

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Madrid (Spain)

## Isolement d'hormones de métamorphose dans l'orthoptère *Dociostaurus maroccanus*\*

par  
M.<sup>a</sup> Dolores Stamm

(Recibido para publicar el 1 de octubre de 1958)

Dans un travail antérieur (1) en collaboration avec KARLSON on démontra la présence en imago de *Bombyx mori* des deux hormones qui réglen la métamorphose des insectes  $\alpha$ - et  $\beta$ -ecdison. Celles-ci ont beaucoup d'importance dans les développement post-embryonnaire et participent à la regulation du processus des mues et differentiation. Pour celà on les a appelées aussi hormones de mues ou de pupation. L'organe qui les sépare est la glande prothoracique, laquelle a besoin de l'estimule de l'hormone prothoracicotrope des cellules neurosegregatives du cerveau.

Les deux hormones avaient été isolées en 1954 en forme cristalline par BUTENANDT et KARLSON (2, 3) à partir d'un extrait des chysalides du même insect *Bombyx mori*, et notre travail fut réalisé pour constater si les hormones se trouvaient aussi dans d'autres stades du développement.

Actuellement nous avons voulu observer si les ecdisones étaient aussi dans les orthoptères. Pour réaliser notre propos nous avons commencé ce travail, lequel nous a permis d'isoler les deux hormones dans l'orthoptère *Dociostaurus maroccanus*.

Nous sommes partis de 10 Kg. d'insectes adultes de l'espece citée lesquels furent conservés en méthanol. Après nous les avons triturés convenablement et les extraits méthanoliques obtenus, après une première purification furent évalués biologiquement et on a verifié qu'ils étaient actives.

L'extraction du matériel initial ainsi que les postérieurs traitements qui ont l'object de priver les hormones d'autres

\* Communication to the 4th International Congress of Biochemistry, Wien, September, 1958.

substances que les impurifient en s'appuyant sur leur solubilité dans l'éther et dans l'acetate d'éthyle furent réalisées également à la façon avant indiquée dans le travail de BUTENANDT et KARLSON (2). Par separation chromatographique et distribution contrecourant nous avons obtenu des fractions chaque fois plus actives, que nous avons valorées au moyen de «test Calliphora» ou par l'identification en elles des hormones par chromatographie sur papier.

Selon nous avons déduit des expériences réalisées, l'activité biologique des extraits de *Dociostaurus maroccanus* est ôue aux hormones déjà connues  $\alpha$  et  $\beta$ -ecdisonne. À côté de celles-ci se trouvent aussi comme dans le *Bombyx mori*, de la quinurine, et une autre substance toxique puisque injectées dans les larves à la dose de 0,1  $\gamma$  provoque la mort de presque toutes les larves en peu d'heures.

Dans l'aspect quantitatif nous pouvons affirmer que la concentration des hormones dans les extraits de *Dociostaurus maroccanus* est supérieure à celle qui existe dans un extrait équivalent de chrysalides ou imagos de *Bombyx mori*, puisque avec si peu de quantité de material initial (10 kg.) nous avons réussi 11 mg. de  $\alpha$ -ecdisonne et 13 mg. de  $\beta$ -ecdisonne, lesquelles ont été identifiées par leur point de fusion dans le microscope à platine chauffante de KOFFER, leur Rf dans la chromatographie sur papier, leur coefficient de répartition, leur spectre ultraviolette et leur activité biologique.

### Partie expérimentale

Le material conservé en methanol, constitué par 10 Kg. d'insectes adultes de l'orthoptère *Dociostaurus maroccanus* a été broyé dans un broyeur ; on a filtré la suspension obtenue et on a évaporé au vide la solution methanolique en obtenant ainsi 307 gr. d'un extrait de consistence sirupeuse (Extrait I) Aussitôt on a homogenisé dans un Turmix le residu insoluble avec environ 15 litres de methanol, en répétant l'opération 2 fois consecutivement. L'homogenat a été centrifugé et la solution methanolique decantée, de couleur jaune brune, a été évaporée aussi au vide jusqu'à obtenir un extrait semblable à l'antérieur (Extrait II=359 gr).

Chacun d'eux a été extrait avec 4 ou 5 fois son poids en eau et après éliminer par centrifugation les substances insolubles on a extrait avec le butanol la solution aqueuse. La couche butanolique a été lavée comme on indique dans le travail de BUTENANDT et KARLSON (2) et les résidus obtenus (17.63 gs. et 20.56 gs. respectivement) ont été filtrés par colonne d'oxyde d'aluminium. Dans la colonne apparaissent deux zones, la pre-

mière d'elles a été éluée avec le butanol et la deuxième avec du méthanol. Aussitôt les éluats butanoliques (4.65 gs. et 7.68 gs.) ont été distribués entre l'éther et l'eau et dans l'acétate d'éthyle/eau, en obtenant après l'évaporation 0.413 gr. et 0.366 gr. de deux huiles de couleur obscure, lesquels étaient actives biologiquement. L'éluat méthanolique était toxique, et injectée dans les larves de *Calliphora* à la dose de 0.1  $\gamma$  il produit la mort de 75 %.

*Chromatographies fractionnées des concentrés des hormones.*

Les concentrés des hormones ont été chromatographiés au travers de l'oxide d'aluminium d'activité 4 selon BROCKMANN et SCHODDER et ont repris les éluats fractionnement en employant comme éluant :

		1er Chromatographie	2e Chromatographie
Butanol-Acétat d'éthyle	(1 : 3)	Fractions 1-6	Fractions 1-11
Méthanol- " "	(1 : 4)	" 7-15	" 12-29
" " "	(1 : 1)	" 16-23	" 30-43

Pour localiser dans quelles fractions se trouvait la substance active ont analysé par chromatographie sur papier les fractions, en employant de l'eau saturé de butanol/eau comme solvant. Comme cela ont pu constater que presque dans toutes les fractions apparaissait après l'impregnation avec de l'acide sulfurique une tache avec fluorescence bleu à l'ultraviolet dont le Rf correspondait à l'hormone (0.71 est celui de la  $\alpha$ -ecdisonone et un peu plus grand est celui de la  $\beta$ - puisque celle-ci est plus soluble dans l'eau que l'antérieur).

TABLE I

Fraction	Dose pour larve	Activité
3	2 $\gamma$	15 %
7	5 $\gamma$	93 %
13	1 $\gamma$	58 %

En même temps ont valoré aussi l'activité biologique de quelques unes des fractions de la même, en employant le test *Calliphora*. Les résultats sont indiqués dans les tables I (qui correspondent à la 1.<sup>ère</sup> chromatographie) et II (correspondant à la 2.<sup>ème</sup>).

Aussitôt ont réuni les fractions 2-20 de la 1.<sup>ère</sup> chromatographie en obtenant 245 mg. d'un concentré, lequel à la dose de 1  $\gamma$  présentait une activité de 52 %.

TABLE II

Fraction	Dose pour larve	Activité
22	1 $\gamma$	89 %
29	2 $\gamma$	93 %
31	2 $\gamma$	68 %

1.<sup>ère</sup> Distribution contrecourant. (DCC)

Les 245 mg. du concentré d'hormones ont été soumis à une distribution contrecourant selon CRAIG dans le système cyclohexane : butanol : eau (6 : 4 : 10). La relation des volumes entre les deux phases supérieure et inférieure fut 1/1 et on l'a réalisé dans 25 étapes.

2.<sup>o</sup> Distribution contrecourant

Les fractions 3-16 du premier DCC lesquelles sont les plus actives dans la valoration biologique ont été de nouveau distribuées dans la même système employé antérieurement, en valorant ensuite l'activité biologique de quelques fractions. (table III).

TABLE III

Fraction	Dose pour larve	Activité
2	5 $\gamma$	6 %
10	1 $\gamma$	38 %
13	0.1 $\gamma$	43 %

3.<sup>o</sup> Distribution contrecourant

Pour une nouvelle distribution des fractions 2-17 du 2.<sup>o</sup> DCC dans le même système ont eu déjà dans la fraction 14 un maximum en substance et activité, qui correspond à un coefficient de répartition 1.28 c'est à dire qui coïncide avec celle de la  $\alpha$ -ecdisonne, selon déterminations de BUTERNANDT et KARLSON.

4.<sup>o</sup> Distribution contrecourant

Les trois premières fractions de la 2.<sup>o</sup> chromatographie fractionnée (90.5 mg.) on les a distribuées aussi de la même manière indiquée avant.

Le maximum de substance et activité se trouva dans la fraction 2,5, qui correspond à un coefficient de repartition  $G=0.13$  identique à celui trouvé par KARLSON pour la  $\beta$ -ecdisonne.

### 5.° Distribution contrecourant

Les fractions 4-21 de la 2.° chromatographie on les a distribuées aussi en contrecourant dans le même système avant indiqué, et on a réalisé la distribution en 33 étapes.

### 3.° Chromatographie fractionnée

Les fractions plus actives de la distribution antérieure (10-28) on les a chromatographiées de nouveau sur de l'oxyde d'aluminium d'activité 4, en employant comme éluant :

Butanol - Acetat d'éthyle (1 :3) (Fractions 1-3).  
Methanol- " " (1 :4) ( " 4-10).

La fraction 2 on l'analysé par chromatographie sur papier dans le système eau saturée de butanol/eau, et on a eu deux taches de  $R_f=0.5$  et  $R_f=0.7$  respectivement. La première des deux a été identifiée par chromatographie de comparaison avec la quinurine, substance qui accompagne les hormones de pupation jusqu'à de hauts degrés de pureté. Les fractions 4 et 5 étaient cristallisées. Les cristaux furent recristallisés dans l'eau, et on a eu alors des aiguilles entrecroisées.

### Caractérisation des substances isolées

Les cristaux aciculaires obtenus des fractions 4 et 5 de la 3.° chromatographie, ainsi que les obtenus après avoir recristallisé dans l'eau la fraction 14 du 3.° DCC ont été analysés par chromatographie sur papier dans le système de l'eau saturé de butanol/eau, obtenant une tache de  $R_f=0.7$  avec fluorescence bleu à l'ultraviolet après avoir impregnée le papier avec de l'acide sulfurique. Dans un autre chromatogramme non traité avec de l'acide sulfurique on a pu éluer la zone correspondante au dit  $R_f$  constatant qu'elle était intensivement active au test *Calliphora*. Le spectre ultraviolet présente un maximum en 244  $m\mu$ . Dans le microscope à platine chauffante de KOFFLER les cristaux subissent à 162° une transformation, avec laquelle ils se fondent partiellement, recristallisent après de nouveau, et se fondent déjà définitivement entre 235-237°, qui

est le point de fusion que donne BUTENANDT et KARLSON pour la  $\alpha$ -ecdisonone. A cause de la quantité réduite obtenue il n'a pas été possible d'apporter un plus grand nombre de données analytiques.

La substance contenue dans les fractions 2-3 du 4.<sup>e</sup> DCC presenta un maximum au 242 m $\mu$  dans la lumière ultraviolette. Dans la chromatographie sur papier dans le système cyclohexane : butanol : eau (6 : 4 : 10) apparait un Rf=0,57 identique à celui qui donne KARLSON pour la B-ecdisonone. Le point de fusion est compris entre 177-179°.

### Bibliographie

- (1) P. KARLSON et M.<sup>a</sup> D. STAMM-MENÉNDEZ : *Anal. Fis. Quím. B.*, **LIII**, 243, 1957.
- (2) A. BUTENANDT, and P. KARLSON : *Z. Naturforschg* **9b**, 389, 1954.
- (3) P. KARLSON : *Vitamins and Hormones*, **14**, 227, 1956.