



**HAL**  
open science

# **SUR QUELQUES COMPOSÉS DE LA GELÉE ROYALE ET DES LARVES DE REINES D'ABEILLES**

Daria Bogdanovsky

► **To cite this version:**

Daria Bogdanovsky. SUR QUELQUES COMPOSÉS DE LA GELÉE ROYALE ET DES LARVES DE REINES D'ABEILLES. Les Annales de l'Abeille, 1963, 6 (1), pp.5-33. <hal-00890170>

**HAL Id: hal-00890170**

**<https://hal.science/hal-00890170v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

## SUR QUELQUES COMPOSÉS DE LA GELÉE ROYALE ET DES LARVES DE REINES D'ABEILLES

Daria BOGDANOVSKY

*Institut de Chimie des Substances naturelles,  
Service du Professeur E. LEDERER, Gif-sur-Yvette (Seine-et-Oise)*

---

### SOMMAIRE

Dans le présent travail, nous décrivons la fraction lipidique des larves de reines d'abeilles, et comparons la composition de cette fraction avec celle des lipides de la gelée royale.

Dans une première partie, nous avons recherché, d'une part l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, acide présent dans la gelée royale et doué de propriétés biologiques importantes, et d'autre part les produits du métabolisme de cet acide.

Dans une seconde partie nous avons examiné les autres acides, en particulier les acides dicarboxyliques.

Enfin nous avons étudié le problème de la nutrition en stéroïdes des larves de reines.

---

### INTRODUCTION

La gelée royale a fait l'objet, au cours des dernières années, de nombreuses études chimiques et biologiques. La bibliographie concernant cette substance est relativement abondante, par contre la bibliographie sur les larves de reines d'abeilles est inexistante.

#### I. — GELÉE ROYALE

La gelée royale est une sécrétion des glandes hypopharyngiennes des abeilles ouvrières. Cette sécrétion se distingue des sécrétions hypopharyngiennes des reines d'abeilles, à la fois par sa composition et par ses propriétés biologiques. Elle est fournie aux jeunes larves durant les premiers jours de leur vie. Elle constitue la nourriture unique des larves de reines. Les larves d'ouvrières reçoivent en plus du pollen, dès le troisième jour de leur vie. Chaque cellule royale peut contenir de 200 à 300 mg de gelée royale.

La gelée royale se présente sous forme d'un lait blanc visqueux. Elle contient, d'après BUTENANDT (1959), 60 p. 100 d'eau, 30 p. 100 d'hydrosoluble dont 15 p. 100 de sucre inverti, et enfin 10 p. 100 d'éthérosoluble.

A) *Propriétés biologiques*

De nombreux travaux ont été effectués sur les propriétés biologiques de la gelée royale. CHAUVIN (1959) a résumé ses propriétés thérapeutiques et son emploi dans les convalescences. La gelée royale est particulièrement riche en vitamines.

Les travaux de TOWNSEND, MORGAN et HAZLETT (1959) (1960) ont montré que la gelée royale inhibe le développement de la leucémie et de certaines variétés de tumeurs chez la Souris. Cette activité est due en partie à l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, isolé par TOWNSEND et LUCAS (1940) et identifié par BUTENANDT et REMBOLD (1957).

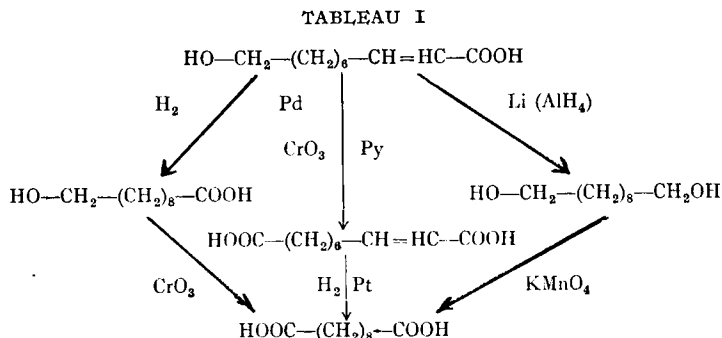
A cette action, doit s'ajouter celle des acides dicarboxyliques, dont l'activité antileucémique a également été étudiée par MORGAN, TOLNAI et TOWNSEND (1960).

La gelée royale possède, *in vitro*, une activité antibiotique, qui serait également due à l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque. Cette activité a été étudiée par BLUM, NOVAK et TABER (1959).

B) *Acides de la gelée royale*a) *Acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque.*

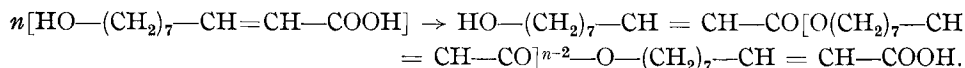
TOWNSEND et LUCAS (1940) ont isolé de la gelée royale, par extraction à l'éther un acide  $C_{10}H_{18}O_3$ . La structure de cet acide a été déterminée par BUTENANDT et REMBOLD (1957).

La réduction de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque par l'hydrure double de lithium et d'aluminium, conduit au décane-diol 1,10. La réduction par l'hydrogène en présence de platine, donne l'acide hydroxy-10 décanoïque. L'oxydation de ces deux alcools conduit à l'acide sébacique. L'acide sébacique lui-même peut être obtenu, après oxydation ménagée en acide décène-2 dioïque, suivie d'hydrogénation de cet acide.



Ainsi que nous l'avons vu, les propriétés biologiques de cet acide sont responsables, en partie, de celles de la gelée royale.

L'activité antitumorale étudiée par TOWNSEND et *al.* (1959) (1960) a été de nouveau étudiée par ROBINSON (1960). Selon cet auteur, il y aurait formation d'un poly-ester.



Ces grosses molécules, ainsi formées pouvant adhérer à la surface des cellules, celles-ci sont entourées et freinées dans leur multiplication.

La synthèse de cet acide ainsi que celle de son isomère *cis*, ont été réalisées par ROBINSON *et al.* (1960, *a*, *b*). Les synthèses de l'acide hydroxy-10 décène-2- *trans* oïque passent par l'intermédiaire de l'acétate d'hydroxy-8 octanal, dont l'obtention par 3 voies différentes est décrite. Ce composé est ensuite condensé sur l'acide malonique dans la pyridine, pour conduire à l'acide acétoxy-10 décène-2 *trans* oïque. Une autre voie de synthèse, à partir de l'acide undécylénique, est proposée par ces mêmes auteurs.

Enfin une modification de la première méthode a été proposée par RAPHAEL (cité par ROBINSON) (1960).

L'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, est une production spécifique des glandes mandibulaires des abeilles ouvrières. Les reines d'abeilles produisent une sécrétion très différente. L'acide céto-9 décène-2 *trans* oïque (Substance royale) a pu être isolé et identifié par CALLOW et JOHNSTON (1960) et par BARBIER *et al.* (1960, *a*, *c*, *d*).



On sait que les sécrétions mandibulaires des reines d'abeilles jouent un rôle très important ; elles sont attractives vis-à-vis des abeilles ouvrières et celles-ci venant lécher leur reine ingèrent ces sécrétions mandibulaires. Il s'ensuit :

— d'une part, ainsi que l'ont montré BUTLER (1957) et PAIN (1957) une inhibition de leurs ovaires ;

— d'autre part, une inhibition de la construction des cellules royales. Ce phénomène a été étudié par BUTLER (1957) (1959).

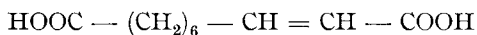
#### b) Autres acides de la gelée royale.

La présence de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque dans la gelée royale permettait de prévoir celle d'une série d'acides pouvant en dériver. L'acide sébacique, signalé par BROWN et FREURE (1959), semble avoir été le premier acide dicarboxylique mis en évidence dans la gelée royale.

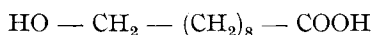


La présence d'acides dicarboxyliques dans la nature est assez rare.

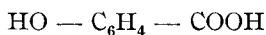
BROWN et FREURE (1959) signalent également la présence dans la gelée royale, de l'acide décène-2 *trans* dioïque. La synthèse de cet homologue de l'acide traumatique a été décrite par ENGLISH (1941).



BROWN, FELAUER et FREURE (1961), ont isolé l'acide hydroxy-10 décanoïque, dont la synthèse à partir de l'acide undécylénique était déjà connue d'après les travaux de BENTON et KIESS (1960).



Dans le même travail, les auteurs signalent la présence de l'acide *p*-hydroxy benzoïque.



Selon les recherches récentes de BROWN et FELAUER (1961) l'acide hydroxy-9 décène-2 *trans* oïque serait également présent dans la gelée royale. Cependant son isolement n'a pas été décrit. Si cette présence était confirmée il serait possible de l'envisager comme précurseur de la substance royale.

TABLEAU 2

*Acides de la gelée royale*

Substances	Formules	P. F.	%
hydroxy-10 décène-2 <i>trans</i> oïque	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$	65°	3 %
sébacique .....	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$	133°	0,02 %
décène-2 <i>trans</i> dioïque .....	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{HC}-\text{COOH}$	160-70°	0,03 %
hydroxy-10 décanoïque .....	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$	72°	0,5 %
p-hydroxy benzoïque .....	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$	214°	0,003 %

C) *Vitamines*

Les différences morphologiques provoquées chez les larves d'abeilles, par la présence de quantités importantes (cas des reines) ou limitées (cas des ouvrières) de gelée royale, ont fait penser à BUTENANDT (1959) que la teneur en vitamines pouvait avoir un rôle particulier.

Nous reportons dans le tableau 3 les pourcentages des vitamines, déterminés dans la gelée royale par BUTENANDT et ses collaborateurs.

TABLEAU 3

*Vitamines de la gelée royale*

Vitamines	Gelée royale donnée aux larves de reines, en $\gamma/\text{g}$ (en poids de substance fraîche)
Vitamine B <sub>1</sub> .....	1,2-18
Vitamine B <sub>2</sub> .....	6-28
Pyridoxine .....	2,2-50
Acide nicotinique .....	48-125
Biotine .....	1,6-4,1
Acide folique .....	0,16-0,5
Acide pantothénique .....	110-320
Inositol .....	78-150

La teneur en acide pantothénique est élevée, et PEARSON et BURGIN (1941) ont montré qu'elle est plus élevée dans la gelée royale qui est distribuée aux larves de reines, que dans celle distribuée aux larves d'ouvrières. Ce fait avait d'abord laissé penser que les quantités d'acide pantothénique étaient déterminantes pour l'induction morphologique.

GARDNER (1948) ayant étudié l'action de l'acide pantothénique sur les drosophiles a trouvé qu'il augmentait considérablement la durée de leur vie. Une action

semblable sur les reines est possible ; elles vivent en effet plusieurs années, alors que la durée de vie d'une ouvrière dépasse rarement un mois.

Le fait que l'activité de la gelée royale sur la morphologie des larves soit due au contenu vitaminique n'est pas encore démontré.

#### D) Biotérine

BUTENANDT et REMBOLD (1958) ont, par chromatographie sur papier, mis en évidence dans la gelée royale, l'amino-2 hydroxy-4 (dihydroxy-1,2 propyl)-6 ptéridine ou biotérine.

Cette substance présente une tache bleue en U. V. et ces auteurs ont réussi à en isoler 4,7 mg à partir de 500 g de gelée royale.

La biotérine avait été précédemment isolée de l'urine humaine par PATTERSON (1955), des drosophiles par FORREST et MITCHELL (1955) et par VISCONTINI (1955). Elle serait également présente d'après VISCONTINI (1955 *b*) (1956) dans les mites et dans les écrevisses.

La synthèse de la biotérine a été décrite par PATTERSON (1956).

Ce composé joue certainement un rôle biologique important car, ainsi que l'a montré BUTENANDT (1959), s'il est possible de le mettre en évidence dans les larves de reines, il est impossible de le détecter dans les larves d'ouvrières.

## II. — UTILISATION DES STÉROLS PAR LES INSECTES

Les travaux de CLARK et BLOCH (1959 *a, b, c*) ont montré que les insectes ne peuvent vivre en absence de stérols. Selon LIPKE et FRAENKEL (1956), ce phénomène ne connaît pas d'exception. D'autre part, il semble d'après les travaux de CLARK et BLOCH (1959, *a*) que les insectes soient incapables d'effectuer la biosynthèse des stérols. De très petites quantités de stérols suffisent à leur survie ; ce besoin possède apparemment un caractère analogue aux besoins en vitamines des animaux supérieurs. Les insectes doivent donc absolument trouver dans leur nourriture les stérols nécessaires à leur développement. Tous les stérols ne peuvent remplir ce rôle pour un insecte donné. Les insectes carnivores sont incapables de vivre avec des stérols végétaux (sitostérol, stigmastérol...) comme unique source de stérols.

Le rôle biologique précis des stérols chez l'insecte est jusqu'à présent inconnu. Des travaux récents de KODICEK et LEVINSON (1960) montrent que les phytostérols sont dégradés par oxydation de la ramification en C<sub>24</sub>.

Des recherches effectuées par MONROE (1960) avec la mouche domestique, indiquent que le cholestérol joue un rôle dans la reproduction. La survie des adultes et même la ponte, ne sont pas affectés par une diminution de la quantité de stérols dans un régime alimentaire synthétique. Mais l'éclosion des œufs peut se trouver réduite de 80 p. 100 dans certains cas. Si ce régime déficient est fourni aux larves, seulement 25 p. 100 arrivent à se métamorphoser.

Il est par ailleurs intéressant de constater, avec les travaux de CLARK et BLOCH (1959, *a*), que les stérols indispensables ne peuvent être remplacés ni par l'acide mévalonique, ou le squalène, ni par le lanostérol ou le diméthyl-4,4' cholestérol ; ce qui indique que la voie de biosynthèse des stérols est bloquée de multiples façons.

(Ces résultats concernant le coléoptère *Dermestes vulpinus* devront être étendus à d'autres espèces, afin de rendre cette constatation plus générale.)

Du point de vue chimique et du point de vue biologique les besoins et l'utilisation des stérols par les insectes, sont encore des problèmes non résolus, et dont l'intérêt pour la compréhension de la biologie générale de ces animaux, est vraisemblablement capital.

BARBIER et SCHINDLER (1959) ont isolé des abeilles le méthylène-24 cholestérol, stérol principal du pollen ; il est remarquable que ce composé n'ait été jusqu'alors isolé que des mollusques par IDLER et FAGERLUND (1955). Selon CLARK et BLOCH (1959, c) le méthylène-24 cholestérol est directement utilisable par les insectes phytophages au même titre que le sitostérol.

## ÉTUDE SUR LES LARVES DE REINES ET LA GELÉE ROYALE

Nous avons eu à notre disposition de grandes quantités de larves de reines (de l'ordre du kg) ce qui représente entre dix et trente mille larves ; nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant d'effectuer des recherches sur ce matériel. Ces larves possédant un intestin imperforé, représentent de véritables « sacs à gelée royale ». Nous avons donc entrepris l'étude des lipides de larves de reines, dans les buts suivants : rechercher les constituants de la gelée royale, déterminer les produits de leur métabolisme, et enfin essayer de découvrir de nouvelles substances.

### I. PLAN GÉNÉRAL DE FRACTIONNEMENT DES LARVES DE REINES

1 kg de larves de reines d'abeilles a été broyé, en suspension dans l'éthanol, et la bouillie ainsi obtenue a été séchée sur plaques d'aluminium, en étuve à 90°, jusqu'à dessiccation complète.

#### A) *Extraction par l'éther*

Une extraction de la poudre résiduelle par l'éther a conduit à 110 g de graisses.

#### B) *Extraction par l'acétone*

Les 110 g de graisses ont été dissous dans environ 500 ml d'acétone. A froid, on obtient un résidu peu important. Après ébullition à reflux pendant 15 mn, l'insoluble disparaît. Il n'est donc pas possible d'isoler de ces lipides une fraction de phosphatides.

#### C) *Séparation par le carbonate de sodium*

Après évaporation de l'acétone, les 110 g de graisses ont été séparés en parties neutres et acides. Pour cela ces 110 g de graisses ont été dissous dans 200 ml d'éther,

et agités en présence de 200 ml de carbonate de sodium 2N. On sépare les couches étherées des couches aqueuses. On effectue trois extractions de cette manière, et on obtient :

a) les extraits aqueux, qui, après acidification par HCl 5N, et extraction à l'éther (l'éther étant lavé 3 fois à l'eau et séché sur sulfate de soude), fournissent 28,8 g d'acides libres.

b) les extraits étherés qui, après lavage à l'eau et séchage, fournissent 78,8 g d'une fraction contenant les neutres et les acides liés.

#### Saponification de cette fraction.

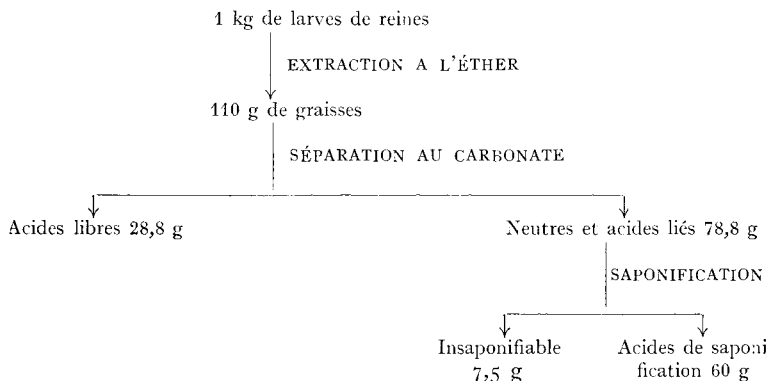
Ces 78,8 g ont été dissous dans 200 ml de benzène, et additionnés de 250 ml de potasse méthanolique 4N, et l'ensemble a été chauffé à ébullition pendant 5 heures.

Après refroidissement et addition d'eau, on extrait à l'éther. On obtient ainsi :

— 7,5 g d'insaponifiable dans les couches étherées.

— 60 g d'acides de saponification dans les couches aqueuses (après acidification par HCl 5N et extraction à l'éther).

TABLEAU 4



## II. ISOLEMENT DES ESTERS DE L'ACIDE HYDROXY-10 DÉCÈNE-2 TRANS OÏQUE A PARTIR DES LARVES ROYALES

L'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque a été isolé de la gelée royale par TOWNSEND et LUCAS (1940) et identifié par BUTENANDT et REMBOLD (1957). Sa présence dans les glandes mandibulaires des abeilles ouvrières a été démontrée par SIMPSON (1960) et par BARBIER et PAIN (1960, *d*).

Il était intéressant de rechercher cet acide dans les lipides de larves de reines. On sait en effet que ces larves, dont l'intestin n'est pas ouvert sur l'extérieur, en font une grande consommation. Nous avons ainsi constaté que l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque était présent, mais en faibles quantités, à l'état libre. Ce fait

nous paraît intéressant, et constitue un élément nouveau pour l'étude du métabolisme de cet acide.

Les acides libres, extraits de leur solution étherée par le carbonate de sodium 2N (voir plan général de fractionnement des larves de reines) ont été chromatographiés sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Les éluats obtenus peuvent être classés en trois fractions principales, correspondant aux acides palmitique et stéarique, aux esters de l'acide hydroxy-10-décène-2 *trans* oïque, et enfin aux acides dicarboxyliques.

#### A) Isolement des acides palmitique et stéarique

La première fraction est éluée par le benzène et par le mélange benzène-éther 95.5. Le spectre IR de cette fraction montre la présence :

- d'un groupe carboxylique (bandes à 3,7, 5,8 et 10,6  $\mu$ ),
- d'un groupe ester (faibles bandes à 5,7 et 8,6  $\mu$ ).

Le point de fusion de cette fraction est de 45-48°.

La chromatographie en phase gazeuse à 225°, des esters méthyliques préparés par action d'une solution étherée de diazométhane, fournit 2 pics dont les volumes de rétention coïncident avec ceux des *palmitate* et *stéarate* de méthyle authentiques (fig. 1) (1).

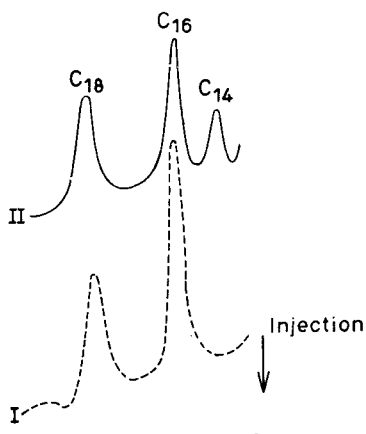


FIG. 1. — Conditions expérimentales

Phase stationnaire . . . . .	huile de silicone
température . . . . .	225°
débit du gaz . . . . .	43 cm <sup>3</sup> /mm
vitesse d'enregistrement . . . . .	12 i/h
sensibilité . . . . .	1 250 volts × 3

I : Esters méthyliques inconnus.

II : Esters méthyliques témoins.

On peut conclure que cette fraction est essentiellement constituée d'acides gras, en mélange avec de petites quantités d'esters (voir ce qui suit).

L'examen des spectres infrarouges et la chromatographie en phase gazeuse des acides obtenus après saponification de ce mélange montrent l'absence de l'acide hydroxy-10-décène-2 *trans* oïque.

(1) Toutes les mesures de chromatographie en phase gazeuse, ont été effectuées sur un chromatographe PYE, avec comme phase stationnaire l'huile de silicone Dow Corning 5 p. 100, fixé sur un chromosorb P.

B) *Isolement des esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque*

Une seconde fraction est éluee par le mélange benzène-éther 9 : 1. Nous avons pu montrer que cette fraction était constituée d'esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque avec les acides myristique, palmitique, stéarique et sébacique ; l'acide palmitique étant le principal acide estérifiant l'acide hydroxylé et l'acide myristique n'étant présent qu'en faibles quantités.

Après cristallisation de cette fraction dans le méthanol, nous avons obtenu un produit dont le point de fusion est de 48-53°.

Son équivalent moléculaire déterminé par titrage est de 560 (calculé par un stéarate d'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque : 452). Cette valeur est calculée par rapport à l'acide stéarique authentique pris comme référence.

Le spectre infrarouge (fig. 2) indique qu'il s'agit d'un acide aliphatique  $\alpha\beta$  insaturé, possédant également une fonction ester (bandes à 3,7-5,7 et 5,8-6,06-8,6 et 10,6  $\mu$ ).

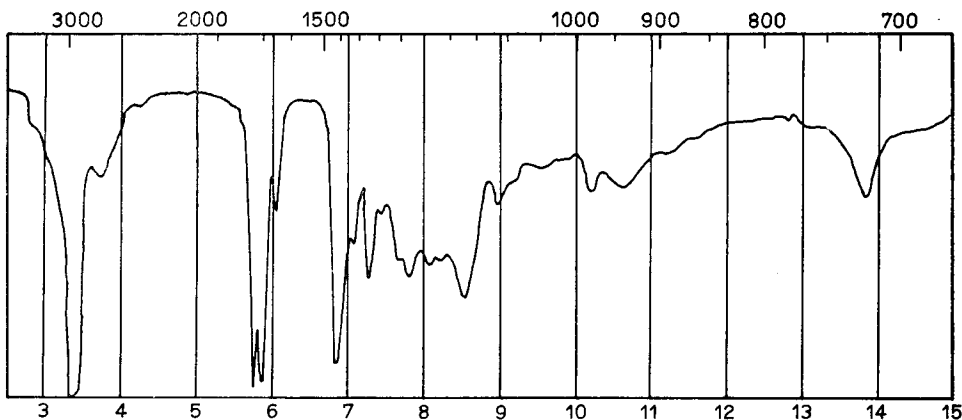


FIG. 2. — Spectre d'absorption infrarouge, mesuré dans le Nujol, des esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque.  
Pour tous les spectres IR, les unités utilisées sont :  
échelle supérieure :  $\text{cm}^{-1}$  ; échelle inférieure :  $\mu$ .

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute  $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_4$  correspondant à un palmitate d'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque.

Le spectre ultraviolet (fig. 3), mesuré dans l'éther, montre un maximum à 212 m $\mu$  ( $\epsilon = 4\ 900$ ) caractéristique d'un acide  $\alpha\beta$  insaturé.

Les esters méthyliques, préparés par action d'une solution étherée de diazo-méthane, ont été chromatographiés en phase gazeuse. A 200° aucun pic n'est observable dans les conditions convenant à l'étude des esters d'acides gras de  $\text{C}_{14}$  à  $\text{C}_{22}$  (fig. 4).

On constate donc ainsi que le titrage acidimétrique l'avait suggéré, que la substance étudiée possède un équivalent moléculaire assez élevé.

*Saponification.*

Nous avons poursuivi l'examen de cette fraction après saponification par la potasse éthanolique à 2,5 p. 100. Aucun insaponifiable n'est obtenu.

La chromatographie en phase gazeuse de l'ester méthylique de la fraction

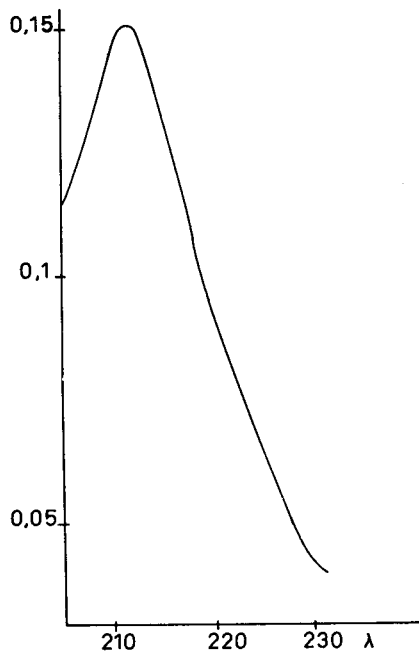


FIG. 3. — Spectre d'absorption ultraviolet des esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque

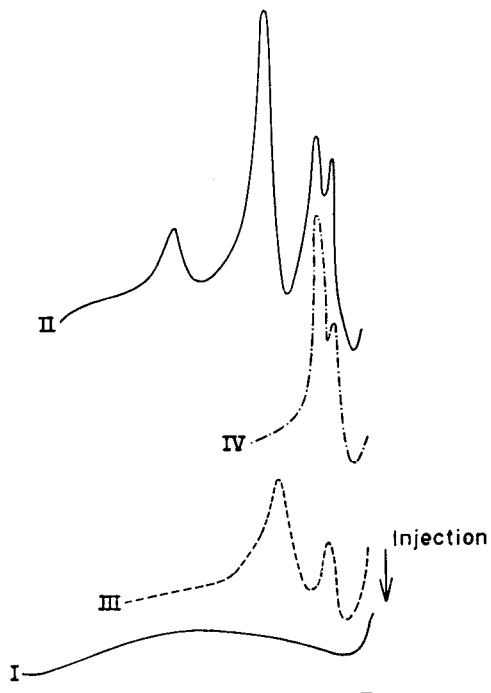


FIG. 4. — Conditions expérimentales

Phase stationnaire .....huile de silicone  
 température .....225°  
 débit du gaz .....43 cm<sup>3</sup>/mn  
 vitesse d'enregistrement.....12 i/h  
 sensibilité .....1 250 volts × 3

- I : Ester de la fraction avant saponification.
- II : Esters de la fraction après saponification.
- III : Esters témoins C<sub>14</sub> et C<sub>16</sub>.
- IV : Ester témoin de l'acide hydroxy-10 décène-2 trans oïque contenant un peu d'acide sébacique.

brute obtenue après saponification, montre qu'il s'agit d'un mélange d'acides gras saturés,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ , d'acide sébacique, avec de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque (fig. 4).

Les acides obtenus après saponification ont été de nouveau chromatographiés sur colonne d'acide silicique, et deux fractions principales ont été obtenues, l'une éluee par le mélange benzène-éther 95 : 5, l'autre par le mélange éther-méthanol 97 : 3.

a) La première fraction est constituée d'un mélange d'acides myristique, palmitique et stéarique. Nous avons déterminé la composition de cette fraction par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse.

b) Les éluats obtenus par le mélange éther-méthanol 97 : 3 sont constitués d'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, contenant une faible quantité d'acide sébacique. Le point de fusion obtenu est de 62-66°, le point de fusion de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque authentique étant de 66°.

Le spectre infrarouge (fig. 5) de l'acide que nous avons isolé, possède les bandes caractéristiques de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque (BUTENANDT et REMBOLD (1957) et BARKER, FOSTER et LAMB (1959)).

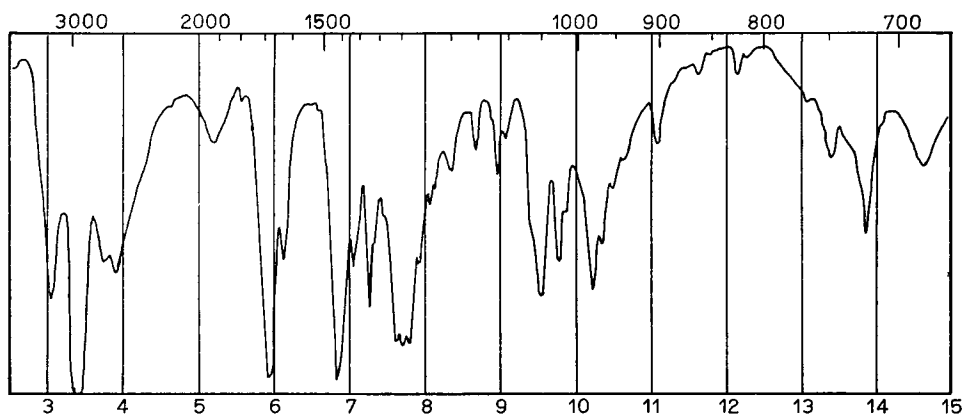


FIG. 5. — Spectre d'absorption infrarouge, mesuré dans le Nujol, de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque.

L'équivalent moléculaire, déterminé par titrage est de 196 (calculé par rapport à l'acide palmitique authentique pris comme référence-calculé pour  $C_{16}H_{32}O_2 = 186$ ).

L'analyse élémentaire est en accord avec une telle composition.

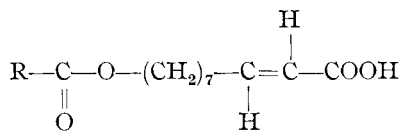
Le spectre UV dans l'éther montre un maximum à 213  $m\mu$  ( $\epsilon = 9\ 000$  pour  $M = 186$  et  $\epsilon = 10\ 400$  pour  $M = 196$ ).

Nous avons complété ces résultats par l'analyse chromatographique en phase gazeuse de cette fraction (fig. 6).

Cette fraction contient, comme le témoin, de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque et de l'acide sébacique.

Etant donné le faible pic observable en chromatographie gaz liquide, pour le myristate de méthyle, il faut considérer que la fraction étudiée est principalement

constituée de palmitate, de stéarate et de sébaçate de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque.



R = chaîne de l'acide estérifiant, par exemple :

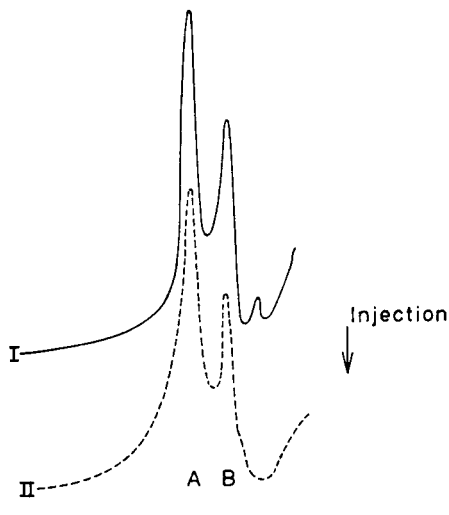
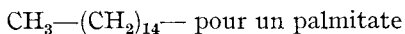


FIG. 6. — Conditions expérimentales.

phase stationnaire .....huile de silicone  
température .....200°  
débit du gaz .....31 cm<sup>3</sup>/mn  
vitesse d'enregistrement....18 i/h  
sensibilité .....1 250 volts × 10

I : Esters méthyliques inconnus.

II : Esters méthyliques témoins.

A) Acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque.

B) Acide sébaçique.

### C) Conclusions

L'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque de la gelée royale se retrouve dans les larves de reines, mais sous forme estérifiée.

Le rôle biologique de ces esters, pas plus d'ailleurs que celui de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, n'est connu.

La valeur élevée de l'équivalent moléculaire, déterminé par titrage, laisse penser que des esters de poids moléculaires plus élevés que les palmitate ou stéarate sont présents dans cette fraction.

D'autre part, l'existence de polyesters de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque (estolides) n'est pas impossible. La formation de tels polyesters a été supposée

par ROBINSON (1960), elle expliquerait, selon cet auteur, l'activité antileucémique de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque. L'ε obtenu pour cette fraction (4 900) est en faveur de cette hypothèse.

#### D) Partie expérimentale

10 g de la fraction « acides libres » (chapitre 1) ont été chromatographiés sur colonne de 350 g d'acide silicique Mallinskrodt. Les éluations ont été effectuées par fractions de 200 ml.

1 à 10 benzène .....	5 970 mg
11 à 14 benzène-éther 95 : 5 .....	1 927 mg
15 à 18 benzène-éther 9 : 1 .....	1 136 mg
19 à 21 benzène-éther 8 : 2 .....	164 mg
22 à 24 benzène-éther 1 : 1 .....	108 mg
25 à 27 éther .....	462 mg
28 à 30 éther-méthanol 97 : 3 .....	80 mg

Pour les examens en phase gazeuse, 1 mg de substance a été repris par une petite quantité (environ 0,5 ml) d'une solution éthérée de diazométhane. Après un contact de quelques minutes, le produit est amené à sec.

##### a) Étude des fractions 1 à 10

Les spectres IR de ces fractions, mesurés dans le Nujol, indiquent qu'il s'agit d'acides aliphatiques, contenant une faible proportion d'esters. Par cristallisation dans le méthanol, on obtient des cristaux : F = 45-48°.

La chromatographie en phase gazeuse des esters de ces fractions montre la présence des esters palmitique et stéarique (fig. 1).

##### Saponification.

La saponification de 3 g de cette fraction a été réalisée. On dissout le produit dans 20 ml d'éthanol à chaud. Après addition de 30 ml de potasse éthanolique à 5 p. 100, la solution a été portée 2 heures au reflux. Après refroidissement, on extrait à l'éther et on acidifie ensuite la couche aqueuse par une solution d'acide chlorhydrique 2 N. On ajoute 50 ml d'eau, et on extrait 3 fois par 40 ml d'éther.

Ces derniers extraits étherés sont lavés 3 fois par 20 ml d'eau, séchés sur sulfate de soude et amenés à sec. On obtient ainsi 2,9 g d'acides.

Ces 2,9 g d'acides ont été chromatographiés sur 100 g d'acide silicique. Les éluations ont été réalisées par fractions de 50 ml.

1 à 4 benzène .....	7 mg
5 à 9 benzène-éther 95 : 5 .....	1 500 mg
10 à 13 benzène-éther 9 : 1 .....	1 219 mg
14 à 16 éther .....	14 mg

L'examen par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques de ces fractions, ne montre pas la présence de nouveaux acides et en particulier d'hydroxy-acides.

##### b) Étude des fractions 15 à 18

Nous avons cristallisé 2 fois cette fraction, la première fois dans le méthanol, la seconde fois dans le mélange éther-pentane. Le produit fond à 48-53°.

Le spectre IR (fig. 2), mesuré dans le Nujol, indique la présence des bandes caractéristiques des fonctions acide et ester aliphatiques.

Nous avons effectué sur ce composé un titrage d'acidité qui a donné les résultats suivants :

1 mg de ce composé consomme 96 mm<sup>3</sup> de potasse éthanolique N/50 ;

2,3 mg de ce composé consomment 225 mm<sup>3</sup> de potasse éthanolique N/50 ;

2,3 mg d'acide stéarique témoin consomment 445 mm<sup>3</sup> de potasse éthanolique N/50 P.M. = 284.

Nous obtenons la valeur de 560.

L'injection des esters méthyliques dans le chromatographe gaz liquide ne fournit aucun pic jusqu'à la position correspondant à l'ester C<sub>22</sub> (fig. 4).

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute :  $C_{26}H_{48}O_4$ .

trouvé	C%	73,20	H%	11,12
calculé		73,53		11,39

Le spectre U V mesuré dans l'éther (1 mg dans 60 ml d'éther) possède un maximum à 212 m $\mu$  (fig. 3).

$$\text{On a donc } \varepsilon = \frac{0,146 \times 560}{0,00166 \times 10} = 4900$$

Quelques tests ont été faits sur ce produit. Le test à l'hypiodite de sodium et l'essai de précipitation d'une 2-4-dinitrophénylhydrazone ont été tous deux négatifs.

#### Saponification.

806 mg de cette fraction, dissous dans 20 ml d'éthanol, ont été saponifiés par chauffage au reflux pendant 1 heure, en présence de KOH à 5 p. 100 ; après extraction par l'éther, la fraction aqueuse est acidifiée par HCl 2 N. On l'extrait ensuite 2 fois à l'éther et on obtient 737 mg d'extrait.

Nous avons chromatographié ces acides sur 50 g d'acide silicique, en éluant par fractions de 30 ml.

1 à 4	benzène	.....	traces
5 à 10	benzène-éther	95 : 5	10 mg
11 à 14	benzène-éther	9 : 1	464 mg
15 à 17	benzène-éther	85 : 15	traces
18 à 20	benzène-éther	7 : 3	traces
21 à 23	benzène-éther	1 : 1	traces
24 à 26	éther	.....	10 mg
27 à 29	éther-méthanol	97 : 3	145 mg
30 à 35	éther-méthanol	95 : 5	traces

Le passage des esters méthyliques de la fraction 11 à 14, élue par le mélange benzène-éther 95 : 5, dans la chromatographe gaz-liquide, permet d'identifier un mélange d'esters d'acides  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  et sébacique, dans lequel l'ester palmitique est le principal composé. Le spectre IR des fractions de 27 à 29 éluées par le mélange éther-méthanol 97 : 3 (après cristallisation de ces fractions dans le mélange éther-pentane) est convenable pour la structure de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque (fig. 5).

Nous avons mesuré le spectre UV (1,8 mg dans 100 ml d'éther).

$$\varepsilon = \frac{0,955 \times 196}{0,0018 \times 10} = 10400$$

Nous avons effectué sur ce composé un titrage d'acidité qui a donné une valeur de 196 pour l'équivalent moléculaire.

1,1 mg consomment 90 mm<sup>3</sup> de potasse éthanolique N/50

1,6 mg d'acide palmitique témoin consomment 100 mm<sup>3</sup> de potasse éthanolique N/50 PM = 256 ;

L'analyse élémentaire  $C_{10}H_{18}O_2$  donne :

Calculé	C%	64,49	H%	9,74
Trouvé		64,20		9,92

L'injection dans le chromatographe gaz-liquide, des esters méthyliques de cette fraction, met en évidence un pic principal, dont le volume de rétention est identique à celui de l'ester de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque authentique ; on observe un second pic correspondant à une certaine quantité d'acide sébacique (fig. 6).

### III. — ÉTUDE DES ACIDES DICARBOXYLIQUES

Deux acides dicarboxyliques : l'acide sébacique et l'acide décène-2 *trans* dioïque, ont précédemment été isolés de la gelée royale (voir introduction). Nous avons pensé que ces acides, et peut-être d'autres, devaient se retrouver dans les larves de reines. Ces acides présentent un intérêt du point de vue biologique ; en effet les travaux de

TOWNSEND (1960) ont montré sur la Souris, l'activité antileucémique de ces acides. Il est donc possible qu'ils participent à l'activité antileucémique totale de la gelée royale.

Une hypothèse récente de Sir Robert ROBINSON (1960) suppose que l'activité antileucémique de la gelée royale serait en rapport avec la possibilité des composés présents à former des estolides (il s'agirait donc d'un effet physique). Le fait que nous ayons isolé des esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, à poids moléculaire relativement élevé, serait en accord avec cette hypothèse.

Nous avons donc recherché ces acides dicarboxyliques, dans les larves de reines d'une part, et dans la gelée royale d'autres part.

#### A) Dans les larves royales

Les acides dicarboxyliques étant plus fortement retenus sur acide silicique, nous les avons principalement recherchés en fin de chromatographie sur colonne.

Nous avons effectué la recherche de ces acides, sur les acides libres d'une part, et sur les acides obtenus après saponification d'autre part. Nous ne les avons trouvés que dans les acides libres.

Dans la chromatographie des acides libres (voir II) nous avons obtenu une importante fraction, éluée par l'éther (462 mg). Nous avons essayé de cristalliser cette fraction, en la dissolvant dans l'éther, et en ajoutant du pentane à 0°.

##### a) Isolement de l'acide décène-2 *trans* dioïque.

Nous avons d'abord isolé 5 mg d'une fraction insoluble dans l'éther. Le point de fusion F : 160-170° et le spectre UV (maximum à 215 m $\mu$ ) nous ont fait penser à l'acide décène-2 *trans* dioïque isolé précédemment par BROWN et FREURE (1959).

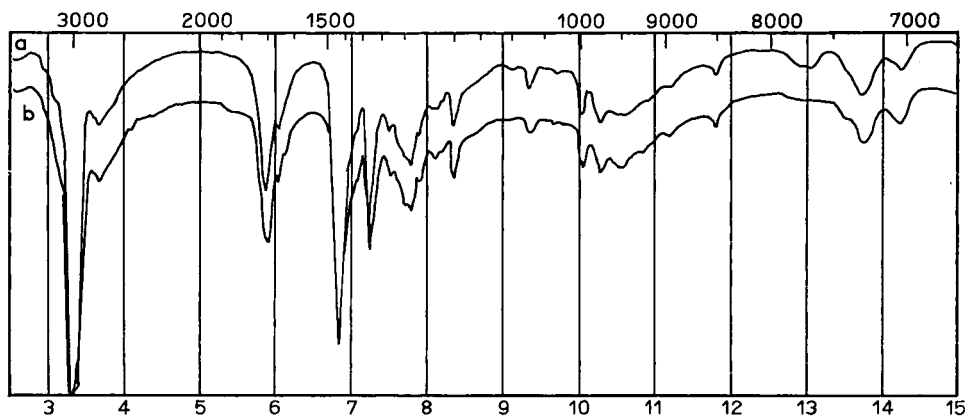


FIG. 7. - Spectres d'absorption infrarouge mesurés dans le Nujol

- a) Acide décène-2 *trans* dioïque isolé.  
b) Acide décène-2 *trans* dioïque authentique.

En fait, le point de fusion de mélange avec un acide décène-2 *trans* dioïque authentique ne présente pas de dépression F : 160-170° ; de plus la comparaison des spectres infrarouges (fig. 7) confirme cette identité.

b) *Identification des acides subérique et sébacique.*

Le reste de la fraction a pu être cristallisé dans le mélange éther-pentane, et nous avons obtenu 225 mg de cristaux. Le spectre infra-rouge des produits cristallisés montre qu'il s'agit d'un mélange d'acides contenant encore de l'acide décène-2 *trans* dioïque.

Nous avons alors étudié ces cristaux par *chromatographie sur papier* en utilisant la technique décrite par BROWN, FELAUER et FREURE (1961).

Nous avons obtenu les  $R_f$  suivants :

Substances	$R_f$
Acide adipique.....	0,32
Acide pimélique.....	0,42
Acide subérique.....	0,41
Acide azélaïque.....	0,46
Acide sébacique.....	0,52
Fraction soluble dans l'éther.....	0,50

Cette séparation sur papier étant mauvaise, nous avons alors étudié ces fractions par *chromatographie en phase gazeuse*. A partir d'esters préparés par action d'une solution étherée de diazométhane, deux séries de chromatographies ont été effectuées l'une à 200° et l'autre à 150°.

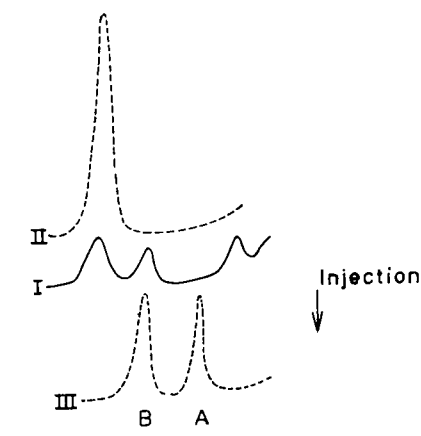


FIG. 8. — *Conditions expérimentales*

phase stationnaire.....	huile de silicone
température.....	200°
débit du gaz.....	26 cm <sup>3</sup> /mn
vitesse d'enregistrement.....	18 i/h
sensibilité.....	1 250 volts × 10

I : Fraction à étudier.

II : Acide décène-2 *trans* dioïque authentique.

III : Acides azélaïque (A) et sébacique (B) authentiques.

Dans la chromatographie à 200° nous avons observé la présence de trois pics. Les volumes de rétention de deux d'entre eux sont identiques aux volumes de rétention des sébacate et décène-2 *trans* dioate de méthyle authentiques (fig. 8).

L'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, ayant un volume de rétention peu différent de celui de l'acide décène-2 *trans* dioïque, nous avons vérifié l'absence de cet acide, dans cette partie de chromatographie, par répétition des essais en présence de témoins internes (fig. 9).

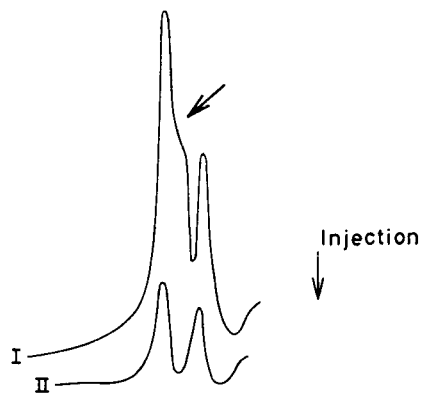


FIG. 9. — Conditions expérimentales

phase stationnaire .....huile de silicone  
température .....200°  
débit du gaz .....32 cm<sup>3</sup>/mn  
vitesse d'enregistrement.....18 i/h  
sensibilités.....1 250 volts × 3

I : Fractions à étudier, contenant en plus de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque.  
II : Fraction à étudier, contenant en plus de l'acide décène-2 *trans* dioïque.

Le volume de rétention du troisième pic est identique, à 150°, à celui du subérate de méthyle (fig. 10).

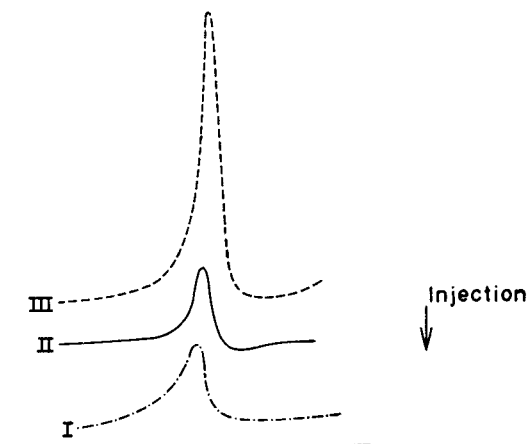


FIG. 10. — Conditions expérimentales

phase stationnaire .....huile de silicone  
température .....150°  
débit du gaz .....32 cm<sup>3</sup>/cm  
vitesse d'enregistrement.....12 i/h  
sensibilité .....1 500 volts × 10

I : Subérate de méthyle.  
II : Fraction à étudier.  
III : Fraction à étudier contenant en plus du subérate de méthyle.

Il est probable que les acides dicarboxyliques mis en évidence dans la gelée royale (voir ci-après) sont également présents dans les larves royales. Mais par suite d'un phénomène de dilution, dû à la présence de nombreuses autres substances lipidiques, il n'a pas été possible de les identifier.

### B) Dans la gelée royale

L'extraction chloroformique de 8 g de gelée royale, séchée 24 heures sous vide à 20°, fournit environ 500 mg d'extrait. Une séparation par le carbonate de sodium fournit ensuite 187 mg de fraction acide, que nous avons chromatographié sur acide silicique.

Les points de fusion de ces fractions sont de 60-80°.

Nous avons ensuite, dans les mêmes conditions que pour les larves royales, examiné ces fractions en chromatographie en phase gazeuse. Seules, les fractions éluées par les mélanges benzène-éther 1 : 1 et 3 : 7 contiennent des acides dicarboxyliques.

Nous avons identifié les acides suivants :

a) Dans les fractions éluées au mélange benzène-éther 1 : 1 (fig. 11) les acides

*pimélique*  
*subérique*  
*sébacique.*

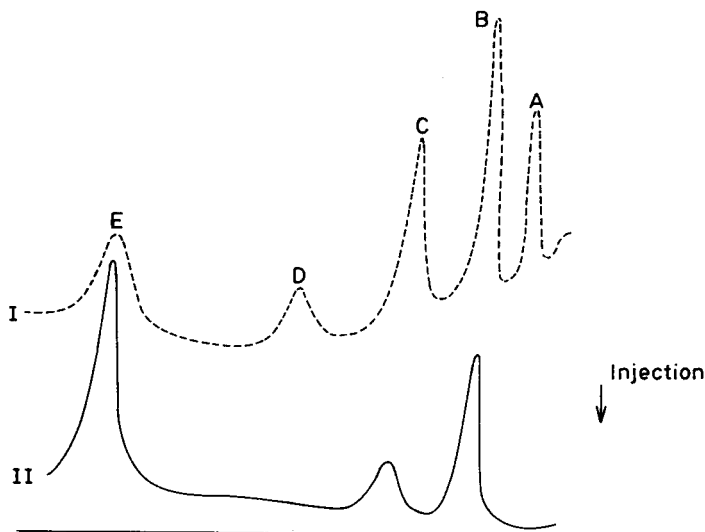


FIG. 11. — Conditions expérimentales

phase stationnaire .....huile de silicone  
température .....150°  
débit du gaz .....21 cm<sup>3</sup>/mn  
vitesse d'enregistrement.....12 i/h  
sensibilité .....1 500 volts × 10

I : Témoins : adipate (A) — pimélate (B) — subérate (C) — azélaate (D) — sébaçate (E).  
II : Fraction éluée au mélange benzène-éther 1 : 1.

b) Dans les fractions éluées par le mélange benzène-éther 3 : 7 nous avons isolé les acides (fig. 12).

*adipique*  
*pimélique*  
*des traces d'acide subérique.*

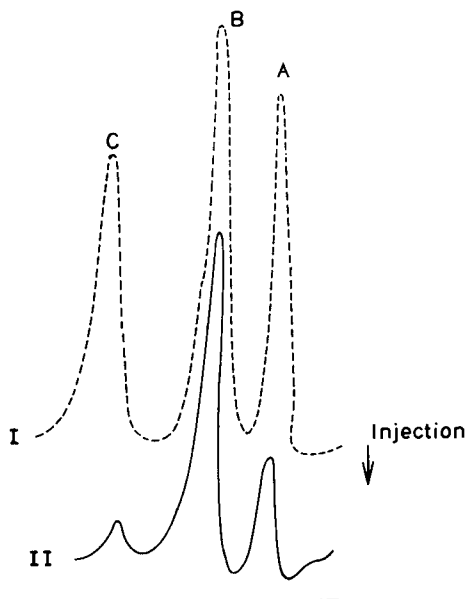


FIG. 12. — Conditions expérimentales

phase stationnaire ..... huile de silicone  
température ..... 150°  
débit du gaz ..... 21 cm<sup>3</sup>/mn  
vitesse d'enregistrement ..... 12 i/h  
sensibilité ..... 1 250 volts × 10

I : Témoins : adipate (A) - - pimélate (B) — subérate (C).  
II : Fraction éluée au mélange benzène-éther 3 : 7.

L'identification de ces substances a été confirmée par la répétition des chromatographies, après introduction de témoins internes dans les échantillons.

Nous avons donc identifié, dans la gelée royale, les acides : adipique, pimélique, subérique, sébacique.

Seuls les acides sébacique et décène-2 *trans* dioïque étaient précédemment cités dans la littérature.

L'évaluation des quantités présentes n'est pas aisée ; cependant la comparaison des pics obtenus, avec celui de l'ester sébacique, permet de déduire les relations suivantes :

Les nouveaux acides identifiés sont en quantités inférieures à celle de l'acide sébacique. (La littérature donne pour cet acide 0,02 p. 100 par rapport au poids sec de la gelée royale.) Les acides pimélique et subérique sont en quantités plus importantes que l'acide adipique, qui n'existe qu'en très faibles proportions. Cependant si on compare la somme des trois acides adipique, pimélique et subérique, on constate que cette somme est au moins égale à la quantité d'acide sébacique.

C) *Conclusions*

Les larves de reines, et la gelée royale, contiennent donc une série d'acides dicarboxyliques. Parmi ces acides, les acides adipique, pimélique et subérique n'avaient jamais été signalés.

Une activité antileucémique sur la Souris ayant été observée par TOWNSEND (1960) pour ces acides, la présence de cette série d'acides est un fait biologiquement intéressant.

D) *Partie expérimentale*a) *Étude des acides dicarboxyliques des larves royales*

Dans la chromatographie des acides libres (chapitres I et II), nous avons obtenu en fin de chromatographie 4 fractions éluées par l'éther, soit 462 mg.

fractions	éluant	mg	cristallisation éther-pentane	PF
—	—	—	—	—
25	éther	98,7	25,8	127-148°
26	éther	161,7	121	132-148°
27	éther	108,3	56,8	130-150°
28	éther-méthanol	98,3	22	130-152°

1) Les fractions 26 et 27 ne sont pas entièrement solubles dans l'éther, et on peut isoler à l'état cristallisé 5 mg de fraction insoluble.

Le spectre infrarouge de ces 5 mg est identique à celui de l'acide décène-2 *trans* dioïque (fig. 7) et le spectre ultraviolet, mesuré dans le chloroforme (1 mg de produit dissous dans 60 ml) présente un maximum à 215 m $\mu$ .

Le point de fusion de cet acide, 160-170°, est identique au point de fusion de l'acide décène-2 *trans* dioïque authentique, et le point de fusion de mélange ne présente pas de dépression.

2) Les cristaux obtenus par cristallisation dans le mélange éther-pentane ont été étudiés :

— Par chromatographie sur papier.

Le solvant de migration utilisé est un mélange :

propanol .....	7
ammoniaque à 28 p. 100.....	3

La durée de migration est d'environ 36 heures.

La révélation se fait à l'aide d'une solution de vert de bromocrésol.

— Par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques préparés à l'aide d'une solution de diazométhane.

Nous avons effectué ces analyses :

à 150° pour l'acide subérique (fig. 10) ;

à 200° pour les acides sébacique et décène-2 *trans*-dioïque (fig. 8 et 9).

b) *Étude des acides dicarboxyliques de la gelée royale*

8 g de gelée royale ont été extraits au chloroforme par ébullition à reflux pendant 12 heures. On sépare les deux couches, on sèche sur sulfate de soude la couche chloroformique, on évapore le chloroforme et on obtient environ 500 mg de résidu.

L'extrait ainsi obtenu est ensuite dissous dans 60 ml de mélange chloroforme-éther 1 : 3.

On sépare les acides par extraction de cette solution par 2 fois 30 ml d'une solution de carbonate de sodium 2 N. On lave une fois par 30 ml d'eau. Après acidification des hydrosolubles réunis, par une solution d'acide chlorhydrique 2 N, on extrait 3 fois par 50 ml du mélange chloroforme-éther 1 : 3. La couche organique a été lavée une fois par 30 ml d'eau, et séchée sur sulfate de sodium.

Nous avons obtenu 224 mg.

*Chromatographie sur colonne.*

Ces 224 mg ont été chromatographiés sur une colonne de 10 g d'acide silicique Mallinckrodt. Les éluats sont de 25 ml.

fractions	éluant	mg
1 à 3	benzène	10 mg
4 à 6	benzène-éther 1 : 1	143 mg
7 à 9	benzène-éther 3 : 7	3 mg
10 à 12	éther	0 mg
13 à 15	éther-méthanol 9 : 1	traces

L'étude par chromatographie en phase gazeuse a été effectuée sur les fractions 1 à 3, 4 à 6 et 7 à 9. Les résultats ont été obtenus avec ces deux dernières fractions.

IV. — RECHERCHE DU *p*-HYDROXY BENZOATE DE MÉTHYLE

BROWN, FELAUER et FREURE (1961) ont décrit l'isolement de l'acide *p*-hydroxy benzoïque à partir de la gelée royale. Cet isolement ayant été effectué après saponification, il était possible de penser à la présence du *p*-hydroxy benzoate de méthyle (Nipagine) précédemment isolé des extraits totaux de reines d'abeilles par BARBIER, LEDERER, REICHSTEIN et SCHINDLER (1960).

Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour rechercher le *p*-hydroxy benzoate de méthyle des extraits de gelée royale d'une part, et des larves de reines, d'autre part :

a) *La chromatographie sur papier*, dans le système chloroforme-formamide selon la technique de ZAFFARONI, BURTON et KEUTMANN (1950).

b) *La chromatographie en phase gazeuse* à 160 et 200°. Ces deux méthodes ont permis de constater l'absence du *p*-hydroxy benzoate de méthyle, dans les deux extraits examinés.

*Conclusion*

L'acide *p*-hydroxy benzoïque, isolé par BROWN, FELAUER et FREURE (1961), existe donc comme tel dans la gelée royale.

*Partie expérimentale*

Pour la chromatographie sur papier par la méthode ascendante, du *p*-hydroxy benzoate de méthyle, nous avons utilisé un papier Whatman n° 1.

Cette feuille a été trempée dans le mélange formamide-acétone 1 : 3. Elle a été ensuite séchée entre deux feuilles de papier-filtre.

Nous avons utilisé comme solvant de développement le système chloroforme-formamide 7 : 3.

Après séchage du chromatogramme, les taches correspondant au *p*-hydroxy-benzoate sont visibles en lumière ultraviolette (taches sombres). Le  $R_f$  est voisin de 0,5.

## V. — PROBLÈME DES STÉROLS ALIMENTAIRES DES LARVES ROYALES

CLARK et BLOCH (1959 *a, b, c*) ont étudié la biogénèse des stérols chez les insectes. Ils ont montré que les insectes ne peuvent vivre en absence de stérols, qu'ils ne peuvent par ailleurs synthétiser.

Or, ainsi que l'a montré von RHEIN (1933), les larves de reines d'abeilles sont nourries uniquement de gelée royale, et la présence de stérols ne paraît pas y avoir

été signalée. Les larves d'ouvrières reçoivent, les deux premiers jours de leur existence, de la gelée royale, puis ensuite du pollen mélangé à la gelée royale. On pouvait se demander quelle pouvait être l'origine des stérols chez les larves de reines, à moins d'envisager un développement en absence de stérols.

Nous avons tenu à vérifier le fait connu que les larves royales ne reçoivent pas de pollen. Nous remercions M. CHAUVIN (Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux de Bures-sur-Yvette) d'avoir bien voulu rechercher le pollen dans la gelée royale d'une part et dans les intestins de larves d'autres part.

Ces recherches ayant été négatives, nous avons alors cherché à mettre en évidence une fraction stérolique dans les insaponifiables de larves royales. Ayant, par chromatographie sur colonne d'acide silicique, isolé une telle fraction, nous en avons étudié la composition. La présence du méthylène-24 cholestérol apporte une solution au problème posé.

#### A) Isolement du méthylène-24 cholestérol à partir des larves royales

600 mg de la fraction insaponifiable ont été chromatographiés sur acide silicique Mallinckrodt.

L'examen systématique de tous les éluats obtenus, par la réaction de Liebermann et par chromatoplaques, a montré la présence d'une importante fraction stérolique, 200 mg, élue par le mélange benzène-éther 95 : 5.

Après deux cristallisations dans le méthanol, nous avons obtenu 45 mg de plaques incolores F. 140-143°. La réaction de Liebermann donne une coloration vert très foncée, elle est donc très positive.

Ce stérol a été identifié au *méthylène-24 cholestérol* le stérol principal des abeilles (BARBIER et SCHINDLER 1959) et du pollen (BARBIER, HUGEL, et LEDERER 1960).

Le pouvoir rotatoire, mesuré dans le chloroforme, est de :

$$(\alpha)_D^{20} = -38 \pm 2^{\circ} \quad (c = 0,8)$$

Le point de fusion de mélange avec un méthylène-24 cholestérol authentique ne présente pas de dépression F. 141-144°.

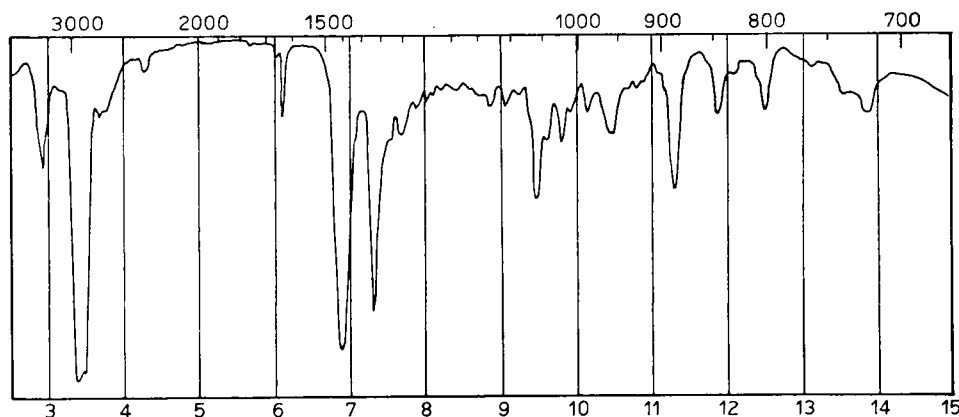


FIG. 13. — Spectre d'absorption infrarouge, mesuré dans le Nujol, du méthylène-24 cholestérol

Le spectre IR (fig. 13) présente bien les bandes caractéristiques du groupe méthylénique à 6,1 et 11,3  $\mu$ ; et il est identique au spectre IR du méthylène 24 cholestérol publié par BARBIER et SCHINDLER (1959). Le  $R_f$  sur chromatoplaques (système pentane-acétate d'éthyle 85 : 15) est identique à celui d'un méthylène-24 cholestérol authentique ( $R_f = 0,23$ ) (fig. 15).

Nous avons de plus préparé deux dérivés :

a) *Un acétate*. — Par action de l'anhydride acétique dans la pyridine.

$$F. 131-135^\circ \quad (\alpha)_{19}^{20} = -46 \pm 2^\circ \quad (c = 0,8 \text{ chloroforme})$$

Le point de fusion de mélange avec un acétate authentique ne présente pas de dépression F. 131-135 $^\circ$  (le point de fusion de cet acétate étant de 131-136 $^\circ$ ).

Le spectre IR présente bien les bandes à 6,1 et 11,3  $\mu$  ainsi que les bandes à 5,8 et 8,1  $\mu$  (groupe acétate).

b) *Un acétate de ceto-24 cholestérol*. — Nous avons obtenu ce produit par ozonisation de l'acétate de méthylène-24 cholestérol.

Le spectre IR (fig. 14) montre la disparition des bandes caractéristiques du groupe méthylénique (6,1 et 11,3  $\mu$ ) et l'apparition d'une bande nouvelle due au groupement cétonique en 24 (5,9  $\mu$ ). Le point de fusion 122-126 $^\circ$  est en accord avec la valeur signalée dans la littérature F. 127 $^\circ$  (IDLER et FAGERLUND 1955).

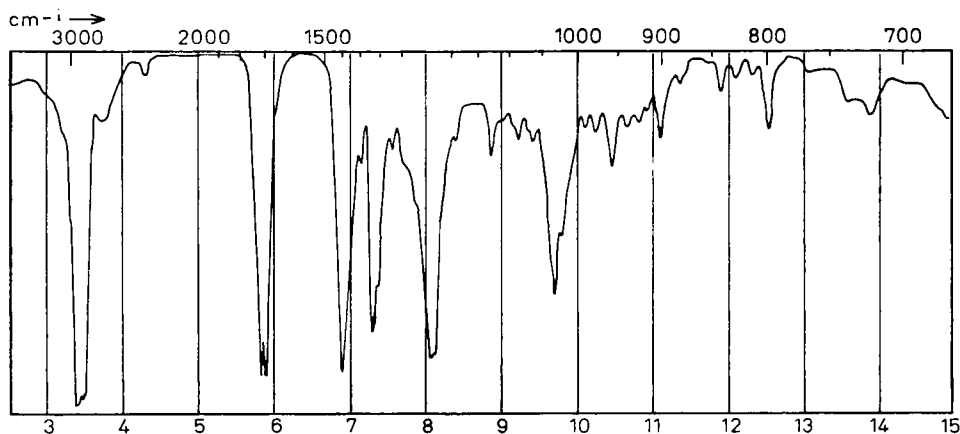
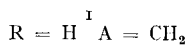
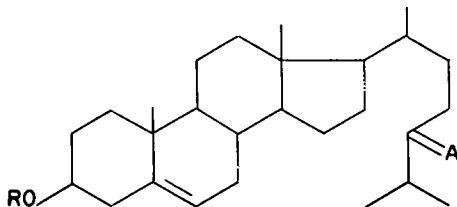
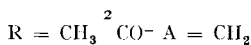


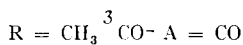
FIG. 14. — Spectre d'absorption infrarouge, mesuré dans le Nujol, de l'acétate de ceto-24 cholestérol



$$\begin{aligned} F. 140-143^\circ \\ (\alpha)_{19}^{20} = -38 \pm 2^\circ \\ R_f = 0,23 \text{ (Fig. 15)} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} F. 133-136^\circ \\ (\alpha)_{19}^{20} = -46 \pm 2^\circ \\ R_f = 0,61 \text{ (Fig. 15)} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} F. 122-126^\circ \\ R_f = 0,52 \text{ (Fig. 15)} \end{aligned}$$

Il était donc certain que les larves de reines ne se développaient pas en absence de stérols. De plus, il devenait nécessaire de vérifier la présence de stérols dans la gelée royale.

### B) Isolement du méthylène-24 cholestérol à partir de la gelée royale

Nous avons recherché la présence de stérols sur un échantillon de gelée royale (correspondant à environ 3 g de matière sèche).

Après une série d'extractions par le mélange éther-chloroforme 3 : 1, nous avons obtenu 374 mg de produit, qui ont été ensuite directement chromatographiés sur colonne d'acide silicique.

Les éluats par le mélange benzène-éther 95 : 5, soit 9 mg, présentent seuls une réaction de Liebermann positive, et montrent, par chromatoplaque, une tache de même  $R_f$  (0,25) que le méthylène-24 cholestérol authentique.

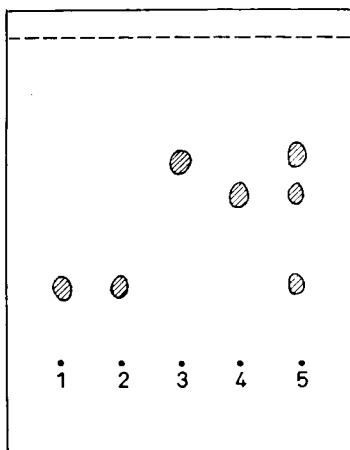


FIG. 15. — Chromatoplaque : mélange acide silicique-plâtre 9 : 1, solvant de développement : pentane-acétate d'éthyle : 85 : 15.

- 1) Méthylène-24 cholestérol authentique.
- 2) Méthylène-24 cholestérol isolé.
- 3) Acétate de méthylène-24 cholestérol.
- 4) Acétate de céto-24 cholestérol.
- 5) 2 + 3 + 4.

Après cristallisation dans le méthanol, nous avons obtenu 3 mg de plaques incolores F. 138-141°.

Le spectre IR-de cette substance est identique à celui du méthylène-24 cholestérol authentique, et présente bien les bandes à 6,1 et 11,3  $\mu$  caractéristiques du groupe méthylénique. Le point de fusion de mélange avec la substance authentique ne présente pas de dépression F. 138-141°.

### C) Conclusions

La présence de méthylène-24 cholestérol dans la gelée royale règle le problème des stérols alimentaires des larves royales. De même que dans le pollen, il existe dans la gelée royale d'autres stérols, dont la séparation et l'étude sont difficiles.

TABLEAU 5

*Constantes physiques du méthylène-24 cholestérol*

Méthylène-24 cholestérol isolé de :	Constantes physiques		R <sub>f</sub> chromatoplaques
	F	( $\alpha$ ) <sub>D</sub> — CHCl <sub>3</sub>	
Huitres .....	143°	— 34,8°	
Reines d'abeilles .....	138-145°	— 31,6 ± 6°	0,24 ± 5 %
Abeilles ouvrières .....	138-140°	— 31,6 ± 2°	0,24 ± 5 %
Pollen .....	141-145°	— 29 ± 1°	0,24 ± 5 %
Larves royales .....	140-143°	— 38 ± 2°	0,23 ± 5 %
Gelée royale .....	138-141°		0,25 ± 5 %

D) *Partie expérimentale*a) *Isolement à partir des larves royales*

600 mg de la fraction neutre provenant de l'extraction générale des graisses (chapitre I) ont été chromatographiés sur une colonne de 200 g d'acide silicique Mallinckrodt. Les éluations sont de 200 ml.

fractions	solvants	mg	Liebermann
1 à 3	benzène	121 mg	—
4 à 6	benzène-éther 98 : 2	12 mg	—
7 à 9	benzène-éther 95 : 5	101 mg	+
10 à 11	benzène-éther 95 : 5	206 mg	+++
12 à 13	benzène-éther 95 : 5	86 mg	—
14 à 16	benzène-éther 85 : 15	57 mg	—
17 à 20	benzène-éther 1 : 1	traces	
21 à 23	éther	traces	

La réaction de Liebermann n'est fortement positive que pour les fractions 10 et 11 éluées au mélange benzène-éther 95 : 5 ; ces fractions correspondent à 206 mg de produit, qui, après deux cristallisations dans le méthanol, donnent 45 mg de plaques incolores F. 140-143°.

Ces cristaux ont été étudiés par chromatoplaques, dans le système pentane-acétate d'éthyle 85 : 15. Après migration du solvant de développement, et séchage de la plaque, on révèle en pulvérisant une solution de chlorure d'antimoine (33 p. 100 dans le chloroforme) et en chauffant à 200° jusqu'à apparition des taches.

L'analyse élémentaire conduit à la formule : C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O

Trouvé	C%	84,35	H%	11,75
Calculé		84,35		11,63

*Formation d'un acétate.*

12 mg de cristaux ont été dissous dans 1 ml de pyridine anhydre, et additionnés de 0,9 ml d'anhydride acétique.

Après 72 heures à la température ambiante, on amène à sec, en entraînant la pyridine par additions successives de 0,5 ml de benzène.

On reprend ensuite par 10 ml d'éther ; on lave 2 fois par 3 ml d'acide chlorhydrique N, 2 fois par 3 ml d'eau, puis 2 fois par 3 ml de carbonate de sodium N et enfin 2 fois par 3 ml d'eau. On sèche la couche étherée sur sulfate de sodium, et on obtient, après évaporation, 11 mg d'acétate brut, qui, après cristallisation dans le méthanol, fournissent 8 mg de plaques incolores.

*Formation d'un acétate de céto-24 cholestérol.*

50 mg d'acétate de méthylène-24 cholestérol ont été dissous dans 10 ml d'acide acétique. Après avoir dosé le débit d'ozone à l'aide d'une solution titrée d'hyposulfite, on fait passer, dans la solution acétique de l'acétate de méthylène-24 cholestérol, 10 fois la quantité théorique d'ozone.

On ajoute ensuite 12 ml d'eau, et on porte à ébullition 5 mn. On extrait ensuite 3 fois par 15 ml de chloroforme, on lave les solutions chloroformiques à l'eau, on les sèche, et on évapore le chloroforme. On obtient ainsi 52 mg de produit. Ces 52 mg sont ensuite chromatographiés sur une colonne de 3 g d'acide silicique.

fractions	éluant	mg
1 à 5	benzène	33 mg
6 à 8	benzène-éther 99 : 1	2 mg
9 à 11	benzène-éther 98 : 2	traces
12 à 14	benzène-éther 95 : 5	1 mg
15 à 17	benzène-éther 9 : 1	7 mg
18 à 20	benzène-éther 7 : 3	traces
21 à 23	benzène-éther 1 : 1	3 mg

La fraction contenant l'acétate de céto-24 cholestérol est la fraction 15 à 17.

Les acétates de méthylène-24 cholestérol et de céto-24 cholestérol ont été étudiés par chromatoplaques en révélant :

— avec une solution de chlorure d'antimoine ;

— avec une solution de dinitro-2,4 phényl hydrazine, à saturation, pour l'acétate de céto-24 cholestérol.

*b) Isolement à partir de la gelée royale*

10,7 g de gelée royale ont été desséchés sous vide. On obtient 3 g environ d'une substance solide blanche, contenant encore un peu d'eau. Nous avons extrait ces 3 g par 250 ml de chloroforme, une heure à reflux.

La couche chloroformique, séparée du résidu, a été lavée, puis séchée sur sulfate de sodium, et amenée à sec. On obtient 374 mg de produit. Ces 374 mg ont été chromatographiés sur 15 g d'acide silicique.

fractions	éluant	mg	Liebermann
1 à 4	benzène	8 mg	—
5 à 6	benzène-éther 9 : 1	9 mg	+++++
7 à 9	benzène-éther 9 : 1	208 mg	—
10 à 12	benzène-éther 8 : 2	93 mg	—
13 à 15	benzène-éther 1 : 1	20 mg	—
16 à 20	éther	traces	—

Les fractions 5 et 6 cristallisées dans le méthanol, fournissent 3 mg de plaques incolores F. 138-141° ; le point de fusion de mélange avec un méthylène-24 cholestérol authentique ne présente pas de dépression. De la même manière que pour les larves royales, nous avons testé ces cristaux par chromatoplaques.

Le spectre IR est identique à celui de la substance authentique.

## CONCLUSIONS

Les recherches décrites dans ce travail montrent la présence dans les larves de reines d'abeilles, d'un mélange d'esters de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque, et il semble que le premier stade de la transformation biologique de cet acide soit son estérification. Dans cette même fraction l'existence de polymères de l'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque est vraisemblable. L'importance de ce point est soulignée par une hypothèse émise par Sir Robert ROBINSON (1960), concernant l'activité anti-leucémique de cet acide et des estolides pouvant en dériver.

La gelée royale et les larves de reines contiennent des acides dicarboxyliques (adipique, pimélique, subérique) dont la présence n'avait pas encore été signalée. Ces acides pourraient participer à l'activité antileucémique attribuée à la gelée royale.

Dans une autre série de recherches sur la composition de la gelée royale, le méthylène-24 cholestérol a pu être isolé et identifié. C'est la première fois que ce stérol est signalé dans cette sécrétion. Les abeilles ouvrières sécrètent ce stérol à l'état libre, et apportent ainsi des stérols aux jeunes larves de reines, uniquement nourries de gelée royale. Ce stérol est aussi présent dans les lipides de larves de reines.

A l'encontre de la gelée royale qui possède une activité antibiotique très nette, les larves de reines sont dénuées de cette activité. Ce fait est peut-être dû à l'absence de quantités importantes d'acide hydroxy-10 décène-2 *trans* oïque libre, dans les larves.

Ces recherches apportent donc des précisions nouvelles sur la composition de la gelée royale, et des larves reines.

*Reçu pour publication en septembre 1962*

### REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie des Substances naturelles, dirigé par M. le Professeur E. LEDERER. Je suis heureuse de lui exprimer ma respectueuse reconnaissance pour l'intérêt avec lequel il a suivi ces recherches.

Ce travail a été réalisé sous la direction de M. BARBIER, Maître de recherches au C. N. R. S. Je tiens particulièrement à le remercier pour ses conseils éclairés et pour l'aide constante qu'il m'a toujours apportée.

J'adresse mes plus vifs remerciements à M. le Professeur DUFRENOY pour ses nombreux encouragements.

Je tiens enfin à remercier M. CHAUVIN et M. LOUVEAUX pour l'intérêt porté à ce travail, et pour le matériel fourni.

### SUMMARY

#### SOME COMPOUNDS IN THE ROYAL JELLY AND LARVAE OF QUEEN BEES

This work describes a study of the lipids present in the royal jelly and in the larvae of the queens.

The principal new compounds isolated and identified were :

- esters of 10-hydroxy 2-decenoic acid with myristic, palmitic, stearic and sebacic acids (royal larvae) ;
- dicarboxylic, adipic, pimelic and suberic acids (larvae and royal jelly) ;
- finally, methylene-24 cholesterol (larvae and royal jelly).

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARBIER M., REICHSTEIN T., SCHINDLER O., LEDERER E., 1959. Isolation of 24-Methylene Cholesterol from Honey Bees (*Apis mellifica* L.). *Nature*, **184**, 732-734.
- BARBIER M., SCHINDLER O., 1959. Isolierung von 24-Methylen-cholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Helv. Chim. Acta*, **42**, 1998-2005.
- BARBIER M., LEDERER E., 1960. Structure chimique de la « substance royale » de la reine d'abeille (*Apis mellifica* L.). *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 4467-4469.

- BARBIER M., LEDERER E., NOMURA T., 1960. Synthèse de l'acide ceto-9 décène-2 *trans* oïque (Substance royale) et de l'acide céto-8 nonène-2 *trans* oïque. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 1133-1135.
- BARBIER M., HUGEL M. F., LEDERER E., 1960. Isolement du 24-méthylène cholestérol à partir du pollen de différentes plantes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 91-97.
- BARBIER M., PAIN J., 1960. Étude de la sécrétion des glandes mandibulaires des reines et des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifica* L.) par chromatographie en phase gazeuse. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3740-3742.
- BARKER S. A., FOSTER A. B., LAMB D. C., 1959. Identification of 10-Hydroxy  $\Delta^2$  decenoic acid in royal jelly. *Nature*, **183**, 996-997.
- BENTON F. L., KIESS A. A., 1960. A preparation of 10-hydroxy-decanoic acid. *J. Org. Chem.*, **25**, 270-271.
- BLUM M. S., NOVAK A. F., TABER S., 1959. 10-hydroxy- $\Delta^2$  decenoic acid, an antibiotic found in Royal Jelly. *Science*, **130**, 452-453.
- BROWN W. H., FREURE R. J., 1959. Some carboxylic acids present in Royal Jelly. *Can. J. Chem.*, **37**, 2042-2046.
- BROWN W. H., FELAUER E. E., 1961. A new fatty acid from Royal Jelly. *Nature*, **190**, 88.
- BROWN W. H., FELAUER E. E., FREURE R. J., 1961. Some new components of Royal Jelly. *Canad. J. Chem.*, **39**, 1086-1089.
- BUTENANDT A., REMBOLD H., 1957. Über der Wieselzellerfuttersaft der Honigbiene. *Hoppe-Seyl. Z.*, **308**, 284-289.
- BUTENANDT A., REMBOLD H., 1958. The Royal Jelly of the honey bee. Isolation of 2-amino 4-hydroxy-6-(1,2-dihydroxypropyl) pteridin. *Z. Physiol. Chem.*, **311**, 79-83.
- BUTENANDT A., 1959. Wirkstoffe des Insektenreiches. *Naturwissenschaften*, **15**, 461-471.
- BUTLER C. G., 1957. The control of ovary development in worker honey bee (*Apis mellifica* L.). *Experientia*, **13**, 256.
- BUTLER C. G., CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., 1959. Extraction and purification of « queen substance » of honey bees. *Bee world*, **41**, (6), 152-153.
- CHAUVIN R., 1959. La valeur diététique et thérapeutique des produits de la ruche. Miels, Pollens, Gelée royale. *Produits pharmaceutiques*, **14** 1-27.
- CLARK A. J., BLOCH K., 1959. The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2578-81.
- CLARK A. J., BLOCH K., 1959. Function of sterols in *Dermestes vulpinus*. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2583-88.
- CLARK A. J., BLOCH K., 1959. Conversion of ergosterol to 22-dehydrocholesterol in *Blattella germanicum*. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2589-94.
- ENGLISH J., 1941. The synthesis of some analogs of traumatic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 941-943.
- FORREST H. S., MITCHELL H. K., 1955. Pteridines from *Drosophila*. Isolation and identification of three more pteridines. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4865-69.
- FRAY G. I., JAEGER R. H., ROBINSON R., 1960. Synthesis of *cis*-10-hydroxydec-2-enoic acid. *Tetrahedron letters*, **13**, 34-35.
- GARDNER T. S., 1948. Pantothenic acid as a longevity factor in Royal Jelly. *J. Gerontol.*, **3**, 1-8.
- IDLER D. R., FAGERLUND U. H. M., 1955. Marine sterols. Isolation of 24 methylene cholesterol from molluscs. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4142-44.
- KODICEK E., LEVINSON Z. H., 1960. Metabolism of  $\beta$  sitosterol and other lipids in the presence of acetate 2- $^{14}$  C by blowfly larvae. *Nature*, **188**, 1023-25.
- LIPKE H., FRAENKEL G., 1956. Insect nutrition. *Ann. Rev. Entomology*, **1**, 17-44.
- MONROE R. E., 1960. Effect of dietary cholesterol on house fly reproduction. **53**, 821-824.
- MORGAN J. F., TOLNAI S., TOWNSEND G. F., 1960. In vitro antitumor activity of fatty acids. Saturated dicarboxylic acids. *Canad. J. Biol. Physiol.*, **38**, 597-603.
- PAIN J., 1955. Influence des reines mortes sur le développement ovarien des jeunes ouvrières d'abeilles. *Insectes sociaux*, **2**, 35-43.
- PATTERSON E. L., BROQUIST H. P., ALBRECHT A. M., SALTZ M. H., STOKSTAD E. L. R., 1955. A new pteridine in urine required for the growth of the protozoan *Crithidia fasciculata*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3167-3168.
- PATTERSON E. L., MILSTREY R., STOKSTAD E. L. R., 1956. The synthesis of a pteridine required for the growth of *Crithidia fasciculata*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 415-417.
- PEARSON P. B., BURGIN C. J., 1941. The pantothenic acid content of Royal Jelly. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **48**, 415-417.
- RHEIN W. W., 1933. Über die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaats. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **129**, 601-665.
- ROBINSON sir Robert, 1960. The biological activity and synthesis of Royal Jelly Acid. *Croatia chemica Acta.*, **32**, 119-122.
- SIMPSON J., 1960. The functions of the salivary glands of *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, **4**, 107-122.
- TOWNSEND G. F., LUCAS C. C., 1940. The chemical nature of Royal Jelly. Acid. *Biochem. J.*, **34**, 1155-1162.
- TOWNSEND G. F., MORGAN J. F., HAZLETT B., 1959. Activity of 10-hydroxydecanoic acid from Royal Jelly against experimental leukaemia and ascitic tumors. *Nature*, **183**, 1270-1271.

- TOWNSEND G. F., MORGAN J. F., TOLNAI S., HAZLETT B., MORTO H. J., SCHUEL R. W., 1960. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids-10-hydroxy-2 decenoic acid from Royal Jelly. *Cancer Res.*, **20**, 503-510.
- VISCONTINI M., LOESER E., KARRER P., HADORN E., 1955. Fluoreszierende stoffe aus *Drosophila melanogaster*. *Helv. Chem. Acta.*, **38**, 1222-1224.
- VISCONTINI M., SCHMID H., HADORN E., 1955. Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Astacus fluviatilis*. *Experientia.*, **11**, 390-392.
- VISCONTINI M., KUHN A., EGELHAAF A., 1956. Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephelia kükuiella*. *Z. Naturforsch.*, **11 b**, 501-504.
- ZAFFARONI A., BURTON R. B., KEUTMANN E. H., 1950. Adrenal cortical hormones : analysis by paper partition chromatography and occurrence in the urine of normal persons. *Science*, **111**, 6-8.