

ISOLEMENT DE L'HIGÉNAMINE A PARTIR DE L'ANNONA SQUAMOSA; INTERET DES RÉSINES ADSORBANTES MACROMOLÉCULAIRES EN CHIMIE VÉGÉTALE EXTRACTIVE.¹

MICHEL LEBOEUF et ANDRÉ CAVÉ

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, F-92290 Chatenay-Malabry

ANDRÉ TOUCHÉ, JEAN PROVOST et PIERRE FORGACS

Centre de Recherches des Laboratoires Roger Bellon, F-94140 Alfortville

RESUME.—A partir des tiges feuillées d'*Annona squamosa* L., un alcaloïde benzyl-tétrahydroisquinoléique, l'higénamine (1), doué d'activité stimulante β -adrénergique, a été isolé. Sa synthèse, ainsi que la préparation de dérivés O-acylés, sont décrites. L'intérêt des résines adsorbantes macromoléculaires non polaires (Amberlites XAD) en chimie végétale extractive est souligné.

ABSTRACT.—From leaves and stems of *Annona squamosa* L., higenamine (1), a benzyltetrahydroisquinoline alkaloid, which is an effective β -adrenergic agonist, has been isolated. Its synthesis, and the preparation of its O-acyl derivatives, are described. The use of adsorbent macromolecular non-polar resins (Amberlites XAD) in extractive phytochemistry is emphasized.

L'*Annona squamosa* L. appartient à la famille des Annonacées, sous-famille des Annonoideae, tribu des Unoneae, sous-tribu des Annonideae (1). Cette espèce présente la particularité historique d'avoir été la première Annonacée décrite, dès 1546, par Oviedo sous le nom de *Guanabano* (2); celui-ci devait être à l'origine du genre *Guanabanus* établi par Plumier en 1703, puis rejeté en 1737 par Linné qui lui préféra *Annona* (3).

Comme la plupart des espèces du genre *Annona*, l'*A. squamosa* est originaire d'Amérique tropicale, mais il est cultivé dans toutes les régions chaudes du globe, notamment en Afrique et en Asie. C'est un arbuste ou un petit arbre de 5 à 6 mètres, très branchu, à rameaux lenticellés; les feuilles, glabres, sont vertes, légèrement glauques à la face inférieure; les fleurs, blanchâtres, sont axillaires, isolées ou groupées par deux; le fruit, sphérique ou ovoïde, mesure 6 à 10 cm de diamètre; son épiderme, gris-verdâtre, est écailleux et mamelonné; sa chair, blanche et molle, possède une saveur sucrée et délicate; ce fruit, la pomme-cannelle ou atte, sweetsop pour les Anglo-Saxons, est comestible; sa qualité est bien supérieure à celle du corossol (soursop), fruit de corossolier, *Annona muricata* L.: c'est un des meilleurs fruits des pays chauds (4, 5).

Des extraits de différents organes de l'*Annona squamosa* ont en médecine locale traditionnelle des emplois variés et assez semblables à ceux de l'*A. muricata* (4, 5, 6, 7). Diverses propriétés pharmacologiques d'extraits d'*A. squamosa* ont été rapportées. C'est ainsi que la fraction hydrosoluble de l'extrait alcoolique de feuilles présente une activité stimulante β -adrénergique (8). Des extraits aqueux ou éthanoliques sont spasmolytiques sur le duodénum du Lapin, mais provoquent un effet spasmogène sur l'intestin du Cobaye et sont utérotoniques chez la Rate; ils montrent également des propriétés β -stimulantes, cardio-vasculaires et respiratoires chez le Chat (9). Par ailleurs, une forte action acétylcholinomimétique est signalée pour les alcaloïdes totaux isolés des feuilles (10), tandis que des propriétés anticancéreuses sont rapportées pour l'extrait hydroalcoolique

¹Partie XXVII dans la série "Alcaloïdes des Annonacées"; partie XXVI: R. Hocquemiller, S. Rasamizafy, C. Moretti, H. Jacquemin et A. Cavé, *Planta Medica* (sous presse).

de feuilles et d'écorces (11). Pour certains auteurs, les extraits présentent une activité antibiotique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (12); ceci est infirmé par d'autres (13). D'éventuelles propriétés antiovoles, anticonceptionnelles, voire abortives, sont vivement controversées: positives pour les uns (14, 15, 16), elles seraient négatives selon d'autres auteurs (13). Enfin, le pouvoir insecticide des graines, des feuilles et des racines semble bien établi (13, 17).

L'étude de la composition chimique de l'*A. squamosa* a fait l'objet d'assez nombreux travaux. Parmi les composés neutres isolés, on peut signaler en particulier une diazépine originale, la squamolone (18), ainsi que plusieurs dérivés terpéniques à squelette kaurane (19, 20). Des alcaloïdes existent, à une teneur variable mais toujours faible, dans divers organes de la plante. Dès 1925, Trimurti (21) signale la présence d'un alcaloïde dans les feuilles; quelques années plus tard, Reyes et Santos (22) isolent à partir des graines une base aporphinique identifiée à l'anonaïne découverte quelques mois auparavant chez *A. reticulata*. Beaucoup plus récemment, une investigation poussée du contenu alcaloïdique est réalisée par plusieurs groupes de chercheurs. Yang et Chen (23) isolent des racines quatre alcaloïdes aporphiniques, une benzyltétrahydroisoquinoléine, la réticuline, et deux bases non identifiées. A partir des tiges feuillées, Bhakuni et coll. (24) extraient neuf alcaloïdes aporphiniques et une proaporphine, la normécambre. Quatre aporphines sont également identifiées dans les écorces par Krishan Rao et coll. (25), tandis que très récemment Mukherjee et coll. (10) isolent à partir des feuilles une aporphine, une oxoaporphine et une benzyltétrahydroisoquinoléine.

Au cours de recherches entreprises dans notre Laboratoire sur la composition chimique et l'activité biologique de diverses Annonacées, nous avons constaté que les extraits hydro-alcooliques de tiges feuillées d'*A. squamosa* originaire de l'Inde présentent d'importantes propriétés bronchodilatatrices chez le Cobaye [technique de Konzett (26)], ainsi qu'une action cardiaque inotrope positive et chronotrope positive, mise en évidence sur l'oreillette isolée de Lapin [techniques de Trevan (27) et de Salle (28)]. Il nous a donc semblé intéressant d'isoler le principe actif responsable de ces activités. Le fractionnement de l'extrait hydro-méthanolique a été guidé à la fois par des essais pharmacodynamiques et par des essais physicochimiques (C.C.M.); il a été réalisé en utilisant une méthodologie particulière faisant appel à une résine adsorbante macromoléculaire non polaire.²

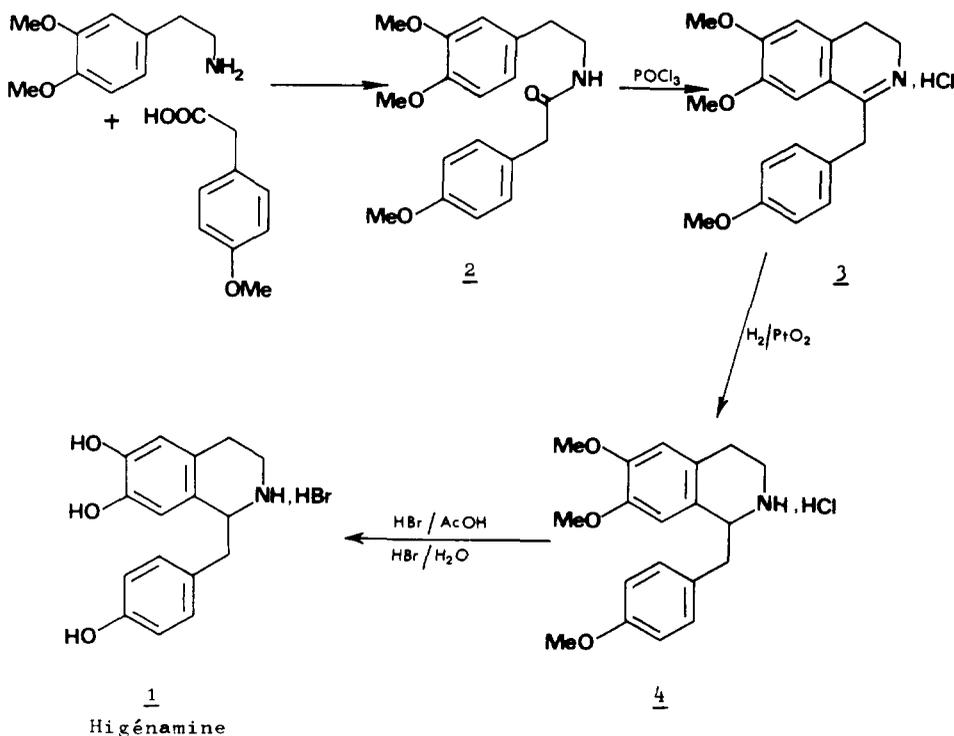
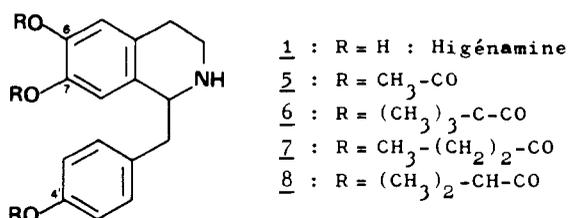
L'extrait aqueux est chromatographié sur colonne de résine Amberlite XAD₂. Après fixation, les produits hydrophiles non adsorbés, dont les sucres et les sels minéraux qui perturbent les essais pharmacodynamiques et les séparations chimiques, sont entraînés par des lavages répétés à l'eau distillée. Les produits hydrophobes adsorbés sont élués ensuite par de l'éthanol à 80°. Cet éluat, seul actif sur les tests pharmacodynamiques, est alors chromatographié sur une résine cationique Amberlite IRC 50 en phase acide. Après lavage de la résine par du méthanol, les produits basiques fixés sur la résine sont élués par du méthanol chlorhydrique; le principe actif se trouve dans cette fraction. Le résidu, repris par du méthanol, laisse cristalliser sous forme de chlorhydrate le produit recherché qui est de nature alcaloïdique (rendement: 800 mg/kg).

L'examen de ses constantes physiques et de ses données spectrales a permis

²Amberlite XAD₂ (Société Rohm et Haas), dont la maille est un copolymère polystyrène-divinylbenzène.

de l'identifier à l'higénamine, 6,7,4'-trihydroxy 1,2,3,4-tétrahydrobenzylisoquinoléine **1** (32); de formule brute $C_{16}H_{17}NO_3$, sa structure est déduite de son spectre de masse (fragmentations à m/z 164 et 107, caractéristiques d'une benzyl-tétrahydroisoquinoléine portant deux hydroxyles phénoliques sur le cycle A et un autre sur le cycle C) et de son spectre de RMN (absence de signal de N-méthyle; présence de 2 singulets de 1 proton chacun à 6.64 et 6.80 ppm dus aux H en 6 et en 8 et d'un système A2 B2 à 6.79 et 7.08 ppm attribuable aux 4 H en 2', 3', 5', 6' (29).

La synthèse de l'higénamine a été réalisée de façon classique, selon la méthode de Bischler-Napieralski en 4 étapes à partir de la 3, 4-diméthoxyphényléthylamine condensée avec l'acide *para*-méthoxyphénylacétique; l'amide obtenu, **2**, est cyclisé à l'aide d'oxychlorure de phosphore en la benzylidihydroisoquinoléine, **3**, dont l'hydrogénation catalytique conduit à la 1-paraméthoxybenzyl 6, 7-diméthoxy-1,



2, 3, 4-tétrahydroisoquinoléine, 4; sa *O*-déméthylation, par l'acide bromhydrique en milieu acétique, fournit l'higénamine I identique au produit naturel isolé, prouvant ainsi la structure de ce dernier. De plus, cette synthèse nous a procuré des quantités importantes d'higénamine, permettant de réaliser son étude pharmacologique et de préparer plusieurs dérivés hémisynthétiques.

Notre but était de rechercher un dérivé plus stable que l'higénamine, à action plus prolongée, et surtout présentant une activité bronchodilatatrice importante tout en ayant une composante cardiovasculaire moins marquée. Quatre dérivés *O*-acylés ont été ainsi préparés: triacétyl 5, tripivaloyl 6, tributyroyl 7 et triisobutyroyl 8. Nos travaux étaient en cours et ont été arrêtés lorsque nous avons eu connaissance de brevets japonais (30) revendiquant la préparation et l'activité cardiovasculaire de *O*-acylhigénamines.

DISCUSSION

Avant le présent travail, l'higénamine n'a été, à notre connaissance, isolée qu'à partir de trois sources végétales: embryons de graines de *Nelumbo nucifera* Nymphéacées (31), racines d'*Aconitum japonicum*, Renonculacées (32, 33) et racines d'*Asiasarum* (= *Asarum*) *heterotropoides* var. *mandshuricum*, Asaracées (= Aristolochiacées) (34). La présence de l'higénamine chez une Annonacée n'a jamais été signalée jusqu'à présent. Cette distribution botanique de l'higénamine ne doit pas cependant surprendre, puisque de nombreuses espèces de ces quatre familles renferment des alcaloïdes isoquinoléiques, en particulier de type aporphinique (35). Ces liens chimiotaxinomiques vont dans le sens des relations phylogénétiques existant entre l'ordre des Magnoliales, auquel appartiennent les Annonacées et les Aristolochiales, les Nymphéales et les Ranunculales: selon Takhtajan (36) ces trois derniers ordres dérivent directement de celui des Magnoliales.

La (\pm)-higénamine, qui est la (\pm)-déméthylcoclaurine, a été synthétisée dès 1958 par Yamaguchi (37); les énantiomères (+) et (-) ont également été préparés par Kametani et coll. (38). L'higénamine est très instable en milieu alcalin; sa demi-vie, à la température ambiante, ne serait que de 45 minutes à pH 8 et moins de 10 minutes à pH 9. Cette instabilité, ainsi que ses solubilités un peu particulières, expliquent les difficultés de son isolement et il est probable que l'higénamine est beaucoup plus répandue dans le règne végétal que ne le laissent supposer les publications existantes. Nous avons d'ailleurs, pour notre part, observé que l'higénamine n'est pas présente dans les alcaloïdes totaux de l'*Annona squamosa* extraits de façon classique par un solvant organique en milieu alcalin. Kosuge et Yokota (32) ont supposé que chez *Aconitum japonicum* l'higénamine est probablement stabilisée, dans le végétal et durant l'extraction, par un glucoside acide particulier, le yokonoside, agissant à la fois comme agent salifiant et comme antioxydant.

D'un point de vue pharmacologique, l'higénamine est un stimulant β -adrénergique puissant; son action se manifeste particulièrement sur le coeur (effet inotrope positif) et les bronches (bronchodilatation) (33, 34, 39); son activité est nettement plus marquée que celle de l'alcaloïde 6-*O*-méthylé correspondant, la coclaurine. Cette différence d'intensité d'action a été expliquée récemment (39) par une étude cristallographique aux rayons X, qui permet de supposer une

meilleure liaison entre le récepteur et l'*O*-(6)-H de l'higénamine par comparaison avec l'*O*-(6)-Me de la coclaurine.

Outre l'intérêt que présente l'isolement de l'higénamine à partir d'*Annona squamosa*, il nous paraît important d'insister sur les avantages que comporte l'utilisation des résines adsorbantes macromoléculaires (Amberlites XAD) en chimie végétale extractive. D'introduction récente en analyse chimique et biochimique, ces résines n'ont reçu que peu d'applications dans l'enrichissement et la séparation de substances végétales pharmacologiquement actives. On peut citer, à titre d'exemples, l'isolement des makistérones, stéroïdes polyhydroxylés du *Podocarpus macrophyllus* (40), la séparation de stéroïdes végétaux (41) et de flavonosides (42), la purification du stéviocide contenu dans *Stevia rebaudiana* (43), l'isolement à partir de *Senecio ambacilla* d'esters de l'acide l-hydroxy 4-oxo 2.5-cyclohexadiényl-acétique et du glucose, doués de propriétés antiulcéreuses gastriques (44). Dans le domaine des alcaloïdes, les Amberlites XAD₂ ont été utilisées pour la purification de l'extrait de *Coptis chinensis* (45) et la séparation d'alcaloïdes pyrrolizidiniques des Borraginacées (48); elles ont permis la mise en évidence de sels de méthylhydrastinium dans les extraits de *Fumaria parviflora*, dont le traitement habituel d'extraction des alcaloïdes par les agents alcalins conduit à la formation d'artéfacts (46).

Dans le cas de l'higénamine, il est peut-être intéressant de comparer deux méthodes d'extraction: celle, assez complexe, mise en oeuvre par Kosuge et Yokota (32) qui isolent 100 mg d'higénamine à partir de 150 kg de racines d'*Aconitum japonicum*; la nôtre, qui est une application de la résine Amberlite XAD₂, permettant d'obtenir à partir d'*Annona squamosa* 800 mg d'higénamine par kg de drogue sèche par une technique simple (cf. schéma). Les rendements en principe actif n'ont évidemment qu'une valeur relative puisque les exemples cités dans le tableau concernent deux plantes différentes. Cependant nous avons constaté dans nos essais que le fait de procéder à des extractions avec le mélange butanol-eau (1-1) entraîne une perte d'environ 50% de l'higénamine par suite d'une dispersion de l'alcaloïde dans les deux solvants. Cette remarque, qui montre l'intérêt de l'emploi de l'Amberlite XAD₂ par rapport à des techniques classiques d'extraction liquide-liquide, peut laisser supposer que les teneurs en higénamine dans les embryons de *Nelumbo nucifera* [190 mg/kg, (31)], ainsi que dans les racines d'*Aconitum japonicum* [0.66 mg/kg, (32, 33)] et d'*Asiasarum heterotropoides* [15 mg/kg, (34)], sont probablement supérieures à celles qui ont été publiées.

Enfin, outre l'accès facile à l'alcaloïde responsable de l'activité cardiovasculaire de l'*Annona squamosa*, l'emploi de la résine Amberlite XAD₂ nous a permis d'isoler d'autres constituants, soit à partir de l'éluat aqueux, soit à partir de l'éluat alcoolique. Dans le premier, il a été procédé en particulier à l'identification et au dosage (analyseur automatique Technicon) des acides aminés; ils sont identiques à ceux rencontrés habituellement dans le règne végétal. D'autre part, des fractionnements effectués sur l'éluat alcoolique ont conduit à l'isolement d'un flavonoside banal, le rutoside, et surtout à la découverte d'un hétéroside aromatique nitré original, le (4'-primevérosyl)-1-phényl-2-nitro éthane, dont la description fait l'objet d'une publication séparée (47).

En conclusion, l'intérêt que présentent les résines Amberlite XAD pour l'enrichissement et la séparation de substances variées, hydrophiles ou hydrophobes, à partir d'extraits végétaux complexes, nous incite à penser que l'utilisation de ces adsorbants particuliers mériterait d'être développée en phytochimie extractive.

et 6⁺); sm (Varian Mat 112, 70 eV): m/z 164 (100%), 149 (3%), 107 (9%); l'ion moléculaire (m/z 271) n'est pas observé sur le spectre de masse.

SYNTHÈSE DE L'HIGÉNAMINE.—La 3,4-diméthoxyphényléthylamine (10 g) est condensée avec l'acide *para*-méthoxyphénylacétique (10 g) par chauffage à reflux 45 minutes dans la tétraline (30 ml); l'amide **2** cristallise dans le milieu réactionnel: F 124° (Rdt 92%). Une solution benzénique (80 ml) de **2** (16.80 g) est portée au reflux, et l'on introduit POCl₃ en solution dans du benzène (48 ml d'une solution à 50%); le reflux est maintenu 1 heure; le chlorhydrate de la benzyltétrahydroisoquinoléine, **3**, cristallise après refroidissement du milieu réactionnel: F 195° (Rdt 96%). Une solution de **3** (16.50 g) dans de l'éthanol (200 ml), est agitée sous hydrogène, en présence de catalyseur (1 g de PtO₂), jusqu'à fin d'absorption d'hydrogène; après essorage du catalyseur et concentration du solvant, le chlorhydrate de la benzyltétrahydroisoquinoléine, **4**, cristallise: F 195° (Rdt 85%). A une solution de **4** (10 g) dans de l'acide acétique (30 ml), on ajoute une solution acétique à 40% de HBr (10 ml), puis une solution aqueuse de HBr (10 ml); le mélange réactionnel est chauffé 4 h à reflux; après refroidissement, l'higénamine **1** cristallise sous forme de bromhydrate: F 285° (Rdt 86%). Le bromhydrate d'higénamine est transformé en chlorhydrate après passage intermédiaire par l'higénamine-base.

SYNTHÈSE DES CHLORHYDRATES DE O-ACYLHIGÉNAMINE.—Cinq g (0.014 mole) de bromhydrate d'higénamine sont mis en solution dans 15 ml d'acide trifluoroacétique. Le chlorure d'acyle (0.14 mole) est introduit et on laisse sous agitation 48 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est jeté sur de la glace pilée; on alcalinise à pH 8.5 par NH₄OH et on extrait par du chloroforme. Celui-ci est lavé à l'eau, séché sur Na₂SO₄ et évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éthanol chlorhydrique; le chlorhydrate cristallise et est recueilli. Chlorhydrate de *O*-triacylhigénamine **5**: Rdt 80%; C₂₂H₂₃O₆N, HCl; F 215–217° [206° (30)]. Chlorhydrate de *O*-tripivaloylhigénamine **6**: Rdt 70%; C₃₁H₄₁NO₆, HCl; F 258–260°. Chlorhydrate de *O*-tributyroylhigénamine **7**: Rdt 73%; C₂₅H₃₃NO₆, HCl; F 175°. Chlorhydrate de *O*-triisobutyroylhigénamine **8**: Rdt 76%; C₂₅H₃₃NO₆, HCl; F 228–230°.

Received 9 June 1980

BIBLIOGRAPHIE

1. A. Le Thomas, "Famille des Annonacées", in "Flore du Gabon" de A. Aubréville, **16**, 25 (1969).
2. G. Oviedo, "Historia General de las Indias" (1546).
3. C. Linné, "Genera Plantarum" (1737).
4. J. Kerharo et J. G. Adam, "La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle", Vigot, Paris (1974).
5. A. Walker et R. Sillans, "Les Plantes utiles du Gabon", Lechevalier, Paris (1961).
6. R. N. Chopra, I. C. Chopra, K. L. Handa et L. D. Kapur, "Indigenous drugs of India", U.N. Dhur and Sons, Calcutta, ed. II (1958).
7. G. Watt, "A Dictionary of the Economic Products of India", Periodical Experts, New Delhi, **1**, 260 (1972).
8. S. Siddiqui, *Pakistan J. Sc. Industr. Res.*, **7**, 214 (1964).
9. G. S. G. Barros, F. J. A. Matos, J. E. V. Vieira, M. P. Sousa et M. C. Medeiros, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, 116 (1970).
10. P. K. Bhaumik, B. Mukherjee, J. P. Juneau, N. S. Bhacca et R. Mukherjee, *Phytochemistry*, **18**, 1584 (1979).
11. D. S. Bhakuni, M. L. Dhar, M. M. Dhar, B. N. Dhawan et B. N. Mehrotra, *Indian J. Exp. Biol.*, **7**, 250 (1969).
12. E. M. Osborn, *Brit. J. Exp. Pathol.*, **24**, 227 (1943).
13. S. B. Vohora, I. Kumar et S. A. H. Naqvi, *Planta Medica*, **28**, 97 (1975).
14. J. C. Saha, E. Javini et S. Kasinathan, *Indian J. Med. Res.*, **49**, 130 (1961).
15. A. Mishra, J. V. V. Dogra, J. N. Singh et O. P. Jha, *Planta Medica*, **35**, 283 (1979).
16. R. N. Chopra, S. L. Nayar et I. C. Chopra, "Glossary of Indian Medicinal Plants," New Delhi (1956).
17. R. F. Heal et E. F. Rogers, *Lloydia*, **13**, 89 (1950).
18. T. H. Yang et C. M. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, **19**, 149 (1972).
19. F. Bohlmann et N. Rao, *Chem. Ber.*, **106**, 841 (1973).
20. T. H. Yang, C. M. Chen, J. L. Chang et K. W. Chung, *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih*, **23**, 8 (1971).
21. N. Trimurti, *J. Indian Inst. Sci.*, **7**, 232 (1924).
22. F. R. Reyes et A. C. Santos, *Philippine J. Sci.*, **44**, 409 (1931).
23. T. H. Yang et C. M. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, **17**, 243 (1970).
24. D. S. Bhakuni, S. Tewari et M. M. Dhar, *Phytochemistry*, **11**, 1819 (1972).
25. R. V. K. Rao et N. Murty, *Indian J. Pharm. Sci.*, **40**, 170 (1978).
26. H. Konzett et R. Rossler, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **195**, 71 (1940).
27. J. W. Trevan, F. M. Broock, F. A. Burn et J. R. Gaddum, *Quart. J. Pharm.*, **1**, 6 (1936).
28. J. Salle, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **121**, 150 (1959).
29. M. Shamma, "The Isoquinoline Alkaloids", Academic Press—Verlag Chemie (1972).

30. T. Okamoto, T. Kosuge et M. Yokota, Brevets japonais 7648677 et 76125711 (1976).
31. H. Koshiyama, H. Okhuma, H. Kawaguchi, H. Y. Hsu et Y. P. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2564 (1970).
32. T. Kosuge et M. Yokota, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 176 (1976).
33. T. Kosuge, M. Yokota et M. Nagasawa, *J. Pharm. Soc. Japan*, **98**, 1370 (1978).
34. T. Kosuge, M. Yokota, H. Nukaya, Y. Gotoh et M. Nagasawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2284 (1978).
35. H. Guinaudeau, M. Leboeuf et A. Cavé, *Lloydia*, **38**, 275 (1975); *J. Nat. Products*, **42**, 325 (1979).
36. A. Takhtajan, "Flowering Plants, Origin and Dispersal", Oliver and Boyd, Edinburgh (1969).
37. H. Yamaguchi, *J. Pharm. Soc. Japan*, **78**, 692 (1958).
38. T. Kametani, K. Sakurai, S. Kano et H. Iida, *J. Pharm. Soc. Japan*, **87**, 822 (1967).
39. N. Masaki, H. Lizuka, M. Yokota et A. Ochiai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 717 (1977).
40. S. Imai, M. Hori, S. Fujioka, E. Murata, M. Goto et K. Nakanishi, *Tetrahedron Letters*, 3883 (1968).
41. M. Hori, *Steroids*, **14**, 33 (1969).
42. M. Hori, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **12**, 2333 (1969).
43. S. Kubomura, J. Ueno, S. Chida et J. Kanaeda, Brevet japonais 7691300 (1976).
44. P. Forgacs, J. Provost, J. F. Desconclois, A. Jehanno, R. Tiberghien, A. Touché, F. Roquet, F. Godard et P. Pesson, *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D*, **283**, 405 (1976).
45. T. Sawda, J. Yamahara et Y. Shintaini, *Shoyakugaku Zasshi*, **28**, 150 (1974).
46. P. Forgacs, J. Provost, J. F. Desconclois, A. Jehanno et M. Pesson, *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D*, **279**, 855 (1974).
47. P. Forgacs, J. F. Desconclois, J. Provost, R. Tiberghien et A. Touché, *Phytochemistry*, **19**, 1251 (1980).
48. H. J. Huizing et T. M. Malingre, *J. Chromatog.*, **176**, 274 (1979).

Pendant que cette publication était sous presse, nous avons eu connaissance d'un travail de H. Wagner, M. Reiter et W. Ferstl [*Planta Medica*, **40**, 77 (1980)] portant sur la chimie et la pharmacologie de l'higénamine, principe actif cardiotonique de l'*Annona squamosa*.