

Invertébrés marins du lagon néo-calédonien. I. Étude structurale d'une nouvelle sapogénine extraite d'une holothurie: *Bohadschia vitiensis* Semper

Marine invertebrates from New-Caledonian Lagoon. I. Structural study of a new sapogenin isolated from a sea-cucumber: *Bohadschia vitiensis* Semper

A. Clastres, A. Ahond, C. Poupat, P. Potier et A. Intès¹

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., F-91190 Gif-sur-Yvette (France), 30 janvier 1978

Summary. Acid hydrolysis of Cuvier's organs alcoholic extract of sea-cucumber, *Bohadschia vitiensis*, led to many sapogenins. The first 3 isolated compounds had already been isolated from another sea-cucumber species/ seychellogenin, 22,25-oxido-holothurinogénine and 24,25-dehydro holothurinogénine. The 4th product is a new sapogenin formulated, **4**, on the basis of spectroscopic data.

L'activité neurotoxique, hémolytique, parfois antitumorale de saponines² isolées d'holothuries ou concombres de mer (Echinodermes, Holothuridés) nous a incités à étudier une holothurie d'une espèce nouvelle récoltée sur la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie.

Les organes de Cuvier de cette holothurie, *Bohadschia vitiensis* Semper, ont fourni, après extraction et hydrolyse acide, 4 sapogénines/ la désoxy-17 holothurinogénine **1** ou seychellogénine³, l'oxydo-22,25 holothurinogénine (**2**)⁴, la déhydro-24,25 holothurinogénine (**3**)⁵, déjà isolées, et un quatrième produit.

Ce composé (F 209–210 °C (MeOH), $[\alpha]_D^{25} -5^\circ$ (CHCl₃), a pour formule brute C₃₀H₄₈O₄ (microanalyse). Le spectre IR (nujol) montre une absorption à 1760 cm⁻¹ (δ lactone) et à 3200–3300 cm⁻¹ (hydroxyle). Dans le spectre UV(EtOH) aucune absorption au-delà de 210 nm n'est observé, ce qui exclut la présence d'un système diénique commun aux génines **1**, **2** et **3**. Le spectre de masse m/e 472 (6%), 454 (12%; M–H₂O) et 395 (100%) montre que ce composé possède le même type de squelette que la seychellogénine, (**1**) avec saturation d'une double liaison et un hydroxyle supplémentaire. Le spectre de RM¹H confirme la présence de 7 groupes méthyles (5 singulets et 1 doublet, J = 6 Hz, CH (CH₃)₂), d'un proton éthylénique à 5,12 ppm (s large, W $\frac{1}{2}$ = 6 Hz) et d'un proton à 4,38 ppm (s large, W $\frac{1}{2}$ = 6 Hz) porté par un carbone hydroxylé.

Le spectre de RM¹³C permet de confirmer la présence d'une lactone (O=C₁₈, 176,2 ppm; C₂₀, 85,1 ppm; C₁₃, 65,8 ppm), d'une double liaison trisubstituée ($>C=$ 153,1 ppm; $-HC=$, 117,8 ppm) et de 2 carbones «méthines» hydroxylés (HC–OH, 78,2 ppm et 71,6 ppm) (tableau 1).

Les positions de la double liaison et du deuxième hydroxyle sont confirmées à la fois: par RM¹³C: les déplacements chimiques des carbones de la double liaison correspondent à ceux des carbones C₉ et C₁₁⁶; par ailleurs le déblindage (~ 8 ppm) du C₁₃ (par rapport à C₁₃ de **1**) indique la proximité du 2e groupe hydroxyle; par dichroïsme circulaire (DC): l'étude des courbes de DC (EtOH) montre une absorption à 205 nm $[\theta] = +18500$ qui correspond à celle d'une double liaison C₉–C₁₁⁷ et non à celle d'une double liaison C₅–C₆ ou C₇–C₈; par RM¹H: le proton éthylénique H–C₁₁ (s large) exclut le voisinage d'un méthylène en C₁₂ et permet de placer sur ce carbone la 2e fonction hydroxyle; la position β de l'hydroxyle est déduite de la largeur des signaux⁸ des protons H–C₁₁ et H–C₁₂ et du déblindage de ces 2 protons respectivement dans le C₆D₆ –0,30 et –0,47 ppm et dans le C₅D₅N –0,48 et –0,42 ppm.

Dans le spectre de RM¹H, la région des méthyles⁹ a été étudiée dans différents solvants (tableau 2). Il résulte de cette comparaison que le méthyle 21, fortement influencé par la présence de l'hydroxyle en 12 β , est situé en arrière du plan du cycle lactonique, donc 21a¹⁰. La génine isolée est donc le trihydroxy-3S, 12R, 20S oïque-18 lactone (18 $\rightarrow$ 20S) $\Delta^{9(11)}$ lanostène.

Matériels et méthodes. 945 g d'organes de Cuvier (16 kg d'holothurie) sont broyés dans 2,5 l d'éthanol à 50% et

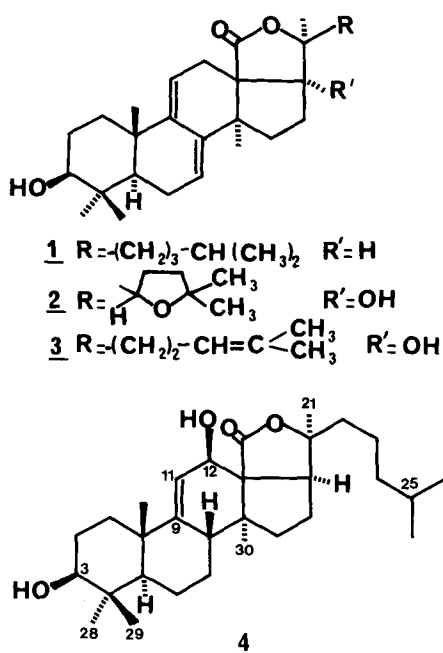


Tableau 1. Spectre de RM¹³C de **1** et **4**

	1		4		1		4
C-1	39,2 t	C-16	26,7 t	C-1	39,2 t	C-16	26,7 t
C-2	23,0 t	C-17	50,1 d	C-2	23,0 t	C-17	50,1 d
C-3	78,9 d	C-18	177,5 s	C-3	78,9 d	C-18	177,5 s
C-4	37,5 s	C-19	21,9 q	C-4	37,5 s	C-19	21,9 q
C-5	49,3 s	C-20	84,1 s	C-5	49,3 s	C-20	84,1 s
C-6	24,2 d	C-21	23,0 q	C-6	24,2 d	C-21	23,0 q
C-7	120,9 d	C-22	35,9 t	C-7	120,9 d	C-22	35,9 t
C-8	139,9 d	C-23	26,6 t	C-8	139,9 d	C-23	26,6 t
C-9	147,8 d	C-24	39,2 t	C-9	147,8 d	C-24	39,2 t
C-10	38,7 s	C-25	28,2 d	C-10	38,7 s	C-25	28,2 d
C-11	111,8 d	C-26	22,5 q	C-11	111,8 d	C-26	22,5 q
C-12	33,3 t	C-27	22,5 q	C-12	33,3 t	C-27	22,5 q
C-13	57,6 s	C-28	26,1 q	C-13	57,6 s	C-28	26,1 q
C-14	48,6 s	C-29	15,8 q	C-14	48,6 s	C-29	15,8 q
C-15	33,3 t	C-30	22,3 q	C-15	33,3 t	C-30	22,3 q

Les spectres de découplage total (PND) et de découplage partiel (OR) sont enregistrés dans le CDCl₃ à 15,08 MHz sur spectromètre Bruker WP60. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, Me₄Si servant d'étalon interne.

agités pendant 8 h. Après centrifugation (2000×g) et filtration, on recueille la solution éthanolique. Cette opération est répétée 2 fois (1,5 l et 1 l). Les solutions hydro-alcooliques sont concentrées à demi-volume et extraites par le benzène. La phase aqueuse est acidifiée par HCl jusqu'à concentration 4 N puis chauffée au bain-marie (100 °C, 4 h).

Les génines, qui précipitent, sont recueillies par filtration (5,85 g). Ce précipité est repris par le benzène bouillant; la partie soluble (4,75 g) est chromatographiée sur Alumine Merck (activité II-III, 140 g). L'élution (fractions de 50 ml) par benzène, benzène-éther et éther fournit 4 produits qui cristallisent du méthanol. Des fractions benzène on recueille le produit 1 (1,91 g, F 232–233 °C, sublimé), des

fractions benzène-éther (90:10) les composés 2 (30 mg, F 295 °C, sublimé) et 3 (15 mg, F 231–232 °C) et des fractions éther le produit 4 (80 mg, F 200 °C).

Tableau 2. Spectre de RM¹H de 4

	H-11	H-12	H-19	H-21	H-26 et H-27	H-28	H-29	H-30
CDCl ₃	5,12	4,38	1,19	1,60	0,87	1,00	0,91	0,82
C ₆ D ₆	5,42	4,85	1,43	1,83	0,87	1,18	1,04	0,92
C ₅ D ₅ N	5,60	4,80	1,38	1,94	0,87	1,24	1,08	1,00

Les spectres sont enregistrés à 60 MHz sur spectromètre Varian T60. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, le Me₄Si servant d'étalon interne.

- Centre O.R.S.T.O.M. de Nouméa, B.P. A5, Nouméa-Cédex (Nouvelle-Calédonie).
- G.R. Pettit, C.L. Herald et D.L. Herald, *J. Pharm. Sci.* 65, 1558 (1976).
- P. Roller, B. Tursch et C. Djerassi, *J. org. Chem.* 35, 2585 (1970).
- J.D. Chanley, T. Mezetti et H. Sobotka, *Tetrahedron* 22, 1857 (1966).
- J.D. Chanley et C. Rossi, *Tetrahedron* 25, 1911 (1969).
- Dans le cas du NN-diméthyle-3β-¹¹conène-5a, les déplacements chimiques des carbones C₉ et C₁₁ sont respectivement 150,3 et 115,4 ppm. G. Lukacs, communication personnelle.
- J. Hudec et D.N. Kirk, *Tetrahedron* 32, 2475 (1976).
- G.F.H. Green, J.E. Page et S.E. Staniforth, *J. chem. Soc. B*, 1966, 807.
- L'addition d'Eu(fod)₃ à une solution chloroformique de 1, a permis de confirmer l'attribution des méthyles 19, 28 et 29 de 4, selon G. Romeo, P. Giannetto et M.C. Aversa, *Org. magn. Resonance* 9, 29 (1977).
- La stéréochimie du C₂₀ a été établie par R.X. dans 2 cas, la méthoxy-25 holotoxigénine (W.L. Tan, C. Djerassi, J. Fayos et J. Clardy, *J. org. Chem.* 40, 466 (1975)) et l'acétyl-3 déoxy-17 oxydo-22,25 holothurinogénine (S.G. Ilin, B.L. Tarnopolskii, Z.I. Safina, A.N. Sobolev, A.K. Dzizenko et G.B. Elyakov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 230, 860 (1976)).

Pentagastrin induction of acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of rats

A.P. Nandi Majumdar and A.M. Nakhla¹

Institute of Medical Biochemistry, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus C (Denmark), 13 January 1978

Summary. A single injection of pentagastrin (500 µg kg⁻¹) produced an immediate (within 15 min) and pronounced increment (about 50%) in the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the cerebral but not in the cerebellar region of the brain. Pretreatment of rats with either actinomycin-D or cycloheximide did not fully abolish the pentagastrin-mediated stimulation of cerebral AChE activity.

The early observation that extracts of equine brain and intestine contain a peptide (now called substance P) with smooth muscle stimulating and hypotensive properties^{2,3} has led to the search for other peptides common to the brain and gut. Somatostatin and vasoactive intestinal peptide (VIP) have also been shown to be present in brain and gut tissues^{4,5}. Recently, using a number of antisera raised against octapeptide cholecystokinin (CCK 8) and gastrin, Dockray⁶ has been able to demonstrate the presence of a CCK-like peptide in the cerebral cortex of rat, dog and hog. In addition, peptides similar to the antral hormone gastrin are also found to be present in certain parts of the brain⁷. Although the significance of the occurrence of gastrin and CCK-like peptides in the brain is not fully understood, a potential role as neurotransmitters or neuromodulators has been suggested⁸. In an effort to study the responsiveness of the brain to gastrin and CCK-like hormones, the acetylcholinesterase (acetylcholine hydrolase, EC 3.1.1.7) activity in the cerebral hemisphere and cerebellum was investigated following a single injection of pentagastrin, a synthetic peptide containing the bioactive carboxy-terminal tetrapeptide portion of both CCK and gastrin.

Materials and methods. Adult male Wistar rats (150–200 g), fasted for 48 h, were injected i.p. with either saline or pentagastrin (peptavlon, I.C.I., Macclesfield, England) and

killed at different intervals as stated in the text below. The cerebral hemisphere and cerebellum were dissected out, and were frozen immediately on solid CO₂. Acetylcholinesterase activity (AChE) in the cerebral hemisphere and cerebellum was measured by the method of Ellman et al.⁹ as described earlier¹⁰.

Results and discussion. In the 1st series of experiments, the responsiveness of AChE to increasing doses of pentagastrin was investigated after 1 h of the hormone treatment. Whereas none of the doses (50, 250, 500, 750 and 1000 µg kg⁻¹) used in the present study caused any alteration in the activity of cerebellar AChE, a 26% enhancement in the cerebral hemisphere was observed after a dose of 500 µg kg⁻¹ (results not shown). Higher doses of pentagastrin were less effective in this respect.

The time interrelationship of the activity of AChE in both cerebral hemisphere and cerebellum was then investigated. A single injection of pentagastrin (500 µg kg⁻¹) produced an immediate and pronounced increment in the activity of the enzyme in the cerebral hemisphere (figure). A maximal stimulation of 50% over the control occurred 30 min after pentagastrin injection. The enzyme activity then declined rapidly, and at 2 h after pentagastrin treatment the values were essentially the same as that of the control, and remained at that level for the rest of the experimental