

Invertébrés marins du lagon néocalédonien

IV*. Saponines et sapogénines d'une holothurie, *Actinopyga flammea*

Manuscrit reçu le 09-02-1984

SUBODH BHATNAGAR¹
BRIGITTE DUDOUET¹
ALAIN AHOND^{1*}
CHRISTIANE POUPAT^{1*}
ODILE THOISON¹
ALAIN CLASTRES²
DOMINIQUE LAURENT²
PIERRE POTIER¹

D'une holothurie (Échinodermes) de Nouvelle-Calédonie, neuf saponines à génines triterpéniques ont été identifiées : déjà connues : les holothurines A et B, l'échinoside A, le déhydro-24 échinoside A et l'hydroxy-22 échinoside A ou holothurine A1, nouvellement décrites : l'hydroxy-24(S) déhydro-25 échinoside A, l'hydroxy-22 é déhydro-24 échinoside A, l'acétoxy-22 é échinoside A et l'hydroxy-25 déhydro échinolyside A. Les six sapogénines, obtenues par hydrolyse acide de l'extrait brut, ont été identifiées aux : oxydo-22,25 holothurinogénine, holothurinogénine, déhydro-24 holothurinogénine, griséogénine, koellikérigénine et ceto-16 holothurinogénine ; seule la dernière n'avait pas encore été décrite.

Summary. — Nine triterpenoid saponins have been isolated from the New Caledonian sea-cucumber, *Actinopyga flammea*. Holothurin A and B, echinoside A, 24-dehydroechinoside A and 22-hydroxy ξ -echinoside A (holothurin A₁) are known compounds, whereas, 24(S)-hydroxy-25-dehydro-echinoside A, 22 ξ -hydroxy-24-dehydro-echinoside A, 22 ξ -acetoxy-echinoside A and 25-hydroxy-dehydroechinoside A are new compounds. Acid hydrolysis of the crude saponins yielded six sapogenins which have been identified as : 22,25-oxydo-holothurinogenin, holothurinogenin, 24-dehydro-holothurinogenin, griseogenin, koellikerigenin and the previously unreported 16-keto-holothurinogenin.

Bien que certaines espèces d'holothuries donnent lieu à une utilisation culinaire en Extrême-Orient, c'est probablement l'ichtyotoxicité, connue depuis longtemps, l'activité antitumorale et/ou l'activité antifongique de ces « concombres de mer » qui ont suscité, depuis plus de cinquante ans, l'intérêt des chimistes pour cette classe d'Échinodermes.

Comme l'indique P. Scheuer (1), les recherches sérieuses sur les constituants chimiques des holothuries ont débuté, dès 1929, avec T. Yamanouchi ; cet auteur devait, quelques années plus tard, isoler une « toxine » qu'il appela holothurine Ia, dont il nota l'hydrosolubilité, les propriétés hémolytiques et qu'il rapprocha des saponines végétales, sans toutefois proposer de structure définie. Avec R. F. Nigrelli, J. D. Chanley et leurs collaborateurs, puis de nombreuses autres équipes (1), l'étude chimique proprement dite progressa rapidement ; elle porta, d'abord, essentiellement sur les produits d'hydrolyse acide (1, 2) : génines triterpéniques, sucres, voire acide sulfurique furent identifiés comme constituants de ces saponines. L'hydrolyse enzymatique devait ensuite permettre de proposer une séquence pour la chaîne glucidique. Des propositions de structure pour les saponines elles-mêmes suivirent. La première structure complète de deux de ces saponines, holotoxines A et B 1 et 2, a été publiée en 1976 par I. Kitagawa et coll. (3) ; elle devait être corrigée un peu plus tard (4). Depuis, vingt-six autres saponines ont été décrites (5), quelques autres n'ont encore fait l'objet que de descriptions partielles.

L'examen des structures proposées montre que :

- à l'exception du rhamnose (6) et du galactose (7) cités chacun une seule fois comme produits d'hydrolyse, les quatre mêmes sucres se retrouvent dans toutes les chaînes polysaccharidiques : xylose, glucose, quinovose, méthyl-3 glucose ;

l'enchaînement est même identique dans de nombreux cas. Cette chaîne carbohydrate peut être sulfatée [monosulfatée dans les holothurines et les échinolysides, disulfatée dans la psoluthurine A (5n)], le cation étant généralement le sodium ; dans un seul cas, les auteurs ont identifié le cation à l'ammonium (51) ;

- toutes les génines sont triterpéniques : ce caractère différencie les Holothurides ou « concombres de mer » des Astérides ou « étoiles de mer » : dans celles-ci, les génines sont stéroïdiques (8). Les différences entre les génines d'holothuries portent sur la présence, ou non, d'hydroxyle en 12 et en 17 et d'un groupement carbonyle en 16 ainsi que sur la nature de la chaîne latérale en 20 ; une double liaison en 9(11) ou 7(8) est présente dans tous les cas : il convient de noter ici que, dès 1969, Chanley et Rossi (9) admettaient, expériences à l'appui, l'existence possible, dans la saponine d'origine, de la lactone et du pont oxydo-22,25 mais soulignaient que les diènes 7(8)-9(11), présents dans les génines, étaient des artefacts d'hydrolyse, de même que la configuration β de l'hydroxyle en 12 ; plus récemment, Elyakov et coll. (10) ont démontré qu'une double liaison 9(11) résultait de la migration d'une double liaison initialement située en 7(8).

D'une holothurie, récoltée en Nouvelle-Calédonie, *Actinopyga flammea*, nous avons isolé neuf saponines (11) ; les quatre composés majoritaires sont des saponosides déjà cités : l'holothurine A, 3, la plus abondante, est connue dans plusieurs espèces du genre *Holothuria* (5a) et une espèce du genre *Actinopyga* (6h), l'holothurine B, 4, a été isolée de plusieurs espèces de *Holothuria* (5b), l'échinolyside A 5 et la déhydro-24 échinolyside A 6 de deux espèces de *Actinopyga* (5c et 5h).

Les cinq autres saponines sont très minoritaires : pour trois d'entre elles, l'obtention de très faibles quantités nous a malheureusement privés de certaines données spectrales, nous obligeant à ne faire que des propositions de structure pour les composés 9 à 11. Tous les composés isolés sont : sulfatés leurs spectres de masse ont été obtenus par la technique de bombardement atomique rapide (FAB) (12).

La description des quatre premiers a été complétée (voir partie expérimentale), notamment en masse, RMN du ¹H et du ¹³C (tableaux 1 et 2) : à noter que nos attributions en RMN du ¹³C pour 3 et 4 diffèrent de celles de I. Kitagawa et coll. (5a) au niveau des C-15, C-26 et C-27 ; nos attributions pour 5 divergent de celles décrites par V. A. Stonik et coll. (51) pour l'holothurine A₂ (= échinolyside A) au niveau des carbo-

1. Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS, 91190 Gif sur Yvette (France).

2. Centre ORSTOM, BP A5, Nouméa Cédex (Nouvelle-Calédonie).

(*): Partie III : A. Clastres, P. Laboute, A. Ahond, C. Poupat et P. Potier, *J. Nat. Prod.*, 1984, 47, 162.

ORSTOM Documentation



010001379

9 FEV. 1996

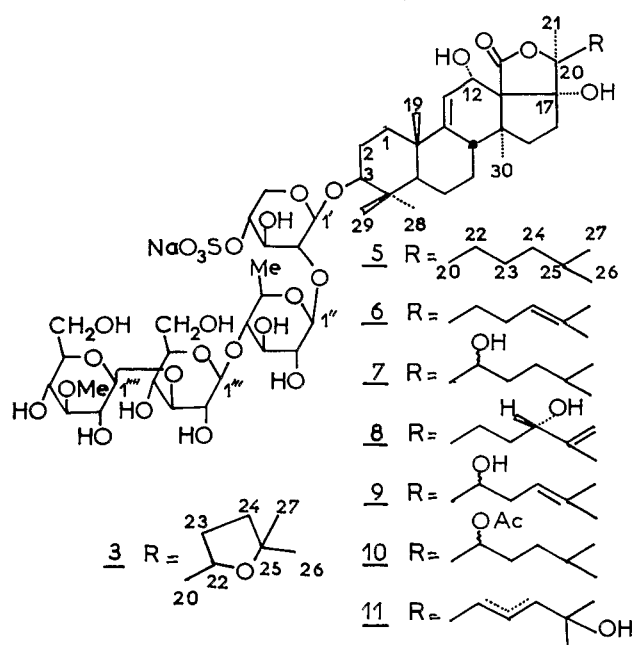
ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 43652
Cote : B

TABLEAU I
Spectres de RMN du ^1H enregistrés à 400 MHz dans $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$

^1H	3	3 désulfatée	4**	5	6	7	8	9	11
11	5,49 (d, J = 5 Hz)	5,52 (m)	5,50 (d, J = 5 Hz)	5,47 (d, J = 5 Hz)	5,47 (d, J = 5 Hz)	5,54 (m)	5,47 (d, J = 5 Hz)	5,46 (d, J = 5 Hz)	5,47 (d, J = 5 Hz)
12	4,87 (d, J = 5 Hz)	4,86 (m)	4,85 (d, J = 5 Hz)	4,87 (d, J = 5 Hz)	4,86 (d, J = 5 Hz)	4,93 (d, J = 5 Hz)	4,83 (d, J = 5 Hz)	4,85 (d, J = 5 Hz)	4,85 (d, J = 5 Hz)
19	1,27 (s)	1,27 (s)	1,25 (s)	1,26 (s)	1,24 (s)	1,27 (s)	1,25 (s)	1,23 (s)	1,25 (s)
21	1,65 (s)	1,65 (s)	1,63 (s)	1,62 (s)	1,65 (s)	1,78 (s)	1,69 (s)	1,64 (s)	1,62 (s)
22	—	—	—	—	—	—	—	4,33 (m)	2,62 (m) ou 5,9
23	—	—	—	—	—	—	—	—	6,02 (dd, J = 15 et 7 Hz)
24	—	—	—	—	5,08 (t, J = 7 Hz)	—	4,27 (m)	5,07 (t, J = 7 Hz)	2,62 ou 5,9 (d, J = 15 Hz)
26	1,06* (s)	1,06* (s)	1,04* (s)	0,73	1,54 (s)	0,76	1,77 (s)	1,53 (s)	1,41 (s)
27	1,08* (s)	1,08* (s)	1,06* (s)	(d, J = 7 Hz)	1,47 (s)	(d, J = 7 Hz)	5,15 (s ép., 2H)	1,45 (s)	
28	0,92 (s)	0,94 (s)	1,0 (s)	0,93 (s)	0,92 (s)	0,93 (s)	0,94 (s)	0,90 (s)	0,92 (s)
29	1,12 (s)	1,14 (s)	1,15 (s)	1,12 (s)	1,12 (s)	1,15 (s)	1,12 (s)	1,10 (s)	1,12 (s)
30	1,57 (s)	1,57 (s)	1,55 (s)	1,55 (s)	1,54 (s)	1,62 (s)	1,57 (s)	1,53 (s)	1,54 (s)
$\text{CH}_3\text{O}-$ 3''''	3,73 (s)	3,76 (s)	—	3,72 (s)	3,73 (s)	3,76 (s)	3,74 (s)	3,71 (s)	3,74 (s)
1'	4,55 (d, J = 7 Hz)	4,42 (d, J = 7 Hz)	4,68 (d, J = 7 Hz)	4,54 (d, J = 7 Hz)	4,56 (d, J = 7 Hz)	4,57 (d, J = 7 Hz)	4,57 (d, J = 8 Hz)	4,53 (d, J = 7 Hz)	4,56 (d, J = 7 Hz)
1''	4,89 (d, J = 7 Hz)	4,86 (d, J = 7 Hz)	5,02 (d, J = 7 Hz)	4,85 (d, J = 8 Hz)	4,85 (d, J = 7 Hz)	4,87 (d, J = 8 Hz)	4,85 (d, J = 8 Hz)	4,85 (d, J = 8 Hz)	4,87 (d, J = 8 Hz)
1'''	4,92 (d, J = 7 Hz)	4,95 (d, J = 7 Hz)	—	4,92 (d, J = 7 Hz)	4,92 (d, J = 8 Hz)	4,95 (d, J = 8 Hz)	4,94 (d, J = 7 Hz)	4,90 (d, J = 8 Hz)	4,95 (d, J = 8 Hz)
1''''	5,22 (d, J = 7 Hz)	5,23 (d, J = 7 Hz)	—	5,20 (d, J = 7 Hz)	5,21 (d, J = 8 Hz)	5,22 (d, J = 8 Hz)	5,20 (d, J = 8 Hz)	5,20 (d, J = 8 Hz)	5,22 (d, J = 8 Hz)
Me-6''	1,60 (d, J = 5 Hz)	1,62 (d, J = 5 Hz)	1,52 (d, J = 5 Hz)	1,58 (d, J = 6 Hz)	1,59 (d, J = 6 Hz)	1,60 (d, J = 6 Hz)	1,62 (d, J = 6 Hz)	1,59 (d, J = 6 Hz)	1,59 (d, J = 6 Hz)

(*) Valeurs pouvant être échangées.

(**) Valeurs complémentaires : 3,92 (t, J = 7 Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 3,61 (dd, J = 7 et 9 Hz, $\text{C}_3\text{-H}$), 5,03 (t, J = 9 Hz, $\text{C}_4\text{-H}$), 4,20 (dd, J = 9 et 10 Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 3,95 (dd, J = 7 et 6 Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 4,77 (dd, J = 6 et 11 Hz, $\text{C}_3\text{-H}$), 4,01 (dd, J = 11 et 7 Hz, $\text{C}_4\text{-H}$), 3,59 (dq, J = 7 et 7 Hz, $\text{C}_5\text{-H}$).



nes des méthyles 19, 28, 29, 30. Pour le déhydro-24 échinocidine A 6, les quelques valeurs publiées par I. Kitagawa et coll. (5h) ont été complétées (13).

Les saponines minoritaires, 7 à 11, ont toutes le squelette de l'échinocidine A : même chaîne de sucres, sulfate, génine de type holothurinogénine ; les différences portent sur la chaîne latérale en 20.

La saponine 7 n'a pas été obtenue parfaitement pure : elle est accompagnée d'holothurine A. Le spectre de masse montre qu'elle possède un hydroxyle de plus que l'échinocide A. L'hydrolyse acide a fourni, en plus d'un peu d'oxydo-22,25 holothurinogénine provenant de l'holothurine A, de la griséogénine **15a** : ce résultat nous permet de proposer pour 7 la structure d'un hydroxy-22 échinocide A [= holothurine A₁ (5f)].

TABLEAU 2

Spectres de RMN du ¹³C enregistrés à 100,1 MHz dans C₅D₅N

¹³ C	3	4	5	6	8
1	35,6	35,7	35,5	36,6	36,1
2	27,0	27,4	26,7	27,7	27,1
3	88,8	88,7	88,4	89,4*	88,8*
4	40,0	40,0	39,7	40,6	40,1
5	52,6	52,7	52,4	53,4	52,8
6	21,2	20,3	20,9	21,9	21,3
7	28,3	28,1	28,1	29,0	28,4
8	40,9	40,9	40,6	41,5	41,0
9	153,8	153,8	153,6	154,7	154,1
10	39,7	39,7	39,4	39,4	39,8
11	115,6	115,5	115,3	116,2	115,7
12	71,5	71,5	71,1	72,0**	71,5
13	58,8	58,8	58,3	59,3	57,8
14	45,9	45,9	46,1	47,0	46,5
15	36,3*	36,4*	36,0	37,0	36,5
16	38,4	38,5	36,4	37,3	36,8
17	89,7	89,7	89,0	89,9	89,5
18	174,5	174,5	174,6	175,4	174,8
19	18,9	18,9	19,8	20,7	20,1
20	86,6	86,6	86,9	87,6	87,4
21	22,5	22,5	22,5	23,6	23,3
22	80,6	80,7	39,4	40,3	35,2
23	36,9*	37,0*	22,0	24,0	30,7
24	28,1	28,7	38,6	125,3	75,4
25	81,4	81,4	27,8	132,4	150,0
26	28,1	28,1	22,3	26,4	110,6
27	28,7	28,7	22,4	18,7	18,2**
28	27,4	27,4	27,8	28,7	28,2
29	16,7	16,7	16,4	17,4	16,8
30	20,3	20,3	22,5	23,2	22,7
1'	105,9	105,7	105,2	106,4	105,9*
2'	83,4	83,4	82,8	83,9	83,4
3'	76,3	76,6	75,9	76,9	76,4
4'	74,9	75,0	74,7	74,7	75,1
5'	64,2	64,0	63,9	64,8	64,3**
1''	105,5	105,2	104,9	106,1	105,4*
2''	75,3	76,1	75,0	76,0	75,6
3''	75,8	77,5	75,7	76,5	76,1
4''	86,5	76,8	86,4	87,3	87,0
5''	72,0	73,4	71,5	72,6	71,9
6''	18,0	18,5	17,8	18,3	18,1**
1'''	105,3	—	104,9	105,9	105,2*
2'''	74,1	—	73,5	75,6	74,0
3'''	87,9	—	87,5	88,5*	88,0*
4'''	70,5	—	70,3	71,3**	70,7
5'''	77,5	—	77,3	78,2	77,8
6'''	61,6	—	60,6	62,4	62,1**
1''''	104,7	—	104,4	105,4	104,9*
2''''	75,2	—	75,0	75,9	75,5
3''''	87,9	—	87,3	88,5*	88,1*
4''''	69,3	—	69,3	70,1	69,8
5''''	78,2	—	77,8	78,8	78,4
6''''	62,0	—	61,8	62,8	62,3**
MeO-3''''	60,9	—	60,5	61,4	60,8

(*, **, ***) Valeurs pouvant être inversées.

Les quatre autres composés minoritaires sont décrits ici pour la première fois.

Le composé **8** diffère de l'échinocide A **5** par la présence d'un hydroxyle et d'une double liaison supplémentaires : le spectre de masse présente un ion à 1 243 [M + Na]⁺ correspondant bien à 14 unités de masse de plus que l'échinocide A. L'examen des spectres de RMN du ¹H et du ¹³C (tableaux 1 et 2) par comparaison avec ceux de l'échinocide A, montre les grandes analogies existant entre les deux saponines, tant dans la partie « sucres » que dans la partie « génine » ; les variations observées, principalement au niveau des déplacements chimiques des carbones 22 à 26, rapprochées des valeurs publiées pour des stérols (14), nous ont conduits à placer le substituant hydroxylé en 24, avec une configuration (S) et la double liaison en 25. La saponine **8** est l'hydroxy-24(S) déhydro-25 échinocide A.

Le composé **9** a même masse que **8** ; son spectre de RMN du ¹H est pratiquement superposable à celui du déhydro-24 échinocide A **6** (tableau 1), à l'exception d'un signal supplémentaire à 4,33 ppm qui pourrait être le proton jouxtant l'hydroxyle. Aucun des déplacements chimiques des méthyles n'étant modifié, l'hydroxyle serait situé sur la chaîne latérale : la nature du signal du proton éthylénique en 24 traduit la présence d'un CH₂ en 23 et nous fait proposer, pour **9**, une structure d'hydroxy-22 ξ déhydro-24 échinocide A.

La saponine **10** a une chaîne latérale saturée, comme l'échinocide A mais, par rapport à celui-ci, elle possède un groupement —O—C(=O)—CH_3 supplémentaire. L'acétylation de la

génine obtenue par hydrolyse acide de **10** ayant fourni la diacétyl-3,22 griséogénine **15b**, nous attribuons à **10** la structure de l'acétoxy-22 ξ échinocide A (= acétyl-22 holothurine A₁).

Le composé **11** n'a pas, non plus, été obtenu très pur. Le produit très largement majoritaire du mélange a une masse identique à celle des saponines **8** et **9**, traduisant la présence d'un hydroxyle et d'une double liaison de plus que dans l'échinocide A. L'hydroxyle a été placé en position 25 en raison du déplacement chimique à 1,41 ppm des signaux des deux méthyles en 26 et 27 qui, de doublets (0,73 ppm dans l'échinocide A) sont devenus un singulet. Sur ce même spectre de RMN du ¹H, la présence des signaux de deux protons éthyléniques (doublet, J = 15 Hz, à 5,9 ppm et doublet dédoublé, J = 15 et 8 Hz, à 6,02 ppm) indique l'existence d'une double liaison théoriquement susceptible d'être en 1, 6, 22 ou 23. L'irradiation du signal à 2,62 ppm, correspondant à un CH₂ couplant avec le proton éthylénique à 6,02 ppm élimine les deux premières localisations possibles de la double liaison : le composé **11** est donc Δ22 ou Δ23.

En l'absence de spectres de RMN de ¹³C, nous ne pouvons fixer avec plus de précision la position de la double liaison : **11** est un hydroxy-25 déhydro-22 ou 23 échinocide A. Le produit dont il est entaché serait de même type mais posséderait une double liaison supplémentaire.

Une hydrolyse acide réalisée avant la séparation des saponines, sur leur mélange, a fourni six génines ; quatre d'entre elles peuvent être facilement reliées aux saponines précédemment décrites :

● l'oxydo-22,25 holothurinogénine **12** (15) est la génine des holothurines A et B 3 et 4 ;

● l'holothurinogénine **13** (16) est celle de l'échinocide A 5 ;

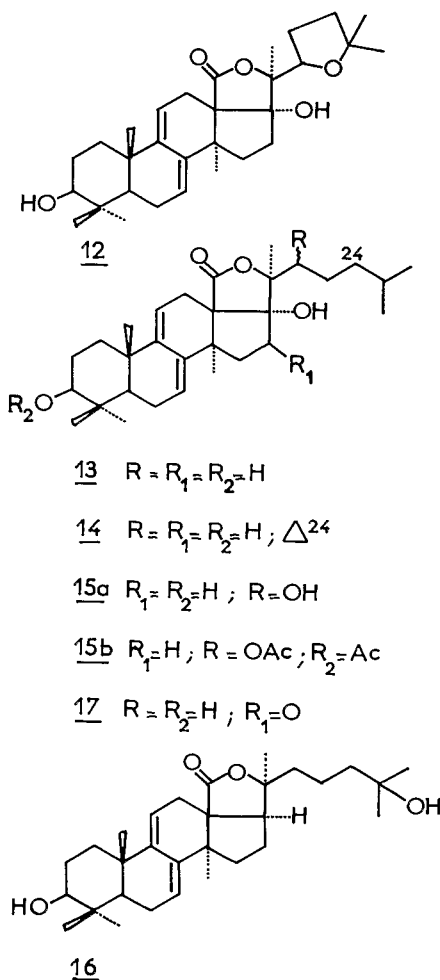
● la déhydro-24,25 holothurinogénine **14** (9b) est celle du déhydro-24 échinocide A 6 ;

● la griséogénine **15a** (17) est celle de l'hydroxy-22 ξ échinocide A 7.

TABLEAU 3
Spectres de RMN du ^1H des génines, enregistrés à 400 MHz dans CDCl_3

H	12	13	14	15a	16	17
3	3,27 (dd, J = 11 et 5 Hz)	3,27 (dd, J = 11 et 5 Hz)	3,27 (dd, J = 11 et 5 Hz)	3,27 (dd, J = 11 et 5 Hz)	3,21 (dd, J = 11 et 5 Hz)	3,26 (dd, J = 11 et 5 Hz)
7	5,28 (d, J = 6 Hz)	5,25 (d ép., J = 6 Hz)	5,28 (d ép., J = 6 Hz)	5,28 (d, J = 6 Hz)	5,23 (s ép.)	5,28 (d ép., J = 6 Hz)
11	5,54 (m)	5,55 (s ép.)	5,56 (m)	5,53 (s ép.)	5,50 (s ép.)	5,58 (s ép.)
19	1,10 (s)	1,11 (s)	1,10 (s)	1,09 (s)	1,11 (s)	1,10 (s)
21	1,36 (s)	1,41 (s)	1,42 (s)	1,37 (s)	1,36 (s)	1,38 (s)
22	4,22 (t, J = 7 Hz)	—	—	3,86 (d ép., J = 9 Hz)	—	—
24	—	—	5,15 (m)	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—
26	1,23* (s)	} 0,89 (d, J = 7 Hz)	1,71 (s)	} 0,9 (d, J = 7 Hz)	} 1,20 (s)	} 1,12 (d, J = 7 Hz)
27	1,26* (s)		1,63 (s)			
28	0,90 (s)	0,91 (s)	0,90 (s)	0,89 (s)	0,95 (s)	0,90 (s)
29	1,02 (s)	1,01 (s)	1,01 (s)	1,02 (s)	1,05 (s)	1,04 (s)
30	1,19 (s)	1,15 (s)	1,15 (s)	1,19 (s)	0,83 (s)	1,15 (s)

(*) Valeurs pouvant être échangées.



Les deux autres génines caractérisées, koellikérigénine 16 (18) et céto-16 holothurinogénine 17 n'ont pu être reliées directement aux saponines que nous avons isolées.

Remerciements. — Nous remercions MM. G. Bargibant, P. Laboute et J. L. Menou (ORSTOM, Nouméa) pour la récolte des échantillons, M. G. Cherbonnier pour la détermination zoologique, le

Dr H.-R. Schulten (Université de Bonn, République Fédérale d'Allemagne) d'avoir bien voulu enregistrer pour nous le spectre de masse en désorption de champ de l'holothurine A désulfatée et nous fournir l'interprétation des principaux ions, le Dr I. Kitagawa (Université d'Osaka, Japon) pour la fourniture d'échantillons de référence des composés 3 et 5, le Dr V. A. Stonik (Institut de Chimie Bioorganique de l'Océan Pacifique, Vladivostok, URSS) pour la communication d'informations complémentaires concernant l'holothurine A₂ et le Dr S. Kan (Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay, Université de Paris-Sud) pour nous avoir obligeamment donné accès au spectromètre expérimental de RMN à 400 MHz.

Partie expérimentale

GÉNÉRALITÉS

Les spectres IR ont été enregistrés sur spectromètre Perkin-Elmer type 257 et les spectres UV, en solution dans l'éthanol, sur un appareil Bausch et Lomb type « Spectronic 505 ». Tous les spectres de RMN du ^1H ont été enregistrés sur appareil à 400 MHz (19) et ceux de RMN du ^{13}C [découplage par bruit (BB) et « spin echo » (20)] sur appareil Bruker WM 400 à 100,1 MHz. Les spectres de masse (FAB) ont été enregistrés sur spectrographe Kratos MS 80 en suspension dans le glycérol, en mode positif. Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été réalisées soit sur plaques Merck de silice (Kieselgel 60 F 254) soit sur plaques de silice greffée Merck (RP8 F254S) ou Whatman (KC18F). La révélation des CCM a été réalisée par le réactif sulfo-molybdique pour les saponines et par le réactif sulfo-vanillique pour les génines. Les chromatographies sur colonne ont été faites sur silice greffée Li Chroprep RP 8 Merck.

EXTRACTION

L'holothurie étudiée, *A. flammaea*, a été récoltée par 35 à 50 m de profondeur sur la pente externe du récif barrière de la côte ouest de Nouvelle-Calédonie (n° réf. EH 25, collection ORSTOM Nouméa).

22 kg d'holothuries fraîchement récoltées et broyées ont été extraits à plusieurs reprises par un mélange, à parties égales, d'eau et d'alcool à 90° (14 l, 10 l et 10 l); les extraits hydroalcooliques ont été concentrés sous vide (7 l) avant d'être dégraissés par l'éther de pétrole puis re-extraits par le butanol saturé d'eau (14 l) après acidification à pH 4-5. La phase butanolique, concentrée à 4,8 l, additionnée de 14,4 l d'éther a finalement été extraite par l'eau (4 × 2,4 l). La lyophilisation des phases aqueuses a fourni 47 g d'extrait brut de saponines: 20,20 g ont cristallisé du méthanol, additionné de quelques gouttes de chloroforme et d'eau; ce produit cristallin, homogène en CCM de gel de silice, s'est révélé contenir plusieurs composés en CCM sur silice greffée (RP8).

Avant d'entreprendre la séparation des saponines, le mélange a été dialysé afin d'éliminer la plus grande partie des sels minéraux encore présents à ce stade de la purification (rendement en saponines = 80 %). Les saponines ont été séparées par chromatographies successives sur colonne de silice greffée. Les solvants d'éluion utilisés ont été des mélanges méthanol-eau en proportions variables (40-60, 45-55, 55-45). L'homogénéité des produits séparés a été vérifiée en CCM sur silice greffée (solvant = méthanol-eau 70/30).

Les sapogénines ont été obtenues par hydrolyse acide (HCl 2N à 100 °C pendant deux heures) de l'extrait cristallin mentionné ci-dessus : après ajustage du pH à 6-7 les gènes précipitent dans le milieu réactionnel. Séparé par filtration, le précipité est traité à plusieurs reprises par du toluène chaud : le rendement en gènes est de 35 %. Celles-ci ont été séparées par chromatographies successives sur colonne et sur couche épaisse de gel de silice : leur pureté a été contrôlée par CCM sur gel de silice (solvant de migration : CH₂Cl₂-MeOH 98/2).

L'hydrolyse acide des saponines déjà séparées a été faite selon la même technique mais les faibles quantités de matière première n'ont pas permis de précipiter les gènes : elles ont été directement extraites par CH₂Cl₂.

Les sucres contenus dans le filtrat ont été acétylés et leurs acétates comparés à des produits de référence.

DESCRIPTION DES SAPONINES ET SAPOGÉNINES

● *Holothurine A 3*

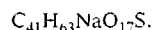
IR (KBr) : 3 400, 1 750, 1 225, 820 cm⁻¹. SM - FAB (m/z) : 1 243 (M + Na)⁺, 1 141 (1 243 - NaSO₃ + H)⁺.

RMN ¹H et ¹³C : voir tableaux 1 et 2.

● *Holothurine A désulfatée*

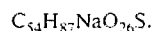
Ce composé a été obtenu selon le mode opératoire déjà décrit (5a et réf. citées). SM - désorption de champ (21) (m/z) : 1 141 (M + Na)⁺, 1 123 [(M + Na) - H₂O]⁺, 582 (M + 2 Na)⁺⁺, 573 [(M + 2 Na)⁺⁺ - H₂O]⁺⁺, 560 [(M + 2 Na)⁺⁺ - CO₂]⁺⁺.

RMN ¹H : voir tableau 1.

● *Holothurine B 4*

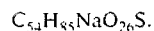
IR (KBr) : 3 400, 1 740 - 1 730, 1 230, 825 cm⁻¹. SM - FAB (m/z) : 905 (M + Na)⁺, 803 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H et ¹³C : voir tableaux 1 et 2.

● *Echinocide A 5*

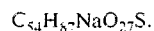
IR (KBr) : 3 350, 1 730, 1 245, 820 cm⁻¹. SM - FAB (m/z) : 1 229 (M + Na)⁺, 1 127 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H et ¹³C : voir tableaux 1 et 2.

● *Dehydro-24 échinocide A 6*

IR (KBr) : 3 350, 1 730, 1 240, 820 cm⁻¹. SM - FAB (m/z) : 1 227 (M + Na)⁺, 1 125 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H et ¹³C : voir tableaux 1 et 2.

● *Hydroxy-22 ξ échinocide A 7*

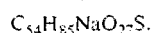
SM - FAB (m/z) : 1 245 (M + Na)⁺, 1 143 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H : voir tableau 1.

● *Hydroxy-24(S) déhydro-25 échinocide A 8*

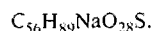
SM - FAB (m/z) : 1 243 (M + Na)⁺, 1 141 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H et ¹³C : voir tableaux 1 et 2.

● *Hydroxy-22 ξ déhydro-24 échinocide A 9*

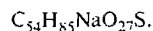
SM - FAB (m/z) : 1 243 (M + Na)⁺, 1 141 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H : voir tableau 1.

● *Acétoxy-22 ξ échinocide A 10*

SM - FAB (m/z) : 1 287 (M + Na)⁺, 1 185 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

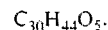
RMN ¹H (pyridine, 400 MHz) : 0,72 [d, J = 7 Hz, 6H, C₂₆(H)₃] et C₂₇(H)₃], 0,94 [s, 3H, C₂₈(H)₃], 1,12 [s, 3H, C₂₆(H)₃], 1,21 [s, 3H, C₁₉(H)₃], 1,52 [s, 3H, C₃₀(H)₃], 1,75 [s, 3H, C₂₁(H)₃], 2,06 [s, 3H, COCH₃].

● *Hydroxy-25 déhydro-22 ou 23 échinocide A 11*

SM - FAB (m/z) : 1 243 (M + Na)⁺, 1 141 [(M + Na) - NaSO₃ + H]⁺.

RMN ¹H : voir tableau 1.

Les sapogénines 12 à 16 ont fourni des caractéristiques spectrales conformes aux données publiées ; nous les avons complétées par un enregistrement de leurs spectres RMN ¹H à haut champ (voir tableau 3).

● *Céto-16 holothurinogénine 17*

IR (KBr) : 3 600, 3 550, 1 740 cm⁻¹. UV : λ_{max}^{EtOH} : ép. 236, 243, ép. 251. SM (m/z) : 484 (100 %), 451 (60 %), 397 (86 %), 299 (28 %), 143 (74 %), 127 (30 %) et 71 (37 %).

RMN ¹H : voir tableau 3.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P. J. SCHEUER, « Chemistry of marine natural products », Academic Press, New York and London, 1973, p. 23 et références citées.
- (2) I. ROTHBERG, B. M. TURSCH et C. DIERASSI, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 209.
W. L. TAN, C. DIERASSI, J. FAYOS et J. CLARDY, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 466.
I. KITAGAWA, T. SUGAWARA, I. YOSIOKA et K. KURIYAMA, *Tetrahedron Letters*, 1975, p. 963 ; *ibid.*, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1976, **24**, 266.
A. KELECOM, D. DALOZE et B. TURSCH, *Tetrahedron*, 1976, **32**, 2313.
A. KELECOM, D. DALOZE et B. TURSCH, *ibid.*, 1976, **32**, 2353.
T. T. DELIA, L. W. HERTEL et L. W. WITTLE, *Toxicol.*, 1977, **15**, 461.
A. CI ASTRES, A. AHOND, C. POUPAT, P. POTIER et A. INTES, *Experientia*, 1978, **34**, 973.
- (3) I. KITAGAWA, T. SUGAWARA, I. YOSIOKA et K. KURIYAMA, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1976, **24**, 275.
- (4) I. KITAGAWA, H. YAMANAKA, M. KOBAYASHI, T. NISHINO, I. YOSIOKA et T. SUGAWARA, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1978, **26**, 3722.
- (5) a) I. KITAGAWA, T. NISHINO et Y. KYOGOKU, *Tetrahedron Letters*, 1979, 1419.
I. KITAGAWA, T. NISHINO, M. KOBAYASHI et Y. KYOGOKU, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1981, **29**, 1951.
b) I. KITAGAWA, T. NISHINO, T. MATSUNO, H. AKUTSU et Y. KYOGOKU, *Tetrahedron Letters*, 1978, p. 985.
V. A. STONIK, A. D. CHUMAK, V. V. ISAKOV, N. I. BELOGORTSEVA, V. CHIRVA et G. B. ELYAKOV, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1979, p. 522.
I. KITAGAWA, T. NISHINO, M. KOBAYASHI, T. MATSUNO, H. AKUTSU et Y. KYOGOKU, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1981, **29**, 1942.
c) I. KITAGAWA, T. INAMOTO, M. FUCHIDA, S. OKADA, M. KOBAYASHI, T. NISHINO et Y. KYOGOKU, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1980, **28**, 1651.
d) T. A. KUZNETSOVA, N. I. KALINOVSKAYA, A. I. KALINOVSKII, G. K. OLEINIKOVA, N. V. ROVNYKH et G. B. ELYAKOV, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1982, p. 482.
e) V. F. SHARYPOV, A. D. CHUMAK, V. A. STONIK et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1981, p. 181.
f) G. K. OLEINIKOVA, T. A. KUZNETSOVA, A. I. KALINOVSKII, V. A. STONIK et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1981, p. 101.
G. K. OLEINIKOVA, T. A. KUZNETSOVA, N. S. IVANOVA, A. I. KALINOVSKII, N. V. ROVNIK et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1982, p. 464.

- g) I. KITAGAWA, M. KOBAYASHI, M. HORI et Y. KYOGOKU, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1981, **29**, 282.
- h) I. KITAGAWA, M. KOBAYASHI et Y. KYOGOKU, *ibid.*, 1982, **30**, 2045.
- i) I. KITAGAWA, M. KOBAYASHI, T. INAMOTO, T. YASUZAWA et Y. KYOGOKU, *ibid.*, 1981, **29**, 2387.
- I. I. MAL'TEV, V. A. STONIK et A. I. KALINOVSKII, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1983, p. 308.
- j) V. A. STONIK, A. I. KALINOVSKII, I. I. MAL'TSEV, C. CONDE et G. B. ELYAKOV, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1982, p. 194.
- k) V. A. STONIK, I. I. MAL'TSEV, A. I. KALINOVSKII et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1982, p. 200.
- l) V. I. KALININ et V. A. STONIK, *ibid.*, 1982, p. 215-219.
- G. K. OLENIKOVA, T. A. KUZNETSOVA, N. V. ROVNYKH, A. I. KALINOVSKII et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1982, p. 527-528.
- m) V. A. STONIK, I. I. MAL'TSEV et G. B. ELYAKOV, *ibid.*, 1982, p. 624.
- n) F.-X. GARNEAU, J.-L. SIMARD, O. HARVEY, J. W. APSIMON et M. GIRARD, *Canad. J. Chem.*, 1983, **61**, 1465.
- o) G. B. ELYAKOV, I. I. MAL'TSEV, A. KALINOVSKII et V. A. STONIK, *Bioorg. Khim.*, 1983, **9**, 280.
- (6) G. B. ELYAKOV et N. V. PERETOLCHIN, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1970, p. 637.
- (7) G. B. ELYAKOV, T. A. KUZNETSOVA et V. E. VAS'KOVSKII, *Khim. prirod. Soedinenii*, 1968, p. 53.
- (8) L. MINALE, C. PIZZA, R. RICCIO et F. ZOLLO, *Pure Appl. Chem.*, 1982, **54**, 1935.
- (9) a) J. D. CHANLEY et C. ROSSI, *Tetrahedron*, 1969, **15**, 1897.
- b) J. D. CHANLEY et C. ROSSI, *ibid.*, 1969, **15**, 1911.
- (10) V. A. STONIK, V. F. SHARYPOV, A. I. KALINOVSKII et G. B. ELYAKOV, *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 1979, **245**, 1133.
- (11) Communication préliminaire au IVth International Symposium on Marine Natural Products, Tenerife (Espagne). 25-30 juillet 1982.
- (12) K. L. RINEHART Jr., *Science*, 1982, **218**, 254 et réf. citées.
- (13) P. JOSEPH-NATHAN, G. MEJIA et D. ABRAMO-BRUNO, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 1289.
- (14) Y. LETOURNEUX, Q. KHUONG-HUU, M. GUT et G. LUKACS, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 1674.
- T. OHMOTO, K. IKEDA et T. CHIBA, *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)*, 1982, **30**, 2780.
- (15) J. D. CHANLEY, *Tetrahedron*, 1966, **22**, 1857.
- (16) G. HABERMEHL et G. VOLKWEIN, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1970, **731**, 53.
- (17) B. TURSCH, I. S. DE SOUZA GUIMARÃES, B. GILBERT, R. T. APLIN, A. M. DUFFIELD et C. DJERASSI, *Tetrahedron*, 1967, **23**, 761.
- (18) P. ROLLER, C. DJERASSI, R. CLOETENS et B. TURSCH, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 4918.
- (19) P. GONORD, S. K. KAN et M. J. SAUZADE, *J. Magnetic Resonance*, 1976, **24**, 457.
- S. K. KAN, P. GONORD, M. FAN, M. SAUZADE et G. COURTIEU, *Rev. Sci. Instr.*, 1978, **49**, 785.
- (20) C. LE COCQ et J.-Y. LALLEMAND, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1981, p. 150.
- (21) H. M. SCHIEBEL et H. R. SCHULTEN, *Biomed. Mass Spectr.*, 1982, **9**, 354.