

# CONTRIBUTION A LA BIOCHIMIE DES ÉLÉMENTS PLANCTONIQUES ÉTUDE DE L'INSAPONIFIABLE DES LIPIDES ET DE LA FRACTION STÉROLIQUE

par J. M. GASTAUD (1)

Les premières observations d'endocrinologie chez les invertébrés datent d'une vingtaine d'années, et leurs progrès sont particulièrement basés sur une meilleure connaissance de leur système neurosécrétoire. Les conditions de vie sont étroitement liées aux facteurs ambiants contrôlés par leur système endocrinien. La reproduction, le développement, les changements de coloration des téguments ainsi que leurs métabolismes dépendent de celui-ci. Le système nerveux central joue un rôle important comme source d'hormones chez différentes annélides (1-2-3). La régénération de leurs segments antérieurs est sous le contrôle de l'hormone de croissance (4-5). L'activité de la reproduction chez les annélides Polychètes comme chez certains crustacés est sous l'influence d'une hormone siégeant au cerveau et permettant également les transformations sexuelles (forme épitoque chez *Hétéronérés*) (6-7-8). On a constaté également que l'ablation de l'organe internéphridien provoque chez certains vers des troubles comparables aux insuffisances adrénocorticales des vertébrés; sa cytologie est, d'après HARMS, comparable au cortex surrénal (9-10). Chez les crustacés, les mécanismes de neurosécrétion ont été mis en lumière par de nombreux travaux. Leur reproduction dépend des cycles saisonniers mais aussi d'une action hormonale. De même chez les Planaires (11) on a constaté la présence d'un produit d'origine crânien nécessaire à la régénération des yeux. Cette rapide révision des travaux antérieurs démontrent l'action des substances hormonales dans les différents mécanismes vitaux chez les invertébrés, mais ces recherches sont surtout d'ordres cytologique et histochimique. Toutefois, des études partielles furent consacrées à la nature chimique des pigments et propigments de la carapace des crustacés au point de vue respiratoire ou vitaminique, mais il ne semble pas que des travaux sur la détermination des composantes biochimiques des éléments planctoniques, et plus particulièrement sur les fractions insaponifiables et hormonales, aient été amorcées à notre connaissance. Signalons toutefois la contribution à l'étude de l'activité biologique des stérols du plancton (12), des lipochromes des crustacés (13), de la cholestérine chez *Helix pomatia* L. (14), des stéroïdes sulfatases chez les invertébrés marins (15), enfin, sur la présence d'une hormone thyroïdienne chez *Ciona intestinalis* L. (16).

Le présent travail est une note préliminaire à l'étude biochimique des éléments planctoniques récoltés au cours de la campagne du navire océanographique « Président-Théodore-Tissier » (2) le long des côtes algériennes au cours des mois de janvier - février 1960.

Le matériel a été récolté à l'aide du filet « Discovery » remorqué en surface à faible vitesse pendant quinze minutes. Dès la remontée à bord, une partie du plancton a été rapidement examinée afin de nous rendre compte des éléments dominants qui, dans ce cas, furent des Copépodes dans la proportion de 98 %. Le reste, après filtration, a été conservé dans l'éthanol à 95°. Après évaporation de ce dernier, le plancton a été séché sous vide à la température du laboratoire. Les matières grasses ont été extraites par l'appareil de Soxhlet. Les lipides ainsi obtenues ont été ensuite séparées en fractions hormonales à l'aide de méthanol aqueux et en fraction lipidique que l'on saponifie ensuite.

(1) Ce travail a pu être accompli grâce à l'appui bienveillant de S.A.S. le Prince Souverain, Président de la Commission internationale pour l'Exploration scientifique de la Mer méditerranée.

(2) Nous tenons à exprimer notre très vive reconnaissance à M. FURNESTIN, Directeur de l'Institut scientifique et technique des Pêches maritimes qui a bien voulu nous faire participer aux campagnes du « Président-Théodore-Tissier ».

Sur cette dernière, nous avons utilisé d'abord la réaction au trichlorure d'Antimoine en solution chloroformique (17) qui développa immédiatement une coloration rouge-violacé laissant supposer la présence de composés insaturés de la série des carbures et qui semble être du squalène. L'addition d'une solution de digitonine à l'insaponifiable provoque un précipité qui démontre la présence de cholestérol libre, tandis que la réaction de Libermann-Burchard développe, au bout de 15 minutes, une coloration verte typique. Afin de nous assurer si cette coloration était bien due à la présence de cholestérol, nous avons tracé son spectre en prenant comme témoin une solution pure de cholestérol. Le spectre dans le visible a montré un maximum d'absorption à 625 m $\mu$ , identique au témoin (fig.1).

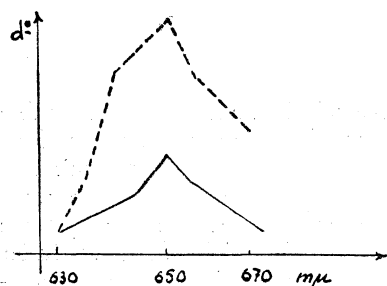


FIG. 1. — Spectre d'absorption dans le visible du cholestérol après réaction de Libermann-Burchard (-solution témoin, — essai).

La solution aqueuse méthanolique a été divisée en deux. Une première fraction, sur laquelle on a pratiqué les caractéristiques des substances hormonales, et une seconde fraction, sur laquelle les mêmes observations seront poursuivies après incubation à l'aide d'une solution de  $\beta$ -glycuronidase à pH 5,2 à 37°C pendant 24 heures.

Sur la première fraction, la réaction de Zimmermann s'est montrée positive, tandis que les autres méthodes furent négatives ou très faiblement positives. La seconde fraction, après incubation enzymatique suivie de la réaction au m-dinitrobenzène en milieu alcalin (méthode de Zimmermann) a montré un maximum d'absorption dans la bande de 520 m $\mu$ ; identique au témoin qui dans ce cas était une solution de déhydroisoandrosterone (fig.2). La présence de stéroïdes neutres oxygénés en position II ou non et possédant une chaîne latérale réductrice

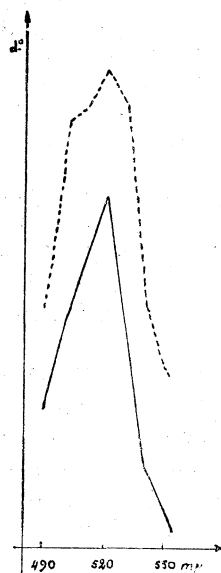


FIG. 2. — Spectre d'absorption des 17-Cétostéroïdes après réaction de Zimmermann (- solution témoin de déhydroisoandrosterone, — essai).

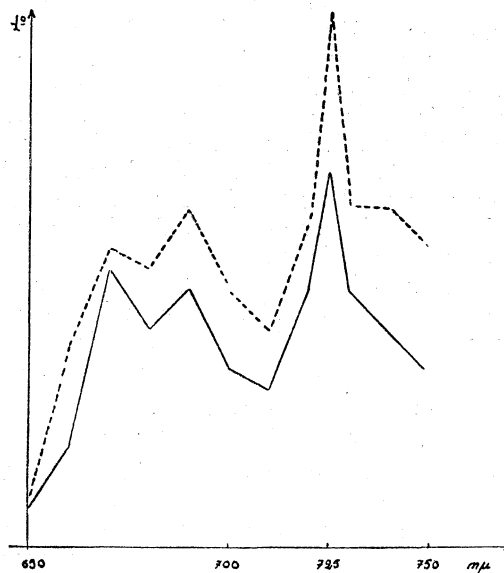


FIG. 3. — Spectre d'absorption des corticostéroïdes réducteurs après réaction de Heard et Sobel (- solution témoin de déoxycorticostérone, — essai).

(18) a été mis en évidence par la méthode de Heard et Sobel à l'aide du réactif de Folin. Le tracé du spectre comparé à celui d'un témoin qui était la déoxycorticostérone montre un maximum d'absorption à 725 m $\mu$  (fig.3).

Nous avons ensuite utilisé la chromatographie sur papier Whatmann n° 1 en employant comme phase mobile le mélange de BUSCH (19) (toluène, éther de pétrole, méthanol, eau) et en faisant migrer conjointement des solutions d'hormones pures cristallisées. La détection des spots a été effectuée en premier lieu par la méthode de BURTON 1961 (20) et REINEKE 1956 (21) (nitrate d'argent ammoniacal, réactif de Tollens), réaction qui se montra fortement positive. Il en fut de même à l'égard de la solution de bleu de tétrazolium qui développa une teinte rouge violacé au niveau du témoin (cortisone) tandis que la solution planctonique ne montra qu'une très faible coloration. La réaction de ZIMMERMANN (22) fut également positive.

L'examen des chromatogrammes en lumière de Wood a permis de déceler sur les bandes témoins et sur les bandes d'essais une fluorescence jaune vif de même R<sub>F</sub>.

Comme nous le soulignons au début, ces résultats préliminaires ne sont que qualitatifs et n'ont pas la prétention de comparer au point de vue chimique les substances trouvées dans nos recherches avec celles bien connues des vertébrés. Ce travail ne vise en premier lieu que de montrer l'existence de précurseurs hormonaux (squalène et cholestérol) ensuite de substance réagissant de façon identique aux réactifs classiques utilisés lors des dosages d'hormones.

L'incubation par la  $\beta$ -glycuronidase a permis de libérer tous les 17-cétostéroïdes neutres sans aucune altération de leurs copules sulfuriques ou glycuroniques. Le terme 17-cétostéroïdes désigne les dérivés stéroïdes porteurs d'une fonction cétone sur la carbone 17. Cette catégorie de substance englobe chez les vertébrés les stéroïdes génitaux et ceux d'origine corticosurrénale doués d'activités androgéniques ou œstrogéniques. Les résultats négatifs obtenus après action du réactif T de Girard et Sandulesco, permettent d'admettre lors de la réaction de Heard et Sobel en la présence de dérivés  $\gamma$ -cétols ou  $\alpha, \beta, 3$ -cétoniques non saturés.

Dans leur étude sur l'activité biologique des stérols (12) du plancton, constitué par des larves de zoé de Porcellana et de nombreux Copépodes, les auteurs ont remarqué un maximum d'absorption caractéristique de l'ergostérol de même que les réactions chimiques et biologiques pour les prises effectuées au mois de juillet; ils signalent par contre des résultats négatifs pour les prises faites en avril. Les pigments liposolubles de certains animaux (13) tel que l'astacine sont spécifiques des crustacés et appartiennent aux caroténoïdes, de même que l'acténio-érythrine, pigment rouge d'*Actinia aquina* L. qui est un ester d'un acide. La fraction insaponifiable des tissus d'un mollusque gastéropode *Helix pomatia* L. (14) renferme une substance amorphe donnant de façon intense toutes les réactions de la cholestérine des vertébrés. Chez *Ciona intestinalis* L. (16), on a constaté la présence d'une hormone thyroïdienne la :3 :5 :3' - triiodothyroxine ou thyroxine. Enfin, l'étude des invertébrés marins (15) a montré que certains enzymes tels que la  $\beta$ -glycuronidase et l'arylsulfatase sont présents chez toutes les espèces étudiées, tandis que la stéroïde sulfatase n'existe que chez certains prosobranches.

Les méthodes actuelles de la biochimie ont donc permis de mettre en évidence des substances qui correspondraient, au point de vue constitution chimique, aux substances hormonales des vertébrés. En l'état actuel, on ne peut leur attribuer une dénomination identique à celle utilisée chez les autres animaux et c'est dans ce but que nous avons commencé une étude à l'aide de la spectrophotométrie dans l'infra-rouge et par des séparations chromatographiques afin d'observer si l'on peut rattacher les produits signalés dans ce travail aux hormones des vertébrés.

*Institut océanographique Monaco-Ville  
et Services scientifiques des laboratoires Theramex.*

BIBLIOGRAPHIE

- 1) BACQ (Z.M.), 1947. — *Biol. Rev.*, **22**, p. 73.
- 2) BLASCHKO (H.) et HIMMS (J.M.), 1953. — *J. physiol.*, **120**, p. 445.
- 3) GASKELL (W.M.), 1916. — *The Involuntary Nervous System.*, Longmans Green Co London.
- 4) HARMS (J.W.), 1944. — *Biol. Zentr.*, **61**, p. 1.
- 5) — 1947. — *Arch. Entwicklu. Organ.*, **47**, p. 332.
- 6) DURCHON (M.), 1948. — *C.R. Acad. Sci.*, **227**, p. 157.
- 7) — 1953. — *Ann. biol.*, **29** (3), p. 31.
- 8) DEFRETIN (R.), 1952. — *C.R. Acad. Sci.*, **235**, p. 100.
- 9) HARMS (J.W.), 1921. — *Arch. Entwicklu. Organ.*, **47**, p. 307.
- 10) KÖLLER (G.), 1938. — *Hormone bei Wirbellosen Tieren.* Akad. Verlagsg., Leipzig.
- 11) LENDER (T.), 1954. — *C. R. Acad. Sci.*, **238**, p. 1742.
- 12) BELLOC (G.), FABRE (R.) et SIMONNET (H.), 1930. — *C. R. Acad. Sci.*, **191**, p. 160-162.
- 13) FABRE (R.) et LEDERER (E.), 1939. — *Bul. Soc. Chim. biol.*, **16**, p. 105-118.
- 14) LEULIER (A.) et CHARNOT (A.), 1934. — *C. R. Soc. biol.*, **1**, p. 517-518.
- 15) CORNER (E.D.S.), LEAN (Y.A.) et BULBROOK (R.D.), 1960. — *J. mar. biol. Ass. U. Kingd.*, **39** (1), p. 51-61.
- 16) ROCHE (J.), SALVATORE (G.), RAMETTA (G.) et VARRONE (S.), 1960. — *C. R. Soc. biol.*, **153**, p. 1571-1577.
- 17) DELABY (R.), SABETAY (S.) et JANOT (M.), 1934. — *C. R. Acad. Sci.*, **198**, p. 276.
- 18) COURTOIS (J.E.) et PERLÈS (R.), 1960. — *Précis de chimie biologique*, **11**, Masson et Cie. édit.
- 19) BUSH (E.), 1952. — *Biochem. j.*, **50** (3), p. 370-378.
- 20) BURTON (R.B.), ZAFFARONI (A.) et KEUTMANN (E.H.), 1951. — *J. Biol. Chem.*, **188**, p. 763-771.
- 21) REINEKE (L.M.), 1956. — *Anal. chem.*, **28**, p. 1853-1858.
- 22) KRITSCHESKY (T.H.) et TISELIUS (A.), 1951. — *Science*, **114**, p. 299-300.
- 23) SHARRER (B.), 1955. — *Hormones in Invertebrates.* p. 57-83, in *The Hormones*, vol. **3**, Acad. Presse Inc.