

CONTRIBUTION A LA BIOCHIMIE DES LIPIDES DE SQUALES

I. - FRACTION INSAPONIFIABLE DE L'HUILE DE FOIE D'*EUGALEUS GALEUS* L.

par Jean-Marie GASTAUD

Depuis longtemps les huiles de poissons font l'objet de nombreuses recherches parmi lesquelles les résultats analytiques tiennent une place importante. La complexité de leur composition s'est révélée au cours des années grâce au perfectionnement des méthodes d'analyse. On s'était contenté au début de déterminer certaines caractéristiques chimiques et physiques, puis on identifia des pro-vitamines, des vitamines, certains hydrocarbures tel que le squalène, etc. Les techniques physico-chimiques actuelles apportent de nouvelles possibilités dans l'étude des lipides et de l'insaponifiable qui, tout en étant la plus petite fraction des corps gras n'en présente pas moins une composition hétérogène. Plusieurs substances ont été isolées de cette fraction, en particulier des stérols dont certains sont doués d'activités biologiques intéressantes.

BERGMANN et coll., en 1934, commencent une étude systématique des stérols chez les Invertébrés marins. En collaboration avec LOW (1947) ils précisent la configuration optique du groupement méthyle au niveau du C 24 de la chaîne latérale.

FANTL (1942), étudiant cette fraction extraite de Mollusques australiens, remarque la présence de provitamine D. En 1948, VAN DER VLIT caractérise, dans l'insaponifiable, des tissus de *Mytilus edulis* de l'ergostérol, du 7-déhydrocholestérol et une provitamine D₃. Chez les Gastéropodes (*Nassa obsoleta*) KIND, SLATER et VINCI identifient le cholestérol. IDLER et FAGERLUND (1960) démontrent chez les Mollusques également la présence de stérols ayant des structures chimiques différentes suivant les espèces. RAOUL et LE BOULCH, en 1963, préparent la « cétone 250 » à partir de la vitamine D des foies de thon blanc ou de thon rouge de Norvège.

Ce caractère hétérogène de la fraction stérol se rencontre aussi dans les lipides totaux du sérum humain (CRASTES DE PAULET, 1961).

Dans la série des carbures, HELLER et coll. (1957) dosèrent le squalène des huiles de foies chez plusieurs espèces de Squalidés.

La fraction stéroïde de l'insaponifiable est également importante à étudier. Au cours des années précédentes furent identifiés et dosés, dans le sang d'animaux marins, plusieurs groupes d'hormones. CHIEFFI et LUPO (1961-1963) signalent la présence de 17-cétostéroïdes, de progestérone et d'oestrogènes dans les gonades de *Scylliorhinus caniculus*, *Conger conger* et *Torpedo marmorata*. Dans un travail précédent (1963), nous avons caractérisé dans le tissu musculaire de *Scylliorhinus caniculus* (L.) des substances dont la structure chimique avait une étroite analogie avec les stéroïdes des Mammifères.

A la suite de ces premiers résultats, il nous a paru intéressant d'étudier l'insaponifiable d'huile de foie d'un autre squalé : *Eugaleus galeus* L.

Matériel et techniques.

Le matériel fut récolté pendant une campagne de chalutage du navire océanographique « Thalassa » de l'Institut scientifique et technique des Pêches maritimes dans le secteur du golfe de Gascogne, au mois d'octobre 1963.

Après détermination des sexes et des stades de développement des gonades, les foies sont prélevés, vidés de leur sang, séchés sur papier filtre, mis dans des sacs en nylon. Placés une nuit à

— 40°, ils sont gardés ensuite à — 25° pendant le reste de la campagne et transportés au laboratoire en caisson isotherme.

Cette méthode de conservation par le froid paraît préférable à l'alcool 70°-80° qui peut, éventuellement, détruire ou dénaturer les substances que l'on désire isoler.

Les tissus sont broyés dans un mixer préalablement refroidi. La bouillie obtenue est extraite à froid par :

- l'éthanol absolu, Prolabo (24 h),
- le mélange acétone R.P.-éthanol absolu ($\bar{a}a$ 48 h),
- l'éther éthylique pur pour analyse (72 h).

La poudre sèche ainsi obtenue est introduite dans un appareil de Soxhlet et épuisée à chaud pendant trois jours par le mélange chloroforme-éther de pétrole (1 : 3 v/v).

Les différents liquides d'extraction réunis sont distillés sous vide à basse température dans un évaporateur rotatif. Les phospholipides et les substances non lipidiques de l'extrait total sont éliminées en traitant celui-ci à 0° pendant une nuit par un mélange d'acétone et d'éthanol absolu. Après filtration, la solution est évaporée sous vide. Le résidu repris par le benzène anhydre, l'eau est entraînée par distillation de l'azéotrope.

On obtient, ainsi, une huile jaune orangé, dont le rendement est compris entre 40 et 43 p.100, par rapport au tissu frais.

Caractérisation et dosage des stérols libres à partir de l'huile.

A l'aide d'une balance de précision (Mettler type B 6) on pèse au mg près un poids de lipides que l'on dissout dans quelques ml d'acétone-éthanol. On ajoute 5 ml de digitonine à 1p.100 dans l'alcool à 80°. Le tube placé quelques minutes au bain-marie à 50° est laissé au repos une nuit à la température du laboratoire. Le précipité est lavé une fois par le mélange éther-acétone, puis plusieurs fois par l'éther éthylique, enfin séché sous vide jusqu'à poids constant.

Poids du complexe	30,85 mg
Teneur théorique en stérols (prise d'essai) ..	7,6815 mg

Le digitonide dissous dans l'acide acétique pur, on effectue sur cette solution le dosage des « Fast et Slow acting stérols » par la réaction de Libermann (modification de Schoenheimer et Sperry). Après addition du réactif (mélange d'anhydride acétique (Merck) et d'acide sulfurique 19/1 v : v) on détermine, à l'aide d'un spectrophotomètre en cuve de 1 cm, les densités optiques de l'essai et des solutions étalons à la longueur d'onde spécifique de 620 m μ en utilisant le mélange réactif pour régler le galvanomètre à 100 p.100 de transmission.

On établit, préalablement, la droite d'étalonnage des densités optiques des témoins en fonction de leur concentration [$D_o = f(\mu g)$]. Sur cette droite, on recherche la teneur en stérols de l'essai. Tous les dosages ont été faits en double exemplaire.

La vitesse d'apparition de la couleur verte qui se développe au cours de la réaction de Libermann permet, d'après MOORE et BAUMANN (1952), de distinguer les « fast » et « slow acting stérols ». Très rapide chez les premiers, dont les doubles liaisons sont en Δ^7 ou $\Delta^{5,7}$ elle est nettement plus lente à l'égard des seconds possédant des doubles liaisons en position Δ^5 .

« Fast acting stérols ».

A une partie aliquote de la solution acétique du complexe, on ajoute 2,5 ml de réactif. On prépare en même temps une gamme étalon de 7-déhydrocholestérol (N.B. C°) en solution dans l'acide acétique qui sera traitée de façon identique. La lecture est faite après séjour d'une minute trente secondes au thermostat à 25° \pm 0,5°C (fig. 1).

Teneur en « fast acting stérols » de la prise d'essai : 80 μg .

« Slow acting stérols ».

Le mode opératoire est identique au précédent, toutefois la lecture des densités optiques des témoins (solution acétique de cholestérol pur cristallisé Industrie biologique française) et de l'essai est effectué après 35 minutes au bain-marie à 25° (fig. 2).

Teneur en « slow acting stérols » de la prise d'essai : 162 μg .

Saponification et extraction de l'insaponifiable.

L'huile est saponifiée à douce ébullition sous reflux par une solution de potasse à 20 p.100 dans le méthanol à 70 p.100 en présence de p-dioxane anhydre (Eastmann Kodak C°), à l'abri de l'air et de la lumière vive. L'extraction par l'éther éthylique est faite avant et après libération des acides gras. Les phases éthérées réunies sont lavées par une solution de carbonate de soude, puis à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Les eaux de lavage sont extraites trois fois par l'éther qui est réuni aux phases précédentes.

Les solvants sont séchés sur sikkon, filtrés et évaporés sous vide, à une température < à 50°C.

On obtient un résidu jaune, légèrement verdâtre, solide, à la température ambiante.

Le pourcentage en insaponifiable est compris entre 4,05 et 4,15 p.100.

Anfin de préciser la composition de l'insaponifiable, nous avons d'abord séparé celui-ci en fractions cétonique et non cétonique, par formation d'hydrazones, à l'aide du chlorure de triméthyl-acéthydrazide ammonium.

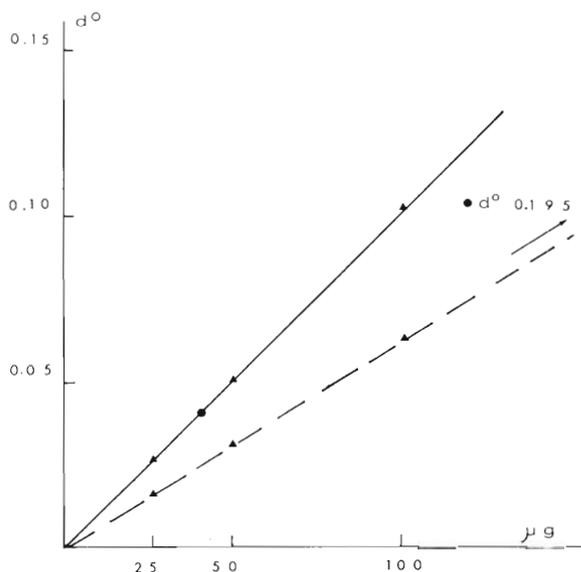


FIG. 1. — Droite d'étalonnage, « Fast acting stérols ». Lecture à 620 m μ . T° 25°C. En abscisse : concentrations des témoins : triangle (7-déhydrocholestérol) cercle : essai. — densités optiques après 1 mn 30 s, — — — après 35 mn.

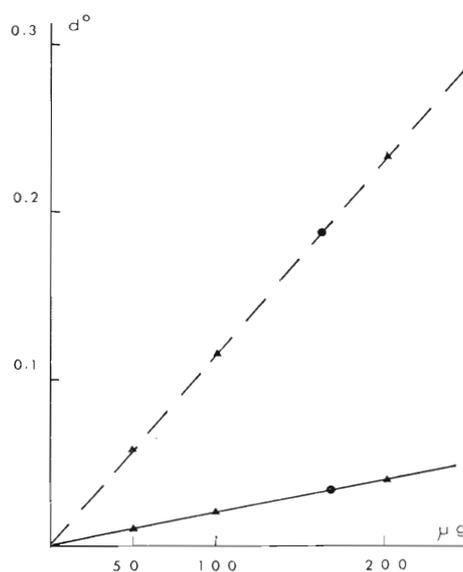


FIG. 2. — Droite d'étalonnage, « Slow acting stérols ». Lecture à 620 m μ . En abscisse : concentrations des témoins triangle (cholestérol) ; cercle : essai. — densités optiques après 1 mn 30 s ; — — — après 35 mn.

Séparation par le réactif T de Girard.

Le résidu repris par 10 ml de méthanol à 99°5 (Prolabo), on ajoute 10 p.100 de réactif. L'hydrolyse est poursuivie pendant trois heures à la température du laboratoire en milieu acétique.

Le mélange est amené, ensuite, à pH 6,3 par titrage au pHmètre. Cette solution est extraite par l'éther éthylique pur. Les phases éthérées réunies sont lavées à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchées, distillées sous vide à basse température. On obtient un résidu solide de couleur jaune foncé (fraction non cétonique).

La phase aqueuse, amenée à une normalité de 0,5 N par l'acide chlorhydrique pur, est laissée une heure au repos à la température ambiante. Les hydrazones régénérés sont extraits par l'éther éthylique pur. La phase éthérée est lavée par l'eau distillée jusqu'à neutralité et évaporée comme précédemment. Cette fraction cétonique dissoute dans 30 ml d'éther éthylique est transvasée quantitativement dans une ampoule à décantation. Les phénolstéroïdes sont extraits par 3 \times 15 ml de soude aqueuse.

La phase étherée lavée jusqu'à neutralité, séchée et évaporée sous vide donne un résidu jaune clair, légèrement verdâtre, solide à la température ambiante.

La solution sodique amenée à pH 8,5 est extraite par l'éther éthylique. La fraction étherée lavée à l'eau distillée, séchée et évaporée laisse un résidu blanchâtre, formé de cristaux amorphes.

Le tableau 1 indique les pourcentages de chacune des fractions. C'est sur celles-ci que seront conduits tous les dosages.

Fractions	Pourcentage par rapport à l'insaponifiable	Pourcentage par rapport aux tissus frais
Stérolique	33	0.567
Cétonique	34,8	0.624
Phénolique	4,2	0.0545

TABLEAU 1.

Suivant leur utilisation, nous avons procédé à une purification préalable des solvants et des réactifs. Leur pureté a été vérifiée par les méthodes classiques. Les spectres ultra-violets et les dosages colorimétriques ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam S.P. 500.

La précision de certaines méthodes a été évaluée par le calcul des paramètres suivants :

moyenne arithmétique : $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$, écart-type : $\sigma = \sqrt{v}$, écart moyen : $\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

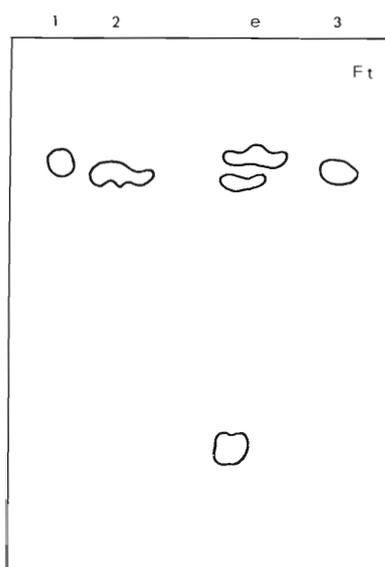


FIG. 3. — Chromatographie de partage sur Kieselgel G; fraction non précipitable par le réactif T de Girard. 1 : cholestérol ; 2 : 7-déhydrocholestérol ; 3 : cholestanol ; e : essai ; Ft : front.

détermination de la moyenne de confiance : $\bar{X} \pm \sigma_m t$

erreur relative sur le dosage : $100 \frac{\sigma_m t}{\bar{X}}$.

Fraction non précipitable par le réactif T.

Quelques μml sont, préalablement, chromatographiés sur couche mince de Kieselgel G (Merck), d'après les indications de CARGILL (1962), avec un mélange benzène-acétate d'éthyle (2 : 1 v/v) comme phase mobile. Parallèlement, on chromatographie sur la même plaque quelques μml de solution étalon de 7-déhydrocholestérol, de cholestanol (dihydrocholestérol) (Nutritional Biochemical C°) et de cholestérol.

Les chromatogrammes sont révélés à froid ou après 15 minutes de chauffage par une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme.

Nous avons constaté que cette fraction était constituée par une forte proportion de cholestérol, une faible quantité de 7-déhydrocholestérol (identifié de Rf avec les témoins) et d'une substance non colorable, mais présentant une très forte fluorescence jaune ($R_f = 0,21$). L'aspect du chromatogramme est celui représenté par la figure 3.

Etude du spectre U.V.

La comparaison des spectres d'absorption du 7-déhydrocholestérol et de l'essai en solution dans l'éthanol absolu, montre pour celui-ci un premier maximum à $\lambda_{\text{max.}} : 230 \text{ m}\mu$, un second à $\lambda_{\text{max.}} : 271,5 \text{ m}\mu$, enfin un troisième à $\lambda_{\text{max.}} : 281 \text{ m}\mu$ (fig. 4). Ces deux derniers correspondant au maxi-

mum de la solution étalon. Le coefficient d'absorption spécifique de l'essai est de : $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 5,40$.

La réaction de Libermann développe, immédiatement, une coloration vert émeraude virant ensuite au brun.

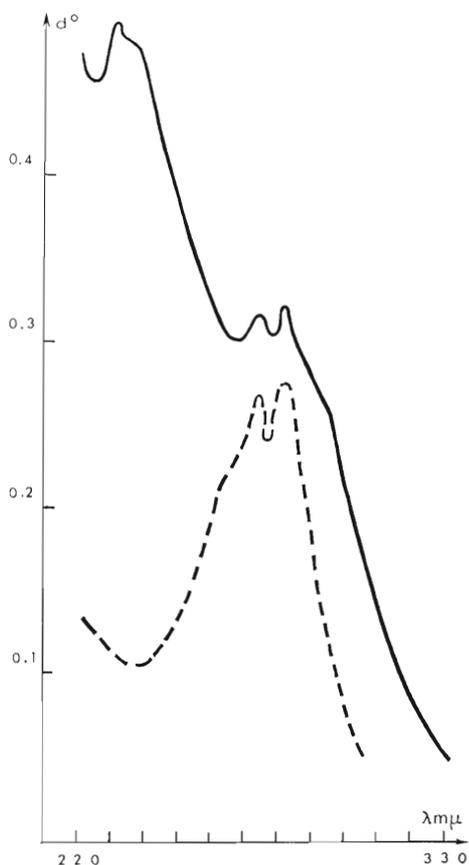


FIG. 4. — Spectre d'absorption U.V. de la fraction non précipitable par le réactif T de Girard. Essai (—); 7-déhydrocholestérol (— — —).

En solution dans le chloroforme, l'essai donne une réaction de type Carr et Price, après addition de quelques ml de trichlorure d'antimoine en solution chloroformique. On observe l'apparition instantanée d'une coloration rouge violacée qui passe au vert clair, après cinq minutes. Dans les mêmes conditions, le 7-déhydrocholestérol développe une coloration rose saumon stable dans le temps; le cholestérol, par contre, ne donne aucune coloration.

La réaction de Lifschutz en milieu acétique développe une teinte rouge violacée qui passe au

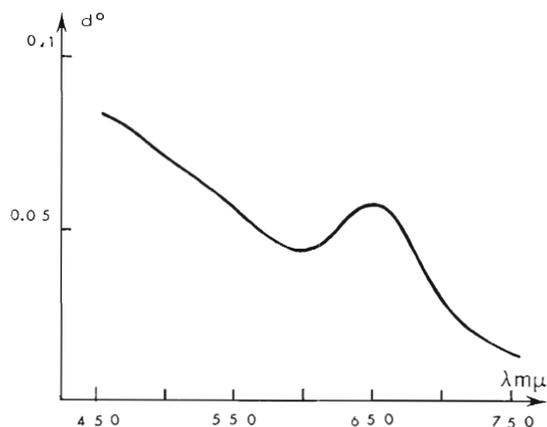


FIG. 5. — Réaction de Lifschutz; spectre d'absorption.

jaune verdâtre, après quelques minutes. Cette coloration est différente de celle obtenue avec un échantillon de 7 α -hydroxycholestérol. Le spectre d'absorption de l'essai présente un maximum à 650 m μ (fig. 5).

Précipitation par la digitonine.

Le résidu précédent dissout dans 10 ml de mélange acétone-éthanol (1 : 2 v/v) est additionné de 7 ml de digitonine. La précipitation est effectuée comme précédemment.

Poids du complexe : 66 mg.

Teneur théorique en stérols : 16,038 mg calculé en cholestérol pur.

En premier lieu, nous avons étudié la cinétique de la réaction de Libermann, dans le but de vérifier la présence de stérols possédant des doubles liaisons en position Δ^5 ou $\Delta^{5,7}$. On trace, simultanément, les courbes des densités optiques de l'essai et des témoins en solution dans l'acide acétique, en effectuant des mesures toutes les trente secondes, à la longueur d'onde de 620 m μ .

Sur la figure 6, on remarque, pour l'essai, un premier maximum, après 1 mn 30 s, un minimum à 2 mn 30 s, puis une augmentation rapide de l'absorption due au cholestérol.

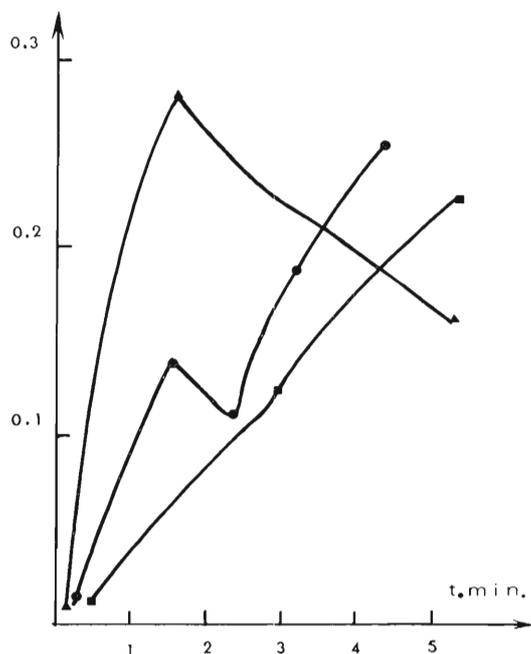


FIG. 6. — Cinétique de la réaction de Libermann.
carré : cholestérol ; triangle : 7-déhydrocholestérol ;
cercle : essai.

Dosages.

Le digitonide est dissous dans l'acide acétique pur. La réaction de Libermann est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment.

« Fast acting stérols »

Etalon : 7-déhydrocholestérol.

Précision de la méthode : $\sigma = 0,00146$;

$\sigma_m = 0,000462$, limites des valeurs moyennes :
— 0,498 et + 0,4998.

Erreur relative : $\pm 0,22$ p.100

Teneur en fast acting stérols : 32 μg .

« Slow acting stérols »

Etalon : cholestérol.

Précision de la méthode : $\sigma = 0,00187$;

$\sigma_m = 0,0006$, limites des valeurs moyennes :
— 0,495 et + 0,504.

Erreur relative : $\pm 0,27$ p.100.

Teneur en slow acting stérols : 162 μg .

Fraction non précipitable par la digitonine.

Elle se présente sous forme d'un résidu huileux jaune ambré clair, dont les réactions de Libermann, Carr et Price, et Lifschutz, sont négatives.

Le squalène a été dosé sur une partie aliquote par la réaction de Libermann, selon WHEATLEY.

Cette méthode est basée sur la formation d'une coloration jaune verdâtre qui se développe à 38° après 120 minutes. La lecture de la densité optique est effectuée à la longueur d'onde de 400 μm en cuve de 1 cm. On établit la droite d'étalonnage à l'aide d'une solution de squalène pur.

Teneur en squalène : 780 μg .

Fraction cétonique précipitable par le réactif T de Girard.

Une partie aliquote, reprise par quelques ml de chloroforme pur, est chromatographiée en couche mince de Kieselgel G (Merck) d'après STAHL. Le chromatogramme, développé dans le système benzène-méthanol 5 p.100 (en ml), les spots sont révélés par pulvérisation d'une solution éthalonique d'acide sulfurique.

Après chauffage, on remarque :

un spot rouge vif ($R_f = 0,30$) identique à celui d'une solution de D H I A,

un spot rouge violacé ($R_f = 0,45$).

Nous avons, ensuite, établi la courbe d'absorption U.V. de cette fraction en solution dans l'éthanol absolu entre 220 μm et 310 μm (fig. 7). On observe les accidents ci-après :

λ max. 234 μm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 11,6$) λ max. 270 μm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 9,3$)

λ min. 265 μm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 8,9$) λ min. 272 μm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 9,1$)

enfin λ max. 280 μm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 9,6$)

Essais colorimétriques en solution.

Ils ont été réalisés par application des méthodes habituelles de dosage des stéroïdes hormonaux.

1° Réaction de Zimmermann, technique de Wilson, fonction cétonique en 17 (maximum à 520 $m\mu$). Les spectres d'absorption des chromogènes sont identiques pour l'essai et la solution étalon de trans-déhydroandrostérone (fig. 8).

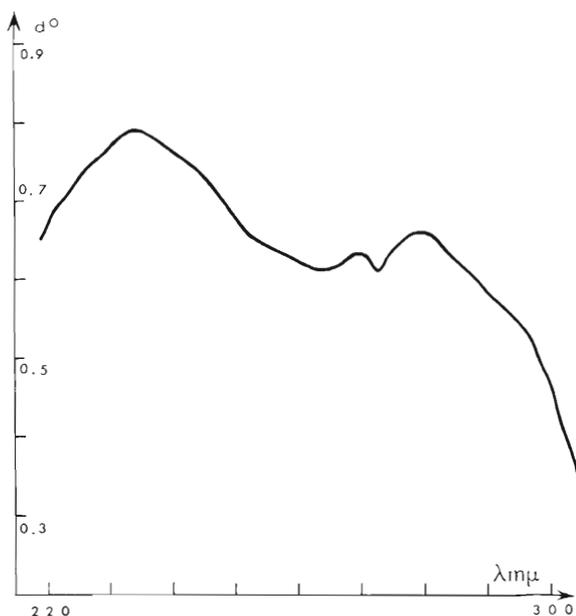


FIG. 7. — Spectre U.V. de la fraction cétonique (solvant : éthanol absolu).

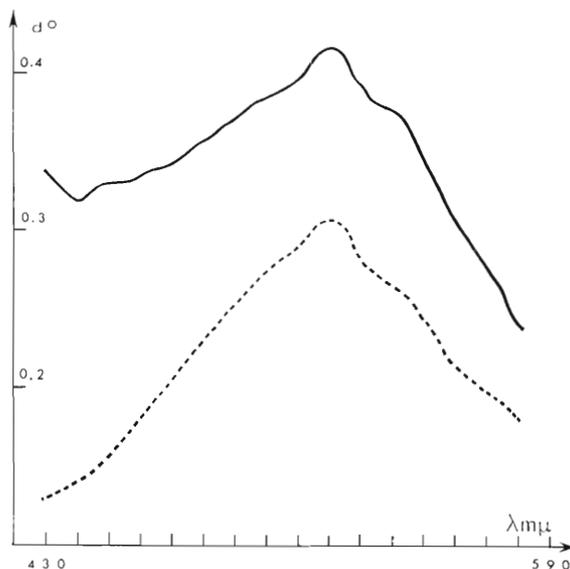


FIG. 8. — Courbe d'absorption des chromogènes Zimmermann positifs. Témoin : trans-déhydroandrostérone (---) ; essai (—).

2° Réaction de Libermann, technique de Schoenheimer et Sperry : nature stérolique et groupement $\Delta^5-3\text{OH}$. Développe, après chauffage, une coloration jaune différente de la coloration obtenue avec une solution de cholestérol.

3° Réaction de Gornall et Mac Donald, après 90 minutes de chauffage à $59^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$: Δ^4-3 cétones + 20,21 α -cétols ou α -glycols. Le spectre colorimétrique de l'essai montre un maximum à 475 $m\mu$ identique à celui de la solution étalon d'acétate de cortisone (fig. 9).

4° Réaction à l'acide phosphomolybdo-tungstique de Folin (Biolyon) technique de Heard et Sobel : groupement α -cétol + α -6 insaturé $3\text{C}=\text{O}$. Maximums d'absorption pour l'essai et la solution étalon de désoxycorticostérone à λ max. 725 $m\mu$.

5° Réaction au bleu de tétrazolium, méthode de Kingsley et Getchell : pouvoir réducteur du groupement 20,21- α cétolique donne une coloration rouge violacé dont l'absorption maximum est à λ max. 525 $m\mu$ pour la solution étalon (acétate de cortisone) et l'essai (fig. 10).

La comparaison des spectres d'absorption de cette fraction et des solutions étalon présente une identité remarquable. Nous avons alors essayé de préciser la structure de certains constituants de cette fraction en pratiquant une précipitation par la digitonine, ce qui permet de définir deux classes : 3- β OH stéroïdes et 3- α OH stéroïdes.

Teneur théorique en 3- β stéroïdes : 15,147 mg. Poids de la fraction non précipitable : 77,60 mg.

Le précipité est décomposé par la pyridine anhydre à 60° . Les stéroïdes sont extraits par l'éther diéthylique suivant la méthode classique. Poids des stéroïdes récupérés : 16,55 mg.

Ces deux fractions sont d'abord analysées par chromatographie comparative sur couche mince, suivant la méthode décrite précédemment. Les chromatogrammes ont été révélés par l'acide sulfurique dans l'alcool absolu. Après chauffage à 70°, l'aspect du chromatogramme est celui représenté sur la figure 11.

À la suite de ces résultats, chaque fraction a été chromatographiée séparément en faisant migrer, simultanément, des solutions témoins.

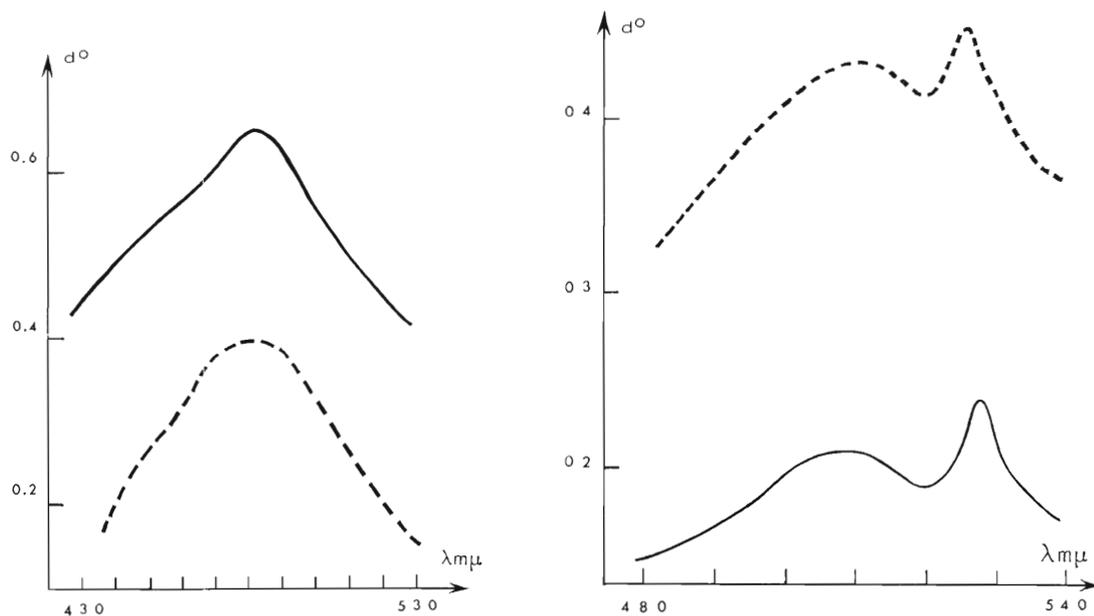


FIG. 9 et 10. — Spectres d'absorption, à gauche : des chromogènes développés par la réaction de Gornall et Mac Donald ; à droite : des groupements réducteurs, bleu de tétrazolium. Témoin : acétate de cortisone (— — —) ; essai (—).

Fraction précipitable.

Deux spots :

le premier coloré en rouge violacé avec fluorescence jaune orangé ($R_f = 0,65$) identique à la déhydro-androstérone ;

le second jaune clair ($R_f = 0,95$) comparable à l'échantillon de cholestanone pur que nous avons préparé au laboratoire à partir du dihydrocholestérol suivant les indications de BRUCE.

L'examen en lumière de Wood révèle, en outre, trois spots présentant une forte fluorescence bleu lavande, dont les R_f sont, respectivement : 0,45, 0,50, 0,55.

Fraction non précipitable.

Chromatographiées dans les mêmes conditions que précédemment, on remarque cinq taches :

un spot gris ($R_f = 0,21$) à fluorescence jaune vif,

un spot marron sale ($R_f = 0,55$) à fluorescence jaune orangé,

un spot rouge violacé ($R_f = 0,69$) à fluorescence bleu clair identique à celui de la désoxycorticostérone,

un spot rose vif ($R_f = 0,90$),

enfin, un spot à fluorescence jaune clair au front du solvant.

Dosages colorimétriques. Réaction de Zimmermann.

Effectuée à 0°, on mesure l'absorption après 15 minutes et après 3 heures, à 440 $m\mu$, 520 $m\mu$ et 600 $m\mu$, ce qui permet de différencier les « fast acting cétostéroïdes » des « slow acting cétostéroïdes ».

Le tracé des spectres, en fonction du temps (fig. 12), montre des différences très importantes entre les deux fractions. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

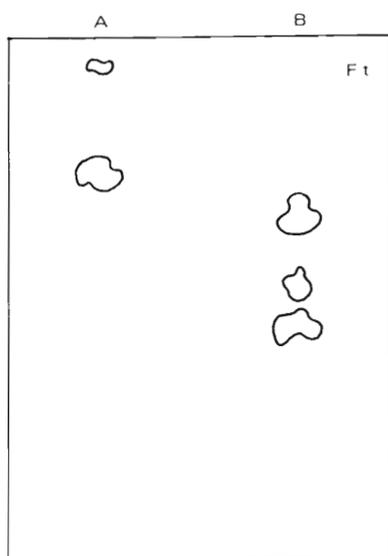


FIG. 11. — Chromatographie comparative sur Kieselgel G des fractions cétoniques, après précipitation par la digitonine. A : fraction β, B : fraction α.

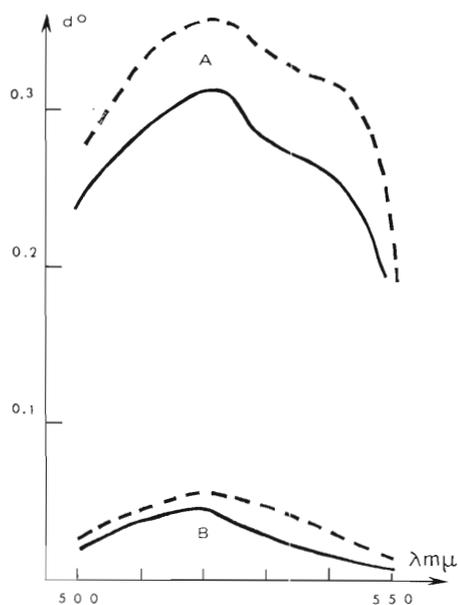


FIG. 12. — Spectre d'absorption des chromogènes Zimmermann positifs en fonction du temps (réaction à 0°). Trait : après 15 mn ; tireté : après 3 h ; A : fraction α ; B : fraction β.

TEMPS	15 mn à 0°			3 h à 0°		
	440	520	600	440	520	600
Longueur d'onde (en mμ)						
Etalon : 25μg	0.02	0.055	0.025	0.08	0.150	0.080
» 50 μg	0.05	0.120	0.05	0.140	0.310	0.160
» 100 μg	0.095	0.240	0.100	0.280	0.620	0.320
Fraction non précipitable par la digitonine 776 μg	0,190	0.320	0.145	0.250	0.360	0.170
Fraction précipitable par la digitonine 827 μg ..	0.03	0.055	0.025	0.04	0.06	0.025

TABLE. 2. — Réaction de Zimmermann. Densités optiques en fonction du temps des solutions étalon (*trans* déhydro-androstérone) et des fractions α- et β-cétoniques.

Si on admet que la réaction au m-dinitro-benzène révèle l'ensemble des substances possédant un groupe cétone en 17, l'examen du tableau précédent tend à démontrer que le taux de ces substances est nettement plus élevé dans la fraction α.

Teneur en 17 CS (calculé en *trans*-déhydroandrostérone).

Précision de la méthode : $\sigma = 0.00216$; $\sigma_m = 0.00068$, limites des valeurs moyennes : — 0.4995 et + 0.5016. Erreur relative : ± 0.308 p.100.

15 mn } fraction α : 133 μ
 } fraction β : 25 μ

3 h } fraction α : 58 μ
 } fraction β : 10 μ

Un repérage des différentes fractions éluées est effectué ensuite par chromatographie en couche mince de Kieselgel G, avec, comme phase mobile, un mélange benzène-méthanol 5 p.100. Après révélation par SO_4H_2 dans l'éthanol, on observe (fig. 14) les spots suivants :

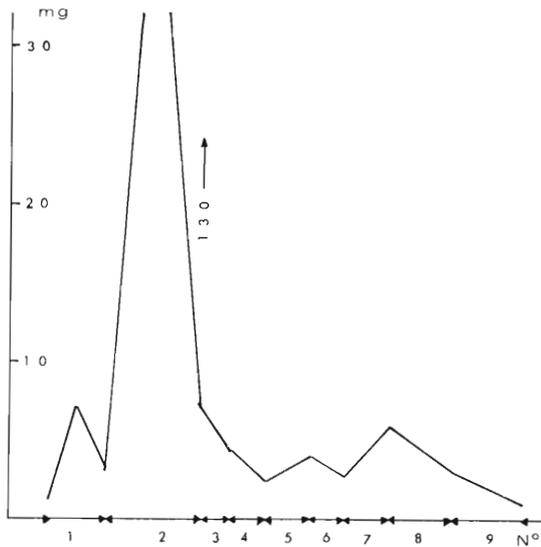


FIG. 13. — Diagramme de fractionnement sur colonne d'alumine de la fraction α . En abscisses : numéros des fractions; en ordonnées : poids en mg.

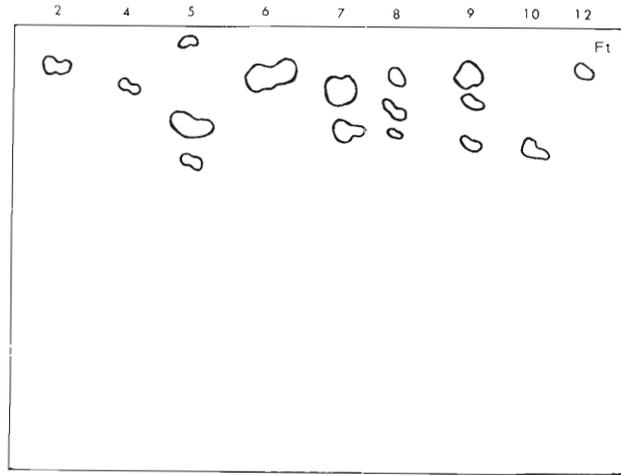


FIG. 14. — Chromatographie sur Kieselgel G des éluats de la fraction α . 2-4-5, etc. numéros des fractions.

fraction 2	un spot à fluorescence jaune paille	(Rf = 0,95)
4	un spot bleu clair	(Rf = 0,85)
5	un spot à fluorescence bleu lavande	(Rf = 0,69)
	un spot bleu foncé à fluorescence jaune orangé	(Rf = 0,78)
	un spot rouge brique	(Rf = 0,97)
6	un spot violet pâle à fluorescence rouge	(Rf = 0,89)
7	un spot bleu foncé à fluorescence rouge	(Rf = 0,78)
	un spot à fluorescence bleu clair	(Rf = 0,88)
8	un spot rouge brique	(Rf = 0,77)
	un spot rouge violacé à fluorescence jaune orangé	(Rf = 0,87)
9	un spot rouge vif à fluorescence jaune bleuté	(Rf = 0,72)
	un spot violet clair	(Rf = 0,87)
	un spot gris bleu	(Rf = 0,89)
10	un spot à fluorescence rouge	(Rf = 0,70)
12	un spot jaune foncé	(Rf = 0,92)

Sur chaque éluat chromatographique, nous avons pratiqué la réaction de Zimmermann, suivant les modalités techniques décrites précédemment. Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.

A titre de contrôle, nous avons réalisé sur chacune des fractions positives à l'égard de la réaction ci-dessus une chromatographie de partage sur Kieselgel G en traitant, simultanément, quelques μml de solution étalon de stéroïdes. On a pu remarquer, ainsi, que les fractions 5 et 7 développent un spot de Rf identique à celui de la désoxycorticostérone et les fractions 10-11, une tache dont le Rf correspond à celui de la cortisone.

b) *Séparation sous forme de dinitro-phénylhydrazone.* L'extrait sec de la fraction cétonique non précipitable par la digonine est dissous dans 0.7 ml d'éthanol absolu et additionné de 0.5 ml de réactif D N P H (125 mg de dinitro-2,4-phénylhydrazine sont dissous dans 15 ml EtOH absolu

et 0.4 ml d'acide chlorhydrique pur). Le tube bouché à l'émeri est maintenu pendant une nuit à la température du laboratoire. On ajoute 0.5 ml de réactif de Bénédict (pour analyse quantitative des sucres) et 0.5 ml d'eau distillée.

Temps	15 mn à 0°			3 h à 0°		
	Longueur d'ondes	440 mμ	520 mμ	600 mμ	440 mμ	520 mμ
Étalon						
50 μg	0.055	0.130	0.045	0.115	0.310	0.150
100 μg	0.085	0.260	0.100	0.250	0.620	0.305
Numéros des fractions						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0.025	0.040	0.030
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0.030	0
5	0	0	0	0.030	0.050	0.025
6	0	0.015	0	0.055	0.070	0.030
7	0.005	0.020	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0.015	0
9	0	0	0	0.020	0.030	0
10	0	0.007	0	0	0.025	0.020
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0.005	0

TABLE 4. — Densités optiques des chromogènes Zimmermann positifs après fractionnement par chromatographie sur colonne. Étalon : *trans-dehydro-androstérone* (Roussel).

Le mélange est chauffé 10 minutes au bain-marie à 95° C. Après refroidissement, la solution est extraite par 10 ml de chloroforme. La couche chloroformique décantée est lavée avec quelques ml d'eau distillée ; les solutions de lavage sont réextraites par le chloroforme et ajoutées à la première fraction organique. Après séchage sur sulfate de soude anhydre, le chloroforme est évaporé sous vide, puis le résidu dissous dans 2 ml de benzène anhydre.

Numéros des fractions	λmμ (max.)
1	0
2	365 (0.820)
3	368 (0.640)
4	367 (0.865) - 375 (0.840)
5	368 (0.725) - 390 (0.610)
6	373 (0.250)
7	371 (0.115) - 381 (0.105)

TABLEAU 5. (Entre parenthèses : densités optiques).

La chromatographie a été réalisée sur 7 grammes d'alumine introduite dans une colonne de 21 × 13 mm, avec les systèmes de solvants suivants :

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1) benzène pur | 5) benzène-chloroforme (1 : 1) |
| 2) benzène-chloroforme (95 : 5) | 6) chloroforme pur |
| 3) benzène-chloroforme (90 : 10) | 7) chloroforme-méthanol (90 : 10) |
| 4) benzène-chloroforme (80 : 20) | |

La vitesse moyenne d'écoulement était de 20 sec. ml. On recueille, ainsi, 45 fractions de 10 ml. La figure 15 représente le fractionnement de cet extrait, qui permet, ainsi, d'expliciter dix pics. Un anneau marron brunâtre reste au sommet de la colonne et ne peut être élué par aucun solvant apolaire.

Les résidus sont dissous dans le chloroforme, puis on trace la courbe d'absorption de chacune des fractions (tableau 5), pour établir leur maximum et le comparer à celui des dinitrophénylhydrazones de substances pures.

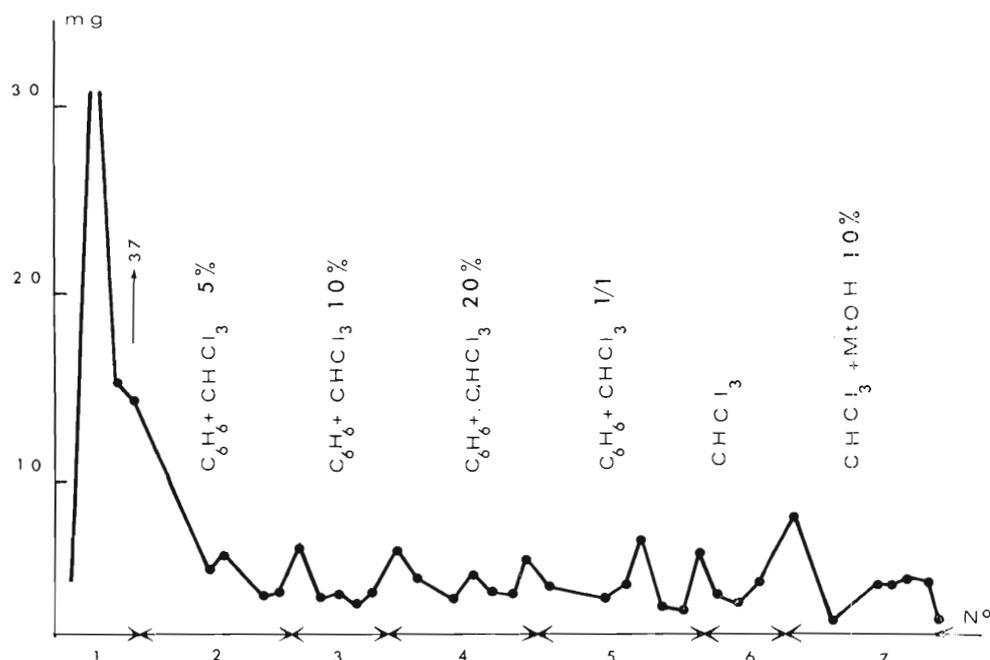


FIG. 15. — Fractionnement sur colonne d'alumine des DNP-H.
En abscisses : numéros des fractions ; en ordonnées : poids en mg.

Phénolstéroïdes.

Nous avons d'abord tracé le spectre colorimétrique entre 450 et 510 $m\mu$ à l'aide du réactif au gaïacol-sulfonate de potassium en milieu sulfurique.

On remarque trois maximums : λ_{\max} : 490 $m\mu$ λ_{\max} : 510 $m\mu$ λ_{\max} : 485 $m\mu$.

Le dosage a été effectué par cette même technique : teneur en phénolstéroïdes : 35 μg .

Discussion.

L'application des techniques analytiques actuelles nous a permis de préciser la composition biochimique de l'insaponifiable de l'huile extraite des foies d'*Eugaleus galeus* mâle (L.). Les essais de stockage à basses températures se sont avérés intéressants. Ils permettent une bonne conservation des substances biologiques que l'on désire identifier par la suite.

L'extraction à froid donne des rendements convenables et la délipidation est presque totale. Les dernières traces lipidiques étant, finalement, extraites par la méthode classique au Kumagawa. Toutefois, cette méthode nécessite des quantités relativement importantes de tissu généralement de l'ordre de 500 grammes au minimum. L'huile est récupérée par distillation des solvants et l'eau entraînée par distillation de l'azéotrope. Les substances non lipidiques sont éliminées de façon satisfaisante par le mélange acétone-alcool après une nuit à 0°.

Les réactions colorimétriques utilisées pour la détermination des stéroïdes nous permettent d'affirmer la présence de groupements caractéristiques identiques aux étalons. Ainsi, ces résultats sont une orientation qui demande, par la suite, des analyses plus poussées et sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

Le pourcentage en stérols libres précipitables par la digitonine, c'est-à-dire possédant un hydroxyle en position β au niveau du carbone 3 est compris entre 3,007 et 3,01 p.100, parmi lesquels la teneur en « fast acting stérols » est de 0,27 p.100 (calculé en 7-déhydrocholestérol) et de 1.19 p.100 en « slow acting stérols » (calculé en cholestérol).

La teneur en insaponifiable varie entre 4,05 et 4,10 p.100. Son spectre U.V. en solution dans l'éthanol absolu après séparation des substances carbonylées montre un maximum à λ max. 230 μ caractéristique des diènes, dont un des cycles est ouvert. De même deux maximums à λ max. 272 μ et λ max. 280 μ supposent l'existence de diènes ayant des doubles liaisons conjuguées.

Le traitement de cette fraction par une solution alcoolique de digitonine permet de préciser la structure de certains constituants de l'insaponifiable.

Le pourcentage de chacune des deux classes est :

fraction précipitable (3 β -OH) 52,3 (α), fraction non précipitable (3 α -OH) 47,7.

Dans la fraction précipitable, la teneur en « fast acting stérols » est de 4,12 p. 100 (calculé en 7-déhydrocholestérol) et de 7,80 à 7,85 p.100 en « slow acting stérols » (calculé en cholestérol) par rapport à l'insaponifiable.

La phase non précipitable renferme, principalement, des hydrocarbures dont le taux varie entre 29,6 et 30,2 p.100 (calculé en squalène).

En solution dans l'éthanol absolu, le spectre U.V. des hydrazones cétoniques montre trois accidents. Un premier maximum à λ max. 234,5 μ , qui laisse envisager la présence possible de diénone, dont les doubles liaisons seraient en position $\Delta^{1,4}$ un second maximum à λ max. 270 μ , probablement dû à la présence d'une seule double liaison dans les cycles A ou B, enfin un troisième maximum à λ max. 280 μ , correspondant à l'absorption spécifique de la cholestanone, c'est-à-dire à une substance saturée dont la fonction cétone est fixée sur le carbone trois.

La séparation des céto-stéroïdes par la digitonine nous permet de mieux définir cette classe. Le pourcentage de ceux-ci se répartit ainsi :

3 β stéroïdes 1,95, 3 α stéroïdes 23,9, par rapport à l'insaponifiable.

Cette répartition par la digitonine mérite quelques remarques. En effet, si les stéroïdes non saturés possédant un hydroxyle libre en 3 orienté comme celui du cholestérol fournissent des digitonides, VELLUZ, PETIT et PESEZ (1946) ont montré que la présence d'un carbonyle en 3 à la place de l'hydroxyle, disposé sur une structure stéroïde saturée en 4-5 et dont les cycles A et B sont unis en position « trans » peuvent former des digitonides, tel est le cas de la cholestanone. Par contre, les céto-stéroïdes carbonylés en 3 mais possédant une double liaison 4-5 ne fournissent plus de digitonides comme, par exemple, la cholesténone. Après régénération des céto-stéroïdes précipitables par la digitonine, nous avons effectué la réaction de Zimmermann sur les fractions α et β . Les pourcentages en « fast » et « slow acting stéroïdes » dosés par cette réaction se répartissent ainsi :

« fast acting céto-stéroïdes »,	« slow acting céto-stéroïdes »,
fraction précipitable par la digitonine : 1,25	fraction précipitable par la digitonine : 0,494
fraction non précipitable : 6,9	fraction non précipitable : 3,21

pourcentages calculés en Δ^5 -androstène-3 β ol-17 one par rapport à l'insaponifiable.

De la confrontation de ces deux résultats, nous pouvons conclure, d'une part, que le taux des céto-stéroïdes est nettement plus élevé dans la fraction α et d'autre part, que, parmi ceux-ci la teneur en « fast acting céto-stéroïdes » est supérieure à celle des « slow acting stéroïdes ».

La réaction de Gornall et Mac Donald montre également un taux plus élevé de dérivés cétoniques dans la fraction α que dans la fraction β . Les pourcentages respectifs, en fonction des temps de réaction, sont :

5 minutes à 25°	90 minutes à 59°
fraction β : 1,04	fraction β : 0,93
fraction α : 6,98	fraction α : 6,72

pourcentages déterminés en acétate de cortisone par rapport à l'insaponifiable.

Le taux de corticoïdes porteurs d'une chaîne réductrice α -cétolique est plus élevé dans la fraction α (2,96 p. 100). Par contre, dans la fraction précipitable, il atteint seulement 0,39 p. 100.

La chromatographie sur alumine de la fraction non précipitable par la digitonine permet de constater, d'une part que la fraction 7 renferme uniquement des « fast acting stéroïdes », et d'autre part que les fractions 6 et 10 sont constituées par un mélange de « fast » et « slow acting stéroïdes », ces derniers étant également, les seuls constituants des autres fractions.

Les séparations chromatographiques des dinitrophényl-hydrazones de la fraction α permet d'expliquer deux pics. Le premier à λ max. 365 m μ (fraction II), le second à λ max 367 m μ (fraction IV) ce maximum pouvant correspondre à des substances dont la fonction cétone est fixée sur le carbone 17.

Conclusion

L'insaponifiable de l'huile de foie d'*Eugaleus galeus* (L.) présente ainsi une composition hétérogène. La plupart des stérols sont sous forme d'esters parmi lesquels le cholestérol est le constituant majeur. La teneur en 7-déhydrocholestérol est en accord avec les résultats obtenus chez d'autres espèces animales. Le caractère insuffisamment probant de la réaction de Lifschütz permet, en l'état actuel, d'admettre, soit la possibilité d'une oxydation *in vitro* du cholestérol, bien que toutes les opérations aient été effectuées sous atmosphère d'azote, soit à l'existence d'un facteur favorisant cette oxydation *in vivo*.

Parmi les cétostéroïdes, la fraction α est la plus importante. Ces produits donnent à des taux relativement élevés les réactions de Libermann, de Zimmermann, de Gornall et Mac Donald, de Kingsley et Getschell, ce qui tend à démontrer la présence de stéroïdes du groupe des 17-CS et de substances appartenant aux types cortisoniques porteurs d'une chaîne latérale α -cétole. La réaction à la dinitro-2,4-phénylhydrazine dans un temps minimum de cinq minutes à froid laisse envisager la présence de Δ^4 -cétones éventuellement douées d'activité biologique.

La présence de cholestanone dans la fraction β peut également être envisagée d'après le spectre U.V. et sa réactivité à l'égard du m-dinitrobenzène ; toutefois son taux paraît peu élevé.

L'examen du spectre des phénolstéroïdes permet d'admettre la présence d'une faible quantité d'œstradiol (λ max. 490 m μ) et d'œstrone (λ max. 510 m μ) ; résultats en accord avec les travaux antérieurs.

Ces résultats chimiques nécessitent, en premier lieu, des essais biologiques actuellement en cours afin de mieux définir leurs propriétés.

Centre scientifique de Monaco
Fondation de S.A.S. le Prince Rainier III.
Laboratoire de Biologie

BIBLIOGRAPHIE

- BERGMANN (W.), 1934a. — Contribution to the study of marine products. II. - The sterols of Mollusks. — *J. biol. Chem.*, **104** : 317-328.
- 1934b. — Contribution to the study of marine products. III. - The chemistry of ostraestrol. — *Ibid.*, **104** : 553-557.
- 1937. — Contribution to the study of marine products. IV. - The sterols of starfish. — *Ibid.*, **117** : 777-781.
- BERGMANN (W.) et LOW (Eva W.), 1947. — Contribution to the study of marine products. XX. - Remarks concerning the structure of sterols from marine invertebrates. — *J. org. Chem.*, **12** : 67-75.
- BERGMANN (W.), McLEAN (Margaret J.) et LESTER (D.), 1943. — Contribution to the study of marine products. XII. - Sterols from various marine invertebrates. — *J. org. Chem.*, **8** : 271-282.
- BOSCOTT (R.J.), 1952. — The separation of urinary cortical steroids. — Ciba Foundation. Colloquia on endocrinology, **5** : 329-331.
- CARGILL (D.I.), 1962. — The separation of cholesterol from related stanols and stanones by Thin-layer chromatography. — *Analyst*, **87** : 865-869.

- CHIEFFI (G.) et LUPO (C.), 1961. — Identification of oestradiol 17β , testosterone and its precursors from *Scylliorhinus stellaris* testes. — *Nature*, Londres, n° 4771 : 169-170.
- 1963. — Identification of Sex Hormones in the Ovarian Extracts of *Torpedo marmorata* and *Bufo vulgaris*. — *Gen. comp. Endocrinology*, **3** : 149-152.
- CRASTES DE PAULET (A.) et CRASTES DE PAULET (P.), 1961. — Hétérogénéité de la fraction « esters du cholestérol » obtenue par chromatographie sur acide silicique des lipides totaux du sérum humain. - « Enzymes of Lipid Metabolism ». — Paris, Pergamon Press S.A.R.L. : 109-125.
- FANTL (P.), 1942. — The sterol fraction of Australian mollusca. — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **20** : 55-58.
- GASTAUD (J.-M.), 1963a. — Contribution à l'étude biochimique des stéroïdes tissulaires chez *Scylliorhinus caniculus* (L.). — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* **27** (2) : 221-234.
- 1963b. — Séparation chromatographique des stérols tissulaires et variations du taux de cholestérol au cours de l'ovulation chez *Acanthias vulgaris* (L.). — *Comm. Explor. sci. Mer Médit., Rapp. et P.V.*, **17** (3) : 731-733.
- HELLER (J.H.), HELLER (M.S.), SPRINGER (S.) et CLARK (E.), 1957. — Squalen content of various shark liver. - *Nature*, Londres, n° 4566 : 919-920.
- IDLER (D.R.) et BAUMANN (A.), 1952. — Skin sterols. II. - Isolation of Δ^7 -cholesterol. — *J. biol. Chem.*, **195** : 623-628.
- KIND (Albert C.), SLATER (Schuyler G.) et VINCI (A.), 1948. — Sterols of marine mollusks. I. - The presence of cholesterol in two gasteropods. — *J. org. Chem.*, **13** : 538-541.
- LUPO (C.) et CHIEFFI (G.), 1963. — Oestrogens and progesterone in ovaries of the marine teleost *Conger conger*. — *Nature*, Londres, n° 4867 : 596.
- MOORE (P.R.) et BAUMANN (C.A.), 1952. — Skin sterols. I. - Colorimetric determination of cholesterol and other sterols in skin. — *J. biol. Chem.*, **195** : 615-621.
- RAOUL (Y.) et LE BOULCH (N.), 1963. — Préparation de la « cétone 250 » à partir de la vitamine D des foies de thon. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **45** : 145-155.
- VAN DER VLIET (J.), 1945. — Investigations on sterols. III. — The provitamins D from the mussel (*Mytilus edulis*). — *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **67** : 265-281.
- VELLIZ (L.), 1951. — Substances naturelles de synthèse. — Paris, Masson et Cie édit., vol. II : 55-56.