

Extraction de l'isostichotoxine de *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) lors de la transformation de cette holothurie

I. Alfonso, J.E. Tacoronte et J.A. Mesa

Introduction

On utilise les holothuries, principalement des familles Holothuridae et Stichopodidae, pour la fabrication d'une boisson tonique traditionnelle et pour la recherche biomédicale (Conand, 2006). Ces animaux représentent une part importante des prises de la pêche de diverses espèces d'invertébrés qui se pratique dans la région indo-pacifique à des fins traditionnelles et alimentaires. Toutefois, depuis le milieu des années 90 jusqu'à la fin du siècle, de nouveaux débouchés de l'exploitation des holothuries sont apparus tant pour la recherche médicale que pour l'aquariophilie (voir le site Web du Secrétariat de la CITES : <http://www.cites.org>, 2002). Les bioprospecteurs ont commencé de s'intéresser aux holothuries pour des travaux de recherche et développement à partir de produits naturels. Plusieurs produits issus d'extraits de bêche de mer sont apparus sur le marché ces dernières années, notamment ArthiSea et SeaCuMax (pour combattre l'arthrite), des compléments alimentaires et Sea Jerky (Morgan, 2000).

Les holothuries contiennent de la chondroïtine et de la glucosamine, importants composants des cartilages, et d'autres substances bioactives dotées de propriétés anti-inflammatoires et antitumorales (Mindell, 1998 ; Herecia et Ubeda, 1998), ainsi que fongicides (Darah et al., 1995). Certains composés extraits des holothuries ont des applications dans la prévention et le traitement de certains cancers, la lutte contre des infections bactériennes, fongiques ou virales (Hamel, 1997). En Malaisie, les chercheurs travaillent sur la fabrication de nouveaux médicaments et produits pharmaceutiques à partir des holothuries, telles l'huile "gamat oil", l'eau "gamat water" la "awal gamat" (Baine et Choo, 1999 ; Choo et al., 2004 ; Zaidnuddin et Kamarruddin, 2006).

L'extraction de substances bioactives par la transformation de *Isostichopus badionotus* a commencé à Cuba en 2003 (Alfonso et al., 2004). On a obtenu ces métabolites comme sous-produits en faisant bouillir dans de l'eau de mer de grandes quantités d'holothuries. Généralement, on rejette l'eau de cuisson à la mer telle quelle, après qu'elle a refroidi. On sait que les holothuries acquièrent des caractéristiques toxiques et produisent des glucosides triterpéniques antifongiques de l'holostane de type 1-5 ayant des propriétés biologiques reconnues. Sur la base de ces faits, la recherche actuelle recommande d'utiliser l'eau de mer où ont bouilli des holothuries et propose une méthode pour isoler ces métabolites. Elle porte aussi sur l'extraction de composés isolés des sous-produits de *I. badionotus*.

Il s'agit de traiter l'eau de mer bouillie avec une solution acide, de procéder au séchage en employant des solvants

(par ex., éthanol et éluants moyennement polaires), d'inverser les conditions des phases avec du Polycrom-XAD-2, de l'Amberlite et par chromatographie avec SiO_2 , et d'obtenir ainsi l'isostichotoxine.

Extraction de la toxine

En juin 2005, on a prélevé cinquante spécimens (pesant 15 kg au total) de *Isostichopus badionotus*, certifiés authentiques lors des travaux d'échantillonnage par Alfonso (spécimen de référence : ISO-IJ-04), (fig. 1), en plongeant à Horiguelas Keyes, situé par $20^{\circ}43.03'N$ et $78^{\circ}16.04'O$, à des profondeurs comprises entre 5 et 12 m. On a filtré l'eau de cuisson (10 L), puis traité l'extrait aqueux en le brassant avec 100 mL d'acide sulfurique à 10 % (H_2SO_4). On a établi le pH à 2,8 puis laissé la solution reposer toute la nuit. On a décanté la phase aqueuse et on y a ajouté de l'éthanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

On a ensuite agité le mélange pendant une heure à 25°C , puis on l'a filtré et on a prélevé la couche supérieure. On a ensuite élevé le pH à 6, concentré la phase aqueuse sous vide et on en a retiré un extrait avec du n-butanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$). On a évaporé l'extrait butanolique et séparé ses composantes par chromatographie sur colonne (XAD-2, Polychrome, 0,5 kg, éluant 0,5–0,7 L 50 % d'éthanol), puis concentré cet éluant. Le produit final a été dissous dans un mélange d'éthanol, chloroforme et eau (100:100:7 v v⁻¹) et purifié par chromatographie sur colonne (Silica gel Mesh 60–230, Merck).

L'isostichotoxine³, mélange de glycosides triterpéniques naturels (mp: plus de 247°C avec décomposition), donne une réaction de Liebermann-Burchard positive (stéroïdes et triterpènes), qui produit par hydrolyse acide (7 % d'acide sulfurique à 100°C) une sorte de mélange de glucides (taches colorées apparaissant sous l'effet du réactif acide d'aniline phosphorée). L'isostichotoxine se caractérise par un maximum de $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ et 1745 cm^{-1} à la spectroscopie infrarouge (FT-IR). On a purifié l'isostichotoxine brute par recristallisation à partir de méthanol (ou d'éthanol), puis testé son activité antifongique in vitro.

Voici ce qui en est résulté: on a dissout des échantillons d'isostichotoxine cristalline pour produire du diméthylformamide en solution aqueuse de 17,5 % et obtenir une solution de 2 mg mL^{-1} . On a dilué la solution obtenue avec de l'eau stérile, puis on l'a répartie dans plusieurs boîtes de gélose, chacune ayant étéensemencée avec un organisme différent. Les résultats sont reproduits au tableau 1 ci-dessous.

1. Project Leader, Fishery Research Centre, 5th Ave. y 246, Barlovento, Sta. Fe, Mpio. Playa. CP 19100 Havana City, Cuba. Courriel: irma@cip.telemar.cu
2. CIIQ. Centre for Engineering and Chemical Researches, CIIQ. Via Blanca e/ Palatino e Infanta, Cerro. CP 10200. Havana City, Cuba. Courriel: jmorales@ciiq.minbas.cu
3. 2005-0236, Cuba, NATURAL FUNGICIDE COMPOSITION, 18 Novembre 2005, J.E. Tacoronte Morales, J.A. Mesa Diaz et I. Alfonso Hernandez



Figure 1. *Isostichopus badionotus*, une holothurie exploitée à Cuba.

On a appliqué sur la peau malade de patients une solution alcoolique aqueuse d'isostichotoxine à un taux de concentration de 0,01 %, une ou plusieurs fois par jour, pendant une durée de trois jours à quatre semaines. Les résultats obtenus sont reproduits au tableau 2 ci-dessous.

On pourrait dire, à titre de conclusion préliminaire, que l'isostichotoxine pourrait être utilisée sous forme d'un mélange fongicide pour le traitement thérapeutique de certaines infections fongiques chez les humains.

Tableau 1. Activité antifongique de *I. badionotus* prélevé dans les eaux s'étendant au sud-est de Cuba

Micro-organismes	Concentration minimale inhibitrice (µg mL ⁻¹)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	5,8–6,2
<i>Bacillus subtilis</i>	88
<i>Candida albicans</i>	13,6–16,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79,9–82,3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	> 100
<i>Microsporus canis</i>	56,3
<i>Escherichia coli</i>	> 100
<i>Torula utilis</i>	2,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,8

Tableau 2. Actions fongicides observées sur une peau malade

Efficacité	Espèces de champignon				Nombre de malades
	<i>Pompholyx trichophytia</i>	<i>Tricophytia</i> at (sur une partie du duvet)	<i>Tinea versicolor</i>	<i>Candida erosio interdigitalis</i>	
Très efficace	10	1	1	0	12
Efficace	7	2	0	1	10
Inefficace	3	1	0	0	4
Nombre total de malades (%)	20	4	1	1	26

77 Aucun effet secondaire n'a été détecté pendant le traitement

Bibliographie

- Alfonso I., Frías M.P., Aleaga L. and Alonso C. 2004. Current status of the sea cucumber fishery in the southeastern region of Cuba. p. 151–159. In: Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.-F. and Mercier A. (eds). Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO. 2004. 457 p.
- Baine M. and Choo P.S. 1999. Sea cucumber fishery and trade in Malaysia. The conservation of sea cucumbers in Malaysia: Their ecology, taxonomy and trade. CITES webpage: <http://www.cites.org>.
- Choo P.S. 2004. Fisheries, trade and utilization of the sea cucumbers in Malaysia. p. 57–68. In: Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.-F. and Mercier A. (eds). Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO. 2004. 457 p.
- Conand C. 2006. Sea cucumber biology: taxonomy, distribution, biology, conservation status. p. 33–50. In: Bruckner A. (ed.). Proceedings of the CITES Workshop on the conservation of sea cucumbers, NOAA Technical Memorandum, NMFS OPR 34. 244 p.
- Darah I., Stheesh N. and Ibrahim C.O. 1995. Growth inhibition of dermatophytes by atratoxins of *Holothuria atra*. Biosci-Penang 6(1):40–48.
- Hamel J.F. 1997. Sea cucumber current fishery and prospects for aquaculture. Aquaculture Magazine 23(1):42–43.
- Herecia F. and Ubeda A. 1998. Anti-inflammatory activity in mice of extracts from Mediterranean marine invertebrates. Life Sciences 62(9):115–120.
- Mindell E. 1998. The supplement bible. New York, New York: Simon and Schuster. 284 p. [également disponible à: <http://www.addall.com/detail/0684856395.html> 2000]
- Morgan A. 2000. Sea cucumbers in demand. Seafood New Zealand 8(6):69–70.
- Zainuddin I. and Kamarruddin I. 2006. National Report Malaysia. p. 169–180. In: Bruckner A.W. (ed). Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumber in the families Holothuriidae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum NMFS OPR 34. 244 p.