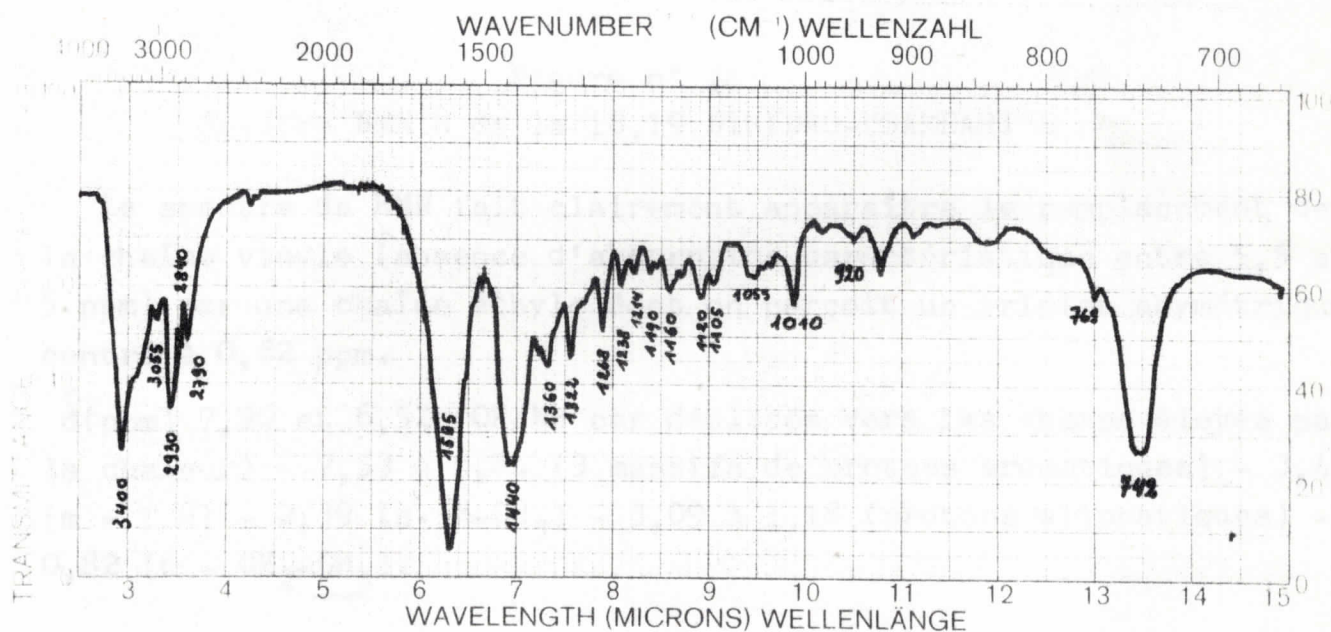


Figure n° 33

Spectre I.R. de la 18,19 DIHYDRO-USAMBARINE

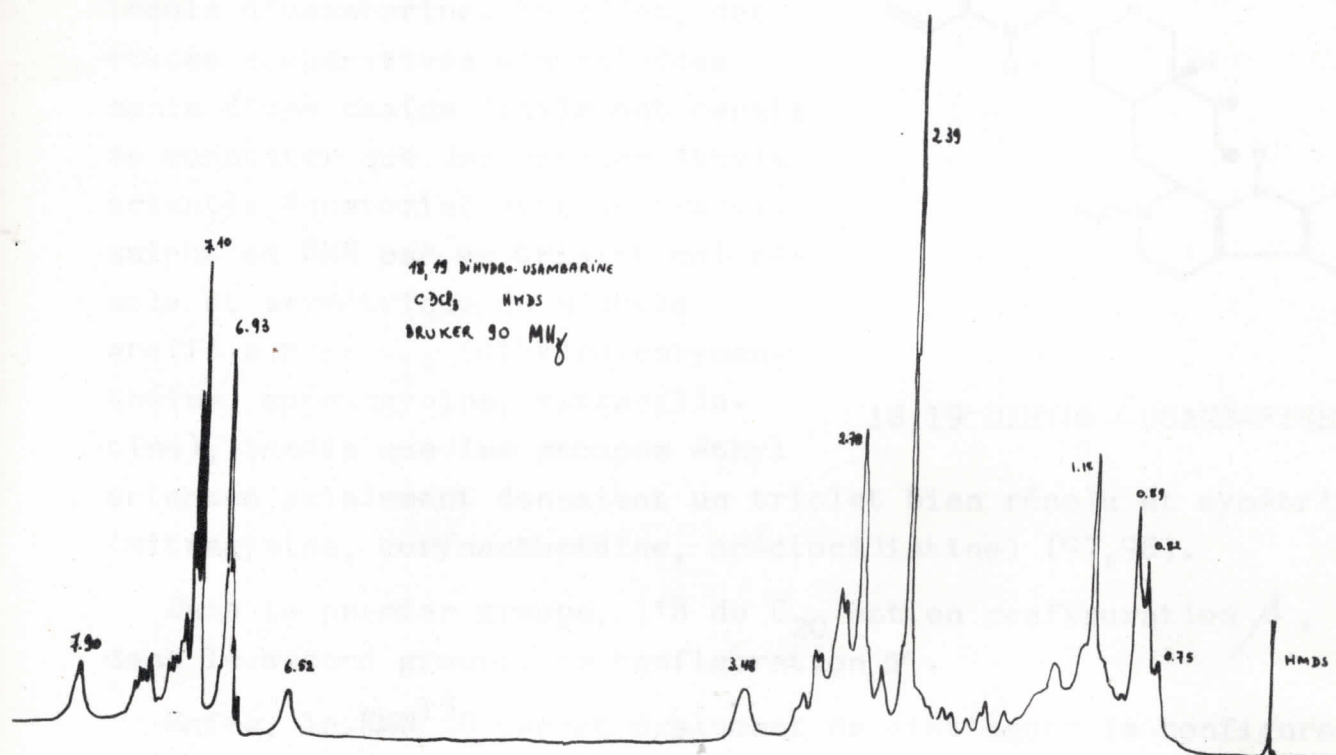
c) Résonance magnétique nucléaire

Figure n° 34

Spectre RMN¹H de la 18,19 DIHYDRO-USAMBARINE

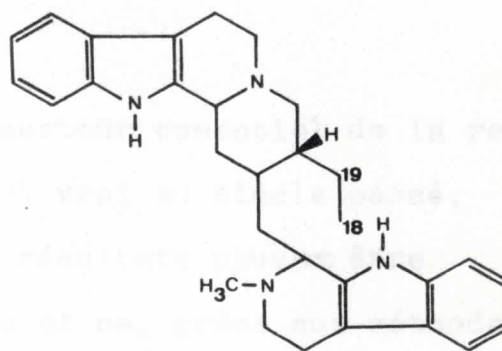
Le spectre de RMN fait clairement apparaître le remplacement de la chaîne vinyle (absence d'absorption caractéristique entre 5,5 et 5 ppm) par une chaîne éthyle dont on perçoit un triplet asymétrique centré à 0,82 ppm.

δ (ppm) 7,90 et 6,52 (OH/NH car déplacés vers les champs élevés par la chaleur) - 7,53 à 6,84 (3 massifs de protons aromatiques) - 3,48 (m = 1 H) - 2,39 (s. N-CH₃) - 3,09 à 1,18 (protons aliphatiques) - 0,82 (t - CH₂-CH₃).

d) Structure

L'analyse des spectres (IR, RMN et de masse) nous permet d'établir la formule ci-jointe. La stéréochimie de la molécule est vraisemblablement la même que celle de l'usambarine en ce qui concerne le C₃ (pas d'absorption vers 4.45 ppm dans le spectre RMN, qui aurait indiqué un H en configuration β cis par rapport à la paire d'électrons libres de N₄) et le C₁₅ (hypothèse biogénétique)

L'H du C_{20} doit être dans la configuration β , comme dans la molécule d'usambarine. En effet, des études comparatives d'alcaloïdes munis d'une chaîne éthyle ont permis de constater que les groupes éthyle orientés équatorialement se traduiraient en RMN par un triplet mal résolu et asymétrique du méthyle greffé sur le C_{19} (dihydro-corynanthéine, spéciogynine, mitraciliatine), tandis que les groupes éthyl orientés axialement donnaient un triplet bien résolu et symétrique (mitragynine, corynantheidine, spéciociliatine) (97,98).



18,19-DIHYDRO-USAMBARINE

Dans le premier groupe, l'H du C_{20} est en configuration β , et dans le second groupe, en configuration α .

Enfin, la RMN ^{13}C permet également de distinguer la configuration au niveau du C_{20} . C'est ainsi que les groupes éthyle orientés axialement (soit en β) donnent des signaux distincts de 5 à 6 ppm, tandis que les groupes éthyle orientés équatorialement (soit en α) sont caractérisés par des signaux distincts de 12 ppm (96).

Ayant réalisé le spectre de la dihydro-usambarine dans le $CDCl_3$ (HMDS), nous avons noté des signaux à δ 10 et 22 ppm, à côté de ceux à δ 18 et 19,5 ppm, déjà observés dans le cas de l'usambaridine "Vi" ce qui implique bien une configuration β pour l'H du C_{20} .

La configuration de l'H du C_{17} sera précisée quand nous aurons réalisé les courbes de dichroïsme circulaire de ce nouvel alcaloïde.

*
* * *

CONCLUSIONS

La Pharmacognosie a toujours été un secteur essentiel de la recherche pharmaceutique. Ce qui était déjà vrai au siècle passé, l'est d'autant plus aujourd'hui, que les résultats peuvent être exploités sur une base plus scientifique et ce, grâce aux méthodes modernes de séparation et d'identification des constituants, ainsi qu'aux prouesses de la synthèse qui puise souvent dans les produits naturels une inspiration bien justifiée.

Dans ce mémoire, nous avons tenté de démontrer l'intérêt que présentent les recherches actuelles consacrées aux *Strychnos* africains (Loganiaceae). Elles ont en effet permis l'isolement d'une série d'alcaloïdes dont certains jouissent de propriétés pharmacologiques intéressantes. C'est ainsi que nous avons personnellement isolé plus de vingt nouveaux alcaloïdes. Ce résultat inimaginable au siècle passé car irréalisable sans la chromatographie et les techniques spectrales et cristallographiques, a été obtenu à partir du *Strychnos usambarensis*, auquel nous avons consacré la plus grande partie de notre temps depuis 1970.

Ce *Strychnos* se caractérise par la diversité chimique de ses molécules alcaloïdiques. Nous avons en effet découvert que la plupart d'entre-elles (usambarensine, akagérine, strychnofoline, strychnopentamine, strychnophylline) étaient bâties sur des squelettes originaux dont des éléments évoquaient parfois les principes actifs découverts dans d'autres familles végétales (Rubiaceae, Apocynaceae). Est-il besoin de citer à ce propos les alcaloïdes des *Rauwolfia*, *Catharanthus*, *Vinca*, *Cinchona*, qui continuent à fournir

à la thérapeutique des remèdes appréciés?

Néanmoins, nous sommes tout autant conscients des limites de notre travail car, au fur et à mesure que nous progressons, nous constatons que le chemin à parcourir reste long. Mais n'est-ce point là notre destinée?

BIBLIOGRAPHIE

1. LEEUWENBERG, A.J.M. (1969) The Loganiaceae of Africa VIII, Strychnos III, Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland 69: 316 p.
2. PERROT, E. et E. VOGT (1913) Poisons de flèches et poisons d'épreuves, Paris, éd. Vigot Frères: 367 p.
3. LEWIN, L. (1923) Die Pfeilgifte, Leipzig, J.A. BARTH: 517 p. - Reprographischer Nachdruck der Ausgabe Leipzig 1923, Verlag Dr H.A. GERSTENBERG, Hildesheim, 1971.
4. BISSET, N.G. et M.C. WOODS (1966) The Arrow and Dart Poisons of South East Asia, Lloydia, 29: 1-18; 172-195.
5. PARKE, T.H. (1891) My Personal Experiences in Equatorial Africa, Sampson Low, Marston and Co, Ltd, éd. London: 300-314.
6. SCHEBESTA, P. (1939) Die Pfeilgifte, Ciba Zeitschrift, 7: 2495-2502.
7. BISSET, N.G. et A.J.M. LEEUWENBERG (1968) The Use of Strychnos Species in Central African Ordeal and Arrow Poisons, Lloydia, 31: 208-222.
8. ANGENOT, L. (1971) De l'existence en Afrique Centrale d'un poison de flèche curarisant africain, issu du S. usambarensis GILG, Annales Pharmaceutiques Françaises, 29: 353-364.
9. ANGENOT, L. (1976) Des poisons de flèches aux réactifs pharmacologiques de pointe. Recueil des Conférences du Cercle Scientifique des Anciens Elèves de l'Institut A. Gilkinet, Université de Liège: 91-122.
10. BISSET, N.G. (1970) The African Species of Strychnos I. The Ethnobotany, Lloydia, 33: 201-243.
11. ANGENOT, L. et J.N. WAUTERS (1974) Note sur le Strychnos innocua DELILE (Loganiaceae), Pl. médecin. Phythoth., 8: 314-317.
12. DENOËL, A., F. JAMINET, G. DETILLEUX, M. VAN SUMSEN et L. MERVEILLE (1953) Contribution à l'étude chimique des Strychnos du Congo Belge Ministère des Colonies, Bruxelles: 208 p.
13. BOUQUET, A. (1968) Recherches chimiques préliminaires sur quelques plantes médicinales du Congo-Brazzaville, Médecine Tropicale, 28: 49-58.

14. BOUQUET, A. (1972) Plantes médicinales du Congo-Brazzaville, Travaux et Documents de l'ORSTOM n° 13, Paris.
15. BOUQUET, A. (1962) Les Loganiacées de la Côte d'Ivoire. Note préliminaire ORSTOM: 35 p., Adiopodoumé.
16. BOUQUET, A. et M. DEBRAY (1974) Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire, Travaux et Documents de l'ORSTOM n° 32, Paris.
17. BOUQUET, A. et A. FOURNET (1975) Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du Congo-Brazzaville, Fitoterapia, 46: 175-191.
18. BOUQUET, A. et A. FOURNET (1975) Recherches récentes sur les plantes médicinales congolaises, Fitoterapia, 46: 243-246.
19. BISSET, N.G. et J.D. PHILLIPSON (1971) The African Species of Strychnos. Part II The Alkaloids, Lloydia, 34: 1-60.
20. SANDBERG, F., E. LUNELL et K.J. RYRBERG (1969) Pharmacological and Phytochemical investigations of African Strychnos species, Acta Pharm. Suecica, 6: 79-102.
21. SANDBERG, F., R. VERPOORTE et A. CRONLUND (1971) Screening of African Strychnos species for convulsant and muscle-relaxant effects, Acta Pharm. Suecica, 8: 341-350.
22. BOHLIN, L., Y. ALI et F. SANDBERG (1974) Idem, Acta Pharm. Suecica, 11: 233-238.
23. VERPOORTE, R. et L. BOHLIN (1976) Idem, Acta Pharm. Suecica, 13: 245-250.
24. ANGENOT, L. et A. DENOËL (1973) Découvertes récentes dans la chimie des alcaloïdes du S. usambarensis, Pl. médicin. Phytoth., 7: 284-291.
25. a) BOURQUELOT, E. et H. HERISSEY (1907) Sur un nouveau glycoside hydrolysable par l'émulsine, la bakankosine, retiré des graines d'un Strychnos de Madagascar, J. Pharm. Chimie (Paris) 25: 417-423
 b) BÜCHI, G. et R.E. MANNING (1960) Structure of verbenalin, Tetr. Letters: 5-12.
26. KOCH, M. (1965) Gentianine et Swertiamarine de l'Anthocleista procera LEPRIEUR (Loganiaceae) Thèse de Doctorat, Université de Paris.
27. PHILLIPSON, J.D., S.R. HEMINGWAY, N.G. BISSET, P.J. HOUGHTON et E.J. SHELLARD (1974) Angustine and related Alkaloids from species of Mitragyna, Nauclea, Uncaria and Strychnos, Phytochemistry 13: 973-8.

28. DENOËL, A. (1950) Le Strychnos icaia BAILLON du Congo Belge, J. Pharm. Belg. n° 3-4: 1-19.
29. SANDBERG, F., K. ROOS, K.J. RYRBERG et K. KRISTIANSON (1969) The Pharmacologically active alkaloids of Strychnos icaia BAILL., Acta Pharm. Suecica, 6: 103-108.
30. JAMINET, F. (1953) La microchromatographie de partage sur papier dans l'analyse phytochimique. Application à l'étude de quelques Strychnos congolais, J. Pharm. Belg., 8: 449-473.
31. BISSET, N.G., M. DEJESTRET et P.E. FOUCHE (1969) Applications de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des alcaloïdes de quelques Strychnos, Annales Pharmaceutiques Françaises, 27: 145-157.
32. BISSET, N.G. (1968) Epoxy-N-méthyl-sec.pseudo brucine, an alkaloid from S. icaia. An unusual case of cis-opening of an epoxide ring, Tetr. Letters: 3107-3110.
33. BISSET, N.G. (1968) Alkaloids of Some African species of Strychnos. Thesis. University of London, 184 p.
34. BISSET, N.G. et A.A. KHALIL (1976) New Alkaloids from S. icaia, Phytochemistry, sous presse.
35. BOSLY, J. (1951) Contribution à l'étude des alcaloïdes du S. holstii GILG, var. reticulata, fo. condensata, J. Pharm. Belg.: 1-51.
36. GARNIER, J., M. KOCH et M. PLAT (1972) Loganiacées de la Côte d'Ivoire. Alcaloïdes du S. camptoneura GILG, Annales Pharmaceutiques Françaises, 30: 299-306.
37. KOCH, M., E. FELLION et M. PLAT (1976) Cinq alcaloïdes nouveaux de S. henningsii, Phytochemistry, 15: 321-324.
38. ANGENOT, L., N.G. BISSET et M. FRANZ (1975) La désacétyl-rétuline extraite du S. variabilis, Phytochemistry, 14: 2519-2520.
39. SARFATI, R., M. PAÏS et F.X. JARREAU (1970) Nouveaux alcaloïdes isolés d'un S. henningsii d'origine malgache, Phytochemistry, 9: 1107-1113.
40. BISSET, N.G., J. BOSLY, B.C. DAS et G. SPITELLER (1975) Alkaloid from S. henningsii: Revised structures for holstiine and rindlin proposed structure for holstiline, Phytochemistry, 14: 1411-1414.
41. SINGH, H., V.K. KAPOOR, J.D. PHILLIPSON et N.G. BISSET (1975) Diaboline from S. potatorum, Phytochemistry, 14: 587-588.
42. OCCOLOWITZ, J.L., K. BIEMANN et J. BOSLY (1965) The structures of the Strychnos alkaloids. Condensamine and Retuline, Il Farmac e.s. 20: 751-756.

43. VERPOORTE, R. et A. BAERHEIM-SVENDSEN (1974) 11 methoxy-diaboline in S. malacoclados, Phytochemistry, 13: 2011.
44. BOHLIN, L. (1976) Communication personnelle à R. VERPOORTE (51).
45. KOCH, M., M. PLAT, B.C. DAS et J. LE MEN (1966) Loganiacées de la Côte d'Ivoire III. Alcaloïdes du S. splendens GILG: isolement et structure de la strychnosplendine, Tetr. Letters: 2353-2359.
46. KOCH, M., M. PLAT, B.C. DAS, E. FELLION et J. LE MEN (1969) Loganiacées de la Côte d'Ivoire VI. Alcaloïdes des écorces et des fruits de S. splendens GILG, Annales Pharmaceutiques Françaises, 27: 229-238.
47. HESSE, M. (1964) Indolalkaloïde in Tabellen, éd. Springer-Verlag, Berlin: 212 p.; ^(Volume 2) Ergänzungswerk: 249 p. (1968).
48. ANGENOT, L. (1973) Contribution à l'étude du S. usambarensis GILG, principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain, Thèse de Doctorat, Université de Liège. Diss. Abstr. Intern. (1974), 34B n° 11, 338.
49. DUBOIS, M., C. GINION, L. ANGENOT, W. VAN DORSSER et A. DRESSE (1974) Caractères chimiques et propriétés pharmacologiques de plusieurs alcaloïdes extraits de S. usambarensis, Arch. Internat. Physiol. Bioch., 82: 823-830.
50. ANGENOT, L., DUBOIS, M., C. GINION, W. VAN DORSSER et A. DRESSE (1975) Chemical Structure and Pharmacological (Curarizing) Properties of Various Indole Alkaloids Extracted from an African Strychnos, Arch. Internat. Pharmacodyn. Thé., 215: 246-258.
51. VERPOORTE, R. (1976) Pharmacognostical Studies of some African Strychnos species. Thèse de Doctorat. Université de Leyde.
52. ANGENOT, L., N.G. BISSET et A. DENOËL (1973) Alcaloïdes des Loganiacées. Sur l'isolement de l'harmane à partir du S. usambarensis GILG, Pl. méd. Phytothér., 7: 33-36.
53. ANGENOT, L. et A. DENOËL (1973) Alcaloïdes des Loganiacées. Sur l'isolement d'un nouvel alcaloïde (6,7-dihydroflavopérérine) à partir du Strychnos usambarensis, Planta Medica, 24: 226-232.
54. VERPOORTE, R. et F. SANDBERG (1971) Alkaloids of S. camptoneura. Acta Pharm. Suecica, 8: 119-122.
55. ANGENOT, L. (1975) De nouveaux alcaloïdes quaternaires du S. usambarensis, Planta Medica, 27: 24-30.
56. BISSET, N.G. et J.D. PHILLIPSON (1974) Antirrhine and antirrhine metho-salt from the leaves of S. camptoneura, Phytochemistry, 13: 1265-67.

Heidelberg
New York

57. AU, T.Y., H.T. CHEUNG et S. STERNHELL (1973) New Corynanthé Alkaloids from S. angustiflora, J. Chem. Soc. Perkin I: 13-16.
58. ANGENOT, L. et N.G. BISSET (1971) Isolement et structure de nouveaux alcaloïdes du S. usambarensis, J. Pharm. Belg.: 585-588.
59. ANGENOT, L. et A. DENOËL (1971) Contribution à l'étude des alcaloïdes du S. usambarensis, Planta Medica, 21: 96-110.
60. KOCH, M. et M. PLAT (1971) Structure de l'usambarine, nouvel alcaloïde isolé du S. usambarensis GILG, C.R. Acad. Sci. Paris, 273C: 753-4.
61. KOCH, M., E. FELLION et M. PLAT (1973) Loganiacées de la Côte d'Ivoire. XI. Alcaloïdes du S. usambarensis GILG, Annales Pharmaceutiques Françaises, 31: 45-48.
62. DIDEBERG, O., L. DUPONT et L. ANGENOT (1975) Détermination de la structure cristalline et de la configuration absolue d'un dérivé de l'usambarensine, Acta Crystallographica, 31B: 1571-5.
63. YAMADA, K., K. AOKI et D. UEMURA (1975) Synthesis and Stereochemistry of (+) 3'-4' Dihydrousambarensine, J. Org. Chem. 40: 2572-2573.
64. PEUBE-LOCOU, N., M. KOCH, M. PLAT et P. POTIER (1971) Alcaloïdes des plantes de Nouvelle-Calédonie - Structure des Ochrolifuanines A et B, alcaloïdes extraits des feuilles de l'Ochrosia lifuana GUILL. (Apocynacées), C.R. Acad. Sci. Paris, 273C: 905-906.
65. GUILHEM, J. (1974) La structure cristalline et moléculaire d'un alcaloïde: l'isocinchophyllamine, Acta Crystallographica, B30: 742-747.
66. TIMMINS, P. et W.E. COURT (1975) Leaf alkaloids of Rauwolfia obscura, Planta Medica, 27: 105-111.
67. AHOND, A. (octobre 1976) I.C.S.N. Gif-sur-Yvette, Communication personnelle.
68. SANDBERG, F. et K. KRISTIANSON (1970) A comparative study of the convulsant effects of Strychnos alkaloids, Acta Pharm. Suecica, 7: 329-336.
69. PELLETIER, S.W. (1970) Chemistry of the Alkaloids, Van Nostrand Reinhold Co. 795 p. New York.
70. DENOËL, A., F. JAMINET, E. PHILIPPOT et M.J. DALLEMAGNE (1951) Contribution à l'étude chimique et pharmacologique des alcaloïdes du Strychnos angolensis, Arch. Intern. Physiologie, 59: 341-347.
71. LEONARD, B.E. (1965) An investigation of the pharmacology of Macusine B, J. Pharm. Pharmacol., 17: 566-576.

72. SINGH, H. et K.V. KAPOOR(1976) IV. Pharmacological studies of Alkaloids of S. potatorum, *Planta Medica*, 29: 226-233.
73. DENOËL, A. (1958) *Matière médicale végétale*, 2 vol., 1157 p. Presses Universitaires de Liège.
74. KINGSTON, D.G.I., B.B. GERHART et F. IONESCU (1976) Isolation, structural elucidation and synthesis of tabernamine, a new cytotoxic bis-indole alkaloid from Tabernaemontana johnstonii, *Tetr. Letters*: 649-652.
75. ANGENOT, L., O. DIDEBERG et L. DUPONT (1975) Isolation and structure of akagerine: a new type of indole alkaloid, *Tetr. Letters*: 1357-58.
76. DUPONT, L., O. DIDEBERG et L. ANGENOT (1975) Structure cristalline et moléculaire d'un nouvel alcaloïde indolique; l'akagerine: $C_{20}H_{24}N_2O_2$, *Acta Crystall.* 31B: 2378-2383.
77. VERPOORTE, R., A. BAERNHEIM-SVENDSEN et F. SANDBERG (1975) Alkaloids of S. camptoneura, *Acta Pharm. Suecica*, 12: 455-460.
78. F. SANDBERG, Communication personnelle du 9.11.1976.
79. LE MEN, J. et W.I. TAYLOR (1965) A Uniform Numbering System for Indole Alkaloids, *Experientia*, 21: 508-510.
80. BATTERSBY, A.R. (1971) Biosynthesis II. Terpenoid Indole Alkaloids dans "The Alkaloids - Specialist Periodical Reports", The Chemical Society, London, 1: 31-47.
81. GUARNACCIA, R., L. BOTTA et C.J. COSCIA (1974) Biosynthesis of Acidic Iridoid Monoterpene Glucosides in Vinca rosea, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 7079-7084.
82. Mc KILLOP A. (1969) An Introduction to the Chemistry of the Alkaloids, 212 p. Butterworths, éd., London.
83. KLYNE, W. et J. BUCKINGHAM (1974) Atlas of Stereochemistry - Absolute Configurations of Organic Molecules, 311 p. CHAPMAN and HALL, éd., London.
84. HESSE, M. (1974) Indolalkaloide Teil 1: Text, 271 p. Teil 2: Spektren, 98 p., *Progress in Mass Spectrometry*, Ed. H. BUDZIKIEWICZ, Verlag Chemie, Weinheim.
85. SADTLER RESEARCH LABORATORIES (1974) Nuclear Magnetic Resonance Spectra.
86. BINDRA, J.S. (1973) Oxindole alkaloids in *The Alkaloids Chemistry and Physiology*, Ed. R.H.F. MANSKE, vol. XIV, Academic Press - New York-London, p. 84-122.

87. SAXTON, J.E. (1973) Alkaloids of Mitragyna and related genera in The Alkaloids, Chemistry and Physiology, vol. XIV, Academic Press, New York-London, p. 123-156.
88. JOULE, J.A. (1975) Indole Alkaloids in "The Alkaloids - Specialist Periodical Reports", vol. 5, p. 182-227, The Chemical Society, ed. London.
89. SCOTT, A.I. (1964) Interpretation of the Ultra-violet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, p. 172-179 et 287-303.
90. ANGENOT, L. (1970) Essais phytochimiques sur quelques plantes médicinales du Rwanda oriental, Pl. médecin. Phytoth., 4: 263-275.
91. GABETTA, B. et G. MUSTICH (1975) Spectral data of indole alkaloids 449 p. Inverni della Beffa, éd., Milan.
92. DIDEBERG, O., J. LAMOTTE-BRASSEUR, L. DUPONT, H. CAMPSTEYN, M. VERMEIRE et L. ANGENOT (1977) Structure cristalline et moléculaire d'un nouvel alcaloïde bis-indolique: la strychnofoline: $C_{30}H_{34}N_4O_2$ Acta Cryst. (sous presse)
93. DUPONT, L., J. LAMOTTE-BRASSEUR, O. DIDEBERG, H. CAMPSTEYN, M. VERMEIRE et L. ANGENOT (1977) La structure cristalline et moléculaire d'un nouvel alcaloïde bis-indolique: la strychnopentamine: $C_{35}H_{43}N_5O$, Acta Cryst. (sous presse).
94. KOCH, M., M. PLAT et N. PREAUX (1973) Structure et hémisynthèse des ochrolifuanines A et B, Alcaloïdes d'Ochrosia lifuana GUILL. (Apocynacées), Pl. médecin. Phytoth. 7: 241-246; Bull. Soc. Chim. Fr. : 2868.
95. VANVACAS, C., W.V. PHILIPSBORN, E. SCHLITTLER, H. SCHMID et P. KARRER (1957) Über die Konstitution des Melinonins-B, Helvetica Chimica Acta, 40, 1793-1808.
96. KOCH, M.C., M.M. PLAT, N. PREAUX, H.E. GOTTLIEB, E.W. HAGAMAN, F.M. SCHELL et E. WENKERT (1975) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Naturally Occuring Substances, XXXIII. The Ochrolifuanines and Emetine, J. Org. Chem., 40, 2836-38.
97. TRAGER, W.F., C.M. LEE et A.H. BECKETT (1967) Corynantheidine Type Alkaloids I Establishment of physical criteria for the normal, pseudo, allo and epiallo configurations by conformational analysis Tetrahedron, 23, 365-374.
98. LEE, C.M., W.F. TRAGER et A.H. BECKETT (1967) Corynantheidine Type Alkaloids II Absolute configuration of mitragynine, speciociliatine, mitraciliatine and speciogynine, Tetrahedron, 23, 375-385.