Sur la Biosynthèse des Stéroïds de l'Holothurie *Stichopus japonicus**

Tadasi NOMURA**, Yasuhiko TSUCHIYA**,
Daniel ANDRÉ*** et Michel BARBIER***

(Received November 28, 1968)

Dans une note précédente, nous avons décrit les résultats de l'analyse des fractions insaponifiables des holothuries *Stichopus japonicus* et *Holothuria tubulosa*. Nous avons été amenés à émettre une hypothèse selon laquelle ces animaux n'effectueraient pas la biosynthèse de leurs stéroïds. Nous avons tenu à vérifier cette hypothèse en étudiant la biosynthèse des stéroïds de *Stichopus japonicus* après injection d'acétate-1,2 ^{14}C .

Les résultats de ces expériences font l'objet de la présente note.

Ces travaux constituent une étape vers l'établissement de l'origine biologique des holothurines (1 à 7). On peut en effet se demander si ces toxines sont biosynthétisées par l'animal lui-même, ou bien si elles proviennent de sa nourriture, ou bien encore si elles sont des produits de transformation de précurseurs existant dans la nourriture.

Par leur structure chimique, les holothurines s'apparentent aux saponines et il est curieux de les trouver chez des animaux. Par ailleurs, leur existence sous forme de glycosides et en particulier de xylosides est un nouvel argument en faveur de leur origine exogène. Notons toutefois que le xylose, sucre typiquement végétal a quelquefois été trouvé chez des vertébrés: dans l'héparine (8) et dans le cartilage du porc (9); il n'est pas possible donc d'exclure totalement la possibilité d'une xylosidation par l'animal.

Dans le présent travail, nous montrons que dans les conditions des expériences, l'holothurie *Stichopus japonicus* ne biosynthétise pas les stéroïds. Cette observation est un argument supplémentaire en faveur de l'origine externe des holothurinogénines (qui possèdent une structure stéroïdique).

Expériences et Résultats

0,1 mC d'acétate-1,2 ^{14}C (activité spécifique 22,2 mC/mM†) a été injecté dans la cavité générale de 40 holothuries *Stichopus japonicus*; (animaux non déviscérés, pesant de 120 à 530 g). Ces expériences ont été effectuées en Juin, dans la période précédant la ponte; les

* Deuxième communication sur la biochimie des holothuries; pour la première communication, voir ce périodique, article précédent.

** Faculté d'Agriculture, Université du Tohoku, Sendai, Japon.

*** Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91, GIF-SUR-YVETTE, France.

† Acétate-1,2 ^{14}C provenant de la Daiichi Pure Chemical Co, Tokyo.

holothuries ont été maintenues 11 jours en bassin d'eau de mer à environ 14°*.

Les extractions effectuées comme précédemment ont fourni 196 g de lipides solubles dans l'acétone. L'insaponifiable (2,5 g) contient une radioactivité totale de $7,4 \times 10^6$ c/mn** et les acides totaux extraits par l'éther après saponification (5,8 g) une radioactivité de $4,3 \times 10^6$ c/mn. L'incorporation calculée sur ces deux valeurs est donc au minimum de 0,53%.

Les chromatographies ont donné 308 mg de stérols bruts de radioactivité $1,7 \times 10^6$ c/mn. La partie contenant les hydrocarbures (et donc le squalène) représente 213 mg et une radioactivité de 9×10^5 c/mn. Les cristallisations successives dans le méthanol font tomber rapidement la radioactivité des stérols à zéro:

1ère cristallisation:	 121 mg	324 c/mn/mg	F. 95-115°***
2ème cristallisation:	 61 mg	150 c/mn/mg	F. 120-131°
3ème cristallisation:	 40 mg	0 c/mn/mg	F. 134-137°

Nous avons vérifié que les stérols de radioactivité nulle contenaient toujours le même mélange de stérols Δ -5 et Δ -7.

Les hydrocarbures recueillis lors de la chromatographie sur colonne de la fraction insaponifiable ont été purifiés par une chromatographie préparative sur couche mince d'acide silicique (développement par l'heptane, révélation latérale par H_2SO_4 , utilisation d'un squalène authentique comme témoin). Nous avons élué les hydrocarbures possédant dans ces conditions le même R_f que le squalène (R_f 0,30), soit 8,5 mg à partir de 63 mg. La radioactivité du produit obtenu est de $1,8 \times 10^5$ c/mn. L'étude de la radioactivité du squalène présent dans ce mélange a été poursuivie par chromatographie en phase gazeuse. Un appareil Chromagaz a été utilisé, avec une colonne de 2 m de longueur contenant de la célite HMDS imprégnée de 10% de silicone QF-1; temps de rétention du squalène: 5,2 mn. Les différentes substances observées par cette analyse ont été recueillies à la sortie de l'appareil et leur radioactivité mesurée séparément; toutes possèdent une radioactivité mesurable; le squalène contient environ un tiers de la radioactivité totale.

Au cours de cette expérience, nous avons pu isoler le cycloarténol et le lanostérol (alors que précédemment nous n'avions trouvé que le cycloarténol). Ces deux alcools triterpéniques, isolés, sous forme de leurs époxydes propionates sont dénués de radioactivité.

Discussion

L'expérience d'incorporation d'un acétate-1,2- ^{14}C réalisée avec *Stichopus japonicus*, a mis en évidence l'absence de biosynthèse des stérols et du lanostérol par cette holothurie,

* Nous remercions sincèrement Monsieur le Professeur adjoint K. Sekino qui a facilité notre travail à la station des Pêches Marines d'Onagawa.

Nous remercions également M. Itoh pour sa collaboration technique.

** Les radioactivités sont mesurées sur un appareil à scintillation Nuclear Chicago Mark I de rendement 80% pour ^{14}C .

*** Les points de fusion sont mesurés avec l'appareil de Kofler et sont corrigés.

du moins dans les conditions de nos expériences. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents indiquant l'absence de biosynthèse des stérols chez certains invertébrés marins (10), (11), (12), (13), (14). Notons cependant que les mollusques *Helix pomatia* (15), *Arion rufus* (16), *Planorbarius corneus* et *Limnea stagnalis* (17) sont capables de biosynthétiser les stérols.

Il est remarquable de constater que dans notre expérience le squalène est marqué, et il est possible d'avancer l'hypothèse selon laquelle *Stichopus japonicus* est incapable de cycliser le squalène en lanostérol; (voir par exemple (18) pour un cas semblable chez un invertébré). Les stérols et les alcools triterpéniques de ces animaux proviennent donc en totalité de leur nourriture animale et végétale.

En conséquence directe de ces résultats, il apparaît comme très probable que les holothuries ne biosynthétisent pas les holothurines. Ces toxines proviendraient de leur nourriture ou seraient des produits de transformation par l'animal de glycosides présents dans leur nourriture.

Nous avons l'intention d'étudier prochainement cette hypothèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Résumé

La biosynthèse des stérols, du squalène et d'alcools triterpéniques à partir d'un acétate-1,2- ^{14}C a été étudiée avec l'holothurie *Stichopus japonicus*. Les expériences d'incorporation ont montré que l'holothurie n'incorpore pas cet acétate dans les stérols ni dans les alcools triterpéniques; cependant le squalène est radioactif.

Nous avançons l'hypothèse selon laquelle les holothurines ont une origine externe, ou bien sont des produits de transformation de précurseurs fournis par la nourriture.

Summary

The biosynthesis of sterols, squalene and triterpenic alcohols from an acetate 1,2- ^{14}C has been investigated in *Stichopus japonicus*. The holothurian does not incorporate the acetate neither into sterols nor into the triterpenic alcohols; however, squalene was labelled in this experiment.

It is suggested that holothurins have an exogenous origin, or are transformation products from constituents of foods.

Bibliographie

- 1) Y. HASHIMOTO et T. YASUMOTO: This Bull., **26**, 1132-1138 (1960).
- 2) T. YASUMOTO, M. TANAKA et Y. HASHIMOTO: This Bull., **32**, 673-676 (1966).

- 3) C. B. ALENDER et F. E. RUSSELL: in "Physiology of Echinodermata" (R. A. Boolootian ed.), 529–543, Interscience Publishers, New-York (1967).
- 4) B. W. HALSTEAD: in "Poisonous Marine Animals" vol. 1, 537–540, U.S. Gov. Printing, Washington (1965).
- 5) J. D. CHANLEY, T. MEZZETTI et H. SOBOTKA: *Tetrahedron*, **22**, 1857–1884 (1966).
- 6) G. HABERMEHL et G. VOLKWEIN: *Naturwiss.*, **55**, 83–84 (1968).
- 7) T. YASUMOTO, K. NAKAMURA et Y. HASHIMOTO: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 7–10 (1967).
- 8) V. LINDAHL, J. A. CIFONELLI, B. LINDAHL et L. RODEN: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2817–2820 (1965), *ibid.*, **241**, 2113–2119 (1966).
 V. LINDAHL et L. RODEN: *B. B. Res. Comm.*, **17**, 254–259 (1964).
 V. LINDAHL: *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 368–382 (1966).
- 9) N. KATSURA et E. A. DAVIDSON: *ibid.*, **121**, 120–127 (1966).
- 10) D. I. ZANDEE: *Nature*, **195**, 814–815 (1962); *ibid.*, **202**, 1335–1336 (1964)
 H. E. VAN AAREM, H. J. VONK, D. I. ZANDEE: *Arch. Inter. Physiol. Biochem.*, **72**, 606–614 (1964).
- 11) A. VAN den OORD: *Comp. Biochem. Physiol.*, **13**, 461 (1964).
- 12) A. SALAQUE, M. BARBIER et E. LEDERER: *ibid.*, **19**, 45–51 (1966).
- 13) D. I. ZANDEE: *ibid.*, **20**, 811–822 (1967); *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **75**, 487–492 (1967).
- 14) P. A. VOOGT: *ibid.*, **75**, 809–815 (1967).
- 15) A. D. F. ADDINK et P. H. J. T. VERVERGAERT: *ibid.*, **71**, 797–801 (1963).
- 16) P. A. VOOGT: *ibid.*, **75**, 492–496 (1967).
- 17) P. A. VOOGT: *ibid.*, **75**, 809–813 (1967).
- 18) J. M. WOOTON et L. D. WRIGHT: *Nature*, **187**, 1027–1028 (1960).