

Étude sur la diversité des saponines parmi les holothuries de la famille des holothuroïdes (Holothuriidae)

Guillaume Caulier^{1,*}, Séverine Van Dyck¹, Pascal Gerbaux², Igor Eeckhout¹, et Patrick Flammang¹

Résumé

Les saponines sont des métabolites secondaires produites par les holothuries. Leur structure repose sur les glycosides triterpéniques, qui jouent un rôle majeur de défense chimique et dont la gamme des propriétés pharmacologiques est large. Cette étude met en relief la très grande diversité des saponines détectées dans les différentes espèces de la famille des holothuroïdes (*holothuriidae*). Pas moins de 59 glycosides triterpéniques ont été comptabilisés. Plusieurs saponines sont présentes dans de nombreuses espèces, mais d'autres sont très spécifiques. Dans l'ensemble, la plupart des espèces semblent posséder un mélange de congénères spécifique. Les différences interspécifiques les plus évidentes qui peuvent être soulignées chez les holothuroïdes reposent sur la présence ou l'absence d'un groupe sulfate attaché à la chaîne glucidique de leurs saponines. Les mélanges de saponines dans un seul animal présentent également divers taux de concentrations en fonction de l'organe, les tubes de Cuvier présentant les taux de concentration en saponines les plus élevés. Toutes les données combinées indiquent un mécanisme complexe de défense chimique avec différents ensembles de saponines issues de différentes parties du corps et qui présentent diverses propriétés liées à leur(s) fonction(s) écologique(s).

Introduction

Découvertes à l'origine dans les végétaux supérieurs où elles sont très répandues, les saponines constituent une classe importante de produits naturels (Li et al. 2006). La quête de nouvelles substances actives sur le plan pharmacologique a permis d'isoler des saponines dans des organismes marins tels que les holothuries (Nigrelli 1952 ; Yamanouchi 1955), les étoiles de mer (Mackie et Turner 1970) et les éponges (Thompson et al. 1985). La structure des saponines des holothuries repose sur des glycosides triterpéniques composés d'une chaîne d'oligosaccharides et d'un aglycone, sur la base d'holostane-3 β -ol (figure 1A) (Kornprobst 2005). Les saponines des holothuroïdes (figure 1B, C) contiennent une double liaison $\Delta^{9(11)}$ dans l'aglycone et la chaîne glucidique comporte jusqu'à 6 unités de sucres (xylose, glucose, 3-O-méthylglucose et quino-vose) et ne peut se ramifier qu'une fois (Kalinin et al. 2005). Certaines de ces saponines peuvent être sulfatées au niveau du xylose seul (figure 1C).

Les glycosides triterpéniques des holothuries intéressent au plus haut point les secteurs de la pharmacologie et de l'écologie. Ces métabolites secondaires possèderaient en effet une large gamme de propriétés pharmacologiques (propriétés hémolytiques, antitumorales, anti-inflammatoires, antifongiques, antibactériennes, antivirales, ichthyotoxiques, cytostatiques et activités antinéoplas-tiques entre autres) (Kerr et Chen 1995 ; Kalinin et al. 1996a, 1996b ; Prokofieva et al. 2003). Nombre de ces activités résultent de leurs propriétés tensioactives. Sur le plan écologique, les saponines sont délétères pour la plupart des organismes et fonctionnent probablement

comme une barrière chimique dissuadant les prédateurs (Kalinin et al. 1996a, b ; Van Dyck et al. Données non publiées. Observations).

Diversité des saponines dans la famille des holothuroïdes

Cet article dresse le bilan des diverses saponines détectées parmi les différentes espèces de la famille des holothuroïdes. Le tableau 1 fait le point sur toutes les saponines extraites au cours des 40 dernières années et caractéristiques des holothuries des genres *Actinopyga*, *Bohadschia*, *Holothuria* et *Pearsonothuria*. Les saponines décrites en détail dans ce tableau ont été purifiées au moyen de diverses méthodes – extractions liquide/liquide par différents solvants, extraction en phase solide ou chromatographie (gel de silice ou résines), et chromatographie liquide à haute performance. Des techniques basées sur la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, combinées à des réactions ainsi que des indices chimiques, ont été utilisées pour mettre en évidence la structure chimique de ces saponines.

Le tableau 1 souligne la très grande diversité des saponines dans les holothuroïdes. En effet, pas moins de 59 glycosides triterpéniques ont été recensés. Lorsque l'on recueille ces données dans la littérature, certains problèmes de nomenclature sont mis en évidence. Il arrive que deux noms aient été indépendamment donnés à la même molécule. Ainsi la structure de nobiliside 2a par Wu et al. (2006c) correspond exactement à celle de desholothurine A, décrite par Rodrigez et al. (1991). Par conséquent, les auteurs devraient harmoniser la nomenclature des saponines en attribuant des noms

1. Université de Mons, Laboratoire de biologie marine, 7000 Mons, Belgique

2. Université de Mons, Laboratoire de chimie organique, Centre interdisciplinaire de spectroscopie de masse (CISMa), 7000 Mons, Belgique

* Auteur correspondant: guillaume.caulier@umons.ac.be

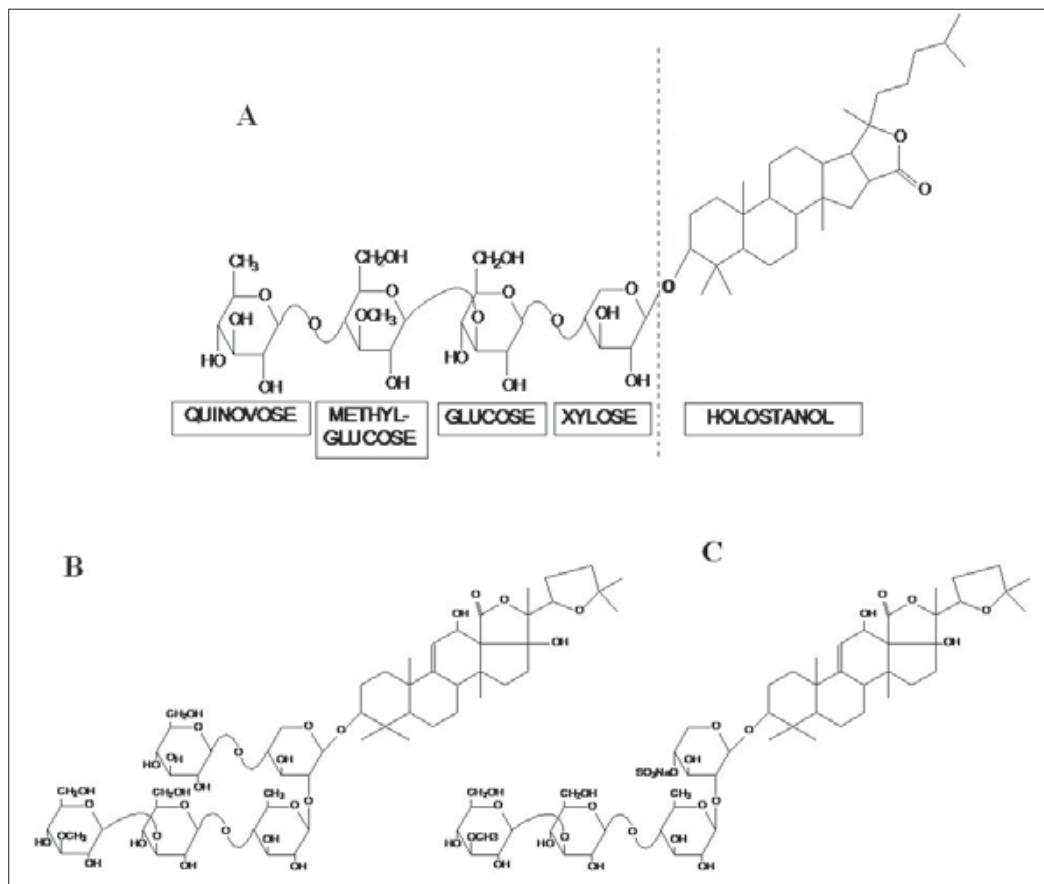


Figure 1. Structure moléculaire d'une saponine hypothétique (A) composée d'un aglycone d'holostanol (d'après la base de données toxicogénomiques comparatives) et d'une chaîne glucosidique linéaire constituée des quatre monosaccharides que l'on trouve le plus fréquemment dans les saponines des holothuries ; (B) d'holothurinosides A, une saponine non-sulfatée ; et (C) d'holothurine A, une saponine sulfatée.

logiques aux nouvelles molécules basés sur la structure des congénères connus plutôt que sur les origines spécifiques des molécules.

Les différences interspécifiques les plus évidentes qui peuvent être soulignées parmi les holothuroïdes s'appuient sur la présence ou l'absence d'un groupe sulfate, attaché à la chaîne glucidique de leurs saponines (Kobayashi et al. 1991). Le genre *Actinopyga* ne contient que des saponines sulfatées (en vert dans le tableau 1), le genre *Bohadschia* n'inclut que des saponines non-sulfatées (en rouge dans le tableau 1), et les genres *Pearsonothuria* et *Holothuria* comportent les deux types de saponines. Dans ce dernier groupe, la situation est même plus complexe encore : plusieurs espèces ne contiennent que des saponines sulfatées, certaines autres présentent les deux types de congénères, et pour finir une espèce, *H. forskali*, comprend exclusivement de la saponine non-sulfatée. Plusieurs saponines sont présentes dans un grand nombre d'espèces, les holothurines A et B par exemple, mais d'autres telles que la griseaside A ou les argusides A-E sont très spécifiques. Il est à noter que les holothurines A et B ont été les premières qui ont été découvertes (Yamanouchi 1955 ; Kitagawa et al. 1978, 1979) et qu'elles ont par conséquent été détectées dans de nombreuses espèces du genre *Holothuria* (Elyakov et al. 1973, 1975). À l'avenir, grâce aux techniques contemporaines,

on doit s'attendre à ce que de nouvelles études détectent de nouvelles saponines dans ces espèces. Le tableau 1 montre clairement en effet qu'un grand nombre de nouveaux congénères n'ont été que récemment décrits. La plupart des espèces semblent par conséquent renfermer un mélange de congénères spécifique, un caractère chimio-taxonomique permettant l'attribution d'une espèce d'holothurie à un taxon spécifique, en fonction de la signature chimique de cette dernière. Par exemple, la position taxonomique de *Bohadschia graeffei* a été révisée suite à l'isolation et la caractérisation de ses saponines, au profit du genre récemment créé, *Pearsonothuria graeffei* (Kalinin et al. 2005).

Parmi les nombreuses études portant sur les saponines des holothuroïdes, très peu distinguent les différentes parties du corps (tableau 1), bien qu'au sein d'un même animal, les saponines puissent présenter divers taux de concentration et compositions en fonction de l'organe pris en compte. Matsuno et Ishida (1969) font état de la distribution des saponines dans les différentes parties du corps des holothuries. Des saponines ont été trouvées dans les organes digestifs, les muscles rétracteurs longitudinaux, l'épiderme, les vaisseaux hémaux intestinaux, les ovaires, les testicules et les tubes de Cuvier. Les quantités de saponines (exprimées par l'indice d'hémolyse) différaient selon les parties du corps ; le tégument et les

Table 1. Saponines d'Holothuriidae par espèce.

| Espèce | Saponines | Tg | TC | Références |
|-----------------------------|--|----|----|---|
| <i>Actinopyga agassizi</i> | 24-dehydroholothurine A ₂ Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine B ₁ Holothurine B ₂ Fuscocineroside B/C* | x | x | Kitagawa et al. (1982) Kitagawa et al. (1982) Kitagawa et al. (1980) Elyakov et al. (1975) Kitagawa et al. (1980) Chapitre 2 Elyakov et al. (1973) Kitagawa et al. (1980) Elyakov et al. (1973) |
| <i>Actinopyga echinites</i> | Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine B/B ₄ * | x | x | Chapitre 2 Kitagawa et al. (1980) Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 |
| <i>Actinopyga flammea</i> | Holothurine B ₁ Holothurine B ₂ Holothurine B ₃ Holothurine A Holothurine B | x | x | Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 |
| <i>Actinopyga lecanora</i> | Holothurine A Holothurine B | x | x | Bhatnagar et al. (1985) Bhatnagar et al. (1985) |
| <i>Actinopyga mauritana</i> | Holothurine A 24-dehydroHolothurine B ₁ Holothurine A Holothurine B | x | x | Elyakov et al. (1991) Kobayashi et al. (1991) Kobayashi et al. (1991) Elyakov et al. (1973) |
| <i>Actinopyga miliaris</i> | Holothurine A ₂ Holothurine B ₁ Holothurine A Holothurine B | x | x | Kobayashi et al. (1991) Elyakov et al. (1973) Kobayashi et al. (1991) Elyakov et al. (1973) |
| <i>Bohadschia argus</i> | Arguside A Arguside B Arguside C Arguside D Arguside E (DesHolothurine A ₁)** | x | x | Liu et al. (2007) Liu et al. (2008a) Liu et al. (2008a) Liu et al. (2008b) Liu et al. (2008b) |
| <i>Bohadschia bivittata</i> | Bivittoside A Bivittoside B Bivittoside C Bivittoside D 17-hydroxy impatienside A 25-acetoxy bivittoside D Bivittoside C Bivittoside D Marmoratoside A (Impatienside A)** Marmoratoside B/Holothurinoside H* | x | x | Ohta and Hikino (1981) Ohta and Hikino (1981) Ohta and Hikino (1981) Ohta and Hikino (1981) Yuan et al. (2009) Yuan et al. (2009) Yuan et al. (2009) Yuan et al. (2009) Yuan et al. (2009) |
| <i>Bohadschia marmorata</i> | Arguside C Bivittoside B Bivittoside C Bivittoside D Impatienside A (Marmoratoside A)** | x | x | Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 |
| <i>Bohadschia subrubra</i> | Holothurinoside F Holothurinoside H/Marmoratoside B* Holothurinoside H ₁ Holothurinoside I Holothurinoside I ₁ Holothurinoside J ₁ Holothurinoside K ₁ Bivittoside C Bivittoside D Bivittoside D Bivittoside D Holothurine A Holothurine B Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine B/B* Holothurine B ₁ Holothurine B ₂ Holothurine B ₃ Axilgoside A Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine B Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine A Holothurine A Holothurine B Holothurine A Holothurine B Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine A Holothurine A ₂ Holothurine B Holothurine A Holothurine B Holothurine A Holothurine A Holothurine B Des-Holothurine A (Nobiliside 2a)** Des-Holothurine A ₁ (Arguside E)** Holothurinoside A Holothurinoside A ₁ Holothurinoside B Holothurinoside C Holothurinoside C ₁ Holothurinoside D | x | x | Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Chapitre 2 Radhika et al. (2002) Radhika et al. (2002) Radhika et al. (2002) Radhika et al. (2002) Elyakov et al. (1973) Elyakov et al. (1975) Kobayashi et al. (1991) Kobayashi et al. (1991) Kobayashi et al. (1991) Chapitre 2 Kobayashi et al. (1991) Chapitre 2 Chapitre 2 Yuan et al. (2008) Kobayashi et al. (1991) Kobayashi et al. (1991) Yuan et al. (2008) Elyakov et al. (1973) Elyakov et al. (1973) Elyakov et al. (1973) Elyakov et al. (1975) Elyakov et al. (1975) Elyakov et al. (1975) Elyakov et al. (1973) Elyakov et al. (1973) Stonik (1986) Stonik (1986) Stonik (1986) Stonik (1986) Elyakov et al. (1982) Rodríguez et al. (1991) Chapitre 1 Rodríguez et al. (1991) Chapitre 1 Rodríguez et al. (1991) Rodríguez et al. (1991) Rodríguez et al. (1991) Chapitre 1 Rodríguez et al. (1991) |

tubes de Cuvier ont révélé les valeurs les plus élevées (les ovaires présentaient également des concentrations élevées de saponines variant néanmoins en fonction du cycle reproductif de l'animal ; Matsuno et Ishida 1969). Van Dyck et al. (2010) ont également souligné une variation des quantités de saponine entre les tubes de Cuvier et le tégument de plusieurs espèces d'holothuroïdes. Les glycosides triterpéniques semblent être particulièrement concentrés dans les tubes de Cuvier, un système de défense spécialisé, développé par certaines espèces au sein de la famille des holothuroïdes (Matsuno et Ishida 1969 ; Elyakov et al. 1973 ; Kobayashi et al. 1991). Cet organe, situé dans la partie postérieure de l'animal, est constitué de multiples tubes qui, chez certaines espèces, peuvent être expulsés par l'individu après stimulation (Bingham et Braithwaite 1986 ; Hamel et Mercier 2000 ; Becker et Flammang, sous presse).

En ce qui concerne la composition du mélange de congénères, bien que de nombreuses saponines soient communes au tégument et aux tubes de Cuvier dans une même espèce, certains congénères semblent être spécifiques à certains organes (tableau 1). Certaines espèces possèdent plus de congénères de saponines dans les tubes de Cuvier que dans le tégument (*H. leucospilota* par exemple), certaines moins (*A. echinites* par exemple), et certaines ont approximativement le même nombre de saponines dans les deux organes (*B. subrubra* et *P. graefi* par exemple) (Kobayashi et al. 1991 ; Van Dyck et al. 2009, 2010).

La multitude des différentes saponines au sein d'une espèce ainsi que les variations inter-individus dans les mélanges de saponines soulèvent la question des fonctions spécifiques de ces molécules. Une espèce de la famille des holothuroïdes peut bien sûr contenir un grand nombre de saponines différentes (plus de 20 dans *H. forskali*) ; le nombre, la position et la nature des unités de monosaccharides varient selon les différents congénères, tout comme le nombre et la position des doubles liaisons, l'hydroxyle, l'acétate, le sulfate et d'autres groupes fonctionnels sur l'aglycone et la chaîne glucidique (Kornprobst 2005 ; Kalinin et al. 2005). Une telle diversité moléculaire devrait constituer un avantage sélectif pour l'animal, les diverses structures moléculaires semblant conférer diverses propriétés aux saponines. Selon Kalinin (2000), la présence d'un groupe sulfate améliore le caractère hydrophile de la saponine, tandis que la longueur et la composition de la chaîne glucidique sont essentielles à son action membranolytique. Cela peut expliquer du moins en partie, la différence de composition de la saponine dans le tégument et les tubes de Cuviers au sein d'une espèce isolée. Pour compliquer encore le tableau, il a récemment été démontré qu'un stress prolongé sur les tubes de Cuvier de *H. forskali*, entraîne la transformation de certains congénères en d'autres, par l'ajout d'un disaccharide (Van Dyck et al. sous presse). Prises dans leur ensemble, toutes les données signalent par conséquent un mécanisme complexe de défense chimique avec, pour une seule espèce, différents ensembles de saponines issus de diverses parties du corps et réagissant différemment au stress. Ce mécanisme ajuste probablement les propriétés des saponines en fonction leurs rôle(s) écologique(s).

Remerciements

S. Van Dyck et G. Caulier ont bénéficié d'une bourse de doctorat du Fonds belge pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA). P. Flammang et P. Gerbaux sont respectivement directeur de recherche et assistant de recherche au Fonds pour la recherche scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS). P. Gerbaux remercie le F.R.S.-FNRS pour sa contribution financière dans l'acquisition du spectromètre de masse Waters Q-ToF Premier et pour son soutien constant. Ce travail a reçu la bourse n° 2.4535.10 du Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (FRFC). Cette étude émane du Centre Interuniversitaire de Biologie Marine (CIBIM).

Bibliographie

- Becker P. and Flammang P. in press. Unravelling the sticky threads of sea cucumbers. A comparative study on Cuvierian tubule morphology and histochemistry. In: von Byern J. and Grunwald I. (eds). Biological adhesive systems — From nature to technical and medical application. Springer Press.
- Bhatnagar S., Dudoet B., Ahond A., Poupat C., Thoisson O., Clastres A., Laurent D. and Potier P. 1985. Invertébrés marins du lagon néocalédonien. IV: Saponines et sapogénines d'une holothurie, *Actinopyga flammea*. Bulletin de la société chimique de France 1:124-129.
- Bingham B.L. and Braithwaite L.F. 1986. Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 98:311-322.
- Dang N.H., Thanh N.V., Kiem P.V., Huong L.M., Minh C.V., and Kim Y.H. 2007. Two new triterpene glycosides from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra*. Archives of Pharmacal Research 30:1387-1391.
- Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V., Slanke V.P., Kuznetsova T.A. and Levin V.S. 1973. Glycosides of marine invertebrates-I. A comparative study of the glycosides fraction of Pacific sea cucumbers. Comparative Biochemistry and Physiology 44:325-336.
- Elyakov G.B., Kuznetsova T.A., Stonik V.A., Levin V.S. and Albores R. 1975. Glycosides of marine invertebrates-IV. A comparative study of the glycosides from Cuban sublittoral holothurians. Comparative Biochemistry and Physiology 52:413-417.
- Hamel J.F. and Mercier A. 2000. Cuvierian tubules in tropical holothurian: usefulness and efficiency as a defence mechanism. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 33:115-139.
- Han H., Yi Y.H., Li L., Wang X.H., Liu B.S., Sun P. and Pan M.X. 2007. A new triterpene glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Chinese Chemical letters 18:161-164.
- Han H., Yi Y.H., Liu B.L., Wang X.H. and Pan M.X. 2008. Leucospilataside C, a new sulphated triterpene

- glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Chinese Chemical letters 19:1462–1464.
- Kalinin V.I. 2000. System-theoretical (holistic) approach to the modelling of structural-functional relationships of biomolecules and their evolution: An example of triterpene glycosides from sea cucumbers (Echinodermata, Holothuroidea). Journal of Theoretical Biology 206:151–168.
- Kalinin V.I., Anisimov M.M., Prokofieva N.G., Avilov S.A., Afiyatulloev S.H., and Stonik V.A. 1996a. Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroids (Echinodermata). p. 139–181. In: Jangoux M. and Lawrence L.M. (eds). Echinoderm studies. Balkema, Rotterdam.
- Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Schentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A. and Drozdova O.A. 1996b. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order dendrochirotida: Some trends in the evolution of this group of toxins. Toxicon 34:475–483.
- Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. and Smirnov A.V. 2005. Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy. Phytochemistry Reviews 4:221–236.
- Kerr R.G. and Chen Z. 1995. In vivo and in vitro biosynthesis of saponins in sea cucumbers. Journal of Natural Products 58:172–176.
- Kitagawa I., Nishino T., Matsuno T., Akutsu H. and Kyogoku Y. 1978. Structure of holothurine B. A pharmacologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt. Tetrahedron Letters 11:985–988.
- Kitagawa I., Nishino T. and Kyogoku Y. 1979. Structure of holothurine A. A pharmacologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt. Tetrahedron Letters 16:1419–1422.
- Kitagawa I., Inamoto T., Fuchida M., Okada S., Kobayashi M., Nishino T. and Kyogoku Y. 1980. Structures of echinoside A and B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber *Actinopyga echinites* (Jaeger). Chemical and Pharmacological Bulletin 28:1651–1653.
- Kitagawa I., Kobayashi M. and Kyogoku Y. 1982. Marine natural products. IX. Structural elucidation of triterpenoidal oligoglycosides from the Bahamean sea cucumber *Actinopyga agassizi* Selenka. Chemical and Pharmacological Bulletin 30:2045–2050.
- Kitagawa I., Kobayashi M., Son B.W., Suzuki S. and Kyogoku Y. 1989. Marine natural products. XIX. Pervicosides A, B and C, lanostane-type triterpene-oligoglycoside sulfates from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. Chemical and Pharmacological Bulletin 37:1230–1234.
- Kobayashi M., Hori M., Kan K., Yasuzawa T., Matsui M., Suzuki S. and Kitagawa I. 1991. Marine Natural Product. XXVII. Distribution of lanostane-type triterpene oligoglycosides in ten kinds of Okinawan sea cucumbers. Chemical and Pharmacological Bulletin 39:2282–2287.
- Kornprobst J.-M. 2005. Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Éditions Tec & Docs. 1834 p.
- Li R., Zhou Y., Wu Z. and Ding L. 2006. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. Journal of Mass Spectrometry 41:1–22.
- Liu B.-S., Yi Y.-H., Li L., Zhang S.-L., Han H., Weng Y.-Y. and Pan M.-X. 2007. Arguside A: a new cytotoxic triterpene glycoside from the sea cucumber *Bohadschia argus* Jaeger. Chemistry and Biodiversity 4:2845–2851.
- Liu B.-S., Yi Y.-H., Li L., Sun P., Yuan W.-H., Sun G.-Q., Han H. and Xue M. 2008a. Arguside B and C, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia argus* Jaeger. Chemistry and Biodiversity 5:1288–1297.
- Liu B.-S., Yi Y.-H., Li L., Sun P., Han H., Sun G.-Q., Wang X.H. and Wang Z.-L. 2008b. Arguside D and E, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia argus* Jaeger. Chemistry and Biodiversity 5:1425–1433.
- Mackie A.M. and Turner A.B. 1970. Partial characterization of biologically active steroid glycoside isolated from the starfish *Marthasterias glacialis*. Biochemical Journal 117:543–550.
- Matsuno T. and Iba J. 1966. Studies on the saponins of the sea cucumber. Yakugaku Zasshi 86:637–638.
- Matsuno T. and Ishida T. 1969. Distribution and seasonal variation of toxic principles of sea cucumber (*Holothuria leucospilota* Brandt). Experientia 25:1261.
- Nigrelli R.F. 1952. The effect of holothurin on fish, and mice with sarcoma 180. Zoologica 37:89–90.
- Ohta T. and Hikino H. 1981. Structures of four new triterpenoidal oligosides, bivittoside A, B, C and D, from the sea cucumber *Bohadschia bivittata* Mitsukuri. Chemical Pharmacological Bulletin 29:282–285.
- Prokofieva N.G., Chaikina E.L., Kicha A.A. and Ivanchina N.V. 2003. Biological activities of steroid glycosides from starfish. Comparative Biochemistry and Physiology 134:695–701.
- Radhika P., Anjaneyulu V., Rao P.V.S., Makarieva T.N. and Kalinovosky A.I. 2002. Chemical examination of the echinoderms of Indian Ocean: The triterpene glycosides of the sea cucumbers: *Holothuria nobilis*, *Bohadschia aff. tenuissima* and *Actinopyga mauritana* from Lakshadweep, Andaman and Nicobar Islands. Indian Journal of Chemistry 41:1276–1282.

- Rodriguez J., Castro R. and Riguera R. 1991. Holothurinosides: new antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Tetrahedron* 47:4753–4762.
- Silchenko A.S., Stonik V.A., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., Zaharenko A.M., Smirnov A.V., Mollo E., and Cimino G. 2005. Holothurins B₂, B₃ and B₄, new triterpene glycosides from Mediterranean sea cucumbers of the genus *Holothuria*. *Journal of Natural Products* 68:564–567.
- Sun G.-Q., Li L., Yi Y.-H., Yuan W.-H., Liu B.-S., Weng Y.Y., Zhang S.-L., Sun P. and Wang Z.-L. 2008. Two new cytotoxic nonsulfated pentasaccharide holostane (=20-hydroxylanostan-18-oic acid -lactone) glycosides from the sea cucumber *Holothuria grisea*. *Helvetica Chimica Acta* 91:1453–1460.
- Thompson J.E., Walker R.P. and Faulkner D.J. 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology* 88:11–21.
- Van Dyck S., Gerbaux P. and Flammang P. 2009. Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology B- Biochemistry and Molecular Biology* 152(2):124–134.
- Van Dyck S., Gerbaux P. and Flammang P. 2010. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Marine Drugs* 8(1):173–189.
- Van Dyck S., Flammang P., Meriaux C., Bonnel D., Salzet M., Fournier I. and Wisztorski M. in press. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: Contribution of MALDI MSI for the study of saponins in Cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS ONE*.
- Wu, J., Yi, Y.-H., Zou, Z.-R., Wu, H.-M., and Tang, H.-F. 2006a. Two new triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria nobilis*. *Chinese Traditional Herbal Drugs*. 37: 497-500.
- Wu, J., Yi, Y.-H., Tang, H.-F., Wu, H.-M., Zou, Z.-R., and Lin, H.-W. 2006b. Nobilisides A–C, three new triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria nobilis*. *Planta Medica* 71:932–935.
- Wu J., Yi Y.-H., Tang H.-F., Zou Z.-R. and Wu H.-M. 2006c. Structure and cytotoxicity of a new lanostan-type triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria hilla*. *Chemical Biodiversity* 3:1240–1254.
- Yamanouchi T. 1955. On the poisonous substance contained in holothurians. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 4:183–203
- Yasumoto T., Nakamura K. and Hashimoto Y. 1967. A new saponin holothurin isolated from the sea cucumber *Holothuria vagabunda*. *Agricultural Biology and Chemistry* 31:7.
- Yuan W.-H., Yi Y.-H., Xue M., Zhang H.-W. and La M.-P. 2008. Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 6:105–108.
- Zhang S.-Y., Yi Y.-H. and Tang H.-F. 2006. Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria fuscocinerea*. *Journal of Natural Products* 69:1492–1495.