

**TRAVAUX
ET DOCUMENTS
DE L'O.R.S.T.O.M.**

**ÉTUDE D'UNE PLANTE
MÉDICINALE MALGACHE
BUXUS MADAGASCARICA Baill.
ET SES VARIÉTÉS**



Roger Solofo RAZAFINDRAMBAO



ÉDITIONS DE L'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

RENSEIGNEMENTS, CONDITIONS DE VENTE

Pour tout renseignement, abonnement aux revues périodiques, achat d'ouvrages et de cartes, ou demande de catalogue, s'adresser à :

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DE L'ORSTOM
70-74, route d'Aulnay, 93140 BONDY (France)

- Tout paiement sera effectué par virement postal ou chèque bancaire barré, au nom de : Régie d'avance SSC ORSTOM 70, route d'Aulnay, 93140 BONDY, compte-courant postal 9152-54 PARIS.
- Achat au comptant possible à la bibliothèque de l'ORSTOM, 24, rue Bayard, 75008 PARIS.

REVUES ET BULLETIN DE L'ORSTOM

I. CAHIERS ORSTOM

a) Séries trimestrielles :

- Entomologie médicale et parasitologie
- Hydrobiologie
- Hydrologie
- Océanographie
- Pédologie (1)
- Sciences humaines

Abonnement : France 95 F ; Etranger : 115 F.

b) Série semestrielle :

- Géologie
- Abonnement : France 75 F ; Etranger : 80 F.

c) Séries non encore périodiques :

- Biologie (3 ou 4 numéros par an)
- Géophysique

Prix selon les numéros

II. BULLETIN ANALYTIQUE D'ENTOMOLOGIE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE

12 numéros par an (en 14 fascicules)

Abonnement : France 75 F ; Etranger 85 F.

(1) Masson et Cie, 120 bld Saint-Germain, F 75280, Cedex 06, dépositaires de cette série à compter du vol.VIII, 1970. Abonnement France : 96 F Etranger : 134 F.

Nous vous rappelons :

dans la collection «Mémoires de l'O.R.S.T.O.M.»

n° 36 - Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville)
A. BOUQUET - 282 p., 3 pl. (21 phot.), tables et index.alphab.
110 F

dans la collection «Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M.»

n° 8 - Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar
M. DEBRAY, H. JACQUEMIN, R. RAZAFINDRAMBAO -
150 p., tabl., index.
28 F

TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'O.R.S.T.O.M.

N° 25

O.R.S.T.O.M.

PARIS

1973

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que « les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1er « de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée « par les articles 425 et suivants du Code Pénal ».

ÉTUDE D'UNE PLANTE
MÉDICINALE MALGACHE
BUXUS MADAGASCARICA Baill.
ET SES VARIÉTÉS

Roger Solofo RAZAFINDRAMBAO

Sommaire

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE	3
I - La famille des Buxacées	5
II - Le genre <i>Buxus</i>	5
A - Dans le monde	5
B - A Madagascar	7
III - Le <i>Buxus madagascari</i> Baill.	7
A - Travaux antérieurs	7
B - Travaux personnels	10
IV - Conclusions	24
DEUXIEME PARTIE : ETUDE CHIMIQUE	25
Chapitre I : Généralités	27
I - Travaux antérieurs	27
II - Tests préliminaires	27
A - Réactions chimiques	28
B - Chromatographies sur papier	31
C - Conclusions	31
Chapitre II : Etude particulière des composés polyphénoliques des feuilles	33
I - Composés flavoniques	33
A - Extraction :	33
B - Etude de l'extrait butanolique	33
C - Obtention des génines	34

II - Acides-phénols	39
A - Extraction	39
B - Chromatographie sur couche mince	39
III - Conclusions	40
Chapitre III : Etude des Alcaloïdes	43
I - Partie théorique	43
A - Historique	43
B - Nomenclature des Alcaloïdes des <i>Buxus</i>	43
C - Liste des Alcaloïdes des <i>Buxus</i>	45
D - Alcaloïdes du <i>Buxus madagascariensis</i> subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	56
II - Partie expérimentale	59
A - Méthode d'extraction	59
B - Méthode d'isolement	62
Description des constantes physiques et spectres	68
III - Conclusions	70
 TROISIEME PARTIE : ETUDE PHYSIOLOGIQUE	 83
I - Travaux antérieurs	85
II - Essais préliminaires de la toxicité	86
A - Généralités	86
B - Protocole expérimental	86
C - Résultats	86
 CONCLUSIONS GENERALES	 89
 BIBLIOGRAPHIE	 91

Introduction

L'étude des plantes médicinales peut être abordée de trois manières différentes :

- par l'enquête ethno-botanique, permettant de sélectionner les plantes utilisées en médecine populaire,
- par la phytochimie ou analyse chimique de certaines familles renfermant des substances douées de pouvoir thérapeutique confirmé,
- par l'inventaire systématique de toute flore d'une région ou d'un pays.

Des plantes médicinales malgaches ont fait déjà l'objet des recherches, au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie de Paris, en particulier avec les thèses de Melle M.L. TERRAC (1947), C. RABENORO (1949) et J.M. TOUCHAIS (1956). Il faut aussi mentionner les importants travaux concernant la flore de Madagascar réalisés par H. HUMBERT, H. PERRIER DE LA BATHIE et continués par BOSSER, R. CAPURON et les équipes des botanistes du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris et de l'ORSTOM de Tananarive.

De par notre travail à l'ORSTOM, nous avons combiné l'ethno-botanique et l'inventaire systématique de la flore malgache. Nous avons déjà publié, en collaboration avec M. DEBRAY et H. JACQUEMIN, un ouvrage intitulé :

“Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar”, nous étant personnellement occupé des plantes des Hauts-Plateaux. Par ailleurs, lors d'une tournée dans le Sud de l'Ile, en pays Bara, avec M. le Pharmacien Commandant M. DEBRAY, et suivant les indications d'un compatriote, nous avons récolté en 1968, le “MANDOKALAHY”, employé contre les maux d'estomac. Cette plante a été identifiée, par la suite, à une variété du *Buxus madagascariensis* Baill. subsp. *xerophila*, et s'est avérée, d'après les essais préliminaires réalisés au laboratoire, très riche en alcaloïdes.

D'autres variétés de cette plante sont signalées par H. PERRIER DE LA BATHIE et R. CAPURON, et nous avons pensé à leur étude comparative. Mais les difficultés de récolte nous ont obligé à limiter cette étude à trois échantillons : *Buxus madagascariensis* espèce-type, *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *silicicola* et *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *calcicola*.

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, nous exprimons à M. le Professeur G. CAMUS, Directeur Général de l'ORSTOM, dont la sollicitude nous a permis de mener à terme cette thèse, notre profonde gratitude.

Nous adressons nos sentiments de respectueuse reconnaissance à M. le Professeur R. PARIS, qui nous a initié dès 1966 à l'étude des substances d'origine végétale, a dirigé, avec compétence et bienveillance, nos travaux et nous fait le grand honneur de présider notre Jury.

Dès notre séjour à la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de Bordeaux en 1957, M. le Professeur MESNARD nous a guidé en nous accueillant dans son laboratoire. Depuis, il n'a cessé de s'intéresser à notre travail et accepte actuellement de siéger dans notre Jury. Qu'il nous soit permis de lui témoigner notre reconnaissance et notre sincère attachement.

Nous tenons à remercier M. le Professeur P. DELAVEAU qui a bien voulu faire partie de notre Jury.

M. le Professeur A. CAVE, nous a aidé dans l'étude des alcaloïdes de *Buxus* et accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici, l'expression de notre gratitude.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. le Professeur M.M. JANOT de la Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université René Descartes de Paris et Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, qui nous a aimablement accepté dans son service.

Nous adressons nos vifs remerciements à M. R. GOUTAREL, Directeur scientifique au CNRS, qui nous a reçu avec bienveillance dans son service de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles et s'est beaucoup intéressé à cette étude.

Nous sommes tout particulièrement reconnaissant à Madame F. KHUONG-HUU-LAINE, Maître de Recherche au CNRS, qui nous a dirigé avec complaisance et patience et nous a fait profiter de sa grande expérience dans le domaine des alcaloïdes des *Buxus*. Qu'elle trouve ici, nos biens sincères remerciements.

Que M. H. GUERIN, Maître des Conférences Honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris, veuille bien recevoir nos remerciements : il nous a prodigué d'utiles conseils dans la partie botanique de ce travail.

Les directives que Madame H. MOYSE, Assistante au laboratoire de Matière Médicale, nous a donné avec gentillesse au cours de notre séjour au laboratoire, nous ont été très précieuses. Nous l'en remercions de tout cœur.

L'étude de la plante nous a été suggérée par Monsieur le Pharmacien Commandant DEBRAY dont l'aide constante nous a été précieuse au cours de nos travaux. Qu'il soit assuré de notre gratitude.

Notre gratitude va à tous ceux ou celles qui nous ont aidé à divers titres :

MM. H. JACQUEMIN, Maître de Recherches à l'ORSTOM, J.B. CHAZAN, Docteur-ès-sciences (Plantes Médicinales), Mlle Y. VEYRET, Maître de Recherches à l'ORSTOM (Botanique) et tout le personnel malgache de la section des Plantes médicinales de l'ORSTOM de Tananarive.

Nos camarades du Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie et plus particulièrement Mlle S. DURET, Mme SON CHAN, M. TEDENEKE, pharmaciens, Mme S. JOUSSET et Mlle E. HENRI.

Mme GEDOVIVUS du Laboratoire National de la Santé Publique (pour les essais de toxicité).

Nos camarades du Laboratoire de l'I.C.S.N., Mme A. MILLIET, M.M. BENECHIE, et plus particulièrement Mme M.J. MAGDELEINE.

Les services de Spectrométrie de masse, de RMN (Mmes ALAIS et KORNPBOST), d'Extraction (M. ESCAUT) et de Micro-Analyse de l'I.C.S.N.

Première partie

ETUDE BOTANIQUE

I - LA FAMILLE DES BUXACEES

La famille des Buxacées, appartenant à la classe des Dicotylédones, sous-classe des Dialypétales, est généralement rattachée à l'ordre des Tricoques. Une partie des plantes qu'elle comprend aujourd'hui était rangée dans la famille des Euphorbiacées, sous le nom de Buxées. Mais H. BAILLON a montré en 1859 qu'elles avaient une organisation très différente des Euphorbiacées, et a suggéré la création d'une famille qu'il plaça à côté des Célastracées. CHADEFAUD et EMBERGER (1960) rattachent les Buxacées aux Térébinthales, l'absence des laticifères et le mode de déhiscence du fruit les éloignant des Euphorbiacées.

La famille, ne comprenant que le seul genre *Buxus* au début, s'enrichit par la suite de plusieurs genres et espèces. D'après MATHOU (1940), elle comporte trois tribus (Buxées, Pachysandrées, Smimondsiées) et six genres (*Buxus*, *Notobuxus*, *Pachysandra*, *Sarcococca*, *Styloceras*, *Smimondsia*).

Actuellement, on dénombre environ 80 espèces de ces plantes toujours vertes, disséminées dans les régions chaudes et tempérées. H. PETTIER DE LA BATHIE (1952) indique qu'elle est représentée à Madagascar par le seul genre : *Buxus*.

II - LE GENRE BUXUS LINNE

A - DANS LE MONDE

Ce genre défini par TOURNEFORT en 1719, comprenait à l'origine une seule espèce : *Buxus sempervirens*. Le *Buxus balearica* et les *Tricera*, espèces américaines, sont décrits en 1797. MATHOU (1940) distingue dans le genre quatre sections : *Eubuxus*, *Austrobuxus*, *Tricera*, *Probuxus*. Le tableau suivant, établi d'après l'Index KEWENSIS et ses suppléments, comprend toutes les espèces répertoriées dans le monde jusqu'à présent, avec leur pays d'origine.

NOM DE L'ESPECE	PAYS D'ORIGINE
<i>acuminata</i> , Muell.	Cuba
<i>aneura</i> , Urb.	Cuba

<i>australis</i> , A Cunn. ex Steud	Australie
<i>austro-yunnanensis</i> , Hatusima	Chine (Yunnan)
<i>bahamensis</i> , Baker	Bahamas
<i>balearica</i> , Lam	Baléares
<i>bartlettii</i> , Standley	Honduras
<i>benguellensis</i> , Gilg.	Afrique tropicale
<i>bodinieri</i> , Léveillé	Chine (Kweichan)
<i>breviceps</i> , Urb.	Cuba
<i>calophylla</i> , Pax	Abyssinie
<i>cephalantha</i> , Léveillé et Vaniot	Chine
<i>citrifolia</i> , Spreng	Amérique australe
<i>cochinchinensis</i> , Pierre ex-Gagnep	Cochinchine
<i>colchica</i> , Pojark	Caucase
<i>conzattii</i> , Standley	Mexico
<i>cubana</i> , Baill.	Cuba
<i>ekmanii</i> , Urb.	Cuba
<i>excisa</i> , Urb.	Cuba
<i>fortunei</i> , Carr.	Chine
<i>glomerata</i> , Muell.	Cuba
<i>gonoclada</i> , Muell.	Cuba
<i>hainanensis</i> , Merrill	Chine (Hainan)
<i>harlandi</i> , Hance	Chine
<i>hebecarpa</i> , Hatusima	Chine (Szechuan)
<i>henryi</i> , Mayr.	Chine
<i>heterophylla</i> , Urb.	Cuba
<i>hildebrandtii</i> , Baill.	Afrique tropicale
<i>hirta</i> (Hutchinson) Mathou = <i>B. benguellensis</i> var. <i>hirta</i>	
<i>holttumiana</i> , Hatusima	Chine (Hupeh)
<i>ichagensis</i> , Hatusima	Chine (Hupeh)
<i>imbricata</i> , Urb.	Cuba
<i>intermedia</i> , Hatusima	Chine (Yunnan)
<i>intermedia</i> , Kanehira	Formose
<i>japonica</i> , Muell.	Japon
<i>laevigata</i> , Spreng	Jamaïque
<i>lancifolia</i> , T.S. Brandegée	Mexico
<i>latistyla</i> , Gagnep	Indochine (Laos, Annam)
<i>linkinensis</i> , Makino	Liukiu
<i>loheri</i> , Merrill	Iles Philippines
<i>longifolia</i> , Boiss.	Syrie
<i>macowwani</i> , Oliver	Afrique tropicale
<i>macrocarpa</i> , Capuron	Madagascar
<i>madagascariensis</i> , Baill.	Madagascar
<i>malayana</i> , Ridl.	Malaisie
<i>megistophylla</i> , Léveillé	Chine (Kweichan)
<i>mexicana</i> , T.S. Brandegée	Mexico
<i>moana</i> , Alain	Cuba
<i>muelleriana</i> , Urb.	Cuba
<i>myrica</i> , Léveillé	Chine (Kweichan)
<i>nana</i> , Hort ex-Journ. = <i>B. sempervirens</i> var. <i>nana</i>	
<i>nyasica</i> , Hutchinson	Nyasaland
<i>nyrcana</i> , Pojark	Caucase
<i>obovata</i> , Urb.	Cuba

<i>olivacea</i> , Urb.	Cuba
<i>pachyphylla</i> , Merrill.	Cuba
<i>papilosa</i> , C.K. Schneider	Inde orientale
<i>pilosula</i> , Urb.	Cuba
<i>portoricensis</i> , Alain	Portorico
<i>pubescens</i> , Greenm	Mexique
<i>pubifolia</i> , Merrill.	Indochine (Annam)
<i>pubiramea</i> , Merril. et Chun	Chine (Hainan)
<i>pulchella</i> , Baill.	Jamaïque
<i>purdieana</i> , Baill.	Jamaïque
<i>retusa</i> , Muell.	Cuba
<i>rheedioides</i> , Urb.	Cuba
<i>riparia</i> (Makino) Makino = <i>Buxus sempervirens</i>	
<i>rivularis</i> , Merrill.	Philippines (Luzon)
<i>rolfei</i> , Vidal	Philippines
<i>rugulosa</i> , Hatusima	Chine (Yunnan)
<i>rupicola</i> , Ridley	Malaisie
<i>sempervirens</i> , Linn.	Europe Orientale, Asie tempérée
<i>stenophylla</i> , Hance	Chine
<i>subcolumnaris</i> , Muell.	Inde occidentale
<i>vahlilii</i> , Baill.	Inde occidentale
<i>wrightii</i> , Muell.	Cuba

B – MADAGASCAR

D'après H. PERRIER DE LA BATHIE (1952), on ne trouve qu'une seule espèce à Madagascar : *Buxus madagascariensis* Baillon, comportant trois sous-espèces : *sambiranensis*, *tropophila*, *xerophila*. Mais en 1960, R. CAPURON a décrit une autre espèce : *Buxus macrocarpa*, à gros fruits.

III - LE BUXUS MADAGASCARICA Baill.

Cette espèce est décrite par H. BAILLON en 1859.

A – TRAVAUX ANTERIEURS

1 – Répartition géographique

L'espèce-type se trouve en différents endroits, localisés dans le domaine de l'Est (Foulpointe, Ambila-Lemaitso, Tampina, Nosy-Varika, Fort-Dauphin).

Les trois sous-espèces, décrites par H. PERRIER DE LA BATHIE (1952), correspondent aux trois domaines floristiques de l'île :

- a) *sambiranensis* (Massif de Manongarivo : Domaine de Sambirano)
- b) *trophophila* (Plateau de l'Ankara-Morondava : Domaine de l'Ouest)
- c) *xerophila* (Domaine du Sud).

La seconde espèce, décrite en 1960 par R. CAPURON, est connue à un seul exemplaire : *Buxus macrocarpa*. Elle a été récoltée dans la région de Maroantsetra (Baie d'Atongil), vers 800 m. d'altitude.

La comparaison des feuilles du *Buxus macrocarpa* R. CAPURON (6-9,5 x 2-3,4 cm) avec celles très polymorphes du *Buxus madagascariensis*, ne permet pas de différencier les deux espèces. Par contre, les fruits de *Buxus madagascariensis*, ne dépassant guère 5-6 mm sont nettement plus petits que ceux du *Buxus macrocarpa*, dont les dimensions atteignent 3 cm de long et 2,5 cm de large.

Ces différentes données sont portées sur la carte (fig. 1), dressée d'après les récoltes effectuées par H. PERRIER DE LA BATHIE, R. CAPURON et nous-mêmes.

2 — Morphologie

Description, d'après H. PERRIER DE LA BATHIE (1952) :

Buxus madagascariensis, Baill.

“Arbuste de 2 à 5 m. de haut, très ramifié, très glabre, à feuilles persistantes et hétéromorphes (forme de jeunesse) ; rameaux ultimes de 1 - 2 mm de diamètre, tétragone puis costulés-ridés. Feuilles opposées, rigides et coriaces, distantes entre chaque paire de 1,5 - 3 cm, celles des jeunes pieds non encore ramifiés linéaires (20-45 x 1-2 mm), sessiles, un peu atténuées presque du sommet à la base, obtuses et uninerves ; celles des rameaux supérieurs ovales - lancéolées, ou lancéolées, variables de grandeur (de 2 x 1 cm à 9 x 4,8 cm) sur un même rameau, en coin et atténuées en un court pétiole (au plus 2-3 mm sur les plus grandes feuilles), atténuées-obtuses au sommet ; nervures-secondaires peu distinctes sur les 2 faces du limbe. Fleurs en petits glomérules axillaires de 2-4 fleurs sessiles, petites et peu visibles (2-3 mm de haut ; bractées 4 sous chaque fleur, écailleuses-brunâtres et petites (à peine 0,5 mm de haut) ; sépales 4, appliqués sur le dos des étamines et plus courts qu'elles, de couleur plus claire que les bractées, obtus un peu inégaux, de 1,5 mm de haut ; étamines 4, sessiles ; anthères oblongues, épaisses, hautes de 2 mm, coalescentes entre elles ; rudiment d'ovaire nul. Fleur ♀ sessiles, solitaire et terminale ou parfois au milieu d'un glomérule de fleurs ♂, entourée de bractées semblables ; sépales 4, plus grands, plus coriaces, plus longs que larges ; 3 styles (parfois 2), divariqués et recourbés au sommet, longs de 3 mm ; fruit à 2-3 valves bicornues au sommet ; pubérolentes-farineuses sur la face interne ; coques lisses, d'un jaune clair ; graines noires, luisantes.”

Subsp. *sambiranensis* H. Perr.

“Diffère de la forme typique par les feuilles des rameaux supérieurs souvent ovales, plus petites (3-4 x 1,5-2,2 cm) et nettement acuminées-aiguës et par les nervures secondaires plus saillantes, bien visibles sur les 2 faces du limbe”.

Subsp. *trophophila* H. Perr.

“Sépales presque aussi larges que hauts (suborbiculaires) ; rameaux plus grêles que sur la forme précédente et le type ; feuilles plus minces, étroitement lancéolées (4,7-6 x 1-1,4 cm), à plus grande largeur au tiers ou au quart inférieur, de ce point atténuées en coin aigu sur le pétiole grêle (1-3 mm) et longuement acuminées-aiguës au sommet ; nervures secondaires peu visibles sur les 2 faces.”

Subsp. *xerophila* H. Perr.

“Sépales comme sur la sous-espèce précédente, mais feuilles glauques sur le vif, très coriaces, oblancéolées ou presque obovales, petites (1,6-2,3 x 0,8-1 cm), atténuées en coin du milieu ou du tiers

supérieur à la base, obtuses ou parfois très courtement acuminées au sommet et à nervures secondaires invisibles sur les 2 faces. Les sépales de la fleur ♀ ont 2,1 mm de haut sur 2 mm de large.”

Ces derniers spécimens ont des feuilles plus minces, plus vertes, à nervures visibles en-dessus quand elles sont jeunes, à sommet plus obtus souvent même émarginé (f. *silvicola*) que les exemplaires du type (f. *calcicola*).

3 – Anatomie

a. Feuille

Deux études sont à citer :

α. Celle de POUCHET (1930) qui en donna la description suivante :

Nervure principale formant un plateau saillant à la face supérieure. Formations libéro-ligneuses en V très ouvert. Mésophylle avec épiderme palissadique, puis un parenchyme sans lacunes visibles et un épiderme inférieur stomatifère. Présence de quelques macles d'oxalate de calcium, mais pas de cristaux isolés.

β. Celle de MATHOU (1940) dont les observations sont les suivantes :

Pétiole à épiderme inférieur pilifère et à macles abondantes. Nervure médiane de la feuille du limbe à section caractéristique. Epiderme inférieur cutinisé ; parenchyme à cellules collenchymateuses, puis à scléréides ; arc conducteur très ouvert ; parenchyme inférieur à scléréides isodiamétriques ; épiderme inférieur à cuticule épaisse. Epiderme supérieur à cellules hautes. Parenchyme à cellules palissadiques, puis à cellules ovales, stomatifères et contenant des cellules maclifères.

b. Tige

MATHOU (1940) mentionne les caractères suivants :

Epiderme à paroi supérieure épaisse, cutinisée, à stomates, poils scléreux. Ecorce avec scléréides et quelques petites macles. Méristèles corticales dans les angles. Péricycle à fibres rares. Liber peu développé. Rayons médullaires à cellules uniseriées, très étroites, Trachéides à ponctuations aréolées. Moelle lignifiée avec de petites macles.

c. Racine

A notre connaissance, aucune étude n'a été faite.

4 – Histochimie

POUCHET (1930) en utilisant différents réactifs, a mis en évidence un changement de coloration des cellules, mais n'est pas formel, quant à la révélation des alcaloïdes, par la méthode histochimique. Il reconnaît la présence des alcaloïdes dans le parenchyme cortical de la nervure, le mésophylle, et les rayons médullaires, principalement au niveau du liber.

MATHOU (1940) localise les alcaloïdes dans :

a. **Tige** : quelques cellules épidermiques, un grand nombre d'éléments corticaux, éléments volumineux du péricycle et du liber, petites cellules pérимédullaires et gros éléments de la moelle.

b. Pétiole et nervure de la feuille : même localisation que dans la tige.

c. Mésophylle : certaines cellules épidermiques, éléments de l'assise contiguë à chaque épiderme, nombreuses cellules de la zone moyenne.

B – TRAVAUX PERSONNELS

1 – Echantillons récoltés

Cette étude concerne TROIS échantillons récoltés :

a. le premier dans la forêt sublittorale de l'est (près du village d'Ambila-Lemaitso) : c'est l'espèce-type ;

b. le deuxième, dans la portion de la forêt de Zombitse, s'étendant de deux côtés de la route de Tananarive-Tuléar sur 11 km (pk 792 au pk 801), près de la ville de Sakaraha; à noter que l'échantillon provient d'une région moins sèche que celle où PERRIER DE LA BATHIE a récolté l'échantillon type (plateau Mahafaly) ;

c. le troisième, dans la zone comprise entre les hautes falaises dominant le petit village de Lavanonô, sous-préfecture d'Ambovombe, et la mer.
(Voir fig. 1 : carte de répartition géographique).

2 – Ecologie

Les trois échantillons sont prélevés dans diverses régions de l'Ile (fig. 2 et 3), dont les caractères écologiques, relevés par H. HUMBERT et G. COURS DARNE (1965), sont rassemblés dans le tableau I.

3 – Morphologie

a. Comparaison

Les observations faites sur les trois échantillons, représentés sur les fig. 4, 5, 6, 7 et 8, au point de vue morphologique, sont consignées dans le tableau II.

b. Conclusion

Le port, d'une part, l'aspect et les dimensions des feuilles, d'autre part, permettent une nette distinction des trois échantillons.

4 – Anatomie

a. Généralités

La méthode fait intervenir la double coloration :

- safranine colorant en rouge les parties ligneuses
- bleu-vert colorant en bleu-vert les parties celluloses.

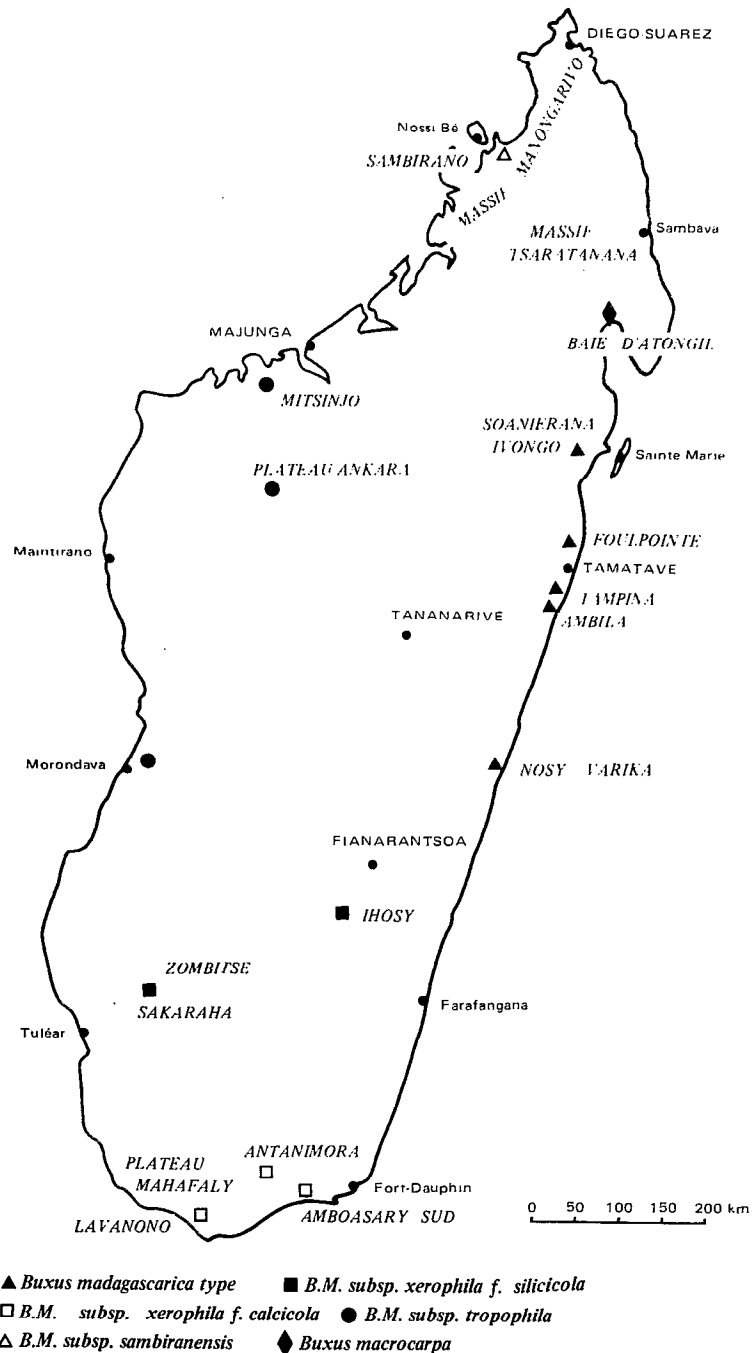


FIGURE 1
Carte de répartition géographique



FIGURE 2

FORET DE ZOMBITSE

Habitat du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *silicicola*

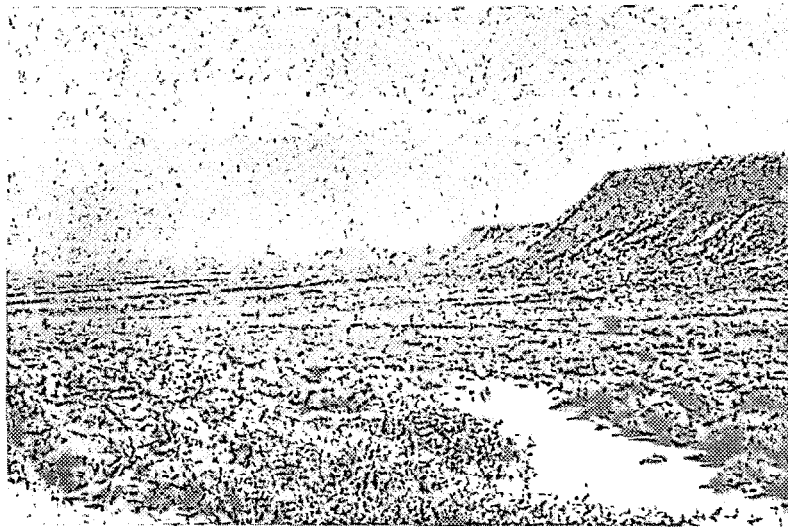


FIGURE 3

FOURRES "BUSH" DE LAVANONO

Habitat du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *calcicola*

TABLEAU I
Caractères écologiques des lieux de récolte

N° Echantillon	Localités	Types de végétation	Géologie	Sols	Bioclimats
N° 1 <i>Buxus madagascariensis</i> (espèce-type)	Ambila-Lemaitso (S/P. Brickaville)	Forêt sub-littorale	Grès (crétacé)	Sols ferrallitiques sous prairie	précipitation p : > 2 000 température moyenne t du mois le plus froid t > 20° nombre de mois secs = 0
N° 2 <i>Buxus madagascariensis</i> subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	Sakaraha (Forêt de Zombitse)	Forêt dense sèche sur sols acides	Calcaires (Jurassique)	Sols ferrugineux tropicaux sur roches acides	précipitation p : 600 ≤ p ≤ 1 000 température t du mois le plus frais : 15° ≤ t ≤ 20° nombre de mois secs = 7-8
N° 3 <i>Buxus madagascariensis</i> subsp. <i>xerophila</i> f. <i>calcicola</i>	Lavanono (S/P. Ambovombe)	Fourrés ("bush")	Sables (pliocène)	Sables dunaires	précipitation p : ≤ 400 température t du mois le plus frais : 15° ≤ t ≤ 20° nombre de mois secs = 9-11



FIGURE 4

Buxus madagascariensis subsp. *xerophila*
f. *silicicola*
(l'échantillon est l'arbre penché)



FIGURE 5

Buxus madagascariensis subsp. *xerophila*
f. *calcicola*



Fig. 6

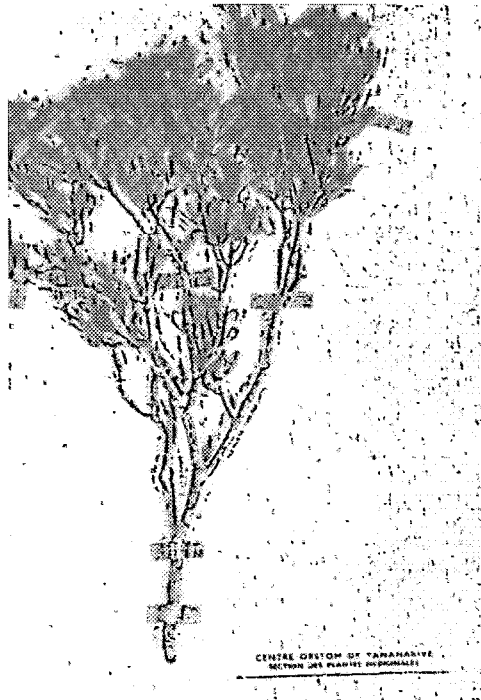


Fig. 8

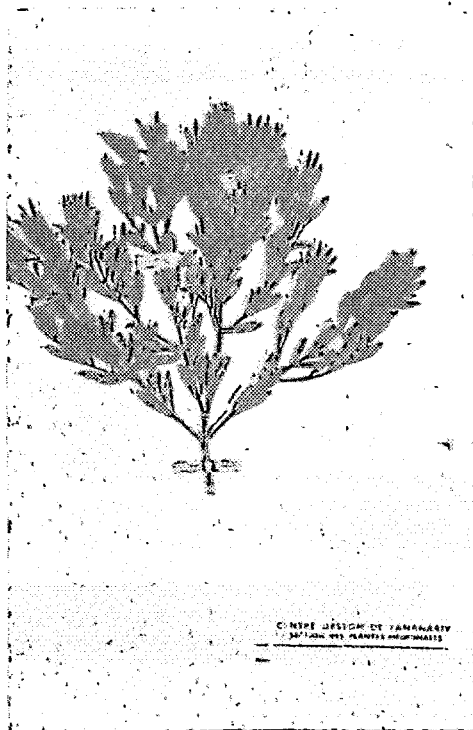


Fig. 7

FIGURE 6

Photographie d'un herbier du *Buxus madagascariensis* Baill. (type) (réduction 1/3).

FIGURE 7

Photographie d'un herbier du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *silicicola* (réduction 1/3)

FIGURE 8

Photographie d'un herbier du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *calcicola* (réduction 1/3).

TABLEAU II
Caractères morphologiques des trois échantillons du *Buxus madagascari*

Echantillon	1 - <i>B. madagascari</i> (type)	2 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	3 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>calcicola</i>
PORT	Arbuste de 1,5 à 2 m	Petit arbre de 7 à 8 m (fig. 4)	Arbuste de 0,50 à 1 m (fig. 5)
FEUILLES	Opposées, ovales, oblongues, atténuées à la base, glabres		
a) Caractères généraux communs			
b) Sommet	les unes légèrement acuminées, les autres obtuses	obtus	acuminé
c) Aspect	brillant surface supérieure	brillant surface supérieure	terne
d) Nervures	centrale très saillante au dessus, peu saillante au dessous, secondaires bien visibles s'anastomosant en une nervure marginale	centrale non saillante, secondaires visibles seulement par transparence	centrale non saillante, secondaires visibles, en saillie dans le limbe.
e) Dimensions (limbe)	4,5 - 5 cm de long 1,5 - 2,5 cm de large	1,5 - 2 cm de long 0,5 - 0,8 cm de large	1,2 - 4,5 cm de long 0,5 - 1,2 cm de large
f) Epaisseur (limbe)	mince : env. 0,25 mm	mince : env. 0,25 mm	nettement plus épaisse que 1 et 2, env. 0,5 mm.
TIGE	Section quadrangulaire aplatie, avec quatre ailes latérales		
a) Caractère général des tiges jeunes			
b) Ecorce	Fissurée, difficilement détachable	Fissurée, facilement détachable ; épaisseur : 1 mm pour 12 mm du diamètre du tronc.	Fissurée moins nette, difficilement détachable mince : 1 mm d'épaisseur pour un tronc de 12 mm de diamètre
RACINE	Fissurée, écorce facilement détachable		
a) Caractères généraux			
b) Epaisseur (écorce)	0,5 mm pour 14 mm de diamètre de la racine	1 mm pour 14 mm de diamètre de la racine	2 mm pour 15 mm de diamètre de la racine
FRUIT	capsule à 2 - 3 valves 2 - 3 mm de diamètre	Non récolté	capsule à 2 - 3 valves 4 - 6 mm de diamètre

Les coupes transversales, réalisées à l'aide d'un microtome à congélation, sont faites :

- pour les feuilles, au niveau de la nervure médiane et du limbe (fig. 9),
- pour les tiges et les racines, au même niveau, dans des organes de même âge.

b. Feuilles

α. Comparaison

Les tableaux III et IV rassemblent les caractères remarquables sur les coupes.

β. Conclusions

Nous observons la même structure dans les trois échantillons :

- épiderme supérieur cutinisé à épaisseur variable suivant les échantillons ;
- parenchyme palissadique ;
- mésophylle montrant les sections des nervures centrales et latérales ;
- éléments conducteurs : au niveau de la nervure centrale, un seul faisceau libéro-ligneux ;
- éléments conducteurs : au niveau des nervures latérales, structure identique à celle de la nervure médiane (vaisseaux spiralés visibles en coupe longitudinale) ;
- éléments de soutien : quelques fibres plus ou moins sclérifiées au voisinage des éléments conducteurs ;
- oxalate de calcium, sous forme des macles.

Nous distinguons comme différences :

- NERVURE MEDIATE : très saillante pour 1
non saillante et peu différenciée pour 2 et 3 ;
- EPIDERME : très cutinisé pour 3 ;
- CUTICULE : mamelonnée pour 3 ;
- le PARENCHYME PALISSADIQUE se continue d'une façon très nette dans la partie centrale pour l'échantillon 2 (existence d'une deuxième assise) ;
- POIL unicellulaire, présent uniquement dans l'échantillon 2.

c. Epiderme inférieur (stomates) fig. 10

Aucune différence notable ne permet de distinguer les trois épidermes, qui sont du type paracytique (deux cellules dont l'axe est parallèle à l'ostiole).

d. Jeunes tiges (1 à 1,5 cm de diamètre)

α. Description

En coupe transversale, nous pouvons distinguer, de l'extérieur à l'intérieur :

- un épiderme cutinisé
- un parenchyme cortical, contenant des traces foliaires, avec xylème et phloème, et des amas des fibres peu colorables dans le voisinage des traces foliaires
- un phloème

TABLEAU III

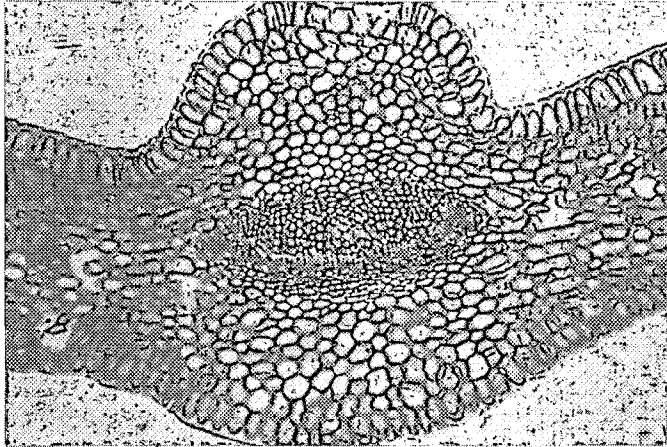
Caractères anatomiques des trois échantillons de feuilles du *Buxus madagascariensis*
 NERVURE MEDIATE (coupe transversale)

Echantillon	1 - <i>B. madagascariensis</i> (type)	2 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	3 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>calcicola</i>
NERVURE	Très saillante à la face supérieure	peu différenciée et non saillante	peu différenciée et non saillante
ASPECT DE LA SURFACE	lisse	lisse	mamelonnée
CUTICULE SUPERIEURE	assez épaisse : 12 μ	env. 12 μ d'épaisseur	très épaisse : env. 40 μ
EPIDERME SUPERIEUR	une assise de cellules, régulières rectangulaires, d'épaisseur 43 μ	une assise de cellules à section plus ou moins carrée : 37 μ d'épaisseur	cellules à section plus ou moins carrée d'épaisseur 37 μ
PARENCHYME PALISSADIQUE	inexistant au niveau de la nervure centrale	se continue au niveau de la nervure centrale, cellules d'épaisseur 37 μ Deux assises dont l'une est nettement palissadique et l'autre vaguement palissadique	s'arrête au niveau de la nervure centrale
PARENCHYME	homogène	homogène	homogène
FAISCEAU LIBEROLIGNEUX	en V très évasé, avec quelques rares fibres à large lumen	entouré des fibres plus ou moins lignifiées à paroi mince et large lumen du côté du phloème à paroi épaisse et lumen réduit du côté du xylème	avec quelques fibres épaisses à lumen réduit
EPIDERME INFERIEUR	une assise des cellules de 50 μ d'épaisseur, avec stomates	cellules stomatifères de 31 μ environ d'épaisseur	cellules à stomates d'épaisseur environ 31 μ
CUTICULE INFERIEURE	même épaisseur que cuticule supérieure	même épaisseur que cuticule supérieure	même épaisseur que cuticule supérieure
INCLUSIONS	oxalate de calcium en macles rares	nombreuses macles d'oxalate de calcium et des cellules à fins cristaux	beaucoup de cellules à oxalate de calcium

TABLEAU IV

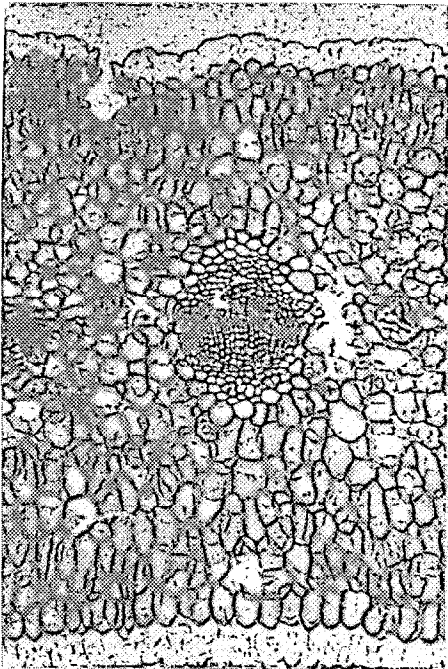
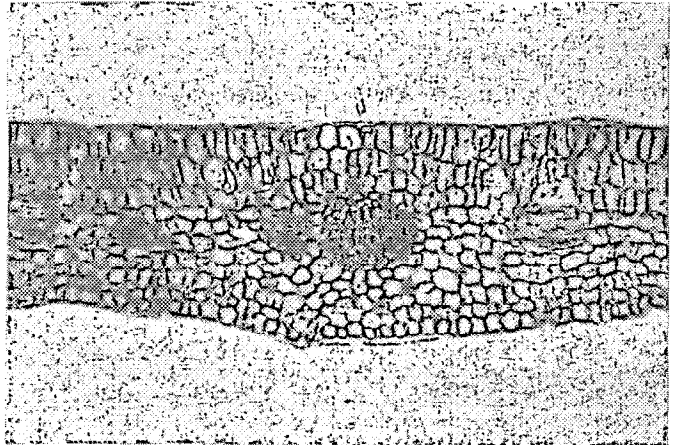
Caractères anatomiques des trois échantillons de feuilles du *Buxus madagascariensis*
LIMBE (Coupe transversale)

Echantillon	1 - <i>Buxus madagascariensis</i> (type)	2 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	3 - Subsp. <i>xerophila</i> f. <i>calcicola</i>
CUTICULE de l'épiderme supérieur	12 μ d'épaisseur	6 μ d'épaisseur	très épaisse et aussi haute que la cavité de l'épiderme : 50 μ d'épaisseur
EPIDERME SUPERIEUR	cellules à section plus ou moins rectangulaire : 62 μ d'épaisseur	cellules à section plus ou moins carrée : 50 μ d'épaisseur	cellules à section plus ou moins carrée : 50 μ d'épaisseur
PARENCHYME PALISSADIQUE	commence dans le limbe ; cellules nettement plus longues que larges épaisseur moyenne : 62 μ une à deux assises	2 couches de cellules, la deuxième moins haute que la première	une couche de cellules d'épaisseur moyenne 100 μ
MESOPHYLLE	lacuneux	homogène	homogène
FAISCEAU LIBEROLIGNEUX	même aspect dans les trois échantillons : certains coupés longitudinalement montrent des vaisseaux spiralés		
EPIDERME INFÉRIEUR	cellules à section carrée ou rectangulaire de 25 μ d'épaisseur moyenne avec stomates	cellules à section nettement carrée : env. 19 μ d'épaisseur avec stomates nombreux	stomatifère et de 31 μ env. d'épaisseur
CUTICULE de l'épiderme inférieur	6 μ d'épaisseur	même épaisseur que cuticule supérieure	env. 43 μ d'épaisseur
INCLUSIONS	oxalate de calcium en macles rares	nombreuses macles d'oxalate de calcium	nombreuses macles d'oxalate de calcium
OBSERVATIONS	structure nettement asymétrique	structure asymétrique Limbe plus mince que dans 1 et 3	structure asymétrique



1

2



3

FIGURE 9

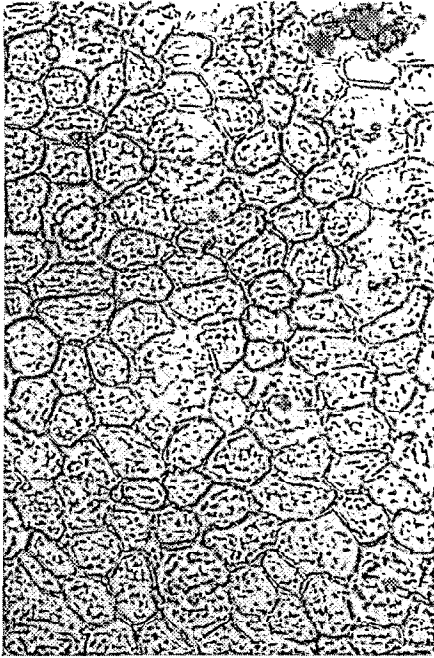
COUPES TRANSVERSALES
au niveau de la nervure médiane des feuilles
du *Buxus madagascariensis*

1 : espèce-type

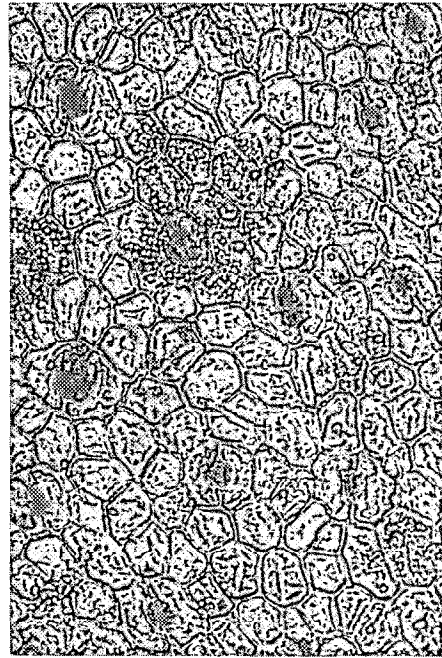
2 : subsp. *xerophila* f. *silicicola*

3 : subsp. *xerophila* f. *calcicola*

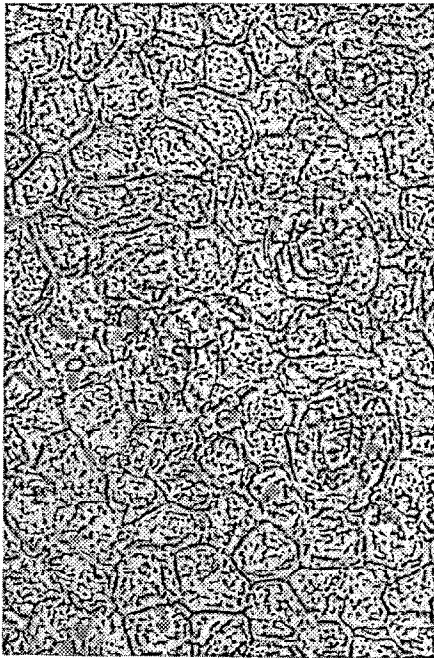
(grossissement 50)



1



2



3

FIGURE 10
PHOTOGRAPHIES épidermes inférieurs
du *Buxus madagascariensis*

- 1 : espèce-type
 - 2 : subsp. *xerophila* f. *silicicola*
 - 3 : subsp. *xerophila* f. *calcicola*
- (grossissement 128)

- un xylème
- une moelle.

Des macles d'oxalate de calcium, réparties dans les divers tissus et de rares fibres péricycliques, sont mises en évidence.

β. Conclusion

Nous pouvons dire que les trois coupes sont presque identiques, à part quelques différences peu spécifiques, à savoir :

- épaisseur de la cuticule, croissante de l'échantillon 1 à l'échantillon 3 ;
- des macles d'oxalate de calcium en quantité croissante de 1 à 3, et plus grosses dans 3.

Nous ne reproduisons donc que le schéma d'ensemble d'une coupe d'un seul échantillon (fig. 11).

e. Jeunes racines (1,5 à 2 cm de diamètre)

α. Description

La coupe transversale nous montre successivement :

- un suber assez épais et quelques assises de phelloderme surmontant directement le phloème,
- un phloème et un xylème.

Mentionnons la présence des très rares fibres péricycliques et quelques macles d'oxalate de calcium.

β. Conclusion

Nous retrouvons les mêmes caractères dans les trois échantillons. Deux différences à noter :

- la présence des quelques fibres lignifiées dans le liber pour 2 et 3, mais il faut signaler que ces fibres n'existent que dans les racines âgées pour 3 ;
- la présence des quelques macles d'oxalate de calcium pour 2 et 3, très nombreuses pour 3.

Ces différences, sans grande spécificité, ne permettent pas de différencier. La fig. 12 montre la coupe d'un seul échantillon (schéma d'ensemble).

5 – *Histochimie*

a. Alcaloïdes

– Méthode : nous faisons deux séries de coupes : les unes sont traitées directement par les réactifs généraux des alcaloïdes : réactif de DRAGENDORFF (solution d'iodo-bismuthite de potassium) colorant en brun rouge les cellules contenant les alcaloïdes, et réactif de BOUCHARDAT (solution iodo-iodurée) provoquant un précipité brun chocolat caractéristique des alcaloïdes, les autres préalablement traitées dans l'alcool tartrique (acide tartrique/alcool absolu : 1/20), qui dissout les alcaloïdes.

En comparant les deux séries de coupes, on vérifie qu'il s'agit des alcaloïdes et non des albuminoïdes.

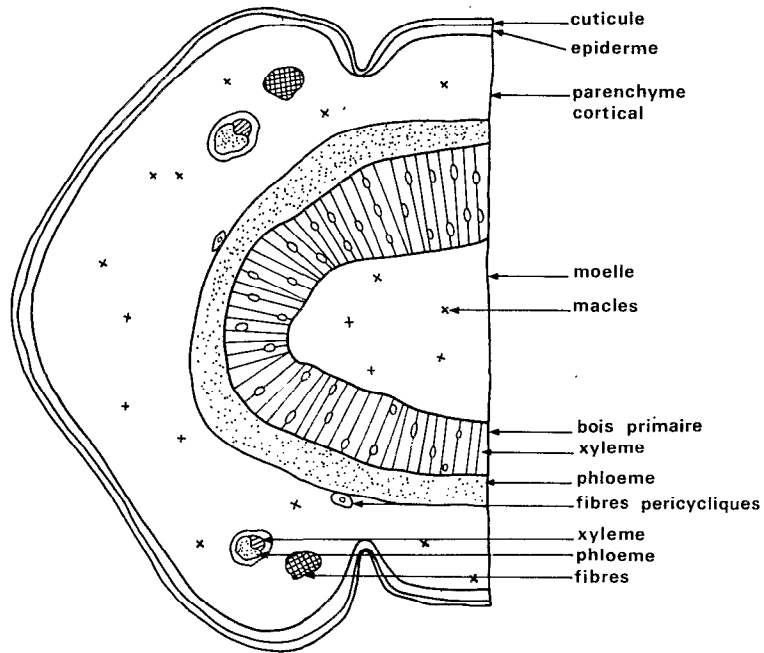


FIGURE 11
COUPE TRANSVERSALE
JEUNE TIGE
Buxus madagascariensis type

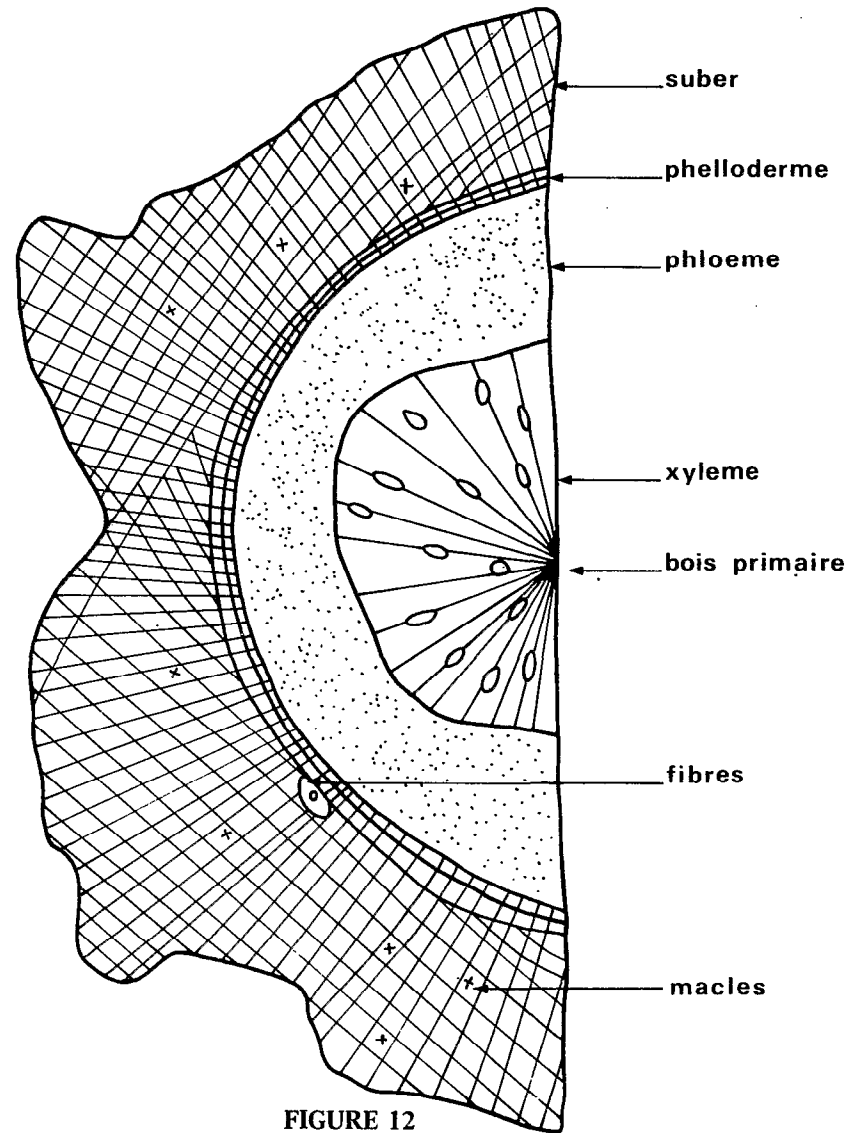


FIGURE 12
COUPE TRANSVERSALE
JEUNE RACINE
Buxus madagascariensis subsp. *xerophila* f. *calcicola*

- Résultats : nous localisons les alcaloïdes dans :
 feuilles : mésophylle surtout, cellules sous l'assise palissadique et en faible quantité dans l'assise palissadique,
 écorces des racines (où le rendement est le plus élevé) : phloème.

b. Polyphénols

– Méthode : c'est celle utilisée par H. GUERIN, P. DELAVEAU et R. PARIS (1971). Les coupes des feuilles des trois échantillons faites au microtome à main, sont plongées quelques secondes dans le réactif : chlorure d'aluminium à 5 p. 100 dans l'alcool éthylique. Elles sont montées au glycérol et examinées rapidement en lumière U.V. Deux sortes de fluorescence : jaune pour les flavonoïdes et bleue pour les acides-phénols.

– Résultats :

Nom de la plante	Flavonoïdes	Acides-phénols
Echantillon 1 <i>Buxus madagascariensis</i> (espèce-type)	Epidermes, quelques cellules du mésophylle et du parenchyme fondamental	Rares cellules du mésophylle
Echantillon 2 <i>Buxus madagascariensis</i> subsp. <i>xerophila</i> f. <i>silicicola</i>	Epidermes et rares cellules du mésophylle	Nombreuses cellules du mésophylle
Echantillon 3 <i>Buxus madagascariensis</i> subsp. <i>xerophila</i> f. <i>calcicola</i>	Epidermes et quelques cellules du mésophylle surtout au voisinage de l'épiderme inférieur et aux extrémités du limbe	Quelques cellules du mésophylle et épiderme supérieur

– Conclusions : nous constatons le même phénomène déjà observé par H. GUERIN, P. DELAVEAU et R. PARIS et divers auteurs : les flavonoïdes se trouvent dans les tissus les plus externes.

Peu de différences remarquées pour les 3 échantillons, quant à la localisation, mais l'existence dans l'échantillon 3 des acides-phénols dans l'épiderme supérieur semble être un caractère de différenciation.

IV - CONCLUSIONS

Il ressort de cette étude comparative que la morphologie et l'anatomie des feuilles montrent quelques différences entre les trois échantillons, mais, par contre l'anatomie des tiges et des racines est très voisine pour les trois lots et la localisation des alcaloïdes et des flavonoïdes identique. Mais les acides-phénols se rencontrent dans l'épiderme supérieur dans la variété 3 uniquement.

Deuxième partie

ETUDE CHIMIQUE

Chapitre I

GENERALITES

I - TRAVAUX ANTERIEURS

Divers constituants chimiques ont été isolés des différents *Buxus*, en dehors des alcaloïdes qui représentent jusqu'à 10 p. 100 des écorces des racines. En 1959, EARLE et col. ont indiqué que l'huile des graines du *Buxus sempervirens*, serait susceptible d'application industrielle. Cette huile est surtout composée des glycérides d'acides gras non saturés : oléique, linoléique et linoléinique (NARING et SADGOPAL - 1962). VIALA et col. (1962) ont étudié les acides organiques non volatils contenus dans les feuilles de *Buxus balearica* et ont mis en évidence par chromatographie sur papier, l'existence des acides oxalique, tartrique, citrique, malique, glycolique, maléique, malonique et d'une substance flavonique X ; les mêmes acides sont détectés dans le *Buxus sempervirens*, et de plus, les deux espèces citées renferment un peu d'acide propionique et d'acide butyrique.

D'autres auteurs mentionnent la présence des composés stéroïdiques dénommés buxpapinol (C₂₇ H₄₆ O) et buxpapininol (C₂₂ H₃₆ O₂) dans le *Buxus papilosa* (IKRAM et col. 1970). Ont été signalés des caroténoïdes : un pigment identifié à l'anhydroeschscholtzanthine (COSTES - 1969), α et β carotène ; de l' α - tocophérol ; des quinones : plastoquinone, plastoquinone, α - tocoquinone (LICHTENTHALER - 1968) du *Buxus sempervirens* ; des dérivés triterpéniques : lupéol et bétuline (NAKANO et col. - 1965) dans le *Buxus microphylla*. Notons, enfin, la mise en évidence des flavonols (kaempférol et quercétol) et des acides sinapique et férulique (BATE-SMITH - 1962) dans le produit d'hydrolyse acide d'un extrait des feuilles du *Buxus sempervirens*, et celle d'arbutoside dans la même espèce (GHODSI et NETIEN - 1970).

II - ESSAIS PRELIMINAIRES

Les trois échantillons des feuilles essayés sont récoltés presque à la même époque : échantillon 1 (espèce-type provenant de la région d'Ambila en novembre 1970), les échantillons 2 (de Sakaraha, forêt de Zombitse) et 3 (de Lavanono) en janvier 1971;

A – REACTIONS CHIMIQUES

1 – Sur l'infusé

Ces réactions sont faites avec de l'infusé à 10 p. 100 des feuilles de chaque échantillon, préparé en projetant 10 g de chaque drogue en petits fragments dans 100 ml d'eau bouillante. On filtre avec expression après 15 mn d'attente.

a. Recherche des anthocyanes

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
coloration infusé	jaune sale	jaune sale	rose pâle
+ HCl pur		pas de changement de coloration	
+ NH ₄ OH		pas de changement de coloration	

Donc, pas d'anthocyanes.

b. Recherche des tanins

	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Interprétation
Infusé + quelques gouttes Fe Cl ₃	coloration brune noirâtre	coloration jaune	coloration brunâtre	
Infusé + réactif de STIASNY (au bain- marie) formol HCl	précipité orange	précipité jaune	précipité orange	présence des tanins ca- téchiques ou cathécols
+ filtration + quelques gouttes de Fe Cl ₃	0	0	0	absence des tanins galli- ques
Infusé + HCl pur + chauffage	coloration rouge	0	coloration rougeâtre	présence des tanins ca- téchiques ou cathécols pour 1 et 3
Infusé + gélatine salée à 1 p. 100	louche	louche	0	présence de très faibles quantités de tanins ca- téchiques condensés

c. Recherche des flavonoïdes

Infusé (5 ml) + alcool chlorhydrique (solution de HCl/alcool 96^C/eau = ââ)
+ 2 copeaux de magnésium + alcool isoamylique

Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3
coloration rose	coloration rose pâle	coloration rose pâle

Donc, présence des flavonoïdes.

d. Recherche des leuco-anthocyanes

Infusé (5 ml) + alcool chlorhydrique + chauffage au bain-marie à 50° pendant quelques minutes.

Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3
rouge cerise	0	rougeâtre

Donc, présence des leuco-anthocyanes dans 1 surtout.

e. Recherche des saponosides

On agite pendant 15 secondes dans le sens de la longueur, un tube à essai contenant 5 ml d'infusé à 10 p. 100. On laisse au repos pendant 15 minutes. La mousse a disparu dans les 3 tubes. Donc, absence des saponosides.

2 – Sur la poudre

a. Recherche des quinones

2 g de la poudre des feuilles sont humectés par 2 ml de HCl dilué au 1/10^e ; on ajoute 20 ml de chloroforme, on laisse en contact plusieurs heures. On filtre et on ajoute la solution chloroformique avec 5 ml d'ammoniaque diluée au 1/2. La phase aqueuse ne se colore pas.

Donc, absence des quinones dans les 3 échantillons contrairement au *Buxus sempervirens*.

b. Recherche de l'arbutoside

Cette recherche a été conduite suivant la méthode décrite par GHODSI et NETIEN (1970).

α. Extraction par le méthanol à 50 p. 100 de la poudre des feuilles au bain-marie sous réfrigérant à reflux, pendant 15 minutes, en additionnant du carbonate de calcium. On agite, on filtre, on précipite par l'acétate de plomb. Après filtration, on évapore sous pression réduite 30 ml de filtrat : le résidu est repris par du méthanol. La solution méthanolique servira à la chromatographie.

Le reste du filtrat est hydrolysé par 20 ml de HCl à 10 p. 100 au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. On lave avec 40 ml d'éther, qu'on sèche sur sulfate de sodium anhydre et qu'on concentre sous vide à 1 ml.

β. On réalise une chromatographie sur couche mince des solutions éthérées et méthanolique :

- support : gel de silice avec plâtre (Kieselgel G. Merck)
- solvant : acétate d'éthyle/méthanol/eau = 100/17/13
- révélateurs : acide phosphomolybdique à 10 p. 100
acide p-sulfanilique dans acide acétique dilué + quelques gouttes de nitrite de sodium à 50 p. 100
- témoins : solution d'hydroquinone.

γ. Résultats : aucune tache ne présente les colorations et les valeurs de Rf de l'hydroquinone (coloration bleu-verte de Rf = 0,94 avec l'acide phosphomolybdique et coloration rouge avec l'acide sulfanilique diazoté) et de l'arbutoside (coloration bleu de Rf = 0,46 avec l'acide phosphomolybdique et coloration rouge avec l'acide sulfanilique diazoté). Donc, absence de l'arbutoside.

c. Recherche des alcaloïdes

L'organe (1 g de feuille ou écorces des tiges ou écorces des racines) est réduit en poudre grossière ; on le triture ensuite avec du sable dans 10 ml d'eau distillée (acide chlorhydrique à 5 p. 100), on filtre : le filtrat est réparti dans trois tubes. Dans chaque tube on ajoute quelques gouttes soit du réactif iodobismuthite (DRAGENDORFF), soit du réactif iodomercurate (MEYER), soit du réactif silico-tungstique. En cas de présence des alcaloïdes, on observe un précipité plus ou moins abondant.

Mais il faut noter que cette méthode n'est pas spécifique, car différents composés azotés réagissent aussi à ces réactifs. La confirmation est faite par une extraction par l'éther et chloroforme ammoniacal, à chaud à l'appareil de Soxhlet, après une nuit de macération, donnant aussi les dosages.

Nous consignons dans le tableau suivant les résultats obtenus : le nombre du signe + traduit la quantité des alcaloïdes détectés.

Nom de la plante		Alcaloïdes			Rendement (*)
		M	D	ST	
<i>Buxus madagascari</i>	F	++	++	++	2,3 p. 100
espèce-type	ET	++	++	++	2,4 p. 100
échantillon 1	ER	++	++	++	2,9 p. 100
<i>Buxus madagascari</i>	F	++	++	++	1,4 p. 100
subsp. <i>xerophila</i>	ET	++	++	++	2,4 p. 100
f. <i>silicicola</i>					
échantillon 2	ER	+++	+++	+++	4,2 p. 100
<i>Buxus madagascari</i>	F	++	++	++	1,7 p. 100
subsp. <i>xerophila</i>	ET	+++	+++	+++	5,5 p. 100
f. <i>calcicola</i>					
échantillon 3	ER	+++	+++	+++	9,3 p. 100

0 = organe récolté (F : feuilles, ET : écorces des tiges, ER : écorces des racines) ; Alcaloïdes (D : réactif de DRAGENDORFF, M : réactif de MEYER, ST : réactif silico-tungstique).

(*) Il ne s'agit là que d'un résultat approché : la méthode classique employée ne convenant pas aux alcaloïdes stéroïdiques de *Buxus*, comme nous nous en sommes rendu compte par la suite.

B – CHROMATOGRAPHIES SUR PAPIER

Ces chromatographies ont été réalisées à partir de l'infusé et de la teinture au 1/5^e dans l'alcool à 60°C, préparée par macération.

Seuls les résultats obtenus avec la teinture, plus nets, sont reproduits dans le tableau suivant :

Révélateurs	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Interprétation
U.V. (fluorescence)	0,15 (bleu-verdâtre) 0,45-0,65 “	0,38 (bleu-verdâtre) 0,56 “	0,45-0,55 (bleu-verdâtre)	acides-phénols
	0,32 (brun-mat) 0,45 (brun mat)	0,30 (brun mat) 0,45 (brun mat)	0,20 (brun mat)	flavonoïdes
Al Cl ₃ (coloration jaune)	0,32 0,45	0,20 0,45	0,20 0,40	flavonoïdes
KOH alcoolique (coloration jaune)	0,18 0,35	0,25 0,40	0,20 0,35	flavonoïdes
NH ₃ (coloration jaune)	0,22 0,35	0,20 0,38 0,44	0,12 0,28 0,48	flavonoïdes
Fe Cl ₃ (coloration verte)	0,15-0,40 0-0,12	0,30-0,38	0-0,28	acides-phénols et flavonoïdes
Vanilline chlorhydrique (coloration rouge-orangé)	0-0,25	—	0-0,25	leuco-anthocyanes
Vapeurs de HCl (coloration rouge-pâle)	0-0,22	—	0-0,20	

C – CONCLUSIONS

Les alcaloïdes sont présents dans les différents organes des trois échantillons. Les flavonoïdes, les cathécols et tanins catéchiques sont communs aux trois variétés, une seule différence est à signaler : les leuco-anthocyanes n'ont été observés que dans les échantillons 1 et 3.

Chapitre II

ETUDE PARTICULIERE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES DES FEUILLES

I - COMPOSES FLAVONIQUES

A – EXTRACTION (Méthode CHARAUX-PARIS)

300 g de feuilles de chaque échantillon sont stabilisées pendant une heure dans l'alcool à 96° bouillant. Après filtration et séchage, la drogue est pulvérisée grossièrement et épuisée à l'appareil du SOXHLET par l'alcool à 96° pendant quatre heures, après une nuit de macération. Les deux solutions éthanoliques sont réunies et évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris par l'eau bouillante, la solution aqueuse est laissée au repos pendant 24 heures. Aucun précipité ne se forme. La liqueur est épuisée, dans une ampoule à décantation, plusieurs fois, successivement par :

- l'éther
- l'acétate d'éthyle
- le butanol.

Les composés flavoniques et les génines ne passent pas dans l'éther, sont à l'état de traces dans l'acétate d'éthyle et seul l'extrait butanolique en contient une quantité susceptible d'être étudié, mais le rendement est faible.

B – ETUDE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE

1 – Réaction de la cyanidine

La réaction de la cyanidine (magnésium chlorydrique voir page 28), donne une coloration rose se rassemblant dans l'alcool isoamylique. Il s'agit vraisemblablement des flavonols.

2 – Chromatographie sur papier

Les extraits butanoliques de chaque échantillon sont chromatographiés avec :

support : papier WHATMAN n° 1

solvants : butanol/acide acétique/eau = 4 1 5 (solvant de Partridge)
acide acétique à 15 p. 100
eau

révélateurs: examen aux U.V. (fluorescence brune mate)

Al Cl₃ (coloration jaune).

Nous remarquons, d'une part que l'échantillon 1, présente trois taches : A₁, B₁, C₁, l'échantillon 2 une seule tache importante : A₂, et l'échantillon 3 deux taches : A₃, B₃, et que d'autre part, les valeurs de R_f de A₁, A₂, A₃ et B₁, B₃ sont identiques. Donc, nous observons trois flavonoïdes A, B, C, seul le flavonoïde A étant abondant dans l'échantillon 2, et le flavonoïde C n'existant que dans l'échantillon 1.

Les valeurs de R_f des flavonoïdes ont été déterminées dans 3 solvants ; il s'agit vraisemblablement d'hétérosides des flavonols (fig. 13).

Solvants	A	B	C
Eau	0,22	0,53	0,65
Acide acétique 15 p. 100	0,61	0,79	0,92
Partridge	0,52	0,26	0,20

3 – Séparation par chromatographie préparative sur couche mince

Support : gel de silice avec plâtre (Kieselgel G.)

Solvant : des essais préliminaires portant sur plusieurs solvants ont montré que le mélange suivant :

acétate d'éthyle	50	} volume/volume
méthanol	20	
eau	10	

permet la meilleure séparation.

Nous avons pu isoler les trois flavonoïdes mentionnés ci-dessus, mais malgré cette purification, ils restent impurs, car les spectres U.V. des substances séparées sont difficilement interprétables. En plus, le rendement faible n'a pas permis de pousser plus loin cette étude.

C – OBTENSION DES GENINES

Les hétérosides isolés, en très faible quantité n'étant pas purs, nous avons essayé d'obtenir les génines directement, par hydrolyse directe d'un extrait des feuilles, selon la méthode suivante.

FRONT

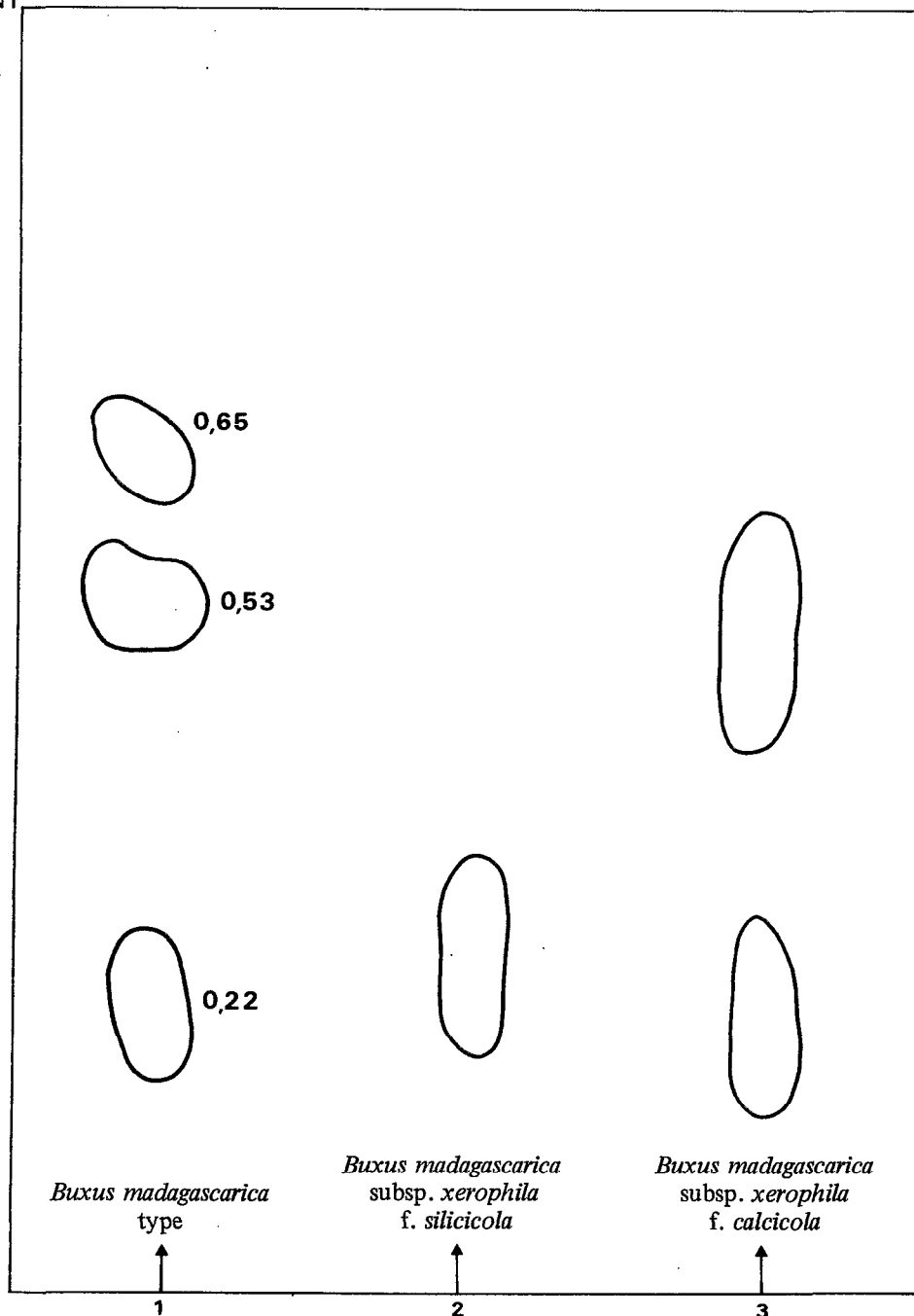


FIGURE 13
CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS BUTANOLIQUES
DES TROIS ECHANTILLONS DE BUXUS
(Solvant : EAU)

a. 100 g de feuilles sont stabilisées et épuisées par un litre d'alcool à 90° bouillant pendant une heure et demie. Après filtration et concentration à sec, le résidu est repris par de l'eau chaude (50 ml). L'hydrolyse est effectuée après addition de 2 ml de H₂ SO₄ concentré par chauffage au bain-marie bouillant, sous réfrigérant à reflux, durant deux heures. Après refroidissement, la liqueur est épuisée par l'éther. La solution étherée, après lavage plusieurs fois à l'eau distillée est évaporée à sec. On reprend le résidu par de l'éthanol et la solution éthanolique ainsi obtenue, sert aux chromatographies. L'opération est réalisée pour les trois échantillons.

b. Chromatographies

Deux sortes de chromatographies sont utilisées :

α. Chromatographies sur papier

- support : WHATMAN n° 1
- solvants : Butanol/acide acétique/eau : 4 1 5 (solvant de Partridge)
Acide acétique/eau/HCl : 30 10 3 (solvant de Forestal)
Acide acétique à 60 p. 100
- révélateurs : Al Cl₃ et examen en lumière U.V.
- support : ARCHES 304
- solvants : Butanol/acide acétique/eau : 4 1 5 (solvant de Partridge)
Acide acétique à 60 p. 100
- révélateurs : Al Cl₃ et examen en lumière U.V.

β. Chromatographie sur couche mince (C C M)

- support : cellulose (poudre MN 300)
- solvant : acide acétique à 60 p. 100
- révélateurs : Al Cl₃ et examen en lumière U.V.

Comme témoins, nous utilisons des flavonols fréquents chez les végétaux : myricétol, rhamnétol, isorhamnétol, quercétol, kaempférol.

γ. Résultats

Ils sont consignés dans le tableau V.

A noter qu'avec les trois échantillons, on obtient deux taches de même R_f : les génines A et B, et que la génine A est en très faible quantité dans l'échantillon 2.

c. Spectres U.V. des génines (appareil BECKMAN DB) (*)

(*) (Voir les tableaux page suivante)

TABLEAU V
Etude en chromatographie sur papier et sur couche mince
des génines flavoniques des trois échantillons des feuilles des *Buxus*

Support et solvant	Génine A	Génine B	Myricétol	Quercétol	Rhamn�tol	ISO Rhamn�tol	Kaempférol
WHATMAN n� 1 Solvant de FORESTAL	0,41	0,61	0,24	0,40	0,61	0,61	0,62
WHATMAN n� 1 Solvant de PARTRIDGE	0,74	0,89	0,46	0,74	0,89	0,87	0,93
WHATMAN n� 1 Acide Acétique 60 %	0,40	0,49	0,28	0,40	0,50	0,50	0,50
ARCHES 304 Solvant de PARTRIDGE	0,69	0,85	0,51	0,72	0,84	–	0,86
ARCHES 304 Acide Acétique 60 %	0,32	0,50	–	0,32	0,51	0,52	0,55
CCM Acide Acétique 60 %	0,38	0,58	0,25	0,39	0,62	0,58	0,62

α. Génine A

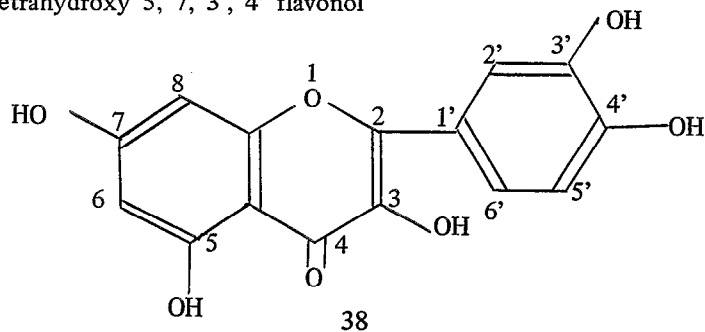
Bande	I		II		Interprétation
EtOH	374 nm		254 nm		Flavone ou Flavonol
EtOH + Al Cl ₃	430	354	266		Effet bathochrome important (56 nm) pour I et dédoublement de pic OH en 5 libre
EtOH + Acétate de sodium	390	320	266	254	Effets bathochromes pour I et II (16 et 12 nm) OH en 3, 4', 7 libres
EtOH + Acétate de Na + acide borique	386		258		Effet bathochrome de la bande I (12 nm) 2 OH en ortho libres (3' et 4')

β. Génine B

Bande	I		II		Interprétation
EtOH	370 nm		252 nm		Flavone ou flavonol
EtOH + Al Cl ₃	430	348	262		Effet bathochrome important (60 nm) et dédoublement de pic OH en 5 libre
EtOH + Acétate de Na	382	324	272	252	Importants effets bathochromes pour I et II (12 et 20 nm) OH en 3, 4', 7 libres
EtOH + Acétate de Na + Acide borique	374		253		Très léger effet bathochrome (4 nm) Pas de 2 OH en ortho libres

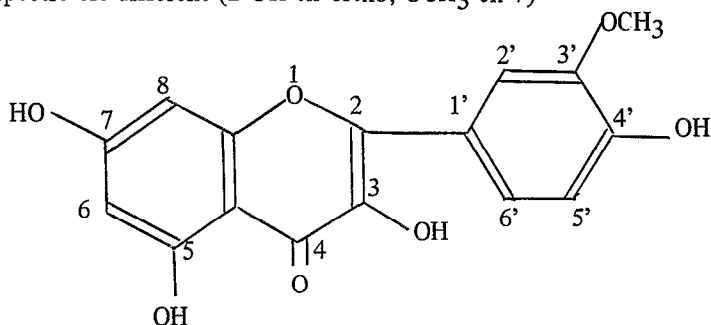
γ. Conclusions

Par les valeurs de R_f et les caractères du spectre U.V., la génine A peut être identifiée au QUERCETOL ou tetrahydroxy 5, 7, 3', 4' flavonol



Les valeurs de Rf observées pour la génine B suggèrent son identité au kaempférol, rhamnétol ou à l'isorhamnétol. Le spectre du kaempférol (λ max. 367, 294 [épaulement] et 266) est assez différent de celui de la génine B.

D'autre part le très léger effet bathochrome (4 nm) remarqué sur le spectre dans la solution alcoolique additionnée d'acétate de sodium et d'acide borique montre l'absence de 2 OH en ortho libres. Cette génine serait alors l'isorhamnétol ou trihydroxy 5, 7, 4' méthoxy 3' flavonol, et non le rhamnétol dont le spectre est différent (2 OH en ortho, OCH₃ en 7)



La faible quantité obtenue de cette génine n'a pas permis de confirmer cette structure par d'autres réactions.

En conclusion, au point de vue des génines flavoniques, les trois échantillons des feuilles sont très voisins, bien que la génine A existe en plus faible quantité dans l'échantillon 2.

II - ACIDES PHENOLS

A – EXTRACTION

Dix grammes de chaque échantillon des feuilles sont mis à infuser dans 100 ml d'eau bouillante. Après refroidissement, on filtre sur entonnoir de Büchner. Le filtrat, acidifié à pH = 1, par H₂ SO₄ à 10 p. 100, est épuisé par l'éther. La solution étherée est extraite ensuite par une solution de carbonate acide de sodium à 2 p. 100, qui est à son tour épuisée par l'éther, après acidification à pH = 1.

L'extrait étheré, ainsi obtenu, renfermant les acides-phénols, est évaporé à sec. Le résidu est repris par 1 ml de méthanol pour l'étude chromatographique.

B – CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Support : cellulose

Solvant : des recherches préalables ont montré que l'acide acétique à 2 p. 100 donne la meilleure séparation.

Révélateurs :

α . p. nitraniline diazotée obtenue en mélangeant extemporanément : 2 ml de la solution A (p. nitraniline à 0,50 p. 100 dans HCl 2N), 8 ml de la solution C (acétate de sodium à 20 p. 100) et deux gouttes de la solution B (nitrite de sodium à 5 p. 100).

β . après séchage, pulvérisation d'une solution de carbonate de sodium à 15 p. 100.

Echantillons de références : ces échantillons ont été choisis, en tenant compte des colorations et des Rf des taches obtenues dans une chromatographie préalable : pour la série benzoïque, acides vanillique et syringique ; pour la série cinnamique, acide para-coumarique.

Résultats

L'échantillon 1 présente trois taches : A₁, B₁, C₁, l'échantillon 2, trois taches : A₂, B₂, C₂, et l'échantillon 3, quatre taches : A₃, B₃, C₄, D₄.

Les colorations et les valeurs de Rf sont rassemblées dans le tableau VI.

Conclusions

α . En tenant compte de leurs Rf et colorations, il semble que les taches A₁, A₂, A₃, peuvent être identifiées à l'acide para-coumarique, les taches C₁, C₂, C₃, à l'acide syringique ou dihydroxyméthoxybenzoïque, et les taches B₁, B₂, B₃, à l'acide vanillique ou hydroxyméthoxybenzoïque.

β . Il est à noter l'existence d'une tache (Rf = 0,80, coloration rose) pour l'échantillon 3 uniquement, qui n'a pas été identifiée.

III - CONCLUSIONS

La comparaison en dérivés polyphénoliques semble donc très voisine pour les trois échantillons des feuilles de *Buxus*. Cependant, il existe quelques différences :

- présence des leuco-anthocyanes pour 1 et 3
- en ce qui concerne les flavonoïdes, les génines sont les mêmes, mais l'échantillon 1 (*Buxus madagascariensis* type) renferme des flavonoïdes plus nombreux que les variétés *calicicola* et surtout *silicicola*.
- les trois acides-phénols caractérisés sont communs aux trois lots, mais un 4^e acide non identifié n'a été trouvé que dans le lot 3.

TABLEAU VI
Etude en chromatographie sur couche mince des acides-phénols
des trois échantillons des feuilles des *Buxus*

TACHES	Rf	PARA-NITRANILINE DIAZOTEE	PARA-NITRANILINE DIAZOTEE + CO ₃ Na ₂
A ₁	0,30 et 0,66	Jaune-brun	Bleu-vert
B ₁	0,48	Jaune	Violet
C ₁	0,56	Jaune-orangé	Bleu
A ₂	0,26 et 0,63	Jaune-brun	Bleu-vert
B ₂	0,42	Jaune	Violet
C ₂	0,50	Jaune-orangé	Bleu
A ₃	0,23 et 0,66	Jaune-brun	Bleu-vert
B ₃	0,49	Jaune	Violet
C ₃	0,55	Jaune-orangé	Bleu
D ₃	0,80	—	Rose
Acide para-coumarique	0,30 et 0,61	Jaune-brun	Bleu-vert
Acide vanillique	0,50	Jaune	Violet
Acide syringique	0,48	Jaune-orangé	Bleu

Chapitre III

ETUDE DES ALCALOÏDES

I - PARTIE THEORIQUE

A – HISTORIQUE

Une buxine, alcaloïde du *Buxus sempervirens* L. signalée par M. FAURE, dès 1830, a fait l'objet des nombreux travaux durant le XIXe siècle. Il s'est avéré qu'il s'agissait d'un mélange.

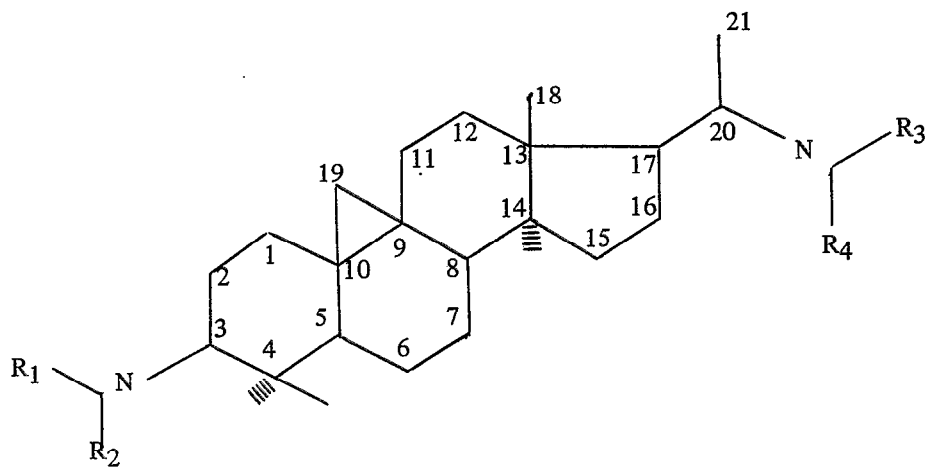
La localisation histochimique des alcaloïdes a été réalisée par E. MARTIN-SANS (1930), POUCHET (1930), MATHOU (1940). Mais l'extraction aboutit à un mélange complexe de nombreux alcaloïdes, dont la séparation est difficile et c'est plus récemment que des alcaloïdes chimiquement purs et désignés par des lettres, ont été isolés par E. SCHLITTLER et col. (1949 et 1950). Des travaux ultérieurs de K.S. BROWN et S.M. KUPCHAN (1962) ont élucidé la structure et la stéréochimie de l'alcaloïde A dénommé cyclobuxine D, et ont démontré que les alcaloïdes du *Buxus*, appartiennent au groupe des alcaloïdes stéroïdiques.

Depuis, plusieurs équipes des chercheurs ont entrepris l'étude des alcaloïdes isolés des différentes espèces des *Buxus*, entre autres : TOMKO et VOTICKY et col., STAUFFACHER, DOPKE et col., GOUTAREL et KHUONG-HUU-LAINE et col., NAKANO et col., KURAKINA et col., IKRAM et col.

La liste ci-après contient les alcaloïdes mis en évidence jusqu'à ce jour.

B – NOMENCLATURE DES ALCALOÏDES DES *BUXUS*

Pour faciliter la dénomination d'un nouvel alcaloïde retiré du genre *Buxus* (Buxacées), alcaloïdes stéroïdiques appartenant au groupe du cyclo 9 β - 19 triméthyl prégnane, les chercheurs réunis à KYOTO en avril 1964, ont adopté la nomenclature suivante, faisant intervenir les lettres A, B, C, D, E, F, G, H, I, : ces dernières traduisant le degré de substitution des deux azotes basiques en position 3 et en position 20.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
B	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
C	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
D	H	CH ₃	H	CH ₃
E	CH ₃	CH ₃	H	H
F	H	H	CH ₃	CH ₃
G	H	CH ₃	H	H
H	H	H	H	CH ₃
I	H	H	H	H

Pour les dérivés du groupe de l'abeo (10 → 19) triméthyl-4-4', 14 α prégnane 5 α, on utilise la même nomenclature.

C – LISTE DES ALCALOÏDES ISOLES DES BUXUS

Alcaloïde	Formule brute	F	(α)D	Formule plane	Espèce	Références
Alcaloïde C	C ₂₆ H ₄₁ ON				b	Kurakina (I.O) et col.-1969
Alcaloïde E	C ₂₇ H ₅₀ O ₃ N ₂				b	Kurakina (I.O) et col.-1969
Alcaloïde F		190°	+ 26,6°		w	Vassova (A) et col. -1970
Alcaloïde F cyclomicrophylline B	C ₂₇ H ₄₆ O ₂ N ₂				b	Kurakina (I.O) et col.-1969
Alcaloïde G	C ₂₇ H ₄₆ O ₃ N ₂				b	Kurakina (I.O) et col.-1969
Alcaloïde L	C ₂₇ H ₄₈ N ₂	200-2°	+ 76°		m	Nakano (T) et col. -1964 Nakano (T) et col. -1965
Alcaloïde M		261°	+ 27°		w	Vassova (A) et col. -1970
Baleabuxaline-F N-isobutryl	C ₃₀ H ₅₂ O ₄ N ₂	275°	- 62°	<u>1 g</u>	b	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967
Baleabuxidine		257°	+ 71°	<u>2</u>	b	Khuong-Huu (F) et col.-1965
Baleabuxine (pseudo)	C ₃₀ H ₅₀ O ₂ N ₂	236-40°	+ 120,7°		b	Kurakina (I.O) et col. -1969 Kurakina (I.O) et col. -1970
Bebuxine	C ₂₆ H ₄₆ ON ₂	212°	+ 47°		s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1966
Buxalphine	C ₃₃ H ₄₆ O ₂ N ₂	202-5°	+ 56°		s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1966
Buxaltine	C ₃₅ H ₄₈ O ₃ N ₂	188-91°		<u>4</u>	s	Döpke (W) et col. -1969
Buxamideine-K	C ₂₆ H ₃₉ ON	180-3°	+ 118°		b	Kurakina (I.O) et col. -1969
Buxamine E = Buxenine E	C ₂₆ H ₄₄ N ₂	amorphe	+ 32°	<u>1 d</u>	s, b	Stauffacher (D) -1964 Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967
Buxamine (nor.)	C ₂₅ H ₄₂ N ₂		+ 20°	<u>1 e</u>	s	Stauffacher (D) -1964
Buxaminol E	C ₂₆ H ₄₄ ON ₂	195-200°	+ 38° + 40°	<u>1 f</u>	s, b	Stauffacher (D) -1964 Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967
Buxandonine	C ₂₄ H ₃₉ ON	157-9°	+ 24°	<u>5</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxandrine	C ₃₅ H ₅₂ O ₄ N ₂	289-90°		<u>6 b</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxanine	C ₃₂ H ₄₃ O ₂ N	196-9°	- 38°	<u>7 b</u>	s	Döpke (W) et col. -1966

Buxarine	C ₃₃ H ₄₈ N ₂ O ₃	210-12 ^o	+ 98 ^o	<u>8 a</u>	s	Döpke (W) et col. -1966
Buxatine	C ₃₃ H ₄₈ O ₂ N ₂	214-7 ^o	+ 112 ^o	<u>8 d</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxazidine B	C ₂₇ H ₄₆ O ₂ N ₂	234-6 ^o	- 31 ^o	<u>6 c</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxazine	C ₂₈ H ₄₈ O ₂ N ₂	238-9 ^o	+ 93 ^o		s	Döpke (W) et col. -1965
Buxdeltine	C ₃₃ H ₄₆ O ₃ N ₂	275 ^o	+ 79 ^o		s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1966
Buxenine G	C ₂₅ H ₄₂ N ₂			<u>1 a</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1964 Puckett (R.T) et col. -1966
Buxenone	C ₂₅ H ₃₉ ON	174 ^o	- 48 ^o	<u>7 a</u>	s	Döpke (W) et col. -1966
Buxepidine	C ₃₃ H ₅₀ O ₃ N ₂	278-9 ^o	- 20 ^o	<u>9</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxeridine	C ₃₄ H ₅₀ ON ₂	208-11 ^o	+ 14 ^o	<u>8 c</u>	s	Döpke (W) et col. -1967
Buxetine	C ₃₂ H ₅₀ O ₃ N ₂	265 ^o	- 30 ^o		s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1966
Buxidienine F N benzoyl	C ₃₃ H ₄₈ O ₃ N ₂	286-8 ^o 291 ^o	- 36 ^o - 23 ^o	<u>1 b</u>	b, s	Kupchan (S.M) et col. -1967 Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967
Buxidienine F N isobutyl	C ₃₀ H ₅₀ O ₃ N ₂	253 ^o	- 67 ^o	<u>1 c</u>	b	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Kurakina (I.O) et col. -1969
Buxidine N benzoyl	C ₂₈ H ₄₂ O ₂ N ₂	254-8 ^o	+ 76,5 ^o	<u>6 a</u>	b, s	Döpke (W) et col. -1966 Khuong-Huu (F) et col.-1966 Döpke (W) et col. -1967
Buxidine N isobutyl				<u>6 d</u>	b	Khuong-Huu (F) et col.-1966
Buxiramine	C ₂₇ H ₄₄ N ₂ O ₂	213-5 ^o		<u>4 b</u>	s	Döpke (W) et col. -1969
Buxocyclamine A	C ₂₇ H ₄₈ N ₂	187-8 ^o	+ 87 ^o	<u>10</u>	s	Döpke (W) et col. -1968
Buxomegine = irehine	C ₃₃ H ₃₉ ON	172-3 ^o	- 40 ^o	<u>3</u>	s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1966
Buxpapamine	C ₂₈ H ₃₀ ON ₂	205-6 ^o	+ 93 ^o		p	Ikram (M) et col. -1968
Buxpapine	C ₂₇ H ₃₄ ON ₂	111-2 ^o	+ 7,5 ^o		p	Ikram (M) et col. -1968
Buxpiine = cyclomicrobuxine	C ₂₅ H ₃₉ O ₂ N	173 ^o	+ 159 ^o	<u>11 b</u>	w, s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1965 Voticky (Z) et col. -1966 Vassova (A) et col. -1970

Buxpsiine	C ₂₆ H ₃₉ ON	176-8° 186°	+ 108 - 112°	<u>12</u>	s	Tomko (J) et col. -1966 Voticky (Z) et col. -1966 Döpke (W) et col. -1967
Buxtauine = cyclobuxoxine	C ₂₄ H ₃₇ O ₂ N	178° 172-8°	+ 154° + 157°	<u>11 a</u>	w, s	Tomko (J) et col. -1964 Voticky (Z) et col. -1965 Vassova (A) et col. -1970
Cyclobuxamine H	C ₂₄ H ₄₂ ON ₂	209-11°	+ 30°	<u>8 b</u>	s	Brown (K.S) et col. -1964
Cyclobuxidine F N benzoyl	C ₃₃ H ₄₈ O ₄ N ₂	274-6°	+ 56°	<u>13 a</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cyclobuxidine F N isobutyryl = alcaloïde D	C ₃₀ H ₅₀ O ₄ N ₂ C ₃₀ H ₅₂ O ₃ N ₂	257°	+ 71°	<u>13 b</u>	b	Tomita (M) et col. -1962 Kurakina (I.O) et col. -1970
Cyclobuxidine H N isobutyryl	C ₂₉ H ₅₀ O ₃ N ₂	285°	+ 76°	<u>13 c</u>		Tomita (M) et col. -1962
Cyclobuxine B				<u>14 a</u>	s	Voticky (Z) et col. -1969
Cyclobuxine D	C ₂₅ H ₄₂ ON ₂	245-7° 248-9°	+ 98° + 103°	<u>14 b</u>	k, w s, m	Brown (K.S) et col. -1964 Nakano (T) et col. -1966 Voticky (Z) et col. -1966 Vassova (A) et col. -1970
Cyclobuxine F N benzoyl	C ₃₃ H ₄₈ O ₂ N ₂	214-6°	+ 90°	<u>14 c</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cyclobuxomicreine	C ₂₉ H ₃₉ ON	195-7°	+ 37°	<u>15 d</u>	m	Nakano (T) et col. -1966
Cyclobuxophylline	C ₂₆ H ₄₁ ON	194-6°	- 72°	<u>7 e</u>	m	Nakano (T) et col. -1966
Cyclobuxophyllinine F	C ₂₅ H ₃₉ ON	181-2°	- 51°	<u>7 d</u>	m, ml	Nakano (T) et col. -1965 Magdeleine (M.J) -1969
Cyclobuxophyllinine M	C ₂₅ H ₃₉ ON	167°	- 69°	<u>7 f</u>	ml	Khuong-Huu (F) et col.-1970
Cyclobuxosuffrine	C ₂₅ H ₃₉ ON	201-4°	- 62°	<u>7 c</u>	m, k	Nakano (T) et col. -1966 Nakano (T) et col. -1970
Cyclobuxoviridine	C ₂₆ H ₄₁ ON	182-3°	+ 16°	<u>16</u>	m	Nakano (T) et col. -1966
Cyclobuxoxazine A		197°		<u>17 b</u>	r	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Milliet (A) -1966
Cyclobuxoxazine C		234-6°	+ 48°	<u>17 c</u>	w	Vassova (A) et col. -1970
Cyclobuxoxine	C ₂₄ H ₃₇ O ₂ N	181-3°	+ 169°	<u>15 e</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1965
Cyclokoreanine B	C ₂₇ H ₄₆ ON ₂	235-6°	+ 109°	<u>18</u>	k	Nakano (T) et col. -1966
Cyclomalayanine	C ₃₆ H ₅₂ O ₃ N ₂	170°	- 61°	<u>8 j</u>	ml	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Magdeleine (M.J) -1969

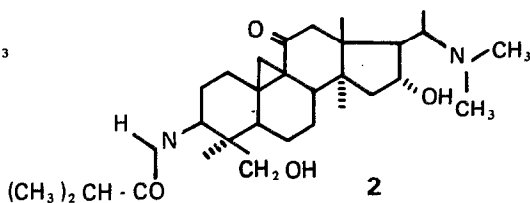
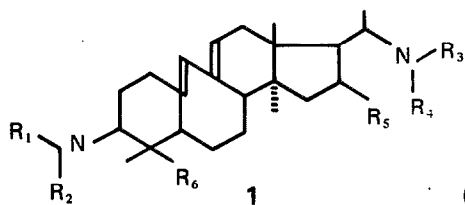
Cyclomethoxazine B	$C_{28}H_{48}O_2N_2$	195°	+ 54°	<u>17 a</u>	r	Khuong-Huu (F) et col. -1966 Milliet (A) -1966
Cyclomicrobuxeine	$C_{25}H_{37}ON$	141-2°	+ 126°	<u>15 a</u>	m	Nakano (T) et col. - 1966
Cyclomicrobuxine	$C_{25}H_{39}O_2N$	188-9° 178-80°	+ 172°	<u>15 b</u>	m	Nakano (T) et col. -1965 Nakano (T) et col. -1966
Cyclomicrobuxinine	$C_{24}H_{37}O_2N$	178-81°	+ 152°	<u>15 c</u>	m	Nakano (T) et col. -1965
Cyclomicrophylline A	$C_{28}H_{48}O_2N_2$	232-3°	- 93°	<u>19 a</u>	m	Nakano (T) et col. -1964 Nakano (T) et col. -1965
Cyclomicrophylline B	$C_{27}H_{46}O_2N_2$	251-2° 254°	- 65° - 60°	<u>19 b</u>	m, b	Nakano (T) et col. -1964 Nakano (T) et col. -1965 Herlem-Gaulier (D) et col. -1965 Khuong-Huu (F) et col. 1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Kurakina (I.O) et col. -1969
Cyclomicrophylline C	$C_{27}H_{46}O_2N_2$	283-4°	- 40°	<u>19 c</u>	m	Nakano (T) et col. -1964 Nakano (T) et col. -1965
Cyclomicrophylline F N benzoyl	$C_{33}H_{50}O_3N_2$	292-4°	+ 19°	<u>19 d</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cyclomicrophyllidine A	$C_{34}H_{52}O_3N_2$		- 160°	<u>19 e</u>	m	Nakano (T) et col. -1965
Cyclomicrosine	$C_{34}H_{50}O_3N_2$	282-4°	- 33°	<u>20</u>	m	Nakano (T) et col. -1966
Cyclomikuranine	$C_{26}H_{43}O_2N$	209-11°	- 3°	<u>21</u>	m	Nakano (T) et col. -1966
Cycloprotobuxine A	$C_{28}H_{50}N_2$	205-7°	+ 75°	<u>22 a</u>	k, b ml	Herlem-Gaulier (D) et col. -1965 Khuong-Huu (F) et col. -1966 Nakano (T) et col. -1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Magdeleine (M.J) -1969
Cycloprotobuxine C	$C_{27}H_{33}N_2$	212-3°	+ 78°	<u>22 b</u>	k, w b, ml	Herlem-Gaulier (D) et col. -1965 Khuong-Huu (F) et col. -1966 Nakano (T) et col. -1966 Herlem-Gaulier (D) et col. -1967 Magdeleine (M.J) -1969 Khuong-Huu (F) et col. -1970 Vassova (A) et col. -1970
Cycloprotobuxine D	$C_{26}H_{46}N_2$	140-2°	+ 112°	<u>22 c</u>	b, s	Kupchan (S.M) et col. -1965 Khuong-Huu (F) et col. -1966 Herlem-Gaulier (D) -1967
Cycloprotobuxine D N acetyl	$C_{28}H_{48}ON_2$	221-4°	+ 53°	<u>22 d</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967

Cycloprotobuxoline C N benzoyl	C ₃₄ H ₅₂ O ₂ N ₂	252-5 ⁰	+ 43 ⁰	<u>23 a</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cycloprotobuxoline D N benzoyl	C ₃₃ H ₅₀ O ₂ N ₂	236-8 ⁰	+ 42 ⁰	<u>23 b</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cyclorolfeibuxidine C	C ₂₇ H ₄₈ O ₃ N ₂	248 ⁰	+ 20 ⁰	<u>24 e</u>	r	Milliet (A) -1966
Cyclorolfeibuxidine D	C ₂₆ H ₄₆ O ₃ N ₂	273 ⁰	+ 41 ⁰	<u>24 f</u>	r	Milliet (A) -1966
Cyclorolfeibuxine D	C ₂₆ H ₄₆ O ₂ N ₂	256 ⁰	+ 78 ⁰	<u>24 g</u>	r	Milliet (A) -1966
Cyclorolfeine	C ₂₅ H ₄₁ O ₂ N	253 ⁰	+ 119 ⁰	<u>11 d</u>	r	Khuong-Huu (F) et col. -1966 Milliet (A) -1966
Cyclorolfoxazine	C ₂₆ H ₄₁ O ₃ N	239 ⁰	+ 106 ⁰	<u>25</u>	r	Khuong-Huu (F) et col. -1966 Milliet (A) -1966
Cyclosuffrobuxine	C ₂₅ H ₃₇ ON	167-72 ⁰	- 92 ⁰	<u>26 a</u>	m, k	Nakano (T) et col. -1966
Cyclosuffrobuxinine	C ₂₄ H ₃₅ ON	144-9 ⁰	- 67 ⁰	<u>26 b</u>	m, k	Nakano (T) et col. -1966
Cyclovirobuxeine A	C ₂₈ H ₄₈ ON ₂	218-20 ⁰	- 86-7 ⁰	<u>27 a</u>	s, ml	Khuong-Huu (F) et col. -1966 Döpke (W) et col. -1968 Magdeleine (M.J) -1969
Cyclovirobuxeine B	C ₂₇ H ₄₆ ON ₂	198- 200 ⁰	- 62 ⁰ - 75 ⁰	<u>27 b</u>	s, ml m	Kuong-Huu (F) et col. -1966 Kupchan (S.M) et col. -1966 Magdeleine (M.J) -1969
Cyclovirobuxeine B N formyl	C ₂₈ H ₄₈ O ₂ N ₂	290 ⁰	- 157 ⁰	<u>27 c</u>	ml	Magdeleine (M.J) -1969 Khuong-Huu (F) et col. -1970
Cyclovirobuxeine F N tigloyl	C ₃₂ H ₅₂ O ₂ N ₂	178-83 ⁰	- 150 ⁰	<u>27 d</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cyclovirobuxine C	C ₂₇ H ₄₈ ON ₂	201 ⁰	+ 65 ⁰	<u>28 a</u>	ml	Magdeleine (M.J) -1969 Khuong-Huu (F) et col. -1970
Cyclovirobuxine D	C ₂₆ H ₄₆ ON ₂	221-4 ⁰ 205-10 ⁰	+ 63 ⁰ + 25 ⁰	<u>28 b</u>	ml, w s	Brown (K.S) et col. -1964 Khuong-Huu (F) et col. -1966 Magdeleine (M.J) -1969 Vassova (A) et col. -1970
Cyclovirobuxine D O vanillyl	C ₃₄ H ₅₂ O ₄ N ₂	210 ⁰	± 2 ⁰	<u>28 d</u>	ml	Magdeleine (M.J) -1969 Khuong-Huu (F) et col. -1970
Cycloxobuxidine F N benzoyl	C ₃₃ H ₄₈ O ₄ N ₂	274-6 ⁰ 277 ⁰	+ 56 ⁰ + 52 ⁰	<u>8 g</u>	b, s	Khuong-Huu (F) et col. -1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Kupchan (S.M) et col. -1967 Herlem-Gaulier (D) et col. -1968

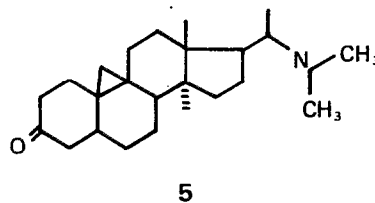
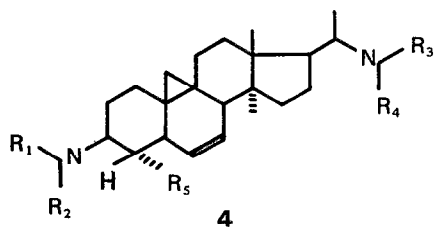
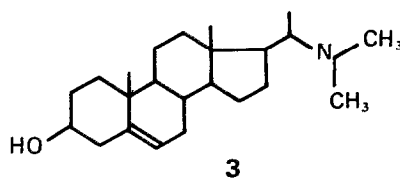
Cycloobuxidine F N isobutyryl = baleabuxidine	C ₃₀ H ₅₀ O ₄ N ₂	257°	+ 71°	<u>8 h</u>	b	Khuong-Huu (F) et col.-1965 Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Herlem-Gaulier (D) et col. -1967
Cycloobuxidine H N isobutyryl				<u>8 i</u>	b	Herlem-Gaulier (D) et col. -1968
Cycloobuxine F N benzoyl	C ₃₃ H ₄₈ O ₂ N ₂	248-50°	+ 76°	<u>8 e</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cycloobuxine F N isobutyryl = baleabuxine	C ₃₀ H ₅₀ O ₂ N ₂	258°	+ 115°	<u>8 f</u>	b	Herlem-Gaulier (D) et col. -1965 Khuong-Huu (F) et col.-1965 et 1966 Herlem-Gaulier (D) et col. -1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Kurakina (I.O) et col. -1969
Cycloobuxoline F N benzoyl-O-acetyl	C ₃₅ H ₅₀ O ₄ N ₂	216-8°	+ 114°		s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Cycloobuxoxazine C	C ₂₇ H ₄₄ O ₃ N ₂	292°	+ 125°	<u>29</u>	b, w	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Herlem-Gaulier (D) -1967 Herlem-Gaulier (D) et col. -1968
Dihydrocyclomicro- phyllidine A	C ₃₄ H ₅₄ O ₃ N ₂		- 33°	<u>24 e</u>	m	Nakano (T) et col. -1965
Dihydrocyclomicro- phylline A	C ₂₈ H ₅₀ O ₂ N ₂	272°	+ 37°	<u>24 a</u>	m	Nakano (T) et col. -1965
Dihydrocyclomicro- phylline C	C ₂₇ H ₄₈ O ₂ N ₂	256°	+ 74°	<u>24 b</u>	r	Khuong-Huu (F) et col.-1966 Milliet (A) -1966
Dihydrocyclomicro- phylline F	C ₂₆ H ₄₆ O ₂ N ₂	260°	+ 4,6°	<u>24 c</u>	m	Nakano (T) et col. -1965
Dihydrocyclomicro- phylline F N benzoyl	C ₃₃ H ₅₀ O ₃ N ₂	292-4°	+ 19°	<u>24 d</u>	s	Kupchan (S.M) et col. -1967
Isochondodendrine	C ₃₆ H ₃₈ O ₆ N ₂	330°	+ 59°	<u>30</u>		Orekhov (A.P) -1955
Isoscooletine	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	189-90°		<u>31</u>	k	Nakano (T) et col. -1966

REMARQUE : Pour les espèces

- b = *Buxus balearica* Willd
m = *Buxus microphylla* Sieb. et Zuc.
ml = *Buxus malayana* Ridl.
p = *Buxus papilosa* C.K. Schneider
k = *Buxus koreana* Nakai
r = *Buxus rolfiei* Vidal
s = *Buxus sempervirens* L.
w = *Buxus wallichiana* Baill.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
a	H	CH ₃	H	H	-	CH ₃
b	H	-CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₂ OH
c	H	-CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₂ OH
d	CH ₃	CH ₃	H	H	-	CH ₃
e	H	CH ₃	H	H	-	CH ₃
f	CH ₃	CH ₃	H	H	OH	CH ₃
g	H	-CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₃



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	H	CO-C ₆ H ₅	H	CH ₃	$ \begin{array}{l} \text{-O-C-CH=C} \\ \parallel \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $
b	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃

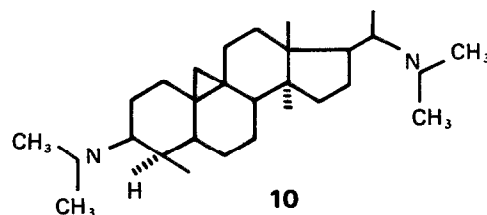
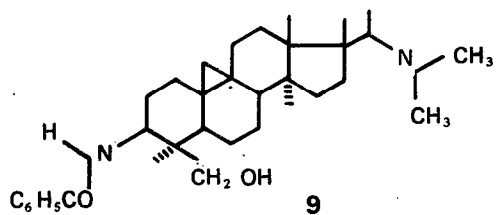
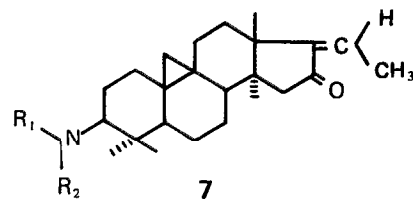
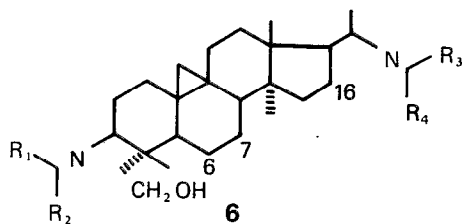
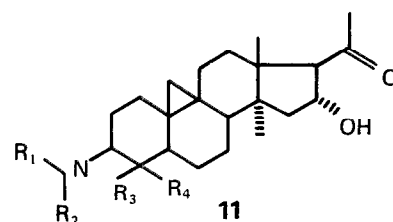
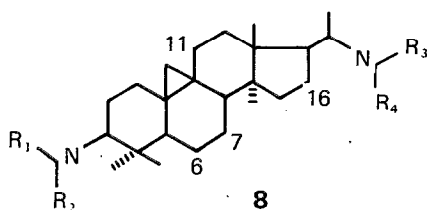


FIGURE 14



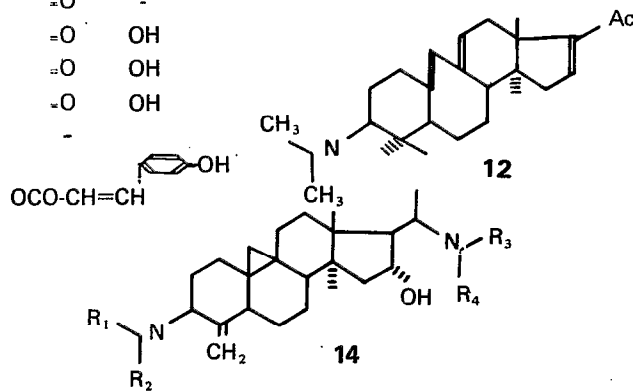
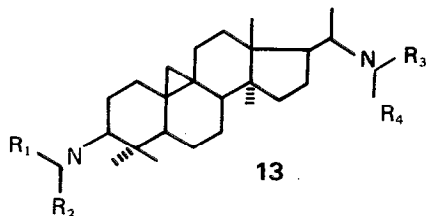
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	6(7)	16
a	H	-CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	Δ	OH
b	H	-CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	Δ	-O-CO-CH ₃
c	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	-	=O
d	H	-CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃	Δ	OH

	R ₁	R ₂
a	H	CH ₃
b	CH ₃	-CO-C ₆ H ₅
c	CH ₃	CH ₃
d	H	CH ₃
e	CH ₃	CH ₃
f	CH ₃	CH ₃



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	6(7)	11	16
a	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-	=O	OH
b	H	H	H	CH ₃	-	-	OH
c	CH ₃	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	Δ	-	-
d	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-	=O	-
e	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-	=O	-
f	H	CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃	-	=O	-
g	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-	=O	OH
h	H	CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃	-	=O	OH
i	H	CO-CH[CH ₃] ₂	H	CH ₃	-	=O	OH
j	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	Δ	-	-

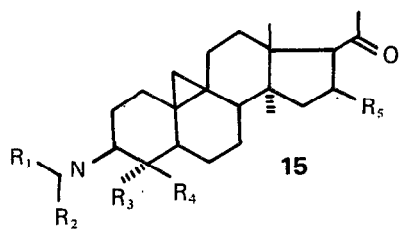
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	CH ₃		CH ₂
b	CH ₃	CH ₃		CH ₂
c	H	CH ₃		CH ₂
d	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃



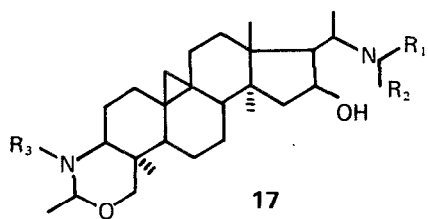
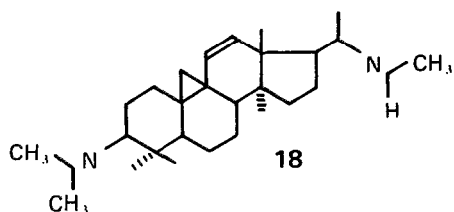
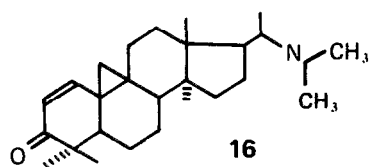
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	CO-CH[CH ₃] ₂	CH ₃	CH ₃
b	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
b	H	CH ₃	H	CH ₃

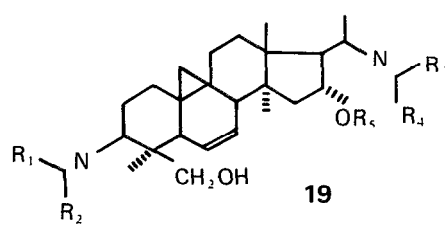
FIGURE 15



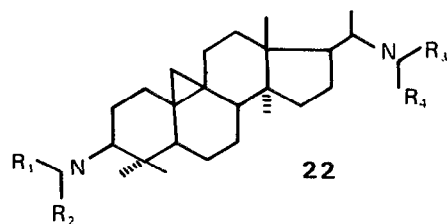
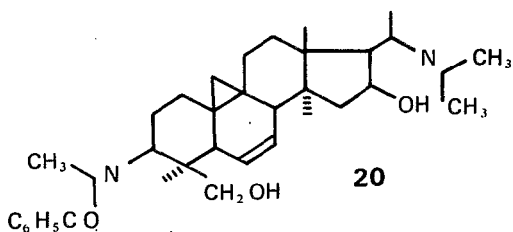
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	CH ₃	CH ₃		CH ₂	-
b	CH ₃	CH ₃		CH ₂	OH
c	H	CH ₃		CH ₂	OH
d	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-
e	H	CH ₃		CH ₂	OH



	R ₁	R ₂	R ₃
a	H	CH ₃	CH ₃
b	CH ₃	CH ₃	CH ₃
c	CH ₃	CH ₃	H



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
b	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H
c	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
d	H	CO-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	H
e	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CO-C ₆ H ₅



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
b	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
c	H	CH ₃	H	CH ₃
d	H	CH ₃	CO-CH ₃	CH ₃

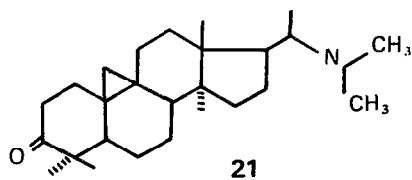
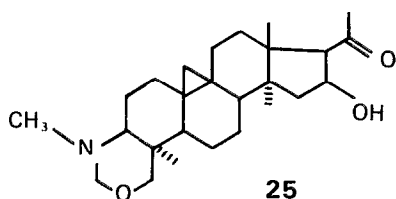
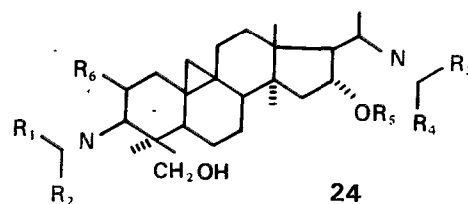
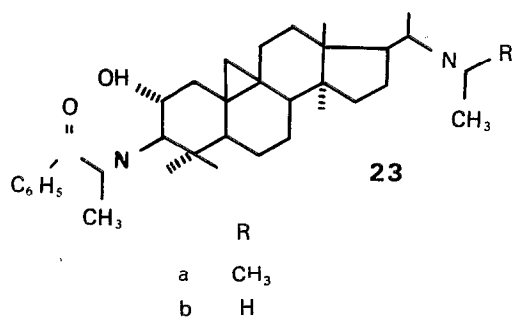
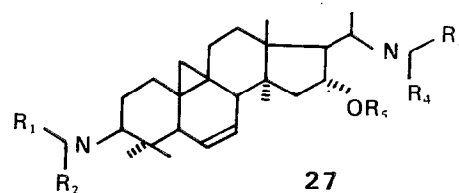
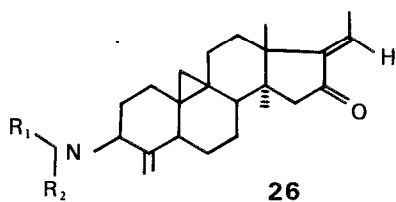


FIGURE 16

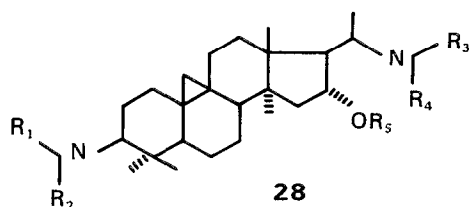


	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
a	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	H	-
b	H	CH_3	CH_3	CH_3	H	-
c	H	H	CH_3	CH_3	H	-
d	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	$CO-C_6H_5$	-
e	H	CH_3	CH_3	CH_3	H	OH
f	H	CH_3	H	CH_3	H	OH
g	H	CH_3	H	CH_3	H	-



	R_1	R_2
a	CH_3	CH_3
b	H	CH_3

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
a	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3	H
b	CH_3	CH_3	H	CH_3	H
c	CH_3	CH_3	$\begin{matrix} O \\ \\ C-H \end{matrix}$	CH_3	H
d	CH_3	CH_3	H	CH_3	$\begin{matrix} CO \\ \\ CH_3 \end{matrix} C=C \begin{matrix} H \\ \\ CH_3 \end{matrix}$



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
a	H	CH_3	CH_3	CH_3	H
b	H	CH_3	H	CH_3	H
c	H	CH_3	H	CH_3	$\begin{matrix} OCO \\ \\ \text{---} \end{matrix} \begin{matrix} \text{---} \\ \\ OH \end{matrix} \begin{matrix} OCH_3 \\ \\ \text{---} \end{matrix}$

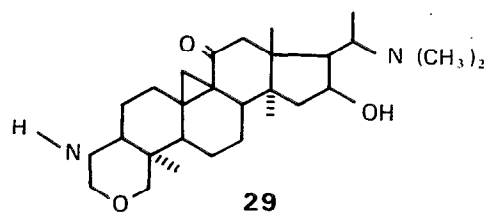
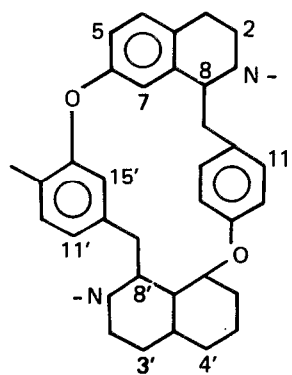


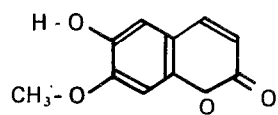
FIGURE 17



30

1,1' - Me, 5 - 6' - OH

5' - OMe, 6--0--15'



31

FIGURE 18

D – ALCALOÏDES DU *BUXUS MADAGASCARICA* SUBSP. *XEROPHILA* F. *SILICICOLA*

a. Méthode d'extraction

En ce qui concerne les alcaloïdes, nous n'avons pu étudier que le *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* forma *silicicola* (échantillon 2) récolté dans la forêt de ZOMBITSE, à 10 km de la ville de Sakaraha.

Trois méthodes ont été mises en œuvre :

Première méthode : après dégraissage à l'éther de pétrole, la drogue, réduite en poudre grossière, est lixiviée par l'alcool acétique à 1 %, et la solution alcoolique ainsi obtenue est extraite par le chlorure de méthylène. L'extractum, séché, évaporé donne le résidu d'alcaloïdes totaux.

Deuxième méthode : (méthode KHUONG-HUU-LAINE et col.), la poudre de la plante est macérée dans un mélange des solvants, en milieu ammoniacal. Après évaporation, sous vide, le résidu repris par de l'éther est extrait par une solution d'acide sulfamique (4 %). La solution acide, alcalinisée à pH = 9, est extraite par le chlorure de méthylène, dont l'évaporation conduit aux alcaloïdes totaux.

Troisième méthode : l'opération est identique à celle de la précédente, sauf dans la première phase où l'on remplace la macération par une extraction à chaud à l'appareil du SOXHLET, par le chlorure de méthylène.

b. Méthodes d'isolement

α . Séparation préalable en différents lots et extraits, par partage entre une solution tampon à pH = 5 et le chlorure de méthylène (sauf pour les extraits provenant de la première méthode). On aboutit aux extraits A et B pour la deuxième méthode, aux lots A, B, C, pour la troisième méthode (lot A = bases fortes ne migrant pas avec le chlorure de méthylène, lot B = bases moyennes, lot C = bases faibles migrant avec le chlorure de méthylène).

β . Séparation par chromatographie sur colonne d'alumine, de diverses activités.

Des extraits isolés de la première méthode, seul celui des écorces des racines permet d'obtenir, par chromatographie, un alcaloïde pur : Alcaloïde III.

Des extraits de la deuxième méthode, on obtient :
Alcaloïde V (extrait A des écorces des racines)
Alcaloïdes I et II (extrait B des écorces des racines)

Des extraits de la troisième méthode, on obtient :
Alcaloïdes II et IV du lot A des écorces des tiges
Alcaloïdes II du lot C des écorces des tiges
Alcaloïdes I, II, IV du lot A des écorces des racines
Alcaloïdes II et V du lot C des écorces des racines.

c. Structure des alcaloïdes isolés

Alcaloïde I

Cet alcaloïde est isolé soit de la fraction 2 de l'extrait B des écorces des racines (deuxième méthode), soit de la fraction 1 du lot A (bases fortes) des écorces des racines (troisième méthode).

Il est cristallisé dans l'acétone : $F = 212^{\circ}$ (après sublimation) ($\alpha_D = + 73^{\circ}$ (chloroforme, $c = 1$) ; répond à la formule brute $C_{27} H_{48} N_2$ identiques à celle du CYCLOPROTOBUXINE-C retiré du *Buxus balearica* (HERLEM-GAULIER -1967, KHUONG-HUU-LAINE et col. -1966).

Nous pouvons donc conclure que l'alcaloïde I est le CYCLOPROTOBUXINE-C (I) (fig. 19).

Alcaloïde II

C'est l'alcaloïde principal du *Buxus madagascariensis*, car on l'isole des différents organes (sauf des feuilles, au stade actuel de nos recherches), après chromatographie sur colonne d'alumine, à partir :

- des fractions 3-7 de l'extrait B des écorces des racines (deuxième méthode),
- de la fraction 7 provenant de la rechromatographie des fractions 1-7 du lot A (bases fortes) des écorces des tiges (troisième méthode),
- des fractions 4-5 du lot C (bases faibles) des écorces des tiges (troisième méthode),
- de la fraction 2 du lot A (bases fortes) des écorces des racines (troisième méthode),
- de la fraction 12 du lot C (bases faibles) des écorces des racines (troisième méthode).
- des fractions 12 à 17 de la rechromatographie des fractions 12-13 du lot C (bases faibles) des écorces des racines (troisième méthode).

Ce produit cristallise dans l'acétone sous forme de dérivé N-isopropylidène : $F = 193^{\circ}$ (après sublimation) ; ($\alpha_D = + 61^{\circ}$ (chloroforme, $c = 1$). Sa formule brute est : $C_{29} H_{50} N_2$.

Le spectre RMN présente : un CH_2 cyclopropanique, un méthyle secondaire, quatre méthyles tertiaires, un groupement $N(CH_3)_2$, et un groupe $-N = C(CH_3)_2$.

Le spectre IR révèle la présence d'un $>C = N$ (bande à 1640 cm^{-1}).

D'autre part, le spectre de masse, outre le pic moléculaire $M + = 426$, permet d'observer le pic à m/e 72 (pic de base), consécutif à une coupure $c - c'$ (fig. 20), vérifiant la position en 20 du groupe diméthylamino $N(CH_3)_2$.

Donc, d'après ces données, la formule 2 peut être attribuée à cet alcaloïde, appelé CYCLOPROTOBUXINE-F (fig. 19).

Après hydrolyse du groupe isopropylidène par filtration sur colonne d'alumine, la cycloprotobuxine F est obtenue cristallisable dans le méthanol $F = 163^{\circ}$ ($\alpha_D = + 42^{\circ}$ ($CHCl_3$, $C = 1$)).

Une corrélation chimique avec la cycloprotobuxine-C confirme la structure proposée ci-dessus.

La formylation de 2 par un mélange d'anhydride acétique et d'acide formique aboutit à 2a, dont le spectre IR (nujol) montre la présence d'un $C = O$ d'un amide à 1680 cm^{-1} et le spectre RMN d'un signal correspondant à $-CHO$.

La réduction de 2a, par l'hydrure de lithium et d'aluminium donne le cycloprotobuxine-C (2b) (fig. 19).

En conclusion, on peut affirmer que le groupement diméthylamino $N(CH_3)_2$ se trouve bien en position 20, et l'amine primaire $-NH_2$ en position 3, comme dans la formule 2.

Alcaloïde III

On le retire, par chromatographie sur alumine :

- de la fraction 3 des écorces des racines (première méthode)

On le retrouve dans un mélange obtenu à partir de la chromatographie du lot A (bases fortes) des écorces des racines (troisième méthode).

Il cristallise dans le mélange : benzène/hexane.

F = 192-193° (après sublimation, $(\alpha)_D = + 57^\circ$ (chloroforme, c = 1), sa formule brute est : $C_{27}H_{44}ON_2$.

Le spectre UV présente trois maximums caractéristiques à 289, 278, et 270 nm ($\log \epsilon = 3,50, 3,62, 3,51$).

Sur le spectre RMN, outre la présence de trois méthyls tertiaires, d'un méthyl secondaire en 21, d'un groupement NH (CH_3) et d'un groupement N (CH_3)₂, on note l'existence d'un signal à 3,23 ppm. correspondant à un H en 3, de quatre protons éthyléniques entre 5,33 et 6,56 ppm, caractérisant le système triénique conjugué 1 (2), 10 (19), 9 (11), pouvant s'analyser comme suit : un multiplet de l'hydrogène en 11 centré à 5,72 ppm, un singulet élargi de l'hydrogène en 19 à 6,1 ppm, un système ABX des protons 1 et 2 (proton en 1 à 5,50 ppm, proton en 2 à 6,1 ppm) et d'un système AB (J = 10 cps) à 3,61 ppm et 3,83 ppm en accord avec un groupe CH_2 OH en 4, dont la présence est vérifiée sur le spectre IR (bande à 1040 cm^{-1}).

La masse moléculaire est confirmée par le spectre de masse (M + = 412). Ce dernier permet de placer le groupe diméthylamino N (CH_3)₂ en 20, grâce au pic m/c 72 (coupure c — c') (fig. 20).

Ces différentes données permettent d'attribuer la formule 3 à cet alcaloïde appelé BUXI-TRIENINE-C (fig. 19).

Alcaloïde IV

On l'isole du lot A (bases fortes) des écorces des racines, par chromatographie sur alumine (fractions 10-11) (troisième méthode), et de la rechromatographie des fractions 1-7 du lot A (bases fortes) des écorces des tiges (fractions 19-23) (troisième méthode).

Cristallisation obtenue dans l'acétone.

F = 200-201° (après sublimation, $(\alpha)_D = + 55^\circ$ (chloroforme, c = 1).

Formule brute : $C_{27}H_{46}ON_2$.

Le spectre RMN montre trois méthyls tertiaires, un méthyl secondaire (CH_3 en 21), un groupe diméthylamino, un groupe monométhylamino, deux protons éthyléniques apparaissant sous forme d'un multiplet centré à 5,52 ppm et d'un singulet à 5,93 ppm, faisant partie d'un système diénique conjugué 9 (11), 10 (19) et d'un système AB (J = 10 cps) à 3,55 et 3,77 ppm révélant la présence d'un groupe CH_2 OH en 4, dont le spectre IR confirme l'existence (bande à 1060 cm^{-1}).

Les coupures c — c', d'une part, et a — a', a — a'', a — a''' d'autre part, correspondant aux pics m/e 72, 70, 57, 44 observées sur le spectre de masse (fig. 20) qui donne aussi le pic moléculaire M + = 414, vérifient la position en 20 de N (CH_3)₂, et en position 3 de NH (CH_3).

Le spectre U.V. possède trois maximums caractéristiques : 254, 246 et 238 nm ($\log \epsilon = 3,40, 3,67, 3,42$).

En considérant toutes ces données physiques, la structure du diène 4 est attribuée à cet alcaloïde auquel on donne le nom de : DESOXY-16-BUXIDIENINE-C. (fig. 19).

Alcaloïde V :

Cet alcaloïde est isolé de la première fraction de l'extrait A des écorces des racines (deuxième

méthode) ; et aussi des fractions 4-5 de la chromatographie du lot C des écorces des racines (troisième méthode).

La cristallisation est obtenue dans l'acétone.
F = 133-134°, (α)_D = + 40° (CHCl₃, C = 0,2)
Il répond à la formule brute : C₂₈ H₄₈ N₂.

Dans le spectre UV, on note trois maximums à 254, 246, 238 nm (log ϵ = 3,40, 3,67, 3,42).

Dans spectre RMN, on remarque : quatre méthyls tertiaires, un méthyl secondaire (CH₃ en 21), deux groupes diméthylamino N (CH₃)₂; et deux protons éthyléniques, en accord avec un système diénique, situé à 5,50 et 5,92 ppm.

Un signal correspondant à un groupe CH₂ OR est absent.

Dans le spectre de masse, on observe le pic moléculaire M + = 412 et les pics m/e (coupure c — c' : diméthylamino en 20), m/e 84 (coupure a — a'), m/e 71 (coupure a — a''), m/e 58 (coupure a — a'''), correspondant à un groupe diméthylamino en 3 (fig. 20).

La formule 5 peut être attribuée à l'alcaloïde V : c'est la BUXAMINE-A (fig. 19).

II - PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion sont pris en tubes capillaires avec un appareil BUCHI, d'après TOTTOLI ; les pouvoirs rotatoires sont mesurés à une température voisine de 20°, avec un polarimètre PERKIN-ELMER.

On réalise les spectres de RMN avec un appareil VARIAN A-60, en solution dans le chloroforme deutérié, additionné de tétraméthylsilane (référence 0) ; les spectres I.R., en suspension dans le nujol ou en KBr, sur Infracord PERKIN-ELMER ou UNICAM I200 ; les spectres UV, en solution éthanolique, sur un spectrophotomètre BECKMAN DB ; les spectres de masse dans le Service de Spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette), sur MS 9.

Les micro-analyses sont effectuées au Laboratoire Central de Micro-Analyse du C.N.R.S.

A — METHODES D'EXTRACTION

Nous avons utilisé trois méthodes :

a. Première méthode

L'organe (feuilles : 2,35 kg ; écorces des racines : 2,25 kg ; écorces des tiges : 1,8 kg), séché, pulvérisé est extrait à l'appareil du SOXHLET, par l'éther de pétrole, pendant deux jours, après une nuit de macération. Le marc, séché, est lixivié par l'alcool acétique à 1 %. L'extrait alcoolique est ensuite soumis à une extraction liquide-liquide, à froid, dans une colonne par le chlorure de méthylène. La solution ainsi obtenue, séchée par addition de sulfate de sodium anhydre, est évaporée sous pression réduite. On a alors la totalité des extraits alcaloïdiques : 33,3 g pour les feuilles, 96 g pour les écorces des racines, et 43,5 g pour les écorces des tiges.

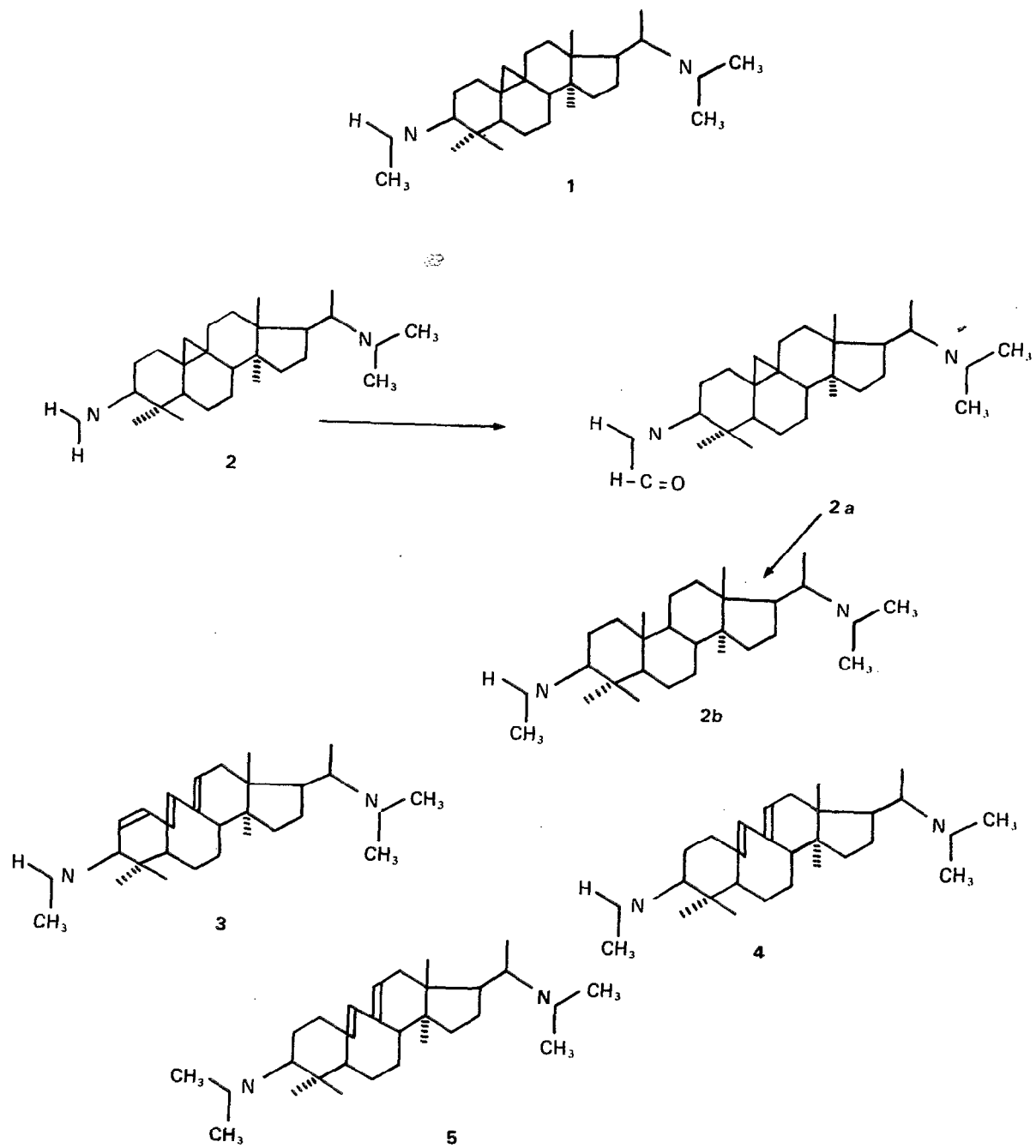


FIGURE 19

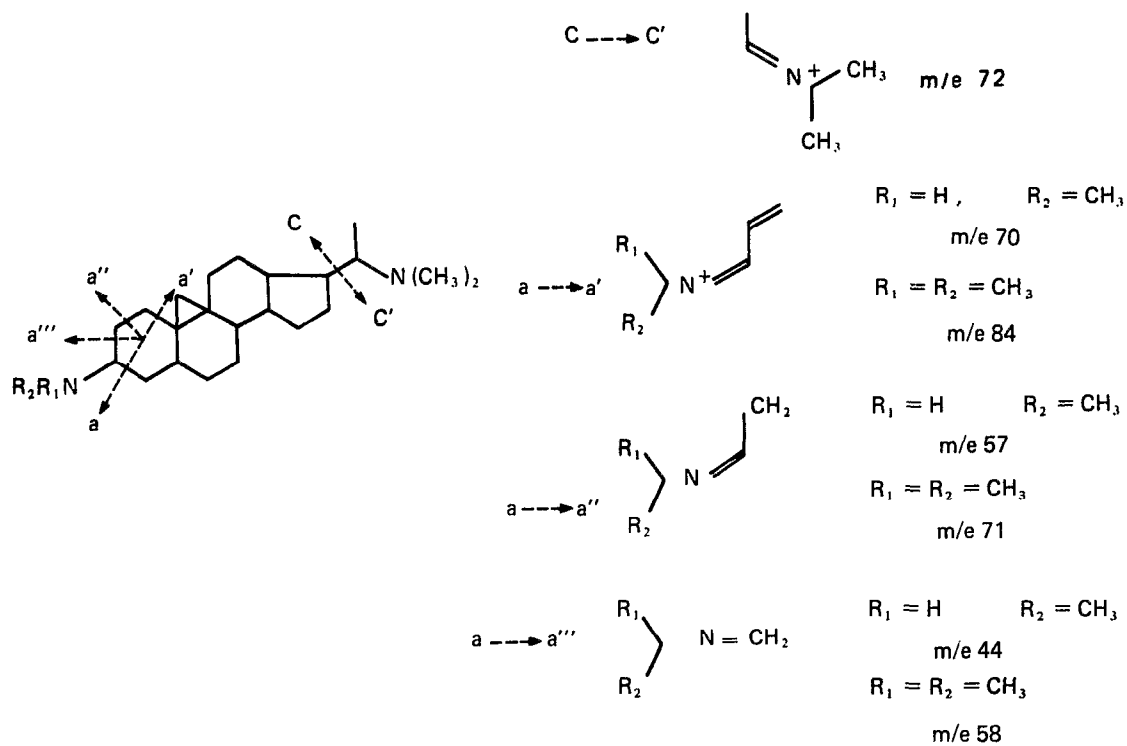


FIGURE 20
COUPURES OBSERVEES SUR SPECTROGRAMMES DE MASSE

Rendements : Feuilles = 1,4 %
Ecorces des racines = 4,2 %
Ecorces des tiges = 2,4 %.

b. Deuxième méthode (Méthode KHUONG-HUU-LAINE et col.).

Cette méthode a été utilisée uniquement pour les écorces des racines. Le matériel végétal (500 g), pulvérisé, est laissé macérer dans le mélange :

Chlorure de méthylène	500 ml
Ether	500 ml
Ethanol	500 ml
Ammoniaque	87,5 ml

pendant trois heures avec agitations fréquentes. L'opération est répétée trois fois, mais sans ammoniaque pour les deux dernières fois. Onessore ; on filtre sur entonnoir Büchner et on concentre à sec sous pression réduite. On a un résidu (30 g), qu'on reprend avec 500 ml d'éther. On extrait ensuite par une solution à 4 % d'acide sulfamique (un litre et demi) : les alcaloïdes sous forme des sulfamates passent dans l'eau acidulée. On alcalinise par l'ammoniaque jusqu'à un pH = 9 ; on extrait ensuite par le chlorure de méthylène jusqu'à épuisement total des alcaloïdes, contrôlé par le réactif de Meyer. Les solutions de chlorure de méthylène sont réunies, lavées avec de l'eau, séchées sur sulfate de sodium pur sec et concentrées sous pression réduite. On obtient un résidu des extraits totaux d'alcaloïdes (38 g).

Rendement = 7,6 %.

c. Troisième méthode

Cette méthode diffère de la précédente seulement par le fait que la macération dans le mélange des solvants est remplacée par une extraction à chaud, au SOXHLET, par le chlorure de méthylène.

L'opération a été réalisée au Laboratoire d'Extraction de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles.

Rendement : Feuilles = 3,8 %
Ecorces des racines = 8,8 %
Ecorces des tiges = 5,6 %.

B – METHODES D'ISOLEMENT

Ces méthodes sont basées sur la chromatographie sur colonne d'alumine. Les extraits totaux d'alcaloïdes sont soumis préalablement à une séparation en différents extraits et lots, par partage entre un tampon à pH = 5 et du chlorure de méthylène, sauf pour le résidu obtenu à partir de la première méthode.

a. Séparation préalable des extraits alcaloïdiques obtenus

α. A partir de la deuxième méthode d'extraction

Le résidu (38 g) est repris par 250 ml de chlorure de méthylène. On agite avec 250 ml de solution tampon à pH = 5 (acide acétique/ammoniaque/eau = 146 ml/140 ml/10 l) ; la manipulation est répétée trois fois dans trois solutions différentes de la solution tampon. La solution de chlorure de méthylène est séchée sur sulfate de sodium anhydre, et évaporée à sec sous pression réduite ; on a l'extrait A (5 g). Les solutions tampon réunies, sont alcalinisées à pH = 9 par l'ammoniaque et extraites par le chlorure de méthylène, jusqu'à réaction négative au réactif de Meyer : l'extractum, séché sur sulfate de sodium, est concentré à sec. On obtient ainsi l'extrait B (30 g).

β. A partir de la troisième méthode d'extraction.

On dissout dans le chlorure de méthylène la totalité du résidu. Deux litres de solution tampon à pH = 5 sont répartis dans cinq ampoules. La solution d'alcoïde est versée successivement dans les différentes ampoules. On alcalinise à pH = 9, puis on extrait par le chlorure de méthylène qui, après séchage sur sulfate de sodium, est évaporé à sec. On partage en trois lots les résidus obtenus :

- Lot A : résidu provenant des deux premières ampoules
(bases fortes ne migrant pas avec le chlorure de méthylène)
- Lot B : résidu provenant de la troisième ampoule
- Lot C : résidu provenant des quatrième et cinquième ampoules
(bases faibles migrant avec le chlorure de méthylène).

Les extraits totaux, recueillis à partir des différents organes soumis au traitement précédent, se sont répartis de la façon suivante :

Feuilles : (poids de l'extrait total = 80 g)

- LOT A = 40 g
- LOT B = 15 g
- LOT C = 25 g

Ecorces des racines : (poids de l'extrait total = 240 g)

- LOT A = 109 g
- LOT B = 53 g
- LOT C = 78 g

Ecorces des tiges : (poids de l'extrait total = 492 g)

- LOT A = 198 g
- LOT B = 94 g
- LOT C = 200 g

b. Séparation par chromatographie sur colonne d'alumine

Nous procédons dans la suite à une chromatographie sur colonne d'alumine d'activité différente, des divers extraits et lots obtenus.

D'autre part, les différents éluats sont suivis à la chromatographie sur plaque en couche mince (CCM), avec comme :

- support alcalin : Kieselgel G. tamponné par la soude,
- éluant : chlorure de méthylène mélangé à différentes proportions d'éthanol (7 à 15 %), suivant les cas,
- révélateur : réactif de DRAGENDORFF.

α. Extraits obtenus de la première méthode d'extraction

Feuilles

Les 27 g d'extrait sont dissous dans le benzène : on sépare l'insoluble (9 g), et les 18 g restants sont chromatographiés sur alumine d'activité II-III Merck (450 g) ; on recueille des fractions de 250 ml.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-13	Benzène	8,3 g	
14-18	Benzène + 50 % Ether	1,3 g	Cristaux ne donnant pas de taches sur CCM, avec réactif de DRAGENDORFF.
19-23	Ether	—	
24-32	Ether + 20 % Ethanol	2,3 g	

33-35	Ether + 50 % Ethanol	2,1 g	
36-38	Ether + 50 % Ethanol	0,4 g	Cristaux ne donnant rien sur CCM, avec réactif de DRAGENDORFF

Ecorces des racines

L'extrait alcaloïdique (50 g), complètement dissous dans le benzène, est chromatographié sur alumine (activité II-III Merck) (650 g).

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-2	Benzène	13,4 g	Cristaux
3	Benzène	2,4 g	Alcaloïde III (cristallisé dans mélange : benzène/hexane)
4-13	Benzène puis Benzène + 50 % Ether	5,2 g	Mélange des cristaux (2 taches sur CCM)
14-20	Benzène puis Ether	6,4 g	Mélange des cristaux (3 taches sur CCM)
21-25	puis Ether + 10 % Ethanol		
	Ether + 25 % Ethanol	2,8 g	
26-32	Ether + 50 % Ethanol	1,9 g	
33-35	Ethanol	4,1 g	Cristaux ne donnant rien sur CCM, avec réactif de DRAGENDORFF
36-41	Ethanol	2,1 g	
42-50	Méthanol	2,8 g	

Ecorces des tiges

La solution benzénique obtenue à partir de l'extrait alcaloïdique, est chromatographiée sur alumine Merck (activité II-III). On recueille par fractions de 500 ml.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1	Benzène	6,3 g	Cristaux
2-12	Benzène	17,8 g	Mélange des cristaux (2 taches sur CCM)
	puis Benzène + 50 % Ether	1,3 g	
13-16	Ether	0,5 g	
17-19	Ether + 10 % Ethanol	1,4 g	
20-22	Ether + 20 % Ethanol	1 g	
23	Ether + 20 % Ethanol	0,3 g	Mélange des cristaux (2 taches sur CCM)
24-25	Ether + 50 % Ethanol	0,5 g	
26-33	Ethanol	1,9 g	

β. Extraits obtenus par la deuxième méthode d'extraction

Extrait A

L'extrait (5 g) est dissous dans benzène (160 ml). Le filtrat, après séparation de l'insoluble (2 g), est chromatographié sur alumine (90 g), et on prélève des fractions de 100 ml.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1	Benzène	0,27 g	Alcaloïde V (cristaux dans benzène)
2-7	Benzène	0,47 g	Mélange des cristaux (2 à 3 taches sur CCM)

8-9	Ether	0,42 g	Mélange des cristaux (plusieurs taches sur CCM)
10-14	Ether	0,88 g	
15	Ether + 50 % Ethanol	0,07 g	
16	Ether + 50 % Ethanol	0,58 g	Cristaux dans acétone.
17-18	Ether + 50 % Ethanol	0,07 g	
19-25	Ethanol	0,02 g	

A part l'alcaloïde V, retrouvé par d'autres méthodes, les cristaux obtenus par cette séparation sont en quantité trop infime pour qu'on puisse les étudier.

Extrait B

Les 30 g d'extrait sont repris par le benzène (500 ml). La chromatographie est faite sur alumine Merck, d'activité II-III, et on recueille des éluats de 500 ml.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1	Benzène	2,3 g	
2	Benzène	2,3 g	Alcaloïde I (cristaux dans acétone)
3-7	Benzène puis Ether	5,8 g	Alcaloïde II (cristaux dans mélange : acétone/benzène)
8-13	Ether	10,9 g	Mélange des cristaux (2 taches sur CCM)
14	Ether + 50 % Ethanol	10,5 g	Mélange des cristaux (2 taches sur CCM)
15-19	Ether + 50 % Ethanol	2,6 g	
20-22	Ethanol	0,2 g	
23-24	Méthanol	0,6 g	

La rechromatographie réalisée à partir des fractions 13-20 précédentes, n'aboutit qu'à des mélanges des cristaux.

γ. Lots obtenus par la troisième méthode d'extraction

Nous étions obligés de limiter la séparation aux lots A (bases fortes) des feuilles, A (bases fortes), C (bases faibles) des écorces des tiges, A (bases fortes), C (bases faibles) des écorces des racines.

— Lot "A" des feuilles

L'extrait (40 g) est dissous dans benzène, on sépare 6 g d'insoluble. La chromatographie est faite avec l'alumine II-III Merck (1 kg), et l'éluat s'effectue par portions de un litre.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-3	Benzène	0,02 g	
4-10	Chlorure de méthylène	6,25 g	Mélange des cristaux (plusieurs taches sur CCM)
11-12	Chlorure de méthylène + 5 % Ethanol	15,92 g	
13-15	Chlorure de méthylène + 10 % Ethanol	1,94 g	
16	Méthanol	0,46 g	

— Lot "A" des écorces des tiges

On utilise le benzène pour reprendre les 198 g d'extrait, et la solution benzénique ainsi préparée, est chromatographiée sur alumine désactivée, par addition de 6 % d'eau (3 kg) ; le volume de chaque éluat est de trois litres.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-6	Benzène	87 g	
7-8	Chlorure de méthylène	12 g	
9-10	Chlorure de méthylène		
	+ 5 % Ethanol	38 g	
11-13	Ethanol	48 g	

Les fractions 1-7 sont rechromatographiées sur alumine Merck, d'activité II-III (3 kg), en éluant à chaque fois trois litres.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-6	Benzène	28,09 g	
7	Benzène	3 g	Alcaloïde II (cristallisé dans méthanol)
8-14	Benzène	20 g	
15	Benzène		
	+ 15 % Chlorure de méthylène	1,95 g	
16-17	Benzène		
	+ 20 % Chlorure de méthylène	3,66 g	
18	Chlorure de méthylène	1,07 g	
19-23	Chlorure de méthylène	8,17 g	Alcaloïde IV (cristallisé dans acétone)
24-28	Chlorure de méthylène	6,38 g	
29-31	Chlorure de méthylène		
	+ 10 % Ethanol	4,35 g	
32-34	Chlorure de méthylène		
	+ 30 % Ethanol	4,61 g	

— Lot "C" des écorces des tiges

L'extrait (200 g) est dissous dans benzène ; l'alumine utilisée pour la chromatographie est désactivée par addition de 6 % d'eau (3 kg), on recueille trois litres pour chaque fraction.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-3	Benzène	102,3 g	
4-5	Benzène	9,4 g	Alcaloïde II (cristallisé dans acétone)
6-7	Chlorure de méthylène	12,2 g	Cristaux
8	Chlorure de méthylène	7,5 g	
9-11	Chlorure de méthylène		
	+ 2 % Ethanol	35,9 g	
12-13	Chlorure de méthylène		
	+ 5 % Ethanol	12,5 g	
14-15	Chlorure de méthylène		
	+ 10 % Ethanol	8,8 g	
16	Ethanol	1 g	

— Lot "A" des écorces des racines

On dissout dans le benzène l'extrait (109 g), et on chromatographie sur 3 kg d'alumine additionnée de 6 % d'eau : on prélève trois litres à chaque fois.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1	Benzène	13 g	Alcaloïde I (cristallisé dans l'acétone)
2	Benzène	17 g	Alcaloïde II (cristallisé dans acétone)
3	Benzène	7 g	Mélange des cristaux des Alcaloïdes II et III
4-5	Benzène	7 g	
6-7	Chlorure de méthylène	15 g	Mélange des cristaux (plusieurs taches sur CCM)
8-9	Chlorure de méthylène	6 g	
10-11	Chlorure de méthylène + 5 % Ethanol	29 g	Alcaloïde IV (cristallisé dans acétone)
12-13	Chlorure de méthylène + 5 % Ethanol	5 g	
14-15	Chlorure de méthylène + 10 % Ethanol	5 g	
16	Ethanol	8 g	

– Lot "C" des écorces des racines

Le lot (78 g) est repris par le benzène et chromatographié sur alumine d'activité II-III Merck (2,5 kg) ; on recueille des fractions de 2,5 litres.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1-3	Benzène	7 g	
4-5	Benzène		
	puis Chlorure de méthylène	2 g	Alcaloïde V (cristallisé dans acétone)
6-7	Chlorure de méthylène	7 g	Mélanges des cristaux (2 taches sur CCM)
8-9	Chlorure de méthylène	5 g	
10-11	Chlorure de méthylène + 5 % Ethanol	25 g	
12	Chlorure de méthylène + 5 % Ethanol	5 g	Alcaloïde II (cristallisé dans acétone)
13-15	Chlorure de méthylène + 10 % Ethanol	10 g	
16-17	Ethanol	3 g	

L'eau-mère de la fraction 12 et la fraction 13 sont mélangées, dissoutes dans benzène, rechromatographiées sur alumine d'activité II-III (240 g) et on élue par fractions de 250 ml.

Fractions	Eluant	Poids	Observations
1	Benzène	0	
2-10	Benzène		
	+ 10 % Chlorure de méthylène	0,4 g	
11	Benzène		
	+ 20 % Chlorure de méthylène	0,14 g	
12-17	Benzène		
	+ 20 % Chlorure de méthylène	0,74 g	Alcaloïde II (cristallisé dans acétone)
18-25	Benzène		
	+ 40 % Chlorure de méthylène puis 60 % Chlorure de méthylène	0,78 g	
26-27	Chlorure de méthylène	0,31 g	
29-30	Chlorure de méthylène + 15 % Ethanol	4,76 g	

DESCRIPTION DES CONSTANTES PHYSIQUES ET SPECTRES

(fig. 21 à 31)

CYCLOPROTOBUXINE C, 1 : Cristallisation dans l'acétone : $-F = 212^{\circ}$ (après sublimation), $(\alpha)_D = + 73^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$).

Spectre RMN identique à celui du produit retiré du *Buxus balearica*.

CYCLOPROTOBUXINE F, dérivé N-isopropylidène : Cristallisation dans l'acétone : $-F = 193^{\circ}$, $(\alpha)_D = + 61^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$).

Analyse pour $\text{C}_{29} \text{H}_{50} \text{N}_2$:

calculé % : C 81,24 ; H 12,23 ; N 6,53

trouvé % : C 81,17 ; H 12,21 ; N 6,62

Spectre IR (KBr) : C = N à 1640 cm^{-1}

Spectre RMN : Système AB ($J = 5 \text{ cps}$) à 0,33 et 0,60 ppm (CH_2 cyclopropanique) ; 4 singulets à 0,66, 0,93, 0,96 et 0,96 ppm (méthyls tertiaires) ; doublet ($J = 6 \text{ cps}$) à 0,80 ppm (méthyl secondaire en 21) ; 2 singulets à 1,80 et 1,98 ppm [$\text{N} = \text{C} (\text{CH}_3)_2$] ; 1 singulet à 2,2 ppm [$\text{N} (\text{CH}_3)_2$].

Spectre de masse : $M^+ = 426$, M-15 (411), M-43 (383) ; pics à m/e 72 [$\text{N} (\text{CH}_3)_2$ en 20] (pic de base).

CYCLOPROTOBUXINE F, 2 : Cristallisation dans méthanol : $-F = 163^{\circ}$, $(\alpha)_D = + 42^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$).

FORMYLATION DE CYCLOPROTOBUXINE F, 2 : 200 g de l'alcaloïde II (2), sont traités par un mélange d'anhydride acétique (10 cc) et d'acide formique (5 cc), pendant une heure. On évapore à sec, on alcalinise par l'ammoniaque et on extrait par le chlorure de méthylène. Après un lavage par une solution saturée de sulfate de sodium et séchage sur sulfate de sodium anhydre, on évapore à sec : on obtient un résidu 2a : $-F = 280^{\circ}$ (acétone), $(\alpha)_D = + 10^{\circ}$ (CHCl_3 , $C = 0,2$).

Spectre IR (nujol) : C = O d'un amide à 1680 cm^{-1}

Spectre RMN : Signal correspondant à un -CHO- à 8,1 ppm.

REDUCTION DE 2a EN CYCLOPROTOBUXINE C, 2b : on solubilise 2a dans le chlorure de méthylène, on ajoute un même volume d'éther anhydre et 185 mg d'hydrure de lithium et d'aluminium. Après agitation mécanique durant la nuit, on filtre et on obtient le produit 2b, dont le spectre RMN se superpose exactement à celui du cycloprotobuxine C.

BUXITRIENINE C, 3 : Cristallisation dans mélange benzène/hexane : $-F = 192-3^{\circ}$ (après sublimation) ; $(\alpha)_D = + 57^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$).

Analyse pour $\text{C}_{27} \text{H}_{44} \text{ON}_2$: 412,64

calculé % : C 78,58 ; H 10,75 ; O 3,88 ; N 6,79

trouvé % : C 78,63 ; H 10,68 ; O 3,91 ; N 6,50

Spectre IR (KBr) : Bandes OH et NH à 3360 cm^{-1} ; alcool à 1040 cm^{-1}

Spectre UV : 3 max. à 289, 278, 270 nm ($\log \epsilon = 3,50, 3,62, 3,51$)

Spectre RMN : 3 singulets à 0,73, 0,74 et 0,85 ppm (trois méthyls tertiaires) ; un doublet ($J = 6$ cps) à 0,83 ppm (CH_3 en 21) ; un singulet à 2,48 ppm [$\text{NH}(\text{CH}_3)$] ; un singulet à 2,19 ppm [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$] ; un massif centré à 3,23 ppm (H en 3) ; quatre protons éthyléniques entre 5,33 et 6,56 ppm (système triénique).

Spectre de masse : $M + = 412$; pics à m/e 72 [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$ en 20] (pic de base).

DESOXY-16 BUXIDIENINE-C, 4 : Cristallisation dans l'acétone
 $-F = 200-1^{\circ}$ (après sublimation) ; $(\alpha)_D = + 55^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$)

Analyse pour $\text{C}_{27} \text{H}_{46} \text{O N}_2$ = 414,65

calculé % : C 78,2 ; H 11,32 ; O 3,86 ; N 6,76

trouvé % : C 78,64 ; H 11,32 ; O 3,71 ; N 6,33

Spectre IR (nujol) : bandes de OH et NH à 3280 cm^{-1} , alcool à 1060 cm^{-1} .

Spectre UV : max. à 254, 246, 238 nm ($\log \epsilon = 3,40, 3,67, 3,42$)

Spectre RMN : 3 singulets à 0,70, 0,75 et 0,88 ppm (3 CH_3 tertiaires) ; un doublet ($J = 6$ cps) à 0,84 ppm (CH_3 en 21) ; singulet à 2,19 ppm [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$] ; singulet à 2,49 ppm [$\text{NH}(\text{CH}_3)$] ; système AB ($J = 10$ cps) à 3,55 et 3,77 ppm (groupe CH_2OH) ; multiplet à 5,52 ppm et singulet à 5,93 ppm (deux protons éthyléniques d'un système diénique conjugué).

Spectre de masse : $M + = 414$; pics à m/e 72 (pic de base) [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$ en 20], 70, 57, 44 [$\text{NH}(\text{CH}_3)$ en 3], 84.

BUXAMINE A, 5 : Cristallisation dans l'acétone.

$F = 133-4^{\circ}$; $(\alpha)_D = + 40^{\circ}$ (CHCl_3 , $C = 0,2$)

Analyse pour $\text{C}_{28} \text{H}_{48} \text{N}_2$:

calculé % : C 81,55 ; H 11,65 ; N 6,79

trouvé % : C 80,18 ; H 11,17 ; N 6,90

Spectre UV : max. à 238, 246, 254 nm ($\log \epsilon = 3,42, 3,67, 3,40$).

Spectre RMN : 4 singulets à 0,71, 0,71, 0,71 et 1 ppm (CH_3 tertiaires) ; doublet ($J = 6$ cps) à 0,85 ppm (CH_3 en 21) ; 2 singulets à 2,20 et 2,26 ppm [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$] ; deux protons éthyléniques situés vers 5,50 et 5,92 ppm (système diénique conjugué).

Spectre de masse : $M + = 412$, $M-15$ (397) ; pics à m/e 72 (pic de base) [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$ en 20], 84 71, 58 [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$ en 3].

III - CONCLUSION

Des écorces des tiges et des racines du *Buxus madagascariensis* Baill. subsp. *xerophila* for. *silicicola*, nous avons mis en évidence la présence de cinq alcaloïdes.

L'un d'eux, la CYCLOPROTOBUXINE-C, est déjà connu et est identifié par comparaison avec un échantillon de référence.

Les quatre autres sont nouveaux et leurs structures sont proposées, eu égard à leurs données physiques (spectres RMN, IR, UV, de masse). Quant à la cycloprotobuxine F, sa structure est confirmée, en plus, par corrélation chimique avec le cycloprotobuxine-C.

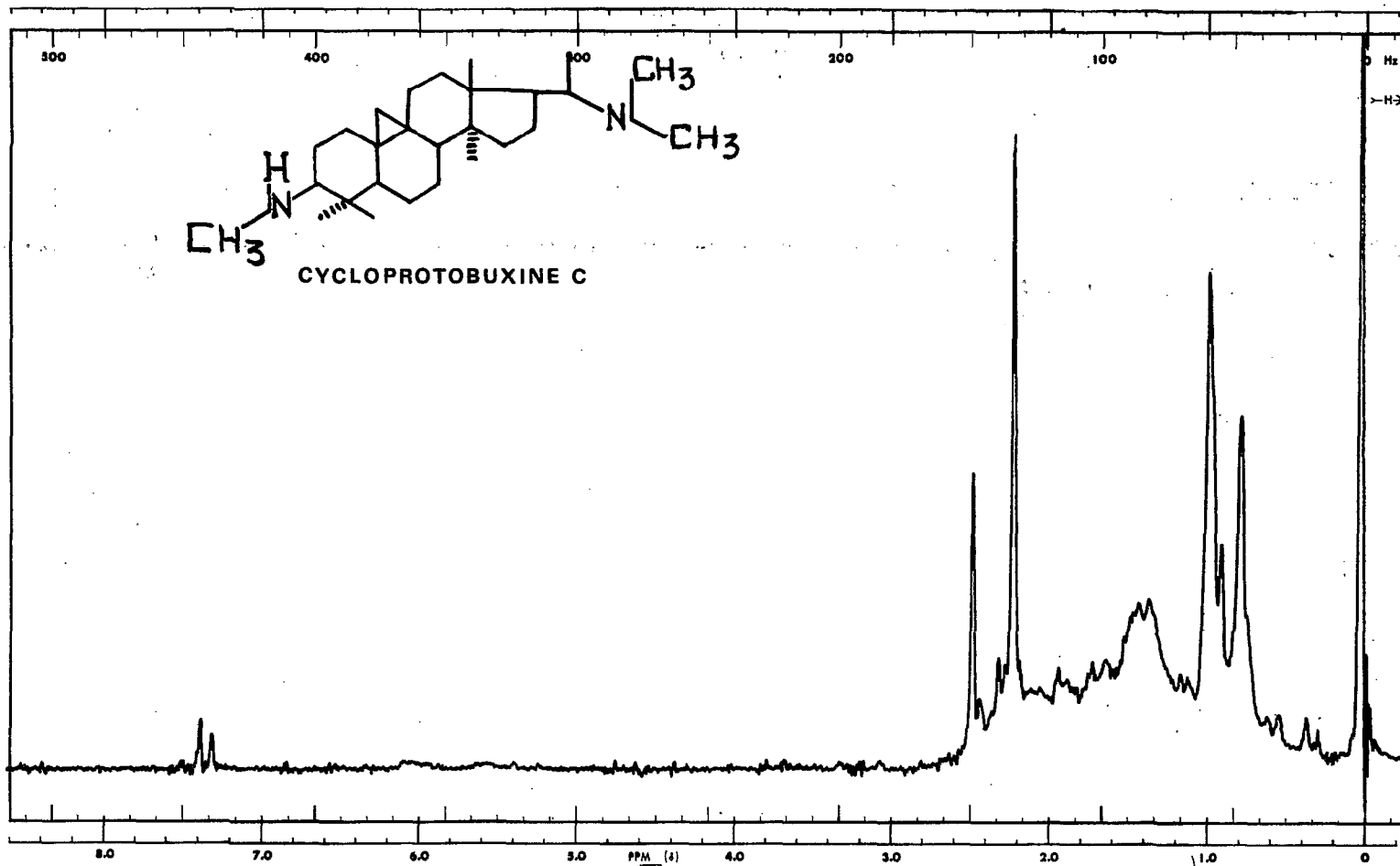


FIGURE 21
SPECTRE RMN

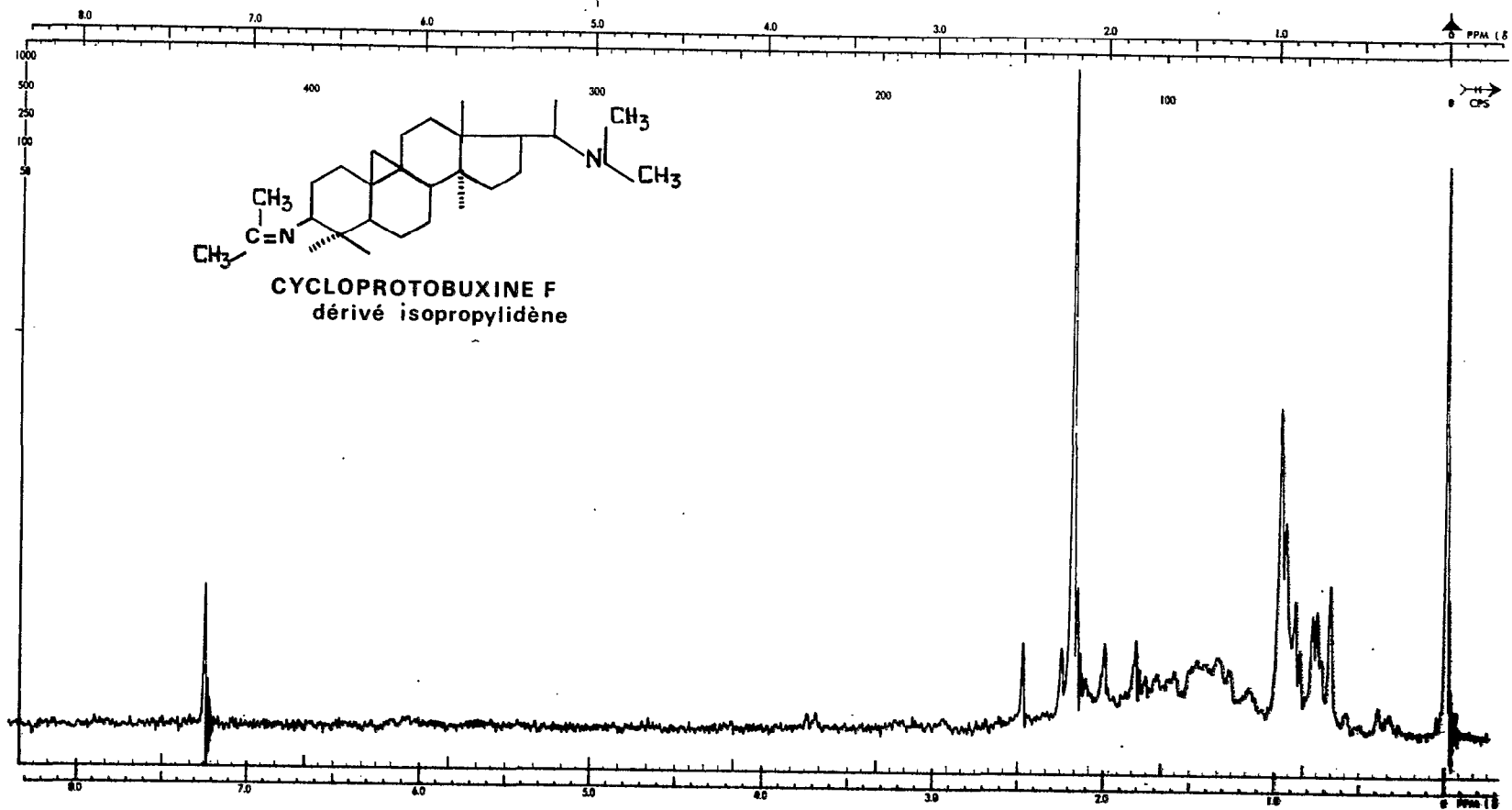


FIGURE 22
SPECTRE RMN

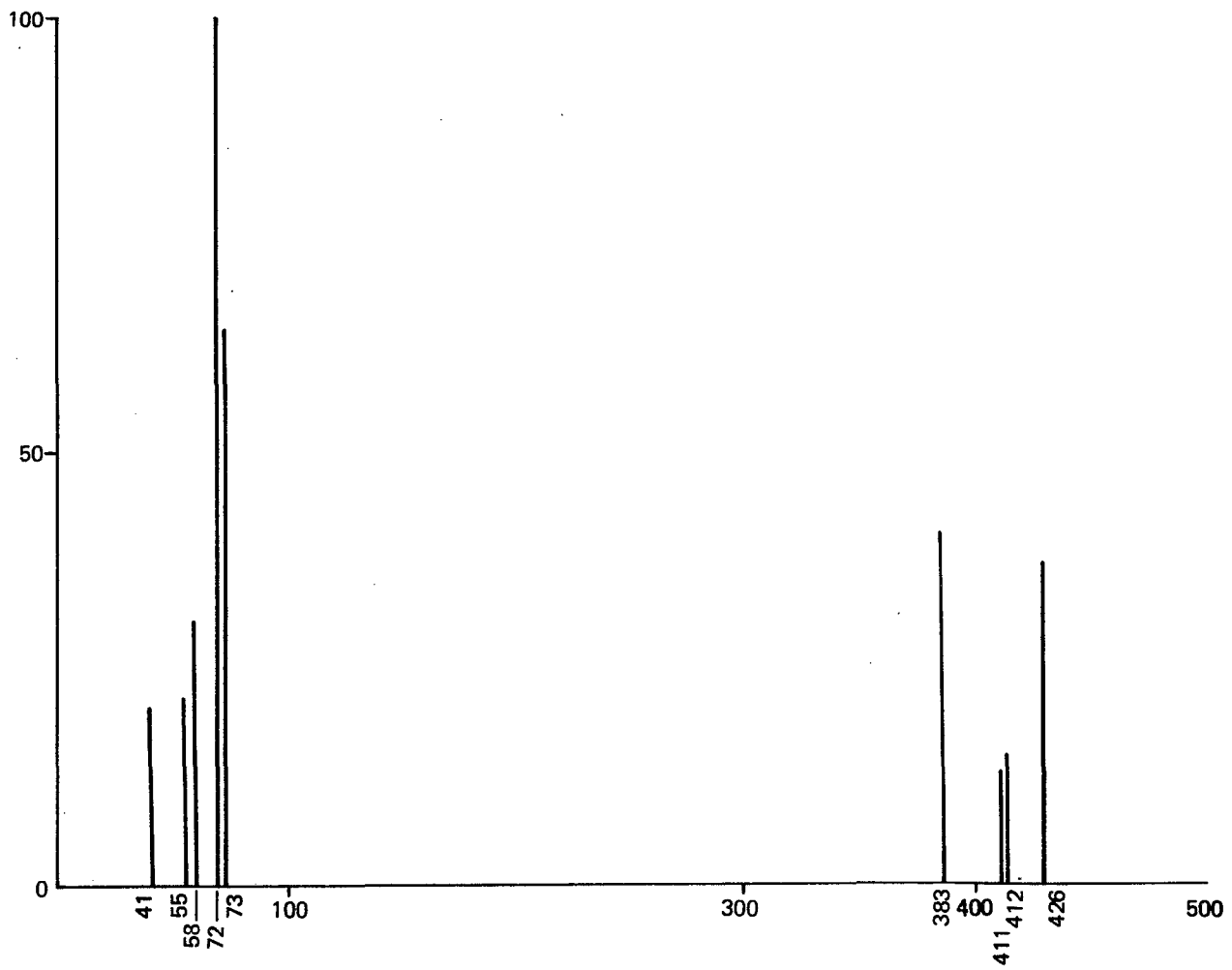


FIGURE 23
SPECTRE DE MASSE – CYCLOPROTOBUXINE F.

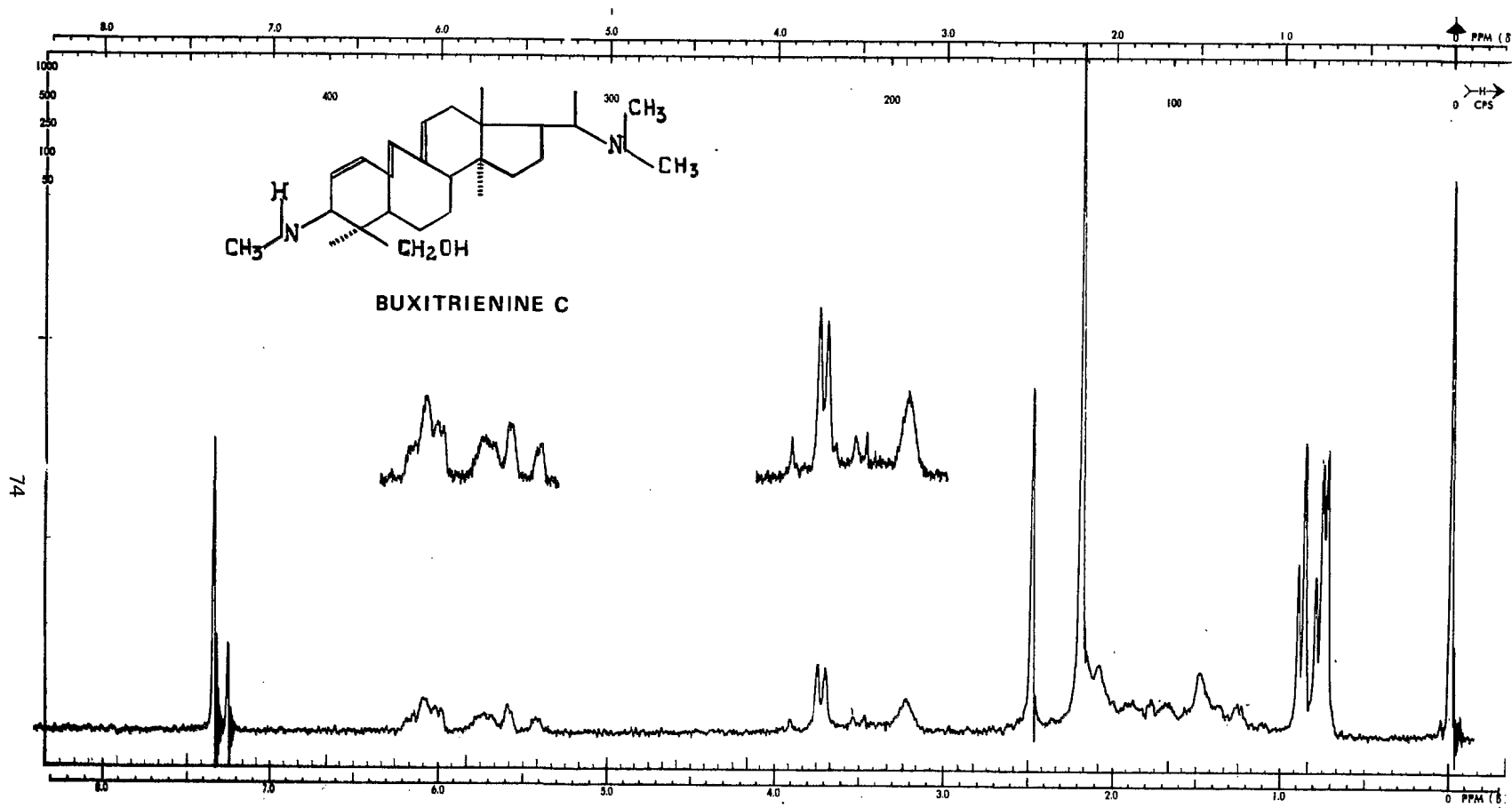


FIGURE 24
SPECTRE RMN

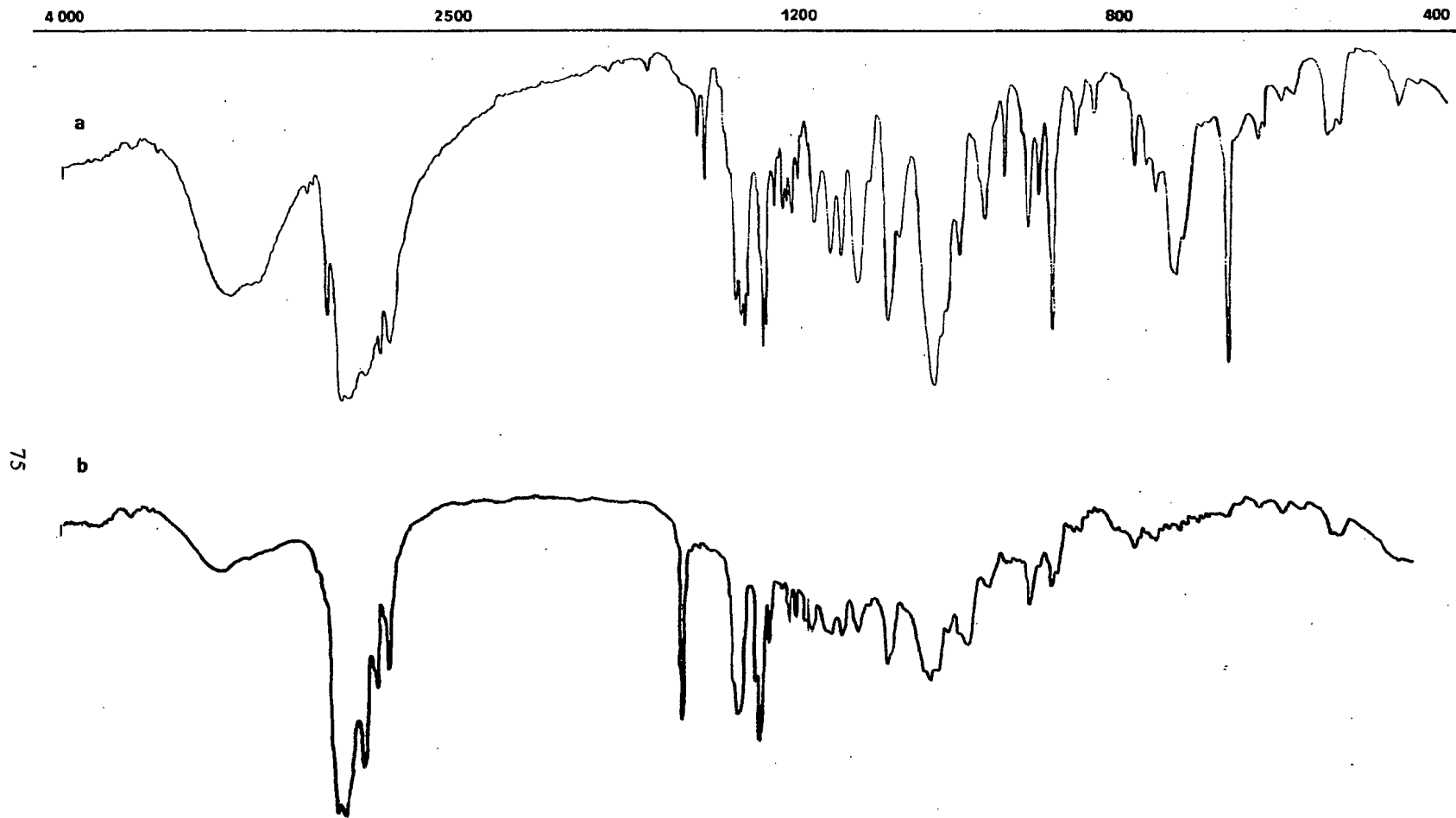


FIGURE 25

- a) SPECTRE I.R. BUXITRIENINE C.
- b) SPECTRE I.R. CYCLOPROTOBUXINE F.

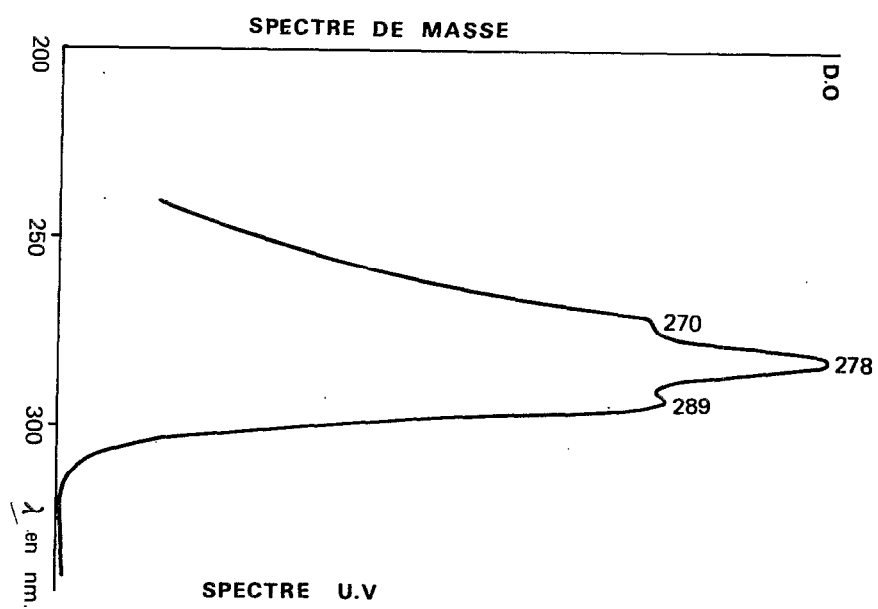
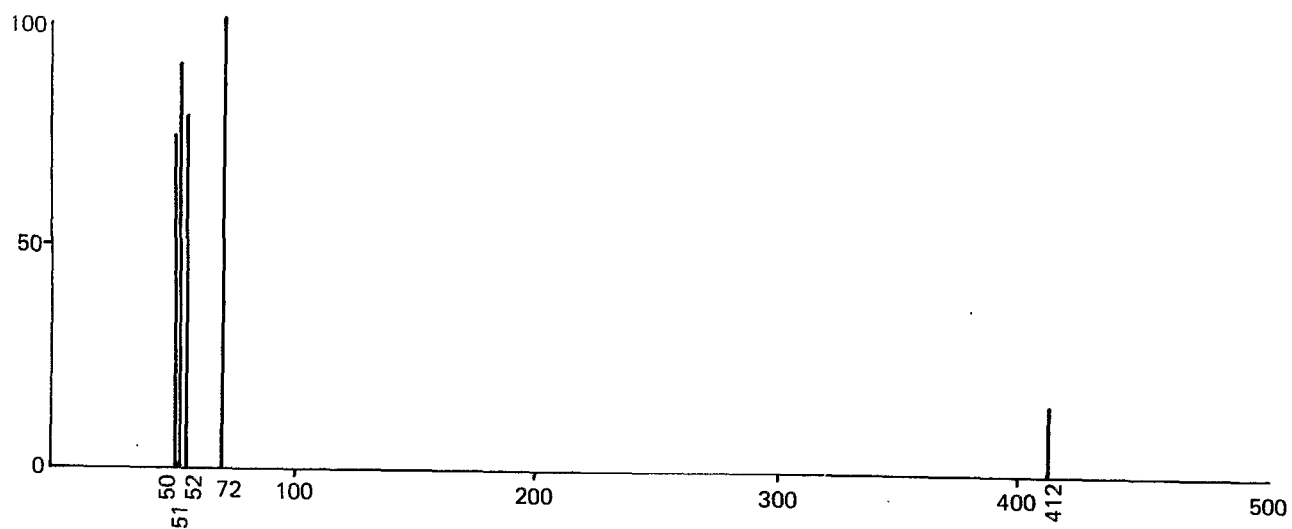


FIGURE 26
BUXITRIENINE C.

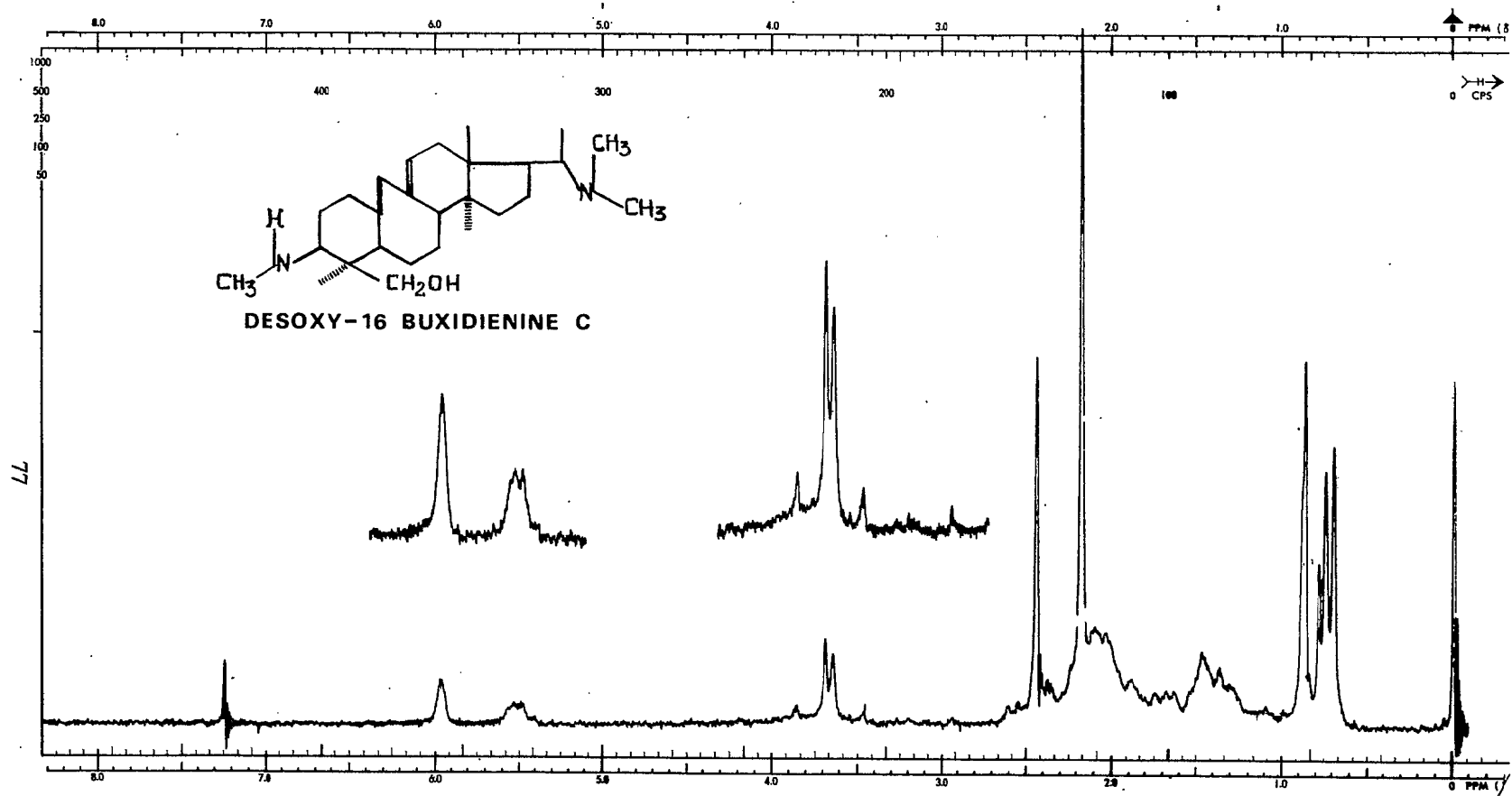


FIGURE 27
SPECTRE RMN

78

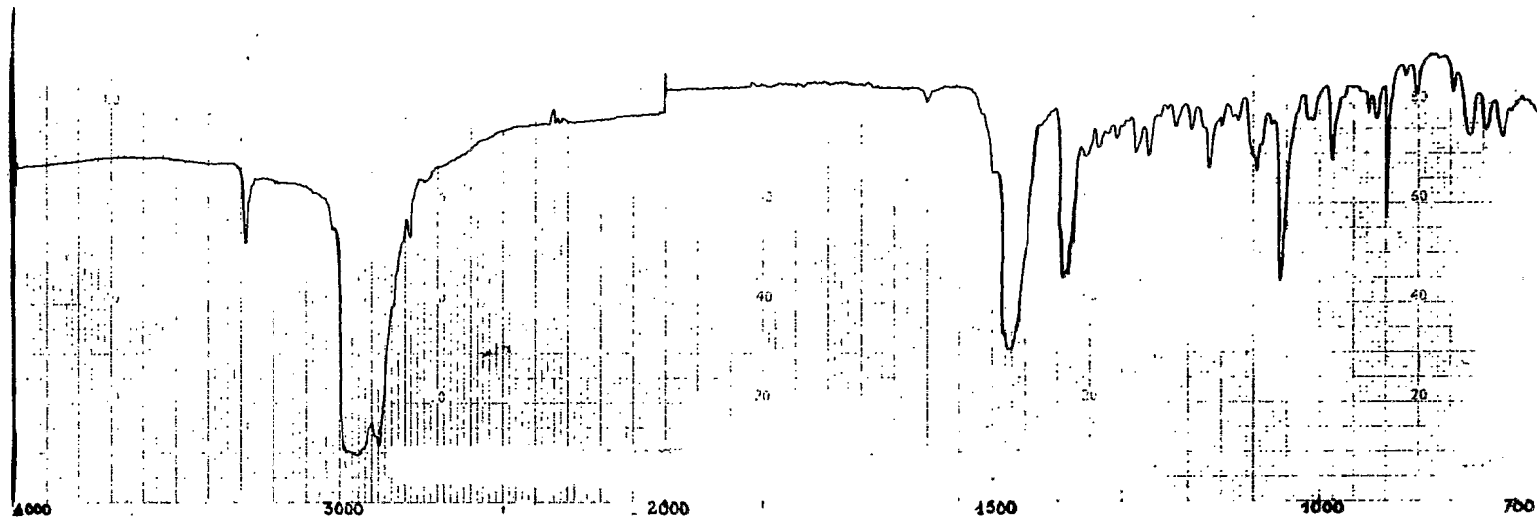


FIGURE 28
SPECTRE I.R. DESOXY-16 BUXIDIENINE C.

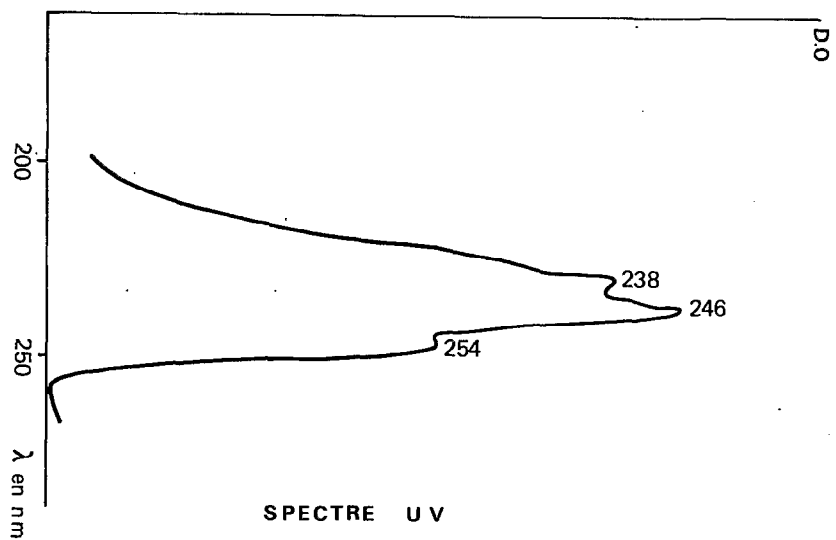
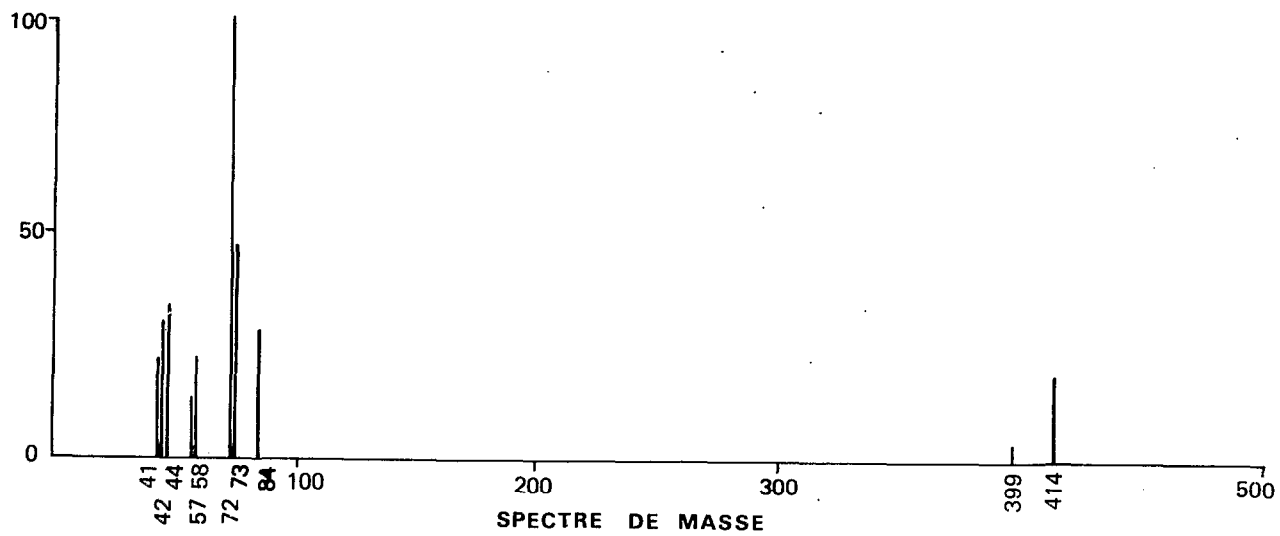


FIGURE 29
DESOXY-16 BUXIDIENINE C.

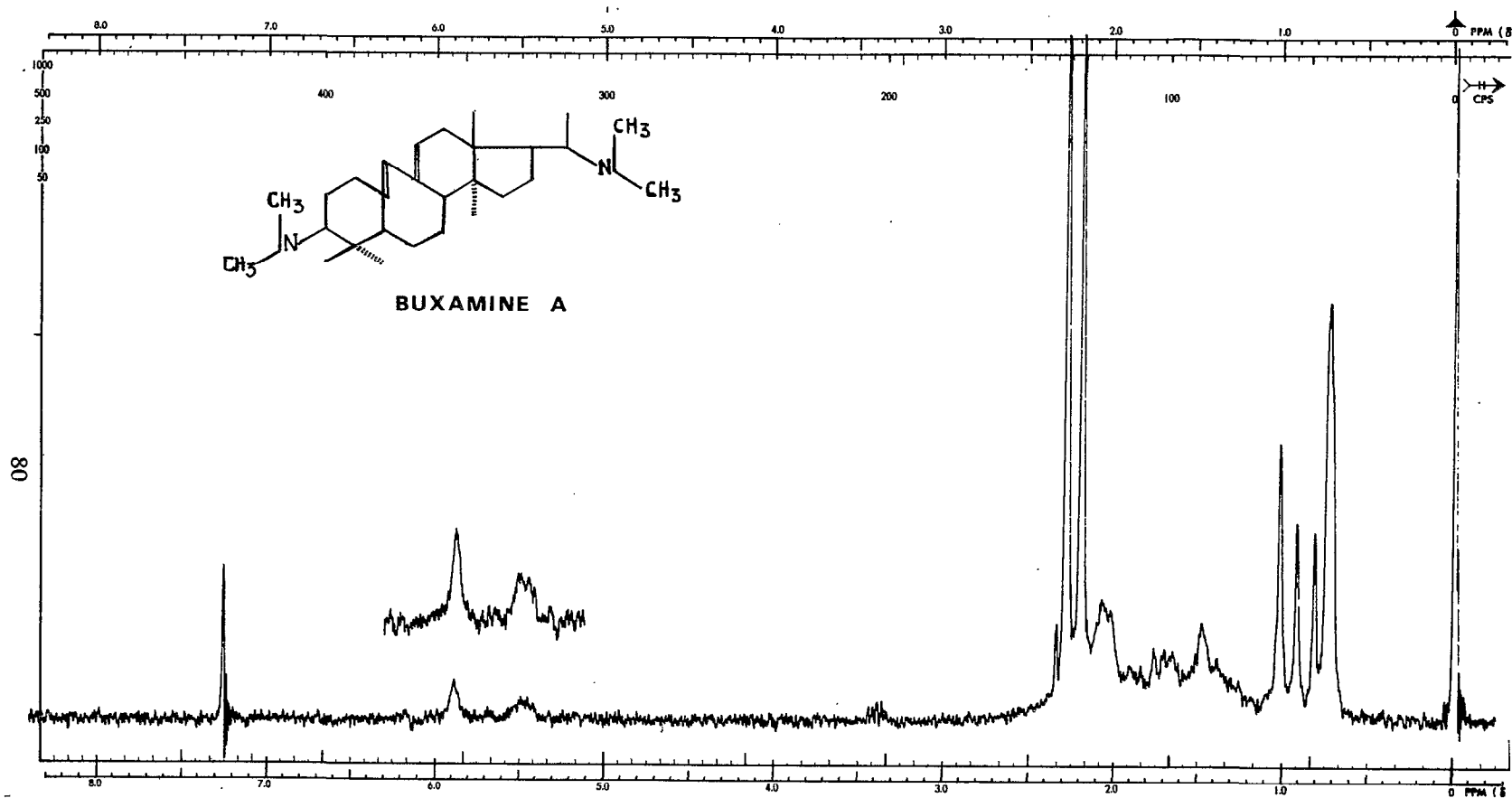


FIGURE 30
SPECTRE RMN

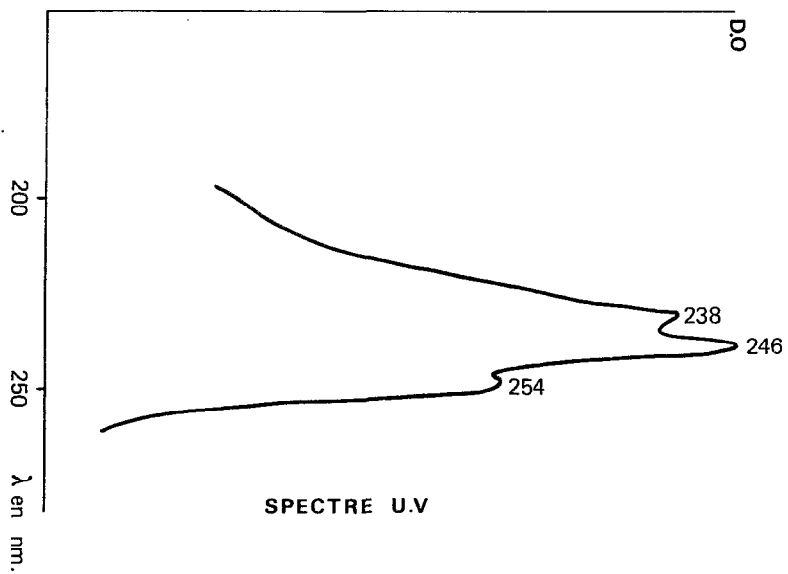
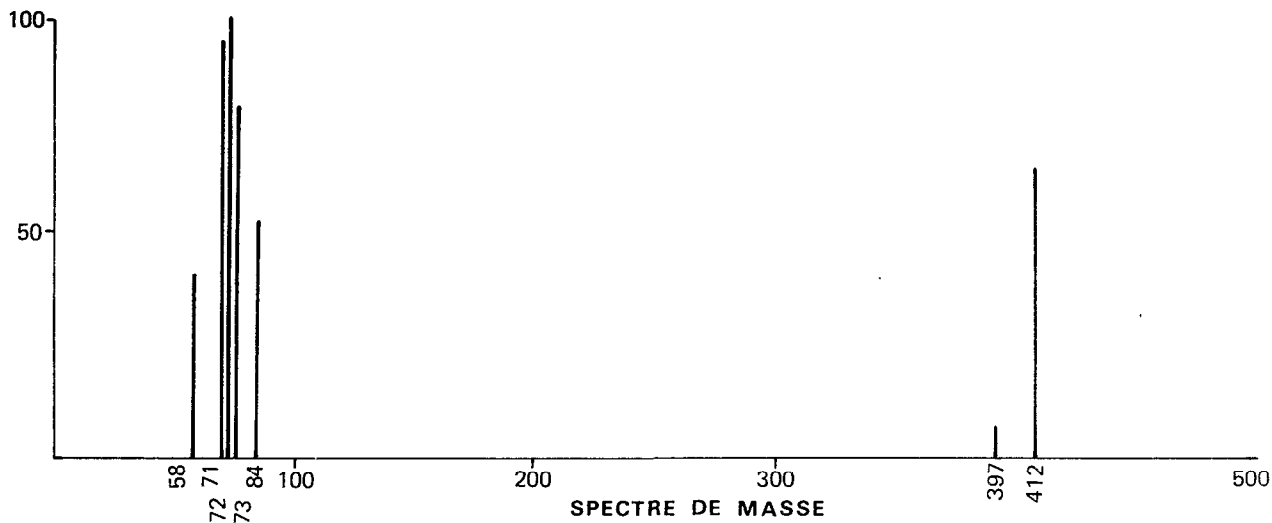


FIGURE 31
BUXAMINE A

Troisième partie

ETUDE PHYSIOLOGIQUE

I - TRAVAUX ANTERIEURS

Le *Buxus sempervirens* L. a figuré au Codex Français de 1818 à 1884. Il a été renommé fébrifuge, employé comme succédané de la quinine et a été utilisé aussi contre les maladies de la peau et les rhumatismes. Plusieurs auteurs ont étudié ses propriétés hypotensives et inhibitrices de la cholinestérase (VINCENT et MATHOU - 1945 -, DELAS et col. - 1948 -). En 1959, J. TAMCHYNA et col. signalent cette action hypotensive due aux alcaloïdes isolés des feuilles de *Buxus sempervirens* et ses variétés : *allovaryegata*, *suffruticosa*, *angustifolia* et *latifolia microphylla* et de *Buxus microphylla japonica* : ils notent une baisse rapide de la tension artérielle, à la suite d'une injection intraveineuse, avec divers phénomènes : ischémie, bradycardie, atteinte du muscle cardiaque. Ils situent la dose létale aux environs de 8-10 mg/kg et la dose efficace 3,7 mg/kg. W. ORGELL (1963) mentionne l'inhibition de la cholinestérase du plasma humain par l'extrait de la plante. D'après STAUFFACHER (1964), la séparation sur une colonne d'alumine basique des alcaloïdes du *Buxus sempervirens*, en alcaloïdes physiologiquement actifs et inactifs est possible et permet d'aboutir à la mise en évidence de trois alcaloïdes ayant pour formules brutes : $C_{26}H_{44}N_2$, $C_{25}H_{42}N$, $C_{26}H_{44}N_2O$, constituant les principes à action cardiaque. Enfin, les propriétés antibiotiques, des graines de la même plante, surtout vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*, sont rapportées par WELLER et col. (1953).

Quant à la toxicité, VAN SOEST et col. (1965) ont décrit des cas mortels chez des porcs et des bovins, après ingestion des feuilles de *Buxus sempervirens*. PUCKETT et col. (1966) font état de l'activité cytotoxique de la buxénine-G, alcaloïde du même *Buxus*, se traduisant par une activité inhibitrice significative contre les cellules dérivées du carcinoma humain du nasopharynx et l'activité anti-tumorale (expérience sur des rats) des autres alcaloïdes.

A Madagascar, l'écorce de tiges du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *silicicola*, très amère est utilisée contre les maux d'estomac : son infusé aurait une action purgative et ocytocique (DEBRAY et col. 1971).

II - - ESSAIS PRELIMINAIRES DE LA TOXICITE

A – GENERALITES

L'étude a comporté :

- La détermination de la toxicité de l'espèce du *Buxus madagascari*-type (échantillon 1) et de sous-espèce *xerophila*, variété *silicicola* (échantillon 2) et variété *calcicola* (échantillon 3), sous forme d'infusés injectés par voie intrapéritonéale.
- La toxicité de quatre alcaloïdes (cycloprotobuxine-C, cycloprotobuxine-F, buxitriénine C, et desoxy-16-buxidienine-C) isolés du *Buxus madagascari* subsp. *xerophila* f. *silicicola*, par voie orale.

B – PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 – Infusés

Quatre grammes de la drogue grossièrement pulvérisée sont projetés dans 40 ml d'eau distillée bouillante. Après infusion de 15 mn, on filtre sur un petit entonnoir Büchner. L'infusé est concentré au bain-marie jusqu'à un volume de 5 ml (un ml contient 0,8 g de drogue).

2 – Alcaloïdes purs

Ils sont obtenus par la méthode décrite dans la partie chimique (voir p. 56).

C – RESULTATS

- Nous nous sommes bornés à une appréciation approximative de la toxicité, ce qui se traduit par une dose léthale comprise entre deux chiffres : l'un équivaut à la dose inférieure ne tuant aucune souris, et l'autre la dose supérieure provoquant 100 p. 100 de mortalité.
- Les symptômes observés sont les suivants : difficultés respiratoires, asphyxie, convulsions entraînant la mort au bout d'un quart d'heure au maximum.

Mais une exception est remarquée pour l'intoxication due à la cycloprotobuxine C et à la buxitriénine C : la mort survient plus lentement au bout d'une heure environ, et pendant ce temps, la souris est prostrée, immobile, ne réagissant ni au pincement, ni aux piqûres, ni au bruit.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

a. Infusés (voie intrapéritonéale)

Echantillon	Organe de la plante	Doses léthales = DL
n° 1	Feuilles	10,000 g/kg < DL < 20,000 g/kg
	Ecorces des tiges	3,000 g/kg < DL < 5,000 g/kg
	Ecorces des racines	0,750 g/kg < DL < 1,000 g/kg
n° 2	Feuilles	10,000 g/kg < DL < 20,000 g/kg
	Ecorces des tiges	0,125 g/kg < DL < 0,500 g/kg
	Ecorces des racines	0,312 g/kg < DL < 0,625 g/kg
n° 3	Feuilles	5,000 g/kg < DL < 10,000 g/kg
	Ecorces des tiges	2,500 g/kg < DL < 5,000 g/kg
	Ecorces des racines	1,250 g/kg < DL < 2,500 g/kg
	Fruits	DL > 10,000 g/kg

b. Alcaloïdes purs (voie orale)

CYCLOPROTOBUXINE C	0,300 g/kg < DL < 0,60 g/kg
CYCLOPROTOBUXINE F	0,300 g/kg < DL < 0,60 g/kg
BUXITRIENINE C	0,125 g/kg < DL < 0,25 g/kg
DESOXY-16-BUXIDEININE C	DL > 2,5 g/kg

Les différents organes de la plante, ainsi que les alcaloïdes, ont une toxicité assez élevée.

Conclusions générales

L'objet de ce travail était l'étude comparée de l'espèce-type du *Buxus madagascariensis* Baill. (échantillon 1) et deux variétés de la sous-espèce *xerophila* : les formes *silicicola* (échantillon 2) et *calicicola* (échantillon 3).

La première partie est consacrée à l'étude botanique au cours de laquelle, après avoir rappelé les caractères de leur habitat respectif, nous avons passé en revue les caractères morphologiques et anatomiques des différents organes des trois plantes. Au point de vue morphologique, existent des différences notables : la sous-espèce *xerophila* f. *silicicola* (échantillon 2) est un petit arbre atteignant 7-8 m de hauteur, l'espèce-type et la forme *calicicola* sont des arbustes ne dépassant guère 2 m ; l'aspect brillant de la face supérieure des feuilles des deux premières variétés et celui terne de la troisième ; et surtout les dimensions de ces feuilles : grandes pour l'espèce-type = 2,5 x 5 cm, très petites pour la sous-espèce *xerophila* f. *silicicola* = 0,8 x 2 cm au maximum, moyennes pour la sous-espèce *xerophila* f. *calicicola* = 1,2 x 4,5 cm, au maximum, sont des critères nets de différenciation. Quant à l'anatomie, seule celle des feuilles apporte quelques éléments de distinction : nervure médiane très saillante pour l'échantillon 1, peu saillante et peu différenciée pour 2 et 3 ; l'épiderme très cutinisé et la cuticule très épaisse et mamelonnée pour 3 ; le parenchyme palissadique continu dans la partie centrale pour 2 seul. Par contre, l'anatomie des tiges et des racines et la structure des épidermes inférieurs (stomates) sont très voisines. La localisation histochimique révèle la présence des alcaloïdes, dans les mêmes tissus pour les trois variétés : mésophylle des feuilles et phloème dans les racines. En ce qui concerne les flavonoïdes, on les rencontre dans le mésophylle et surtout dans les épidermes pour les trois échantillons ; les acides-phénols se trouvent dans le mésophylle et, en outre, pour l'échantillon 3 dans l'épiderme supérieur.

La deuxième partie comprend l'étude chimique. Le premier chapitre concerne le rappel des travaux antérieurs sur les *Buxus*, l'espèce malgache n'ayant pas encore fait l'objet des recherches, et les essais préliminaires effectués. Ces essais montrent l'absence d'anthocyanes, de quinones, de saponosides et de l'arbutoside, la présence des leuco-anthocyanes (dans les échantillons 1 et 3), des tanins catéchiques ou catéchols, des flavonoïdes, des acides-phénols (dans les trois échantillons). Les alcaloïdes sont abondants dans tous les organes des trois variétés.

L'étude particulière des composés polyphénoliques des feuilles est faite dans le chapitre II. Si les flavonoïdes eux-mêmes n'ont pu être identifiés, nous avons pu isoler les deux génines dans les produits d'hydrolyse des trois échantillons : la première peut être identifiée, eu égard à son Rf et ses données spectrales au quercétol ou tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavonol, la deuxième serait vraisemblablement l'isorhamnétol ou trihydroxy-5, 7, 4' - méthoxy-3' flavonol. Les acides paracoumarique, vanillique et syringique se rencontrent dans les trois variétés. Un quatrième acide, non identifié, a été mis en évidence dans la sous-espèce *xerophila* f. *calicicola*.

Au point de vue des alcaloïdes, nous n'avons pu étudier, de manière approfondie, que la sous-espèce *xerophila* f. *silicicola* (échantillon 2) dans le chapitre III. Les teneurs en alcaloïdes sont sensiblement analogues pour les trois lots, elles croissent des feuilles aux écorces des tiges et aux écorces des racines.

Des méthodes d'extraction ont été utilisées : la première est une lixiviation par l'alcool acétique, après dégraissage à l'éther de pétrole, la solution éthanolique obtenue est extraite par le chlorure de méthylène dont l'évaporation conduit aux alcaloïdes totaux ; la deuxième consiste en une macération à froid dans un mélange des solvants (chlorure de méthylène/éther/éthanol) en milieu ammoniacal, et la troisième en une extraction à chaud à l'appareil du Soxhlet, par le chlorure de méthylène. En utilisant successivement une séparation par partage entre une solution-tampon à pH = 5 et le chlorure de méthylène, et la chromatographie sur colonne d'alumine de diverses activités, nous avons pu isoler cinq alcaloïdes dont quatre nouveaux.

– le premier est identifié à la CYCLOPROTOBUXINE C, déjà isolé dans d'autres espèces des *Buxus*,

– le deuxième, de formule brute $C_{29}H_{50}N_2$, cristallise dans l'acétone en donnant un dérivé N-isopropylidène ($F = 193^{\circ}$; $(\alpha)_D = + 61^{\circ}$, $M + = 426$), dont les spectres I.R., R.M.N. et masse et une corrélation chimique avec la cycloprotobuxine C, permettent de lui attribuer la structure de la CYCLOPROTOBUXINE F, d'après la nomenclature internationale adoptée pour les alcaloïdes des *Buxus*,

– le troisième, cristallise dans le mélange benzène/hexane ($F = 192-3^{\circ}$, $(\alpha)_D = + 57^{\circ}$, $M + = 412$, formule brute $C_{27}H_{44}ON_2$), il se caractérise par la présence d'un système triénique (spectre U.V., R.M.N.) : nous l'avons appelé BUXITRIENINE C,

– le quatrième, de formule brute $C_{27}H_{46}ON_2$, cristallise dans l'acétone ($F = 200-1^{\circ}$, $(\alpha)_D = + 55^{\circ}$, $M + = 414$), présente un système diénique conjugué dans sa structure, établie d'après ses caractères spectraux (U.V., R.M.N., I.R.) : nous lui avons donné le nom de DESOXY-16-BUXIDIENINE C,

– le cinquième, cristallise dans l'acétone ($F = 133-4^{\circ}$, $(\alpha)_D = + 40^{\circ}$, $M + = 412$), de formule $C_{28}H_{48}N_2$: c'est la BUXAMINE A dont la structure est proposée d'après les spectres U.V., R.M.N., et de masse.

Dans la troisième partie consacrée à quelques essais physiologiques, nous avons constaté la toxicité assez élevée, chez les souris, des différents organes des trois variétés (infusés par voie intrapéritonéale) et celle des alcaloïdes isolés (voie orale). Cette toxicité a été déjà signalée, surtout pour les alcaloïdes, pour d'autres espèces des *Buxus* : elle empêche, d'ailleurs, l'utilisation thérapeutique de ces plantes, malgré l'action hypotensive, anti-microbienne, anti-tumorale expérimentalement reconnue. A signaler, cependant, l'emploi du *Buxus madagascariensis* subsp. *xerophila* f. *silicicola*, en médecine populaire, contre les maux d'estomac à symptômes mal définis.

Si la comparaison des compositions en alcaloïdes des trois lots n'a pu être faite, l'étude morphologique et anatomique des feuilles et celle des composés polyphénoliques apportent quelques éléments de différenciation. Nous souhaitons que ce travail soit le début d'investigations plus larges et plus approfondies, les méthodes apprises dans les laboratoires où nous avons travaillé, nous aideront par la suite à étudier d'autres constituants du *Buxus madagascariensis* et nous permettent d'élargir ces recherches aux autres plantes médicinales de notre pays.

Bibliographie

- BATE-SMITH - 1962 - in HEGNAUER (R).
Chemotaxonomie der Pflanzen, III. Burkhauser Verlag Basel und Stuttgart. p. 318.
- BROWN (K.S), KUPCHAN (S.M) - 1964 -
Constitution of cyclovirobuxine D. *Tetrahedron Letters*, 39-40, pp. 2895-900.
- BROWN (K.S), KUPCHAN (S.M) - 1964 -
The structure of cyclobuxine. *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (20), pp. 4414-24.
The Constitution of cyclobuxamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (20), pp. 4430-2.
- CAPURON (R) - 1960 -
Un "*Buxus* nouveau". *Not. syst.* vol. XVI, fasc. 1 - 2, p. 80.
- COSTES (C) - 1969 -
Sur la présence d'anhydroeschscholtzoxanthine dans les feuilles rouges de Buis. *Buxus sempervirens*.
Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét. 15, 1, pp. 55-70.
- DEBRAY (M), JACQUEMIN (H) et RAZAFINDRAMBAO (R) - 1971 -
Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. *Travaux et Documents de l'ORSTOM* -
n° 8 - Paris. 150 p.
- DELAS (R) et col. - 1948 -
Sur l'action hypotensive des extraits du *Buxus balearica*. *Toulouse médical*, 49, p. 57.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B) - 1965 -
Alkaloïde aus *Buxus sempervirens* L. *Naturwissenschaften*, 52, n° 3, p. 61.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B) et JEFFS (P.W) - 1966 -
Buxarin und Buxenon, Zwei neue Alkaloïde aus *Buxus sempervirens* L. *Die Pharmazie*, 21, n° 10, p. 643.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B) - 1966 -
Zur Struktur des Buxanins und Buxidins, Zweier neuer Alkaloïde aus *Buxus sempervirens* L. *Die Pharmazie*
21, n° 12, pp. 769-70.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B) - 1967 -
Über die Struktur des Buxepidins und Buxandonins, Zweier neuer Alkaloïde aus *Buxus sempervirens* L.
Die Pharmazie, 22, n° 11, p. 666.

- DÖPKE (W), MÜLLER (B), SPITELLER (G), SPITELLER-FRIEDMAN (M) - 1967 -
 Über die Alkaloïde Buxazidin - B und Buxeridin. *Naturwissenschaften*, 54, n° 8, pp. 200.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B), JEFFS (P.W) - 1967 -
 Zur Struktur des Alkaloïde Buxatin. *Naturwissenschaften*, 54, n° 10, p. 249
- DÖPKE (W), MÜLLER (B), SPITELLER (G), SPITELLER-FRIEDMAN (M) - 1967 -
 Structure and stereo-chemistry of buxidine and buxandrine. *Tetrahedron Letters*, 43, pp. 4247-9.
- DÖPKE (W) MÜLLER (B) JEFFS (P.W) - 1968 -
 New alkaloids from. *Buxus sempervirens*. *Die Pharmazie*, 23, 1, pp. 37-8.
- DÖPKE (W), MÜLLER (B) - 1969 -
 Buxaltin und Buxiramin, zwei neue Alkaloïde aus *Buxus sempervirens* L. *Die Pharmazie*, 24, n° 10, p.649.
- DURET (S), DEBRAY (M), PARIS (R) - 1971 -
 Chimio-taxonomie des polyphenols des Apocynacées : sur les Flavonoïdes et les acides-phénols de quelques plantes malgaches appartenant aux genres *Pandaca* et *Hazunta*. *Pl. méd. et Phytothérapie*, Tome V, n° 1, pp. 4-15.
- EARLE (F.R), MELVIN (E.H), MASON (L.H), VANETTEN (C.H), WOLFF (I.A) - 1959 -
 Search for new industrial oils. *J. Amer. Oil Chemists Soc*, 36, pp. 304-7 - *Chem - Abstr.* 53 - 16 561 h.
- GHODSI (M.R), NETIEN (G) - 1970 -
 Sur la présence de l'Arbutoside dans les feuilles de *Buxus sempervirens*. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, Tome XIV, n° 4, pp. 115-8.
- GUERIN (H), DELAVEAU (P), PARIS (R) - 1971 -
 Localisations histochimiques. II. Procédés simples de localisation des pigments flavoniques. Application à quelques Phanérogames. *Bull. Soc. Bot. Fr.*
- HARBORNE (J.B) - 1967 -
 Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press - London and New-York. 383 p.
- HERLEM-GAULIER (D), KHUONG-HUU-LAINE (F), STANISLAS (E), GOUTAREL (R) - 1965 -
 Alcaloïdes stéroïdiques XXXV Famille des Buxacées. Les Alcaloïdes du *Buxus balearica* Willd. *Bull. Soc. Chim. Fr.* n° 3, pp. 657-68.
- HERLEM-GAULIER (D), KHUONG-HUU-LAINE (F) GOUTAREL (R) - 1966 -
 Alcaloïdes stéroïdiques LVI. Famille des Buxacées. Alcaloïdes de *Buxus balearica* : structure de la N 3 isobuturyl cycloxbuxine-F. (baleabuxine). *Bull. Soc. Chim. Fr.*, n° 11, pp. 3478-86
- HERLEM-GAULIER (D) - 1967 -
 Alcaloïdes du *Buxus balearica* Willd (Buxacées). Isolement et détermination des structures. Thèse Doc. Sci. phys. Paris, 187 p., multigr.
- HERLEM-GAULIER (D), KHUONG-HUU (F) GOUTAREL (R), MAGDELEINE (M.J) - 1968 -
 Alcaloïdes stéroïdiques LXXII. Famille des Buxacées. Alcaloïdes du groupe des cycloxbuxidines retirés de *Buxus balearica* Willd. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, n° 2, pp. 763-73.
- HUMBERT (H), COURS DARNE (G) - 1965 -
 Notice de la carte de Madagascar. Extrait des travaux de la section Scientifique et technique de l'Institut français de Pondichéry.
- IKRAM (M), MIANA (G.A), MAHMUD (F) - 1968 -
 Chemical studies on *B. papillosa*. Isolation of two new alkaloids : buxpapine and buxpapamine. *C.A.* 71, 779 b.

- IKRAM (M), MIANA (G.A), MAHMUD (F), KHAN (M.I) - 1970 -
Nonalkaloidal constituents of *Buxus papilosa*. C.A. 73, 32 300 w.
- KHUONG-HUU-LAINE (F), HERLEM-GAULIER (D), GOUTAREL (R) - 1965 -
Alcaloïdes stéroïdiques. Famille des Buxacées. Baléabuxine et baléabuxidine, alcaloïdes du *Buxus balearica* Willd. CR. Acad. Sci. Fr. 261, n° 20, pp. 4139-41.
- KHUONG-HUU-LAINE (F), MAGDELEINE (M.J), BISSET (N.G), GOUTAREL (R) - 1966 -
Alcaloïdes stéroïdiques. XLV. Famille des Buxacées IV. Alcaloïdes du *Buxus malayana* Ridl. Bull. Soc. Chim. Fr. n° 2, pp. 758-62.
- KHUONG-HUU-LAINE (F), MILLIET (A), BISSET (N.G), GOUTAREL (R) - 1966 -
Alcaloïdes stéroïdiques XLVII. Famille des Buxacées (5è comm.). Alcaloïdes du *Buxus rolfei* Vidal. Bull. Soc. Chim. Fr. n° 4, pp. 1216-21.
- KHUONG-HUU-LAINE (F), HERLEM-GAULIER (D), QUI KHUONG-HUU, STANISLAS (E), GOUTAREL (R) -1966
Alcaloïdes stéroïdiques, LII. Alcaloïdes du *Buxus balearica* Willd. Tetrahedron, 22, n° 10, pp. 3321-7.
- KHUONG-HUU (F), MAGDELEINE (M.J) - 1970 -
Alcaloïdes stéroïdiques XCVI. Famille des Buxacées. Alcaloïdes du *Buxus malayana* Ridl. Ann. Pharm. Fr., 23, n° 3, pp. 211-22
- KHUONG-HUU (F), PARIS (R), RAZAFINDRAMBAO (R), CAVE (A), GOUTAREL (R) - Sous presse -
Alcaloïdes stéroïdiques CXXXVI. Famille des Buxacées (16è communication). Alcaloïdes de *Buxus madagascarica* Baill. subsp. *xerophila* f. *silicicola*.
- KUPCHAN (S.M), ASBUN (W.I) - 1964 -
Buxus alkaloids VII. The structure of Buxenine - G. a new novel steroidal from *Buxus sempervirens* L. Tetrahedron Letters, n° 42, pp. 3145-50.
- KUPCHAN (S.M), KUROSAWA (E) - 1965 -
Buxus alkaloids VIII. The isolation and constitution of cycloprotobuxine D. J. org. Chem. USA, 30, pp. 2046-7.
- KUPCHAN (S.M), ABUSHANAB (C) - 1965 -
Buxus alkaloids IX. Isolation and constitution of cyclobuxoxine. J. org. Chem., 30, pp. 3931-3.
- KUPCHAN (S.M), OHTA (G) - 1966 -
Buxus alkaloids X. The isolation and constitution of cyclovirobuxine-B. J. Org. Chem. USA, 31, pp. 2608-10.
- KUPCHAN (S.M), KENNEDY (R.M), SCHLEIGH (W.R), OHTA (G) - 1967 -
Buxus alkaloids XII. Benzamide alkaloids from *Buxus sempervirens* L. Tetrahedron 23, n° 12, pp. 4563-86.
- KURAKINA (I.O), PROSKURNINA (N.F), STEPANYANTS (P.U) - 1969 -
Alkaloids of *Buxus balearica* - CA., 72, 75 652 j.
- KURAKINA (I.O), PROSKURNINA (N.F), STEPANYANTS (P.U), MONDESHKA (D.M) - 1970 -
Alkaloids of *Buxus balearica*. CA. 73, 84 626 b.
- LICHTENTHALER (H.K) - 1968 -
Distribution and relative concentrations of lipophilic plastid quinones in green plants. Planta, 81, pp. 140-52 C.A., 69, 49 799 f.
- MABRY (T.J), MARKHAM (K.R), THOMAS (M.B) - 1970 -
The systematic identification of flavonoids. Springer. Verlag Berlin - Heidelberg New-York, 354 p.

- MAGDELEINE (M.J) - 1969 -
Alcaloïdes du *Buxus malayana* Ridl. Isolement et détermination des structures. Thèse Doct. Univ. Paris. multigr.
- MARTIN-SANS (E) - 1930 -
Généralité de la présence d'alcaloïdes chez les Buxacées. CR. Ac. Sci, 191, 625.
- MATHOU (T) - 1940 -
Recherches sur la famille des Buxacées. Thèse Doc. Sci. - Les frères Douladoure - Toulouse.
- MILLIET (A) - 1966 -
Alcaloïdes du *Buxus rolfei* Vidal. Isolement et détermination des structures. Thèse Doc. 3è cycle. Orsay, multigr.
- MURGU (L), PARIS (R) - 1970 -
Sur les composés polyphénoliques de *Spiraea crenata* L. Pl. méd. Phytothérapie 4, n° 3, pp. 201-14.
- NAKANO (T), TERA0 (S) - 1964 -
Buxus alkaloids II. The structure and the stereochemistry of cyclomicrophyllines A, B. and C. *Tetrahedron, Letters*, n° 18, pp. 1045-52.
- NAKANO (T), TERA0 (S) - 1964 -
Buxus alkaloids I. The structure of three new alkaloids cyclomicrophyllines A, B and C. from *B. microphylla* Sieb and Zucc *Tetrahedron Letters*, n° 18, pp. 1035-43.
- NAKANO (T), HASEGAWA (M) - 1964 -
Buxus alkaloids III. The structure of "alkaloid L" and its correlation with cyclomicrophylline A. *Tetrahedron Letters* n° 48, pp. 3679-82.
- NAKANO (T), TERA0 (S), LEE (K.H) - 1965 -
Nonalkaloidal constituents of *Buxus microphylla*, var. *suffruticosa* J. Pharm. Sci, 54, pp. 1201-3.
- NAKANO (T), TERA0 (S) - 1965 -
Buxus alkaloids IV - Isolation and structure elucidation of eight alkaloids from *B. microphylla* Sieb and Zucc var. *suffruticosa* Makino. J. Chem. Soc, pp. 4512-37.
- NAKANO (T) TERA0 (S) - 1965 -
Buxus alkaloids V - The constitution of cyclobuxoxazine a new skeletal alkaloids containing a tetrahydrooxazine ring. J. Chem. Soc. pp. 4537-42.
- NAKANO (T), HASEGAWA (M) - 1965 -
Buxus alkaloids VI. The constitution of cyclomicrobuxine, cyclomicrobuxinine and alkaloid L. J. Chem. Soc., pp. 6688-94.
- NAKANO (T), TERA0 (S), SAEKI (Y) - 1966 -
Buxus alkaloids VII. The isolation and the constitutions of ten new alkaloids from the weak-base fractions of two species *B. microphylla* Sieb and Zucc var. *suffruticosa* and *B. microphylla* Sieb and Zucc var. *suffruticosa* Makino forma *major* J. Chem. Soc., n° 16, pp. 1412-21.
- NAKANO (T), TERA0 (S), SAEKI (Y), JIN (K.D) - 1966 -
Buxus alkaloids VIII. The isolation and constitution of a new alkaloid from *B. koreana* Nakai J. Chem. Soc. C, n° 20, pp. 1805-10.
- NAKANO (T), VOTICKY (Z) - 1970 -
Buxus alkaloids IX - Interconversion of cyclobuxine - D and cyclobuxosuffrine. J. Chem. Soc. C, 4, pp. 590-2.

- NARANG et SADGOPAL - 1962 -
 in HEGNAUER. Chemotaxonomie der Pflanzen, tome III, pp. 318-22. Burkhauser, Verlag Basel und Stuttgart.
- ORGELL (W) - 1963 -
 Inhibition of Human plasma cholinesterase in vitro by Plant extracts. *Lloydia* 26, n° 2, pp. 59-66.
- OREKHOV (A.P) - 1955 -
 Akad. Nauk. USSR. Moscow. 2 nd edition.
- PARIS (R), NOTHIS (A) - 1969 -
 Sur quelques plantes de Nouvelle-Calédonie. *Pl. Méd. Phytothérapie* 3, n° 4, pp. 274-287.
- PARIS (R), NOTHIS (A) - 1970 -
 Plantes de Nouvelle-Calédonie. II. Etude particulière des plantes à dérivés polyphénoliques. *Pl. Méd. Phytothérapie* 4, n° 1, pp. 63-74.
- PARIS (R), MURGU (L) - 1970 -
 Sur les composés polyphénoliques de *Spiraea crenata* L. I. Identification des acides phénoliques. *Pl. Méd. Phytothérapie*, 4, n° 2, pp. 138-149.
- PERRIER DE LA BATHIE (H) - 1952 -
 Flore de Madagascar 113e, Famille des Buxacées, Imprimerie Nationale Tananarive.
- POUCHET (J.C) - 1930 -
 Recherche et localisation des alcaloïdes dans le genre *Buxus* Linné. Thèse Doc. Univ. Pharmacie. Toulouse.
- PUCKETT (R.T), SIM (G.A), ABUSHANAB (E), KUPCHAN (S.M) - 1966 -
 Buxenine G. *Tetrahedron Letters*, 32, pp. 3815-18.
- RABENORO (C) - 1949 -
 Recherches sur quelques Myrsinacées de Madagascar (en particulier *Maesa emirnensis* D.C et *Embelia barbeyana* Dez. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris.
- RIBEREAU-GAYON (P) - 1968 -
 Les composés phénoliques des végétaux. Dunod Paris. 254 p.
- STAUFFACHER (D) - 1964 -
 Uber buxamin, Nor-buxamin und buxaminol, neue Alkaloide aus *Buxus sempervirens* L. *Helv. Chim. Acta*, 47, n° 4, pp. 968-81.
- STAUFFACHER (D) - 1964 -
 Cardiotropic principles of *Buxus sempervirens* L. - C.A. 62 - 11 870 e.
- TAMCHYNA (J), ZEMANIK (I), DOHNALOVA (V) - 1959 -
 Contents and effectiveness of *Buxus* alkaloids. C.A., 58 - 7264 b.
- TERRAC (M.L) - 1947 -
 Contribution à l'étude des plantes médicinales de Madagascar, de la Réunion et de l'Ile Maurice. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris.
- TOMITO (M), SUGAMOTO (M) - 1962 -
 Pharm. Soc. Japan 82, pp. 1457.
- TOMKO (J), VOTICKY (Z), PAULIK (V), VASSOVA (A), BAUEROVA (O) - 1964 -
 Alkaloidy z. *Buxus sempervirens* L. Isolacia a charakterizacia. *Bull. sign. CNRS*, 26-13 - 5212. *Chem., Zvesti, Ceskosl.*, 18, n° 10, 721-31.

- TOMKO (J), BAUEROVA (O), VOTICKY (Z), GOUTAREL (R), LONGEVIALLE (P) - 1966 -
Alkaloids of *Buxus sempervirens* L. VII. Structure of buxpsiine. *Tetrahedron Letters*, n°9, pp. 915-9.
- TOUCHAIS (J.M) - 1956 -
Contribution à l'étude de l'*Aphloia* de Madagascar. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris.
- VAN SOEST (H), GOTINK (W.H), VANDER VOOREN (L.J) - 1965 -
Buxus vergiffiging by warkens en runderen. *Bull. Sign. CNRS*, 26 - 13 - 14 735. T. Diergenceskde, Nedel., 90, n° 6, 387-9.
- VASSOVA (A), TOMKO (J), VOTICKY (Z), BEAL (J.L) - 1970 -
Buxus alkaloids. B. Alkaloids from *Buxus wallichiana* Baillon. *Die Pharmazie*, 25, pp. 363-5.
- VIALA (A), BASTIA (B), STANISLAS (E) - 1962 -
Les acides organiques dans le genre *Buxus*. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 22, pp. 108-19.
- VINCENT (D), MATHOU (Th) - 1945 -
Action inhibitrice du buis (*Buxus sempervirens* L. et *Buxus balearica* Willd.) sur la cholinesterase du sérum. *C.R. Ac. Sc.*, 220, p. 474.
- VOTICKY (Z), TOMKO (J) - 1965 -
Alkaloids from *Buxus sempervirens* V. Configuration of buxtanine and buxpiine. *Tetrahedron Letters*, 40, pp. 3579-84.
- VOTICKY (Z), TOMKO (J) - 1965 -
Alkaloids from *Buxus sempervirens* L. II. Structure of buxomegine and its identity with irehine. *Bull. Sign. CNRS* 26 - 13 - 9820, *Collect. Czechosl. Chem. Communic.*, 30, n° 1, 348-50.
- VOTICKY (Z), TOMKO (J), DOLEJS (L), HANUS (V) - 1965 -
Alkaloids from *Buxus sempervirens* L. IV. The structure of buxtauine *Bull. Sign. CNRS*, 27 - 13 - 7053 , *Collect. Czechosl. Chem. Communic.*, 30, n° 11, 3705 - 10.
- VOTICKY (Z), PAULIK (V), SEDLAK (B) - 1969 -
Alkaloids of *Buxus sempervirens*. VII. Structure and configuration of cyclobuxine - *B. Chem. Zvesti*, 23, n°9, pp. 702-3.
- WELLER (L.E), REDEMANN (C.T), GOTTSHALL (R.Y), ROBERTS (J.M), LUCAS (E.H), SELL (H.M) - 1953 -
Antibacterial substances in seed plants active against Tubercle Bacilli - *Antibiotics and chemotherapy*, 3, p. 603.
- Précis de Botanique - 1965 -
par CRETE (P) et GUIGNARD (J.L), Masson Paris. 429 p.
- Précis de Botanique Systématique - 1960 -
par EMBERGER (L) et CHADEFAUD (M) - Masson. Paris 1539 p.

Les Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer tendent à constituer une documentation scientifique de base sur les zones intertropicales et méditerranéennes, les pays qui en font partie et sur les problèmes posés par leur développement.

CAHIERS ORSTOM.

— Séries périodiques:

- **entomologie médicale et parasitologie:** systématique et biologie des arthropodes d'intérêt médical et vétérinaire, parasitologie, épidémiologie des grandes endémies tropicales, méthodes de lutte contre les vecteurs et les nuisances;
- **géologie:** études sur les trois thèmes suivants: altération des roches, géologie marine des marges continentales, tectonique de la région andine;
- **hydrologie :** études, méthodes d'observation et d'exploitation des données concernant les cours d'eau intertropicaux et leurs régimes.
- **océanographie:**
Sud-Ouest du Pacifique
Canal de Mozambique et environs
Atlantique Tropical Est...
hydrologie, physico-chimie, hydrodynamique, écologie, caractérisation des chaînes alimentaires, niveaux de production, dynamique des stocks, prospection faunistique.
- **hydrobiologie:**
Bassin Tchadien
Nouvelle-Calédonie...
- **pédologie:** problèmes soulevés par l'étude des sols: morphologie, caractérisation physico-chimique et minéralogique, classification, relations entre sols et géomorphologie, problèmes liés aux sels, à l'eau, à l'érosion, à la fertilité;
- **sciences humaines:** études géographiques, sociologiques, économiques, démographiques et ethnologiques.

— Séries non périodiques:

- **biologie:** études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale; agronomie.
- **géophysique:** données et études concernant la gravimétrie, le magnétisme et la sismologie.

MÉMOIRES ORSTOM: consacrés aux études approfondies (synthèses régionales, thèses...) dans les diverses disciplines scientifiques (62 titres parus).

ANNALES HYDROLOGIQUES: depuis 1959, deux séries sont consacrées: l'une, aux Etats africains d'expression française et à Madagascar, l'autre aux Territoires et Départements français d'Outre-Mer.

FAUNE TROPICALE: collection d'ouvrages principalement de systématique, couvrant ou pouvant couvrir tous les domaines géographiques où l'ORSTOM exerce ses activités (18 titres parus).

INITIATIONS/DOCUMENTATIONS TECHNIQUES: mises au point et synthèses au niveau, soit de l'enseignement supérieur, soit d'une vulgarisation scientifiquement sûre (20 titres parus).

TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'ORSTOM: cette collection, diverse dans ses aspects et ses possibilités de diffusion, a été conçue pour s'adapter à des textes scientifiques ou techniques très variés quant à leur origine, leur nature, leur portée dans le temps ou l'espace, ou par leur degré de spécialisation (18 titres parus).

L'HOMME D'OUTRE-MER: cette collection, publiée chez Berger-Levrault, est exclusivement consacrée aux sciences de l'homme, et maintenant réservée à des auteurs n'appartenant pas aux structures de l'ORSTOM (9 ouvrages parus).

De nombreuses **CARTES THÉMATIQUES**, accompagnées de **NOTICES**, sont éditées chaque année, intéressant des domaines scientifiques ou des régions géographiques très variées.

BULLETIN ANALYTIQUE D'ENTOMOLOGIE MÉDICALE ET VÉTÉRINAIRE (périodicité mensuelle; ancienne dénomination jusqu'en 1970: Bulletin signalétique d'entomologie médicale et vétérinaire) (XX^e année).

O.R.S.T.O.M.

Direction générale :

24, rue Bayard, 75008 PARIS

Services Scientifiques Centraux.

Service Central de Documentation :

70-74, route d'Aulnay, 93140 BONDY

Imprimerie COPEDITH

O.R.S.T.O.M. Editeur

Dépot légal : 2e trim. 1973