



**Étude des saponines isolées d'une espèce d'holothurie
<Holothuria tubulosa> de la lagune de Bizerte**

Item Type	Journal Contribution
Authors	Tekitek, A.; Sellem, F.; Langar, H.; El Abed, A.; Louiz, I.
Citation	Bull. INSTM Salammbo, 30. p. 115-119
Publisher	INSTM
Download date	09/02/2023 08:40:45
Link to Item	http://hdl.handle.net/1834/1129

ETUDE DES SAPONINES ISOLEES D'UNE ESPECE D'HOLOTHURIE *HOLOTHURIA TUBULOSA* DE LA LAGUNE DE BIZERTE.

Ibtissem LOUIZ¹, F. SELLEM^{2*}, A. TEKITEK¹, H. LANGAR et A. EL ABED²

1- Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Bizerte.

2- Laboratoire des Ressources Marines Vivantes, Institut national des Sciences et Technologies de la Mer - Salammbô.

*feriel.sellem@instm.rnrt.tn

ملخص

دراسة عدد من الصابونيات من صنف من اصناف خيار البحر المتواجدة ببحيرة بنزرت : قمنا في هذا البحث باستخلاص عدد من الصابونيات من صنف من اصناف خيار البحر المتواجدة ببحيرة بنزرت وهي (اولوتيغيا تيبيلوزا) *tubulosa Holothuria* وتمت دراسة هذه المواد المستخلصة حسب مرحلة النضوج الجنسي. وتم كذلك اثبات ان هذا المستحضر ذو مفعول بيولوجي اذ تسبب في انحلال كريات الدم الحمراء.

المفاتيح : خيار البحر - بحيرة بنزرت - الصابونيات - انحلال كريات الدم الحمراء.

RESUME

Suite à une séparation par chromatographie sur couche mince plusieurs types de saponines ont été mis en évidence dans les extraits partiellement purifiés d' *Holothuria tubulosa* de la lagune de Bizerte. Ces composés paraissent quantitativement différents selon la période sexuelle et présentent une importante activité hémolytique qui dépend de la concentration de l'extrait ainsi que de la durée de son incubation avec les globules rouges.

Mots clés : *Holothuria tubulosa* - lagune de Bizerte - saponines - hémolyse.

ABSTRACT

Study of saponins of *Holothuria tubulosa* from Bizerta lagoon : Following a separation by thin layer chromatography we demonstrate the presence of several types of saponins in partially purified extracts of *Holothuria tubulosa* of the Bizerte lagoon. These compounds appear quantitatively different according to the sexual period. Saponins of *Holothuria tubulosa* present an important hemolytic activity.

Key words: Holothurians - the lagoon of Bizerte - saponins - hemolytic activity

MATERIEL ET METHODES

L'identification d'*Holothuria tubulosa*, provenant de la

INTRODUCTION

Les saponines des échinodermes, particulièrement celles des espèces tropicales appartenant aux classes des Holothuridés et des Astéridés (Bruno *et al.*, 1993; Ivanchina *et al.*, 2000), sont des produits naturels marins assez bien étudiés. Cependant, les saponines des Holothuries d'origine méditerranéenne sont mal connues. Ces substances toxiques se trouvent surtout dans les tubules de Cuvier des Holothuries et dans la paroi de leur corps. Elles sont sécrétées pour légitime défense contre les prédateurs et les parasites et peuvent aussi intervenir dans la maturation des gamètes. Le but de ce travail est d'étudier les saponines isolées de *Holothuria tubulosa*, qui est parmi les Holothuridés les plus communes des côtes méditerranéennes. *Holothuria tubulosa* est une espèce benthique essentiellement littorale. Elle fréquente des biotopes très variés, les fonds sableux et vaseux, les fonds rocheux couverts d'algues, les prairies de Posidonies et autres Phanérogames (Koehler, 1921; Cherbonnier, 1956; Tortonese, 1965).

lagune de Bizerte; est basée sur des critères morphologiques, anatomiques et endo-squelettiques (Koehler, 1921; Tortonese, 1965). La taille moyenne des animaux est d'environ 23 cm et leur poids frais moyen est de l'ordre de 110g. Les extractions sont réalisées sur deux lots d'Holothuries: le premier est collecté pendant la période de ponte (août 2001) et le deuxième après la ponte pendant le mois de janvier 2002 (Bute *et al.*, 1992); les animaux sont conservés à - 20 °C.

Pour la séparation des saponines, on a adopté la stratégie proposée par Riguera (1997) avec une légère modification. L'extraction est effectuée par de l'éthanol à chaud. L'extrait brut est ensuite repris par l'éther de pétrole; la fraction insoluble est de nouveau extraite par un mélange *n*-BuOH:H₂O. La phase butanolique contenant les saponines est concentrée et reprise par du méthanol. Ainsi on obtient un extrait (H) pour le lot du mois de janvier et un extrait (E) pour le lot du mois d'août. La fraction renfermant les saponines est soumise

à une séparation par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques de gel de silice (Merck) sont de dimensions 5cm × 20cm et le solvant de développement est constitué de CHCl₃/MeOH/H₂O dans les proportions 70/30/4 (v/v/v). Les spots obtenus sont révélés par les lumières UV_{254 nm} et UV_{356 nm}, par le réactif de Molish (N), par le trichlorure d'antimoine (A) (Stahl, 1969) ou par du sang (S) (Wagner et al., 1984). L'activité hémolytique des saponines n'a été effectuée que pour l'extrait (H) selon la méthode décrite par Apers *et al.*, (2001).

RESULTAT

1- Identification des holothuries

Les holothuries utilisées appartiennent à la sous-classe des *Aspidochirotacea*. Leurs tentacules sont au nombre de 20 possédant une forme de bouclier. Leur gonade est située à gauche du mésentère dorsal. L'organe de Cuvier est absent. Les podia non blancs sont éparpillés sur toute la surface du corps; ceux de la région dorsale sont modifiés en papilles (Fig.1).



Figure 1: Morphologie externe de *Holothuria tubulosa* Gmelin, face dorsale. (Capturé dans la lagune de Bizerte)

Cette espèce est caractérisée par la présence de spicules rugueuses et épineuses, y compris des corpuscules turriculaires de très petite taille et dont le disque basilaire présente une forme presque circulaire épineuse à contour ondulé (Fig.2-a), des boucles plus ou moins arrondies à contour irrégulier et lisse, à orifices très petits (Fig.2-b) et enfin des boucles rugueuses et épineuses (Fig.2-c). On note aussi la présence de plaques larges arrondies présentant plusieurs perforations (Fig.2-d). On peut aussi trouver des plaques allongées au niveau des papilles et podia (Fig.2-e). Les tentacules contiennent des bâtonnets allongés, rugueux et ne présentent pas de ramifications (Fig.2-f). Cette description permet d'attribuer les échantillons récoltés à l'espèce *Holothuria tubulosa* dont la classification est la suivante :

Ordre : *Aspidochirotida* Grube, 1840

Famille : *Holothuriidae*

Genre : *Holothuria* Linneo, 1767

Espèce : *tubulosa* Gmelin, 1788

2- Identification des saponines et analyse comparative des extraits (E) et (H)

Les chromatogrammes des extraits (E) isolés des *Holothuries* collectées pendant la ponte, ont montré un important nombre de spots représentés schématiquement dans la figure 3-a.

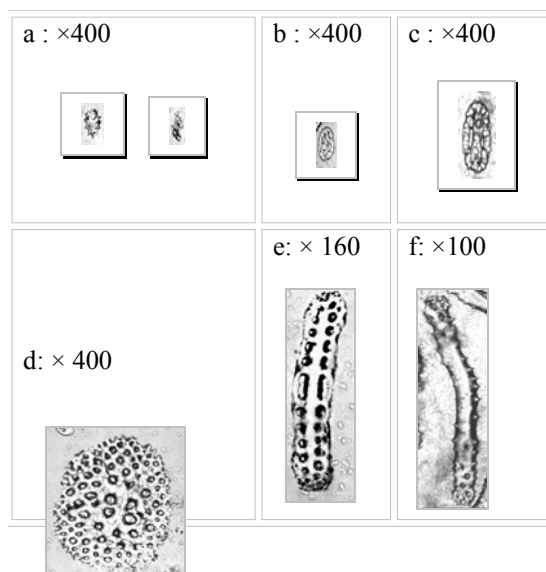


Figure 2: Description des spicules de *Holothuria tubulosa* Gmelin, d'après les échantillons récoltés dans la lagune de Bizerte. a: Corpuscules turriculaires; b: Boucles arrondies à contour irrégulier et lisse de la face ventrale; c: Boucles rugueuses et épineuses; d: plaques perforées arrondies des podia; e: Plaques allongées perforées; f: Bâtonnets des tentacules.

Suite à une révélation par le réactif de Molish (N) on peut noter la présence de 9 spots (2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 et 13) colorés à différents niveaux de bleu renfermant donc des sucres de différentes structures (Fig.3-b; E(N)). Suite à une révélation des stérols sapogénines par le trichlorure d'antimoine (A), on distingue sept importants spots qui donnent une coloration rouge-violette en lumière visible et en UV_{356nm}, des couleurs verte, rouge-violet ou bleu (les spots, 2, 4, 5, 8, 9, 11 et 13) (Fig.3-b; E(A)). La révélation par le sang (S) montre la présence de 6 zones à effet hémolytique important qui correspondent aux spots n° 2, 3, 9, 10, 12 et 13; les spots

n° 4, 5, 7 et 14 sont de faible intensité (Fig.3-b; E(S)). En résumé (Tab.I) six spots peuvent correspondre à des saponines; ce sont les spots n° 2, 4, 5, 9, 10 et 11, les spots 12 et 13 peuvent être considérés comme des saponines de faible concentration avec un pouvoir hémolytique élevé.

Bien que les différences entre les chromatogrammes soient minimales, leur analyse comparative permet de mieux reconnaître les saponines isolées de *Holothuria tubulosa*. Pour l'extrait (H) isolé des *Holothuries* après la ponte, nous avons trouvé presque les mêmes

chromatogrammes que ceux de l'extrait (E) (Fig.3-c). Des différences dans l'intensité des spots peuvent toutefois apparaître (Tab.1). Les observations des chromatogrammes à l'UV_{254nm} indiquent que le spot n° 9 constitue la saponine la plus importante quantitativement dans les extraits d'été et d'hiver d'*Holothuria tubulosa*.

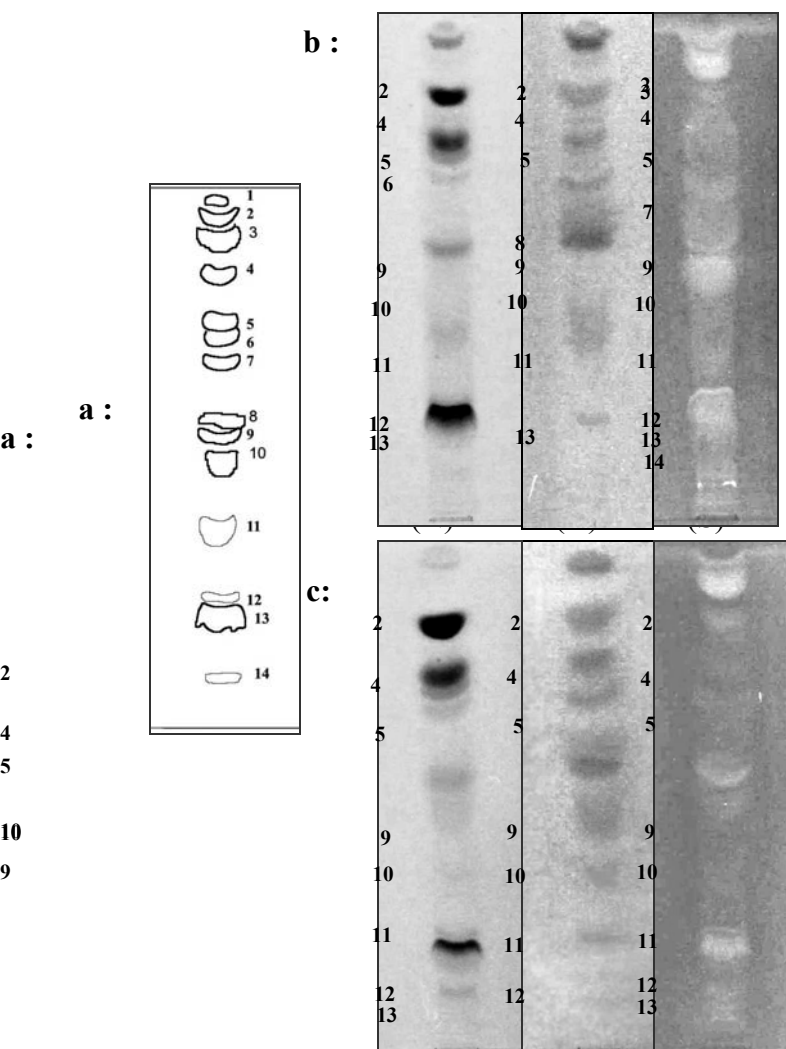


Figure 3: a- Représentation schématique des spots. b- Les chromatogrammes de l'extrait E.; E(N): révélation par l' α -Naphtol; E(A): révélation au trichlorure d'antimoine; E(S): révélation par le sang. c- Les chromatogrammes de l'extrait H. H(N): révélation par l' α -Naphtol; H(A): révélation au trichlorure d'antimoine; H(S): révélation par le sang. (la quantité d'extrait déposée est d'environ 2 mg par plaque).

DISCUSSION

La comparaison entre les chromatogrammes des deux extraits (E) et (H) nous amène à conclure que l'extrait isolé de *Holothuria tubulosa* renferme plusieurs types de saponines présentant des concentrations relatives différentes selon la période de maturité sexuelle; on peut

3- Mesure de l'activité hémolytique de l'extrait

L'incubation des globules rouges en présence de l'extrait (H) contenant les saponines de *Holothuria tubulosa*, entraîne une importante libération d'hémoglobine (Fig.4). Cet effet qui résulte d'une lyse de la membrane des hématies, dépend de la concentration de l'extrait (H) dans le mélange réactionnel et de la durée d'incubation (Fig.5). L'extrait (H) d'*Holothuria tubulosa* donne un pourcentage d'hémolyse de 50 % lorsque sa concentration dans le mélange réactionnel est d'environ 50 μ g/ml (fig.6).

donc supposer que ces composés possèdent différents rôles. Les saponines n° 2, 9, 11 et 13 sont les plus concentrées dans l'extrait d'été (E); elles auraient donc un rôle important durant la gamétogenèse. Ce résultat est en accord avec ceux d'Aminin et Anisimov (1987) qui ont mis en évidence une très faible variation dans la concentration des Holotoxines extraites de la paroi de l'*Holothurie* du genre *Stichopus japonicus* durant les périodes d'après et d'avant ponte. En revanche, la

concentration des glycosides au niveau des gonades est plus importante avant la ponte. Notons par ailleurs que Maltsev et al. (1984) a montré que les Holotoxines glycosides, extraites des Holothuries, *Stichopus japonicus*, collectées de localités différentes sont de même nature mais peuvent avoir une variation dans leur concentration relative. D'autres études de Ginger *et al.*, (2000) réalisées sur les lipides majeurs chez sept espèces d'Holothuries collectées dans la zone abyssale, ont montré une différence interspécifique significative dans la distribution des stérols libres chez ces espèces. Cette différence pourrait être en relation avec les niches écologiques et les stratégies alimentaires. Ces observations laissent supposer que les différences des concentrations relatives des saponines détectées dans l'extrait (E) et l'extrait (H) peuvent résulter d'une

Tableau 1 : Comparaison de l'intensité des spots des deux extraits (E) et (H). «++»: Couleur accentuée; «+» : faible intensité ; «-»: absence de spot.

Spot n°	Rf	Spots correspondant à des saponines des deux extraits					
		E			H		
		α -naphtol (N)	SbCl ₃ (A)	Sang (S)	α -naphtol (N)	SbCl ₃ (A)	Sang (S)
1	0.9 7						
2	0.9 5	++	++	++	+	+	+
3	0.9 0						
4	0.8 4	+	+	+	++	+	+
5	0.7 5	+	+	+	++	+	+
6	0.7 2						
7	0.6 7						
8	0.5 9						
9	0.5 4	++	++	+	+	+	++
10	0.4 5	+	+	++	++	+	+
11	0.3 5	++	++	+	+	+	+
12	0.2 2	+	-	++	+	+	+
13	0.1 9	++	+	++	+	-	+
14	0.1 0						

variation du régime alimentaire entre les mois de janvier et d'août, sachant que les glycosides triterpéniques des Holothuries peuvent être synthétisés à partir des delta-5-stéroïds d'origine alimentaire (Stonik, et al., 1999).

Dans le cas de l'extrait (H) d'*Holothuria tubulosa* renfermant des saponines, nous avons mesuré une importante activité hémolytique qui se manifeste immédiatement après le contact avec les globules rouges. Le mode d'action des saponines sur la membrane des globules rouges a été étudié par plusieurs auteurs. Les saponines agissent sur le cholestérol membranaire en formant un complexe stérol-glycoside (Likhatskaya et al., 1985) causant des perturbations de la perméabilité membranaire. Les saponines peuvent également agir par une augmentation de la microviscosité de la bicouche lipidique (Aminin et al., 1989) et l'inhibition de l'activité d'enzymes membranaires suite à des modifications de leur interaction avec les lipides (Gorshkova et al., 1999).

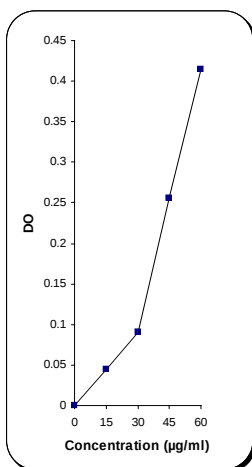


Figure 4: Activité hémolytique de l'extrait (H) suite à une incubation pendant 30 min à 37°C. La concentration est exprimée en µg d'extrait par ml de mélange réactionnel. Les valeurs correspondent à la moyenne de 4 essais (n= 4).

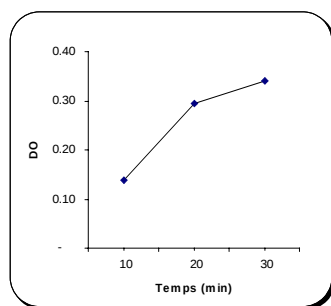


Figure 5: Cinétique d'hémolyse produite par l'extrait (H). La concentration utilisée est de 50µg/ml. Les globules rouges sont employés à 10^8 cellule/ ml. (n= 4)

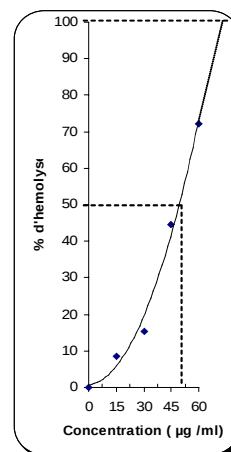


Figure 6: Pourcentage l'hémolyse provoquée par l'extrait (H). L'hémolyse est exprimée en pourcentage d'hémoglobine libérée. Les globules rouges sont employés à 10^8 cellules/ml et la durée d'incubation est de 30min (n= 4).

CONCLUSION

L'analyse par CCM a montré que les extraits partiellement purifiés de l'Holothurie méditerranéenne *Holothuria tubulosa* renferment plusieurs types de

saponines. Suite aux différents types de révélations utilisés dans ce travail les saponines paraissent quantitativement différentes selon la période de maturité sexuelle. Le test biologique de l'extrait (H) d'hiver a montré une importante activité hémolytique.

BIBLIOGRAPHIE

- Aminin, D.L., & Anisimov, M.M., 1987 - Holotoxin content in the tissues of the holothurian (*Stichopus japonicus*) at different seasons of the year and their effect on oocyte maturation. *Zhurn. Evol. Biokhirn. Fyziol.* (23): 545-547.
- Aminin, D.L., Osipov, A.N., Korepanova, E.A., & Anisimov, M.M., 1989 - Effect of holotoxin A₁ on microviscosity of model and biological membranes. *Biofizika, Mar*; 34(2): 318-9.
- Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwe, J.B., Witvrouw, M., Clercq, E.D., Berghe, D.V., Marck, E.V., Vlietinck, A., Pieters, L., 2001 - Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta. Med* (67): 528-532.
- Bruno, I., Minale, L., Riccio, R., Cariello, L., Higa, T., Tanaka, J., 1993 - Starfish saponins: Part 50. Steroidal glycosides from the Okinawan starfish (*Nardoa tuberculata*). *J. Nat. Prod. (Lloydia)*; 56 (7): 1057-1064.
- Bulteel, P., Jangoux, M., & Coulon, P., 1992 - Biometry, bathymetric distribution, and reproductive cycle of the Holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from Mediterranean seagrass beds. *Marine Ecology-Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napolii*. 13(1):53-62
- Cherbonier G., 1956 - Les échinodermes de Tunisie. *Bull. Stat. Oceanogra. Salammbô*, (53): 1-23.
- Ginger, M.L., Santos, V.L.C.S & Wolf, G.A., 2000 - A preliminary investigation of the lipids of abyssal holothurians from the north-east Atlantic Ocean. *J. Mar. Bio. Asso. UK* (80):139-146
- Gorshkova. I.A., Kalinin, V.I., Gorshkov, B.A., & Stonik, V.A., 1999 - Two different modes of inhibition of the rat brain Na⁺, K⁺-ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B from the holothurian (*Psolus fabricii*). *Comp. Bioch. And Physiol. Part C* (122): 101-108.

- Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Kalinovsky, A.I., Dmitrenok, P.S., Stonik, V.A., Riguera, R., Jimenez, C., 2000 - Hemolytic polar steroidal constituents of the starfish (*Aphelasterias japonica*). *J. Nat. Prod. Aug*; 63(8):1178-1181
- Koehler, R., 1921, Echinodermes. *Faune de France*, (1): 1—210.
- Likhatskaia, G.N., Iarovaia, T.P., Rudnev, V.S., Popov, A.M., Anisomov, M.M., 1985 - Formation of the complex of the triterpene glycoside holothurin A with cholesterol in liposomal membranes. *Biofizika. Mar-Apr*; 30(2):358-9.
- Maltsev, I.I., Stonik, V.A., Kalinovsky, A.I., & Elyakov, G.B., 1984 -Triterpene glycosides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Comp. biochem. physiol. (B) comp. Biochem.*, 78 (2):421-426.
- Riguera, R., 1997- Isolating bioactive compounds from marine organisms, *J. Mar. Biotechnol.* (5): 187-193.
- Stahl, E., 1969 - Thin-layer chromatography a laboratory hand book, *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. Second edition*: 240-357
- Stonik, V.A.; Kalinin, V.I., & Avilvo, S.A., 1999 -Toxins from sea cucumbers (Holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *J. Nat. Toxins*(8):235-248
- Tortonese, E., 1965 - Echinodennata. *Fauna d'Italia. Calderini Bologna*: 422 p.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984 – Plant drug analysis. *springer verlag Berlin Heidelberg. New York Tokyo. Translated by Th. A. Scott. Pp*: 299