

INVERTÉBRÉS MARINS DU LAGON NÉO-CALÉDONIEN, VII.¹ ÉTUDE STRUCTURALE D'UN NOUVEAU SAPONOSIDE SULFATÉ EXTRAIT DE L'HOLOTHURIE, *NEOTHYONIDIUM MAGNUM*

M. BEDOYA ZURITA, A. AHOND,* C. POUPAT,* P. POTIER,

Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

et J. L. MENU

Centre ORSTOM, B.P. A5, Nouméa Cédex, Nouvelle Calédonie

ABSTRACT.—The main component of the glycoside fraction isolated from the New Caledonian sea-cucumber *Neothyonidium magnum* is a new triterpenoid saponin, neothyonidioside (**3**). The chemical structure has been elucidated on the basis of chemical and physicochemical evidence as 3 β -O[3-O-methyl-D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-4-O-sulfate- β -D-xylopyranosyl]-holosta-9(11), 25(26)-dien-3 β -ol-16-one.

Les premiers travaux effectués sur les constituants chimiques des Holothurides (Échinodermes) commencèrent, dès 1929, avec T. Yamanouchi (1); depuis, de nombreuses espèces ont été étudiées en raison des activités pharmacologiques présentées par les saponosides isolés de ces animaux.

La première structure complète de deux de ces saponosides, holotoxines A (**1**) et B (**2**), a été établie et publiée en 1976 par I. Kitagawa et coll. (2) puis corrigée (3). Il existe maintenant trente-six structures complètes connues, décrites sous quarante et un noms (4 à 14); trois structures supplémentaires sont encore incomplètes, l'enchaînement des sucres n'ayant pas été précisé. Les génines de ces saponosides ont en commun un squelette triterpénique: elles ne diffèrent que par la nature de la chaîne latérale portée en C₂₀ et par leur fonctionnalisation; les chaînes polysaccharidiques, sulfatées ou non, comportent deux, quatre, ou six sucres: les quatre mêmes sucres se retrouvent généralement, le xylose, le glucose, le méthyl-3 glucose, et le quinovose.

De l'extrait hydroalcoolique de l'Holothurie *Neothyonidium magnum* Ludwig (Dendrochirota), récoltée sur la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie, nous avons isolé un saponoside sulfaté majoritaire (**3**) dont la génine est l'holotoxigénol (**4**): nous l'avons appelé néothyonidioside.²

Parmi les saponosides déjà décrits, six d'entre-eux possèdent l'holotoxigénol comme génine: isolées de *Stichopus japonicus* (Aspidochirota), les holotoxines A (**1**) et B (**2**) (2,3) ainsi que les holotoxines A₁ (**5**) et B₁ (**6**) (10,11), isolés de *Psolus fabricii* (Aspidochirota), la psoluthurine A (**7**) (9) et le psolososide A (**8**) (12,13) les quatre holotoxines ne sont pas sulfatées, les deux autres saponosides possèdent deux groupes sulfate.

Le néothyonidioside **3** possède un seul groupement sulfate; il a pour formule brute C₅₃H₈₁O₂₄S Na. Sur son sm (fab, Figure 1), le pic moléculaire apparaît à MNa⁺ 1179, les autres fragments observés étant à *m/z* 1077 (MNa-NaSO₃), 625, 609, 493, 477, 451, et 331; tous ces pics, à l'exception de celui à *m/z* 451, correspondent à des fragments accompagnés d'un atome de sodium (+23): lorsque le spectre est enregistré en présence de KCl, tous les fragments, sauf celui à *m/z* 451, sont augmentés de 16 unités.

¹Partie VI. G. de Nanteuil, A. Ahond, C. Poupat, P. Potier, M. Pusset, J. Pusset, et P. Laboute, *Tetrahedron*, **41**, 6035 (1985).

²Communication préliminaire présentée au Ve Symposium International de Chimie Marine (I.U.P.A.C.), Paris, 2-6 septembre 1985.

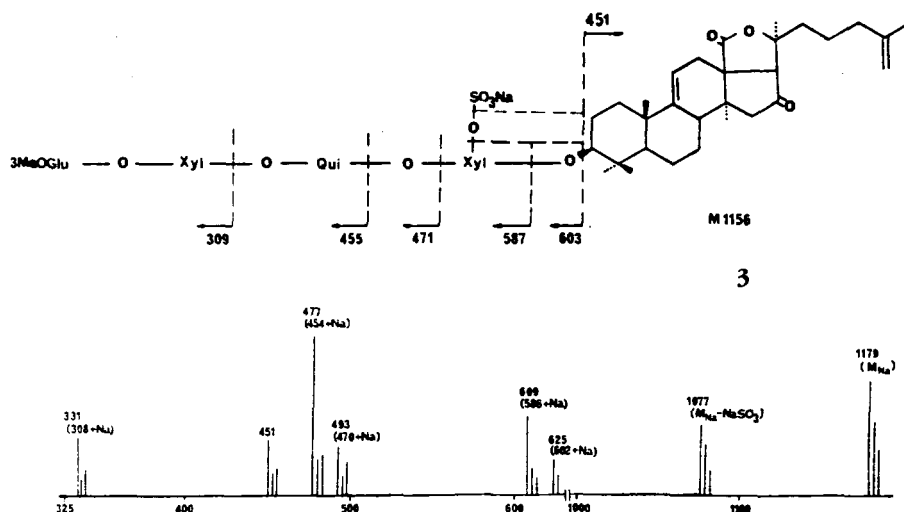


FIGURE 1. Spectre de masse fab dans glycérol

Sur le spectre ir, on note la présence d'une bande intense à 3400 cm^{-1} (hydroxyle), d'une large bande à 1740 (carbonyle) et de bandes à 1240 (sulfate) et 1025 cm^{-1} (éther). Aucune absorption n'est décelable en uv au-delà de 210 nm . Le double effet Cotton négatif observé sur le spectre de dc ($\Delta\epsilon_{306} = -5,49$ et $\Delta\epsilon_{228} = -12,06$) confirme la présence d'une cyclopentanone (15) et d'une γ -lactone (16).

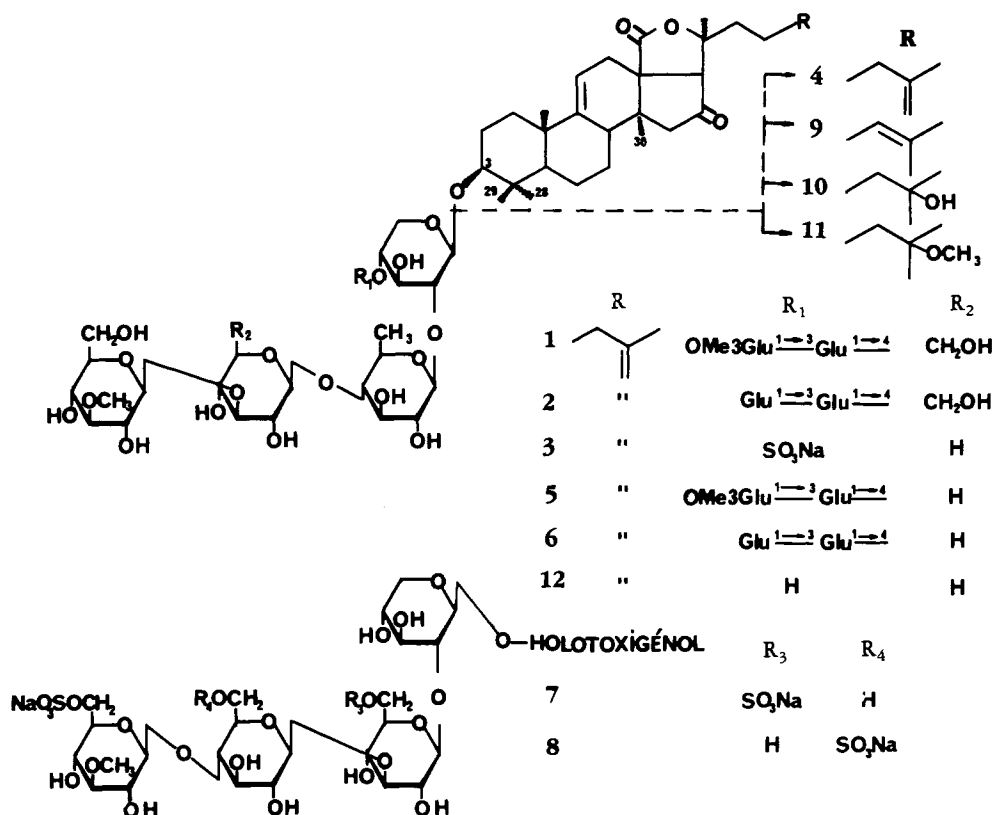
L'hydrolyse acide du mélange brut de saponines, dans lequel le néothyonidioside est largement majoritaire, fournit deux génines connues: la stichopogénine A_2 (**9**) (15, 16), produit majoritaire, et la stichopogénine A_4 (**10**) ou holotoxinogénine (15, 16). La méthanolyse acide de **3** fournit également **9** et **10** mais le produit majoritaire obtenu est la *O*-méthyl-25 holotoxinogénine (**11**) (9, 15, 16); la caractérisation de ce dernier composé a été complétée: elle figure en partie expérimentale.

On admet que les composés **10** et **11** sont produits lors de l'hydrolyse ou de la méthanolyse par hydratation ou alcoylation d'une double liaison 24,25, elle-même issue de la migration d'une double liaison 25,26 (16). De cette hydrolyse, on a donc déduit que la génine de **3** portait une double liaison en 9, 11, un groupement cétonique en position 16 et une autre double liaison en 25,26, ce que confirme l'examen du spectre de rmn^{13}C .

Les sucres obtenus par hydrolyse du mélange ont été acétylés et identifiés aux xylose, quinovose, glucose, et méthyl-3 glucose; il est à noter que, d'après les caractéristiques spectrales du composé **3** (en particulier sm et rmn^{13}C): le glucose est absent de la chaîne polysaccharidique du néothyonidioside.

Sur le spectre de rmn^1H du néothyonidioside **3** on remarque, outre les cinq singulets de méthyles à 1,10 (Me-19), 1,24 (Me-21+Me-30), 1,53 (Me-27), 0,73 (Me-28), 0,92 (Me-29) ppm un doublet de trois protons à 1,57 ppm ($J=5\text{ Hz}$) attribué au méthyle en C-5 du quinovose, un singulet de trois protons à 3,63 ppm attribué au méthyle du méthyl-3 glucose, un singulet épais de deux protons ($W_{1/2}=3,5\text{ Hz}$) à 4,63 ppm attribué aux protons du méthène *exo* C-26, et un singulet épais de un proton ($W_{1/2}=10\text{ Hz}$) à 5,17 ppm attribué au proton en C-11. Les protons anomériques des sucres résonnent à 4,33 (d, $J=7\text{ Hz}$, H-1'), 4,58 (d, $J=7\text{ Hz}$, H-1''), et 5,23 ppm (d, $J=7\text{ Hz}$, H-1'''); le signal du proton H-1''' disparaît sous celui de l'eau.

Le spectre de rmn^{13}C (Tableau 1) présente de grandes analogies avec celui de la psoluthurine A (**7**) de Garneau et coll. (9) dans sa partie génine et celui d'un produit d'hydrolyse enzymatique **12** de l'holotoxine A_1 décrit par Maltsev et coll. (11) dans sa



partie polysaccharidique. Nos attributions diffèrent seulement de celles de Garneau au niveau des méthyles C-28 et C-29. Compte tenu des résultats de l'hydrolyse, la sm a permis de fixer l'enchaînement des sucres et de localiser le sulfate sur le xylose directement lié à la génine. La position exacte du sulfate a été déterminée par rnm¹³C: les

TABLEAU 1. Spectres de Rnm¹³C Enregistrés dans C₅D₅N^a

Atome Composes			Atome Composes			Atome Composes			Atome Composes		
C	7(9)	3	C	7(9)	3	C	12(11)	3	C	12(11)	3
1	36,0	36,7	16	213,9	213,1	C'1	105,5	105,6	C'''5	66,5	66,8
2	26,8	27,3	17	61,1	61,8	C'2	83,9	83,6	C'''1	105,5	105,2
3	88,7	89,1	18	176,4	176,8	C'3	77,9	76	C'''2	75,0	75,2
4	39,4	40,2	19	20,9	20,9	C'4	71,0	73,8	C'''3	87,8	87,8
5	52,7	53,3	20	83,4	83,3	C'5	66,5	64,4	C'''4	71,0	69,3
6	21,9	21,5	21	23,0	22,5	C''1	105,5	105,5	C'''5	78,2	78,5
7	28,3	28,8	22	38,1	38,8	C''2	76,5	76,6	C'''6	62,6	62,5
8	38,6	39,1	23	22,1	22,7	C''3	75,7	75,1	OMe	60,4	60,9
9	151,4	151,7	24	37,7	38,3	C''4	86,0	86,2			
10	39,6	40,1	25	145,3	145,9	C''5	71,9	71,1			
11	111,0	111,4	26	110,4	110,8	C''6	18,1	18,2			
12	31,9	32,6	27	27,9	28,4	C'''1	104,9	105,3			
13	55,7	56,1	28	17,4	27,2	C'''2	73,5	72,1			
14	41,9	42,4	29	26,6	17,0	C'''3	87,8	88,2			
15	51,9	52,3	30	20,5	23,4	C'''4	69,2	69,8			

^aSpectres de bruit (BB) et "spin-echo" (20).

seules différences observées au niveau des sucres entre les composés **12** et **3** sont modestes et concernent les C-3', C-4', et C-5'; elles sont en faveur d'une localisation en C-4' du groupement sulfate.

Ces résultats sont en accord avec la structure **3** proposée pour le néothyonidioside.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les spectres uv ont été enregistrés dans l'EtOH, les spectres ir en film ou après pastillage dans le KBr. Les spectres de rmn du ^1H ont été enregistrés à 400 MHz sur appareil expérimental I.E.F. (18, 19) et celui de ^{13}C à 50, 32 MHz sur appareil Bruker. Les sm (i.e.) ont été réalisés sur appareil Kratos MS50, à 70 eV sous une tension de 8 kv ou (fab) sur spectrographe Kratos MS80 en suspension dans le glycérol, en mode positif. Les points de fusion ont été mesurés au microscope chauffant Reichert Thermovar.

MATÉRIEL ANIMAL.—*N. magnum* a été récolté à l'île Nou, sur la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie; un échantillon est conservé au Centre ORSTOM de Nouméa, sous le no. EH 257. L'identification du matériel a été faite par G. Cherbonnier, du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (17).

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT.—Les holothuries (2,95 kg), fraîchement récoltées, sont broyées puis extraites successivement par l'eau et le mélange eau: EtOH à 90% (1:1; 23 litres). Après dégraissage par l'hexane, l'extrait hydroalcoolique a été acidifié à pH 5 par HCl 2 N puis extrait par le *n*-BuOH saturé d'eau (9,8 litres). La phase butanolique a été concentrée au tiers, additionnée d'Et₂O (9,8 litres) puis extraite par l'eau (4 × 1,65 litres). La lyophilisation de la phase aqueuse a fourni 1,7 g d'extrait brut (saponines + sels minéraux).

Les saponosides ont été séparés par chromatographies successives sur silice neutre (Merck, art. 7736) et sur silice greffée (Merck, Lichroprep RP8); les solvants utilisés ont été le mélange CHCl₃-MeOH (65:35) et le mélange MeOH-H₂O en proportions variables. Le néothyonidioside **3**, majoritaire, a été purifié par clhp (colonne de silice greffée, Resolve C-18, éluant MeOH-H₂O, 55:45): 32 mg ont été obtenus qui cristallisent du mélange EtOH-H₂O.

HYDROLYSE ACIDE DES SAPONOSIDES.—L'Extrait (230 mg) brut lyophilisé a été dissous dans 30 ml HCl 2N et la solution chauffée à 100° pendant 2 h. Le pH est amené à 6-7 par NaOH 2N: les génines précipitent dans le milieu. Le précipité est traité par du toluène chaud à plusieurs reprises: après distillation du solvant, il reste 38 mg de génines brutes; après séparation sur gel de silice (c.c.e.), 6,2 mg de **9** et, 3,2 mg de **10** ont été obtenus. Stichopogénines A₂ et A₄ ont été identifiées par comparaison de leurs caractéristiques spectrales avec celles déjà décrites (15, 16).

Le filtrat, qui contient, entre autres, les sucres, est évaporé à sec et le résidu traité par 2,5 ml de Ac₂O en présence de pyridine à température ambiante pendant 48 h. Après extraction on obtient 115 mg de brut qui sont soumis à une c.c.e. (silice neutre, migration dans hexane-AcOEt, 7:3); les acétates de glucose, xylose, quinovose, et méthyl-3 glucose ont été séparés et identifiés selon les méthodes classiques et par comparaison avec des échantillons de référence.

MÉTHANOLYSE DE 3.—Le saponoside **3** (6 mg) a été dissous dans 5 ml de HCl 0,2N dans le MeOH anhydre et la solution chauffée à 50° pendant 24 h. Du résidu obtenu après évaporation du solvant et traité par chromatographie sur plaque épaisse de gel de silice sont séparés 2,1 mg de **11**.

NÉOTHYONIDIOSIDE 3.—F=241-243° (EtOH/H₂O); α_D -73° (C₅H₅N, $c=0,49$); C₅₃H₈₁O₂₄S Na; ir (KBr) ν cm⁻¹ 3400, 1740, 1240, 1025; uv (EtOH) pas d'absorption au-delà de 210 nm; sm (fab) m/z 1179 (MNa⁺) 1077, 625, 609, 493, 477, 451, 331; dc (MeOH, $c=0,16$); λ max nm ($\Delta\epsilon$) 228(-12,06), 266(-1,59), 306(-5,49); rmn ^1H (C₅D₅N) δ_{ppm} 5,23 (d, $J=7$ Hz, C_{1'-H}), 5,17 (s. ép., $W^{1/2}=10$ Hz, C_{11'-H}), 4,63 [s. ép., $W^{1/2}=3,5$ Hz, 2H, C_{26'-H}(2)], 4,58 (d, $J=7$ Hz, C_{1'-H}), 4,33 (d, $J=7$ Hz, C_{1'-H}), 3,63 (s, 3H, OMe), 1,57 (d, $J=5$ Hz, 3H, C_{6'-H}), 1,53 [s, 3H, C_{27'-H}(3)], 1,24 [s, 6H, C_{21'-H}(3) et C_{30'-H}(3)], 1,10 [s, 3H, C_{19'-H}(3)], 0,92 [s, 3H, C_{29'-H}(3)], 0,73 [s, 3H, C_{28'-H}(3)]; rmn ^{13}C (C₅D₅N, 50,32 MHz) voir Tableau 1.

MÉTHOXY-25 HOLOTOXINOGENINE (11).—F=232-4° (MeOH); α_D -100° (CHCl₃, $c=0,13$); C₃₁H₄₈O₅; ir (film) ν cm⁻¹ 3440, 1750; uv (EtOH) pas d'absorption au-delà de 210 nm; sm (i.e.) m/z 500 (M⁺), 485, 462, 453, 435, 109, 73, 69; dc (MeOH, $c=0,19$); λ max nm ($\Delta\epsilon$), 213(0), 232(-7,76), 265(-0,92), 307(-4,87), 340(0); rmn ^1H (CDCl₃) δ_{ppm} 5,30 (s. ép., 1H, $W^{1/2}=5$ Hz, C_{11'-H}), 3,24 (dd, 1H, $J=12$ et 4 Hz, C_{3'-H}), 3,20 [s, 3H, C_{31'-H}(3)], 2,55 [m, 2H, C_{12'-H}(2)], 2,30 (d, 1H, $J=16$ Hz, C_{15'-H}), 2,08 (d, 1H, $J=16$ Hz, C_{15'-H}), 1,43 [s, 3H, C_{21'-H}(3)], 1,21 [s, 3H, C_{30'-H}(3)], 1,16 [s, 3H, C_{27'-H}(3)], 1,15 [s, 3H, C_{26'-H}(3)], 1,01 [s, 3H, C_{19'-H}(3)], 0,91 [s, 3H, C_{29'-H}(3)], 0,86 [s, 3H, C_{28'-H}(3)].

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Docteur S.K. Kan, de l'Institut d'Électronique Fondamentale d'Orsay (Université Paris-Sud) de nous avoir donné accès à son appareil expérimental de rmn à haut champ.

BIBLIOGRAPHIE

1. P.J. Scheuer, "Chemistry of Marine Natural Products," Academic Press, New York, 1973, pp. 22-35 (et références citées).
2. I. Kitagawa, T. Sugawara, et I. Yosioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 275 (1976).
3. I. Kitagawa, H. Yamanaka, M. Kobayashi, T. Nishino, I. Yosioka, et T. Sugawara, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3722 (1978).
4. S.S. Afiyatullof, V.A. Stonik, et G.B. Elyakov, *Khim. Prir. Soedin.*, 654 (1983).
5. S.A. Avilov, L. Ya. Tishenko, et V.A. Stonik, *Khim. Prir. Soedin.*, 799 (1984).
6. S. Bhatnagar, B. Dudouet, A. Ahond, C. Poupat, O. Thoison, A. Clastres, D. Laurent, et P. Potier, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **II**, 124 (1985) et références citées.
7. S.S. Afiyatullof, L. Ya. Tishenko, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskii, et G.B. Elyakov, *Khim. Prir. Soedin.*, 244 (1985).
8. Takeda Chem. Ind. Ltd., *Jpn Kokai Tokkyo Kobo JP* **59**, 196, 900 [84, 196, 900] (*Chem. Abstr.*, **102**, 182848).
9. F.X. Garneau, J.L. Simard, O. Harvey, J. ApSimon, et M. Girard, *Can. J. Chem.*, **61**, 1465 (1983).
10. G.B. Elyakov, I.I. Maltsev, A.I. Kalinovskii, et V.A. Stonik, *Bioorg. Khim.*, **9**, 280 (1983).
11. I.I. Maltsev, V.A. Stonik, A.I. Kalinovskii, et G.B. Elyakov, *Comp. Biochem. Physiol.*, **78B**, 421 (1984).
12. V.I. Kalinin, V.R. Stepanov, et V.A. Stonik, *Khim. Prir. Soedin.*, 789 (1983).
13. V.I. Kalinin, A.I. Kalinovskii, et V.A. Stonik, *Khim. Prir. Soedin.*, 212 (1985).
14. D.J. Burnell et J.W. ApSimon dans "Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives," éd. par P.J. Scheuer, vol. 5, chap. 6, Academic Press, New York, 1983, pp. 324-389.
15. W.L. Tan, C. Djerassi, J. Fayos, et J. Clardy, *J. Org. Chem.*, **40**, 466 (1975) et erratum p. 3810.
16. I. Kitagawa, T. Sugawara, I. Yosioka, et K. Kuriyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 266 (1976).
17. G. Cherbonnier, *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris*, (4e série), **2** (section A), 615 (1980).
18. P. Gonord, S.K. Kan, et M.J. Sauzade, *J. Magn. Reson.*, **24**, 457 (1976).
19. S.K. Kan, P. Gonord, M. Fan, M. J. Sauzade, et J. Courtieu, *Rev. Sci. Instrum.*, **49**, 785 (1978).
20. C. Le Cocq et J.Y. Lallemand, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 150 (1981).

Received 28 January 1986