

N° D'ORDRE :
181

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

RENÉ GRANGAUD

Maitre de Conférences, Agrégé
à la Faculté de Médecine et Pharmacie d'Alger

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR L'ASTAXANTHINE, NOUVEAU FACTEUR
VITAMINIQUE A.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 23 octobre 1950 devant la Commission d'examen.

MM. CORDIER *Président.*
BERNARD }
MEUNIER } *Examineurs.*

ÉDITIONS DESOER
21, RUE SAINTE-VÉRONIQUE
LIÈGE

1951

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

DOYEN

M. DOUIN, ✱, ☞, ☞ I.

ASSESEUR

M. EYRAUD, ☞ I., *Calcul différentiel et intégral.*

DOYEN HONORAIRE

M. LONGCHAMBON, ✱, ☞, ☞ I., +, Médaille de la Résistance.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. VESSIOT, C. ✱, ☞ I.	MM.
DULAC, ✱, ☞ I.	SIRE, ✱, ☞ I., +.
VANEY, ✱, ☞ I., +.	FROMAGEOT, ☞ I.
MEUNIER, O. ✱, ☞ I.	LOCQUIN, ✱, ☞ I.

PROFESSEURS

MM. LONGCHAMBON, ✱, ☞, ☞ I., +, Médaille de la Résistance, *Minéralogie.*
DOUIN, ✱, ☞, ☞ I., *Botanique.*
DEJARDIN, ✱, ☞ I., *Physique.*
SOLLAUD, ☞ I., *Zoologie.*
THIBAUD, ☞ I., *Physique expérimentale.*
EYRAUD, ☞ I., *Calcul différentiel et intégral.*
THORAL, ☞ A., *Géologie.*
DŒUVRE, ☞ I., *Chimie organique.*
CORDIER, ☞ A, ☞, Chevalier Mérite agricole, *Physiologie.*
PRETTRE, ☞ A., *Chimie industrielle.*
KÜHNER, ☞ A., *Botanique.*
COURTY, ☞ A., *Chimie-Physique.*
MALÉCOT, *Mécanique rationnelle.*
PARIS, *Chimie minérale.*
AUMÉRAS, ☞ I., *Chimie.*
DE LARAMBERGUE, ☞ A., *Zoologie.*
BERNARD, ☞ A., *Physique.*
VIRET, ☞ I., *Géologie.*
BÉNARD, *Chimie.*
COLONGE, ☞ A., *Chimie.*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ET CHARGÉS DE COURS

MM. DUFAY, ☞ I., *Astronomie et Physique supérieure.*
MEUNIER P., *Chimie biologique.*
GILLES, *Botanique.*

MM. JANIN, *Physique*.
MOUSSA, *Physique*.
WAUTIER, *Zoologie*.
M^{me} CHAIX, *Chimie biologique*.
MM. BRACONNIER, *Mathématiques*.
NIGOND, *Zoologie*.
MENTZER, *Chimie biologique*.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

MM. STRIFFLING, *Météorologie*.
PELLETIER, *Géologie*.
M^{me} FIASSON, *Zoologie*.
MM. GARRIGUES, *Botanique*.
MÉSARD, *Physique*.
PENNANEAC'H, *Mathématiques*.
GAUTHIER J., *Chimie*.
MAZENOT, *Géologie*.
GAUTHIER H., *Géologie*.
MURET, *Botanique*.
FIASSON, *Zoologie*.

SECRÉTAIRE

M. ROUX,  I.

A ma femme et à mes enfants :

*Jean-Paul, Danielle, Michelle, Geneviève,
Jacqueline, Nicole et Jean-Michel.*

A mes parents et à mes beaux-parents.

A tous les miens.

PRÉFACE

En dépit des récentes et importantes acquisitions qui tendent à éclairer le mécanisme de l'action de la vitamine A dans les processus biochimiques [68], [69], [70], [103], [76], il n'est pas possible d'attribuer à l'un ou l'autre des symptômes de carence une valeur de spécificité : la stabilisation puis la chute de poids qui surviennent chez l'animal carencé, les lésions épithéliales et en particulier la xérophtalmie ne sont en définitive que des manifestations secondaires de la « lésion biochimique » due au défaut du biocatalyseur.

Il n'en reste pas moins que l'administration de vitamine A, à condition de n'être pas trop tardive, entraîne la régression puis la disparition de ces symptômes, la guérison de la xérophtalmie n'étant obtenue chez le rat blanc qu'avec des doses de vitamine supérieures à celles permettant la reprise de poids. Quant aux facteurs vitaminiques A autres que l'axérophtol, leurs effets sur la carence ne se distinguent de ceux de la vitamine A elle-même que par des différences globales d'intensité. C'est qu'en effet l'organisme utilise ces substances en les transformant en axérophtol : ce mode d'utilisation, certain pour les carotènes et les caroténoïdes naturels, dont l'activité vitaminique est reconnue, semble bien être également celui de composés synthétiques actifs tels que le β -apo-2-carotinal [15].

Au cours de recherches sur l'activité vitaminique A d'une huile de Crustacé, tandis que l'action sur la reprise de poids était pratiquement nulle, nous avons enregistré un effet curatif intense sur les lésions oculaires. Cette constatation inattendue, en désaccord avec les données classiques, devait nous conduire avec M^{lle} R. MASSONET à envisager puis à vérifier la présence dans l'huile étudiée d'un facteur vitaminique A se distinguant précisément de tous les autres facteurs de ce groupe par la prédominance de l'activité antixérophtalmique sur l'effet de croissance [27].

Nous avons identifié ce principe antixérophtalmique nouveau et montré qu'il s'agit de l'astaxanthine — l'un des principaux caroténoïdes des Crustacés — considérée jusqu'ici comme dépourvue de propriétés vitaminiques A [29].

SOMMAIRE

INTRODUCTION : Importance de l'astaxanthine parmi les caroténoïdes naturels.

CHAPITRE I : Constitution et propriétés physiques et chimiques de l'astacine, de l'astaxanthine et de leurs dérivés.

CHAPITRE II : L'astaxanthine chez les êtres vivants. — Etude du pigment d'*Aristeomorpha foliacea* (*Penaeidae*).

CHAPITRE III : Importance biologique de l'astaxanthine.

A. — Origine et destinée de l'astaxanthine dans le monde vivant.

B. — L'astaxanthine nouvelle vitamine du groupe A :

I. — Activité vitaminique A des huiles d'*Aristeomorpha foliacea*.

II. — Activité antixérophtalmique du pigment caroténoïde d'*Aristeomorpha foliacea*.

1° Activité du pigment extrait de l'huile d'hépatopancréas.

2° Activité du pigment extrait de l'hypoderme.

III. — Localisation de l'astaxanthine dans l'organisme du rat traité.
Mise en évidence dans la rétine.

CHAPITRE IV : Discussion des résultats.

1° Constitution chimique et activité vitaminique de l'astaxanthine.

2° Dissociation de l'activité antixérophtalmique et de l'effet de croissance de l'astaxanthine chez le rat blanc carencé en vitamine A.

3° L'astaxanthine et le problème de la vision.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

loin⁽¹⁾, ils ont assigné à l'astaxanthine la constitution du 3, 3'-dihydroxy-4, 4'-dicéto- β -carotène. En outre KUHN et SORENSON ont établi que le pigment épiphasique⁽²⁾ de l'hypoderme rouge du homard n'est pas un ester de l'astacine ainsi que cela avait été admis antérieurement mais un ester de l'astaxanthine. Ils ont émis l'hypothèse que l'astacine isolée de nombreux organismes animaux n'y préexiste pas mais se forme au cours des opérations d'isolement à partir de l'astaxanthine qui représente le caroténoïde naturel. Confirmée dans un certain nombre de cas seulement, cette conception ne peut pas être généralisée de façon absolue (cf. KARRER et JUCKER [40], p. 233).

Il n'en reste pas moins que l'astaxanthine a été mise en évidence dans des espèces animales et végétales appartenant aux groupes les plus variés : Algues, Protozoaires, Crustacés, Insectes, Tuniciers, Poissons, Reptiles, Oiseaux, Mammifères⁽³⁾. La présence de ce caroténoïde dans des organismes aussi divers ne va pas sans poser d'importants problèmes de Biochimie qui suffiraient déjà à justifier une étude monographique de l'astaxanthine.

(1) Page 19 et suivantes.

(2) Sont épiphasiques les pigments qui sont plus solubles dans l'éther de pétrole que dans l'alcool à 85 % et hypophasiques ceux qui sont plus solubles dans l'alcool aqueux que dans l'éther de pétrole.

(3) Le pigment n'a pas toujours été immédiatement identifié à l'astaxanthine et on trouve dans la littérature divers noms synonymes : haematochrome, carotinine, euglenarhodon (cf. WALD [105], page 212).

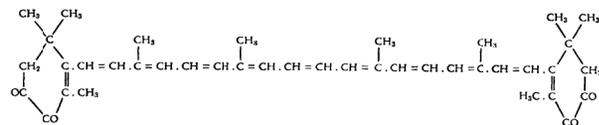
CHAPITRE I

CONSTITUTION, PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'ASTACINE, DE L'ASTAXANTHINE ET DE LEURS DÉRIVÉS

A. - ASTACINE ET DÉRIVÉS.

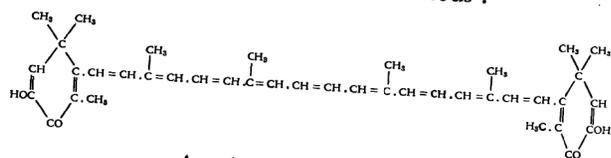
La nature caroténoïde de l'astacine et la présence d'oxygène dans chacun des noyaux de β -ionone ont été reconnues par KUHN et LEDERER (45).

P. KARRER et coll. (38) ont établi en 1934 la formule brute $C_{40}H_{48}O_4$ et la constitution du pigment qui est celle d'un tétracéto- β -carotène. Cette constitution est déduite de la formule brute et des propriétés des groupes oxygénés. L'astacine, en effet, donne une dioxime possédant 4 atomes d'hydrogène actif et dont deux appartiennent aux radicaux oximes, les deux autres étant fixés à deux carbonyles énolisés. Le caroténoïde possède donc 4 groupes cétoniques qui ne sont pas équivalents. L'orthophénylène diamine réagit en donnant la bis-phénazine astacine ce qui indique que chaque noyau de β -ionone renferme deux groupes carbonyles. L'oxydation par le permanganate donne de l'acide diméthyl malonique et l'oxydation du dérivé diphénazinique conduit à l'acide α - α -diméthyl succinique, ce qui établit que les groupes carbonyles occupent les sommets 3, 4, 3', 4'. La formule de constitution de l'astacine est donc :



Astacine (forme cétonique).

Cependant la microhydrogénation catalytique révèle l'existence non de 11 mais de 13 doubles liaisons. Ces deux doubles liaisons supplémentaires établissent la possibilité d'existence de la forme énolique représentée par le schéma ci-dessous :



Astacine (forme énolique).

En réalité l'astacine libre n'est que très peu énoisée ainsi que le montre la faible vitesse d'éthérisation avec le diazo-méthane et la détermination des hydrogènes mobiles (ZEREWITINOFF). Le caractère acide de l'astacine disparaît par hydrogénation.

L'astacine cristallise d'un mélange de pyridine et d'eau en aiguilles violettes à reflets métalliques fondant à 228° C [KUHN, STENE et SORENSEN (48)] (1).

L'astacine est insoluble dans l'eau, très difficilement soluble dans l'éther, l'éther de pétrole et le méthanol, difficilement soluble dans le benzol, l'acétate d'éthyle et l'acide acétique, assez facilement soluble dans le sulfure de carbone, très soluble dans le chloroforme, la pyridine (solution concentrée rouge sang, solution diluée orangée) et le dioxane.

Par agitation de la solution dans l'éther de pétrole avec du méthanol à 90 %, l'astacine passe dans la phase hydro-alcoolique mais par dilution avec de l'eau, le pigment se redissout facilement dans l'éther de pétrole. Il demeure par contre dans la phase aqueuse si celle-ci est additionnée de soude ou de potasse manifestant par là son caractère acide. Par refroidissement le pigment se sépare de la solution alcaline sous forme de flocons rouges qui se rassemblent à l'interphase. L'acidification par l'acide acétique transforme le sel amorphe en cristaux violets et étincelants d'astacine libre.

L'astacine en solution dans un mélange de benzol et de ligroïne se laisse vigoureusement adsorber sur carbonate de calcium. Elle est également adsorbée sur alumine de sa solution dans le mélange benzol-ligroïne ou dans l'éther de pétrole : elle forme une zone violette à la partie supérieure de la colonne. Les éluants sont le benzol ou la pyridine additionnés de méthanol ainsi que l'éther de pétrole additionné de 5 % de potasse.

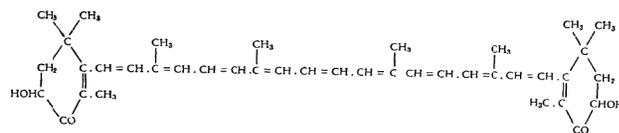
(1) On trouve aussi 240°-243° (KUHN et LEDERER [45]), 241° c (KARRER et BENZ [36]).

Le spectre d'absorption de l'astacine est caractéristique et présente une large bande à maximum unique (500 m μ dans la pyridine et 510 m μ dans le sulfure de carbone). Le spectre d'absorption et le comportement du pigment vis-à-vis de la soude sont les deux caractères principaux permettant son identification. Autres caractères moins spécifiques : dans l'acide sulfurique concentré, l'astacine se dissout en donnant une coloration bleu foncé. La solution chloroformique donne avec le réactif au trichlorure d'antimoine (R. de CARR et PRICE) une coloration bleu-vert.

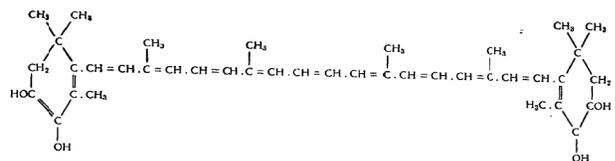
L'astacine est très résistante à l'oxydation à l'air. KUHN, LEDERER et DEUTSCH (46) ont obtenu le diacétate d'astacine. Le dipalmitate (astacéine) a été également préparé (KUHN et coll. [48]).

B. - ASTAXANTHINE ET DÉRIVÉS.

KUHN et SORENSEN (47) ont établi que l'astaxanthine possède quatre atomes d'hydrogène de plus que l'astacine, sa formule brute étant C₄₀H₅₂O₄. Ils ont montré en effet que la transformation, en milieu alcalin et en présence d'air, de l'astaxanthine en astacine est une autoxydation d'un éne-diol qui absorbe deux molécules d'oxygène avec formation de deux molécules d'eau oxygénée. Faisant dériver la structure de l'astaxanthine de celle de l'astacine ils lui ont assigné la formule suivante qui est celle du 3,3'-dihydroxy-4,4'-dicéto- β -carotène :



Astaxanthine (forme cétonique).

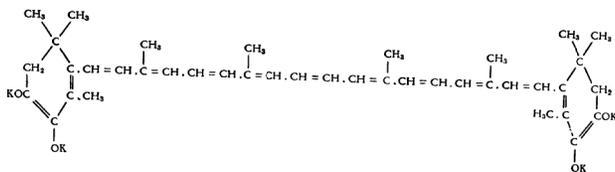


Astaxanthine (forme énolique).

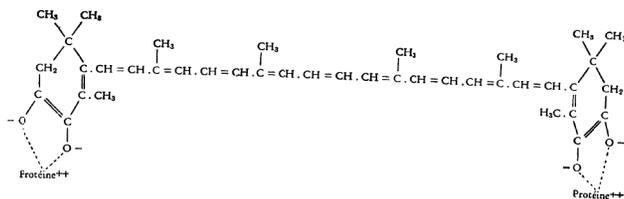
Le schéma de constitution correspondant au 4,4'-dihydroxy-3,3'-dicéto- β -carotène peut également être envisagé. Cependant KUHN

et SORENSSEN s'appuyant sur des considérations d'ordre énergétique admettent que c'est le groupe carbonyle qui est conjugué avec la chaîne polyénique.

En l'absence d'oxygène, l'astaxanthine donne avec la potasse un sel bleu foncé auquel KUHN et SORENSSEN, par analogie avec le dérivé potassique du stilbenediol et les diesters méthyliques de la dihydrocrocétine et de la dihydrobixine ont donné la formule suivante :



KUHN et SORENSSEN admettent que l'ovoverdine des œufs de homard peut également être considérée comme un dérivé de la forme énolique et représentée par le schéma suivant :

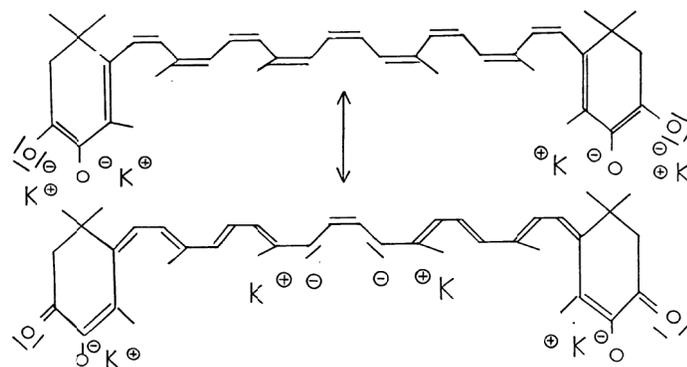


cette représentation qui admet une liaison ionique entre la protéine et le caroténoïde rend compte du changement de couleur qui se produit lorsque le groupement prosthétique est détaché du chromoprotéide. Ce mode d'union n'explique pas cependant la résistance du complexe protéique à l'autoxydation. KUHN et SORENSSEN envisagent que d'autres liaisons, de nature encore inconnue entre la protéine et le caroténoïde doivent intervenir pour protéger celui-ci de l'oxydation : le groupement prosthétique serait comme encastré dans la protéine ⁽¹⁾.

En réalité, la coloration qui se développe par action de la potasse sur l'astaxanthine en l'absence d'oxygène doit actuellement être interprétée comme l'effet bathochrome d'une réaction d'halochromie (73) (maximum d'absorption vers 700 mμ. comme dans la

(1) KUHN et SORENSSEN emploient les expressions de « Verankerung » et de « Einbettung ».

réaction de CARR et PRICE, cf. fig. III). Cette réaction correspond à la mésomérie suivante qui implique l'oscillation de six doublets électroniques [P. MEUNIER ⁽¹⁾] :



Quant aux édifices hétéroprotéïdiques tels que l'ovoverdine, on peut considérer que l'union entre astaxanthine et protéine y est encore du même type, l'extrémité d'une chaîne polypeptidique $-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}_3^+$ occupant la place de l'ion K^+ .

R

Le poids moléculaire de l'ovoverdine a été déterminé par divers expérimentateurs, WYCKOFF (112) lui attribue une valeur d'environ 300.000. KUHN et SORENSSEN ont décrit une méthode de précipitation de l'ovoverdine. Le pigment est précipité de sa solution aqueuse par le sulfate d'ammonium à saturation. On peut le purifier par dissolution dans l'eau et adsorption sur hydroxyde d'aluminium puis élution par le sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Il suffit d'élever la concentration en sulfate d'ammonium pour reprécipiter le chromoprotéide. En répétant ces opérations à plusieurs reprises on obtient un produit très pur où le caroténoïde et la protéine sont unis dans le rapport de 1 à 242, ce qui donne un poids moléculaire de 144.000. STERN et SALOMON (93) attribuent à la protéine de l'ovoverdine le caractère d'une albumine. Dans ces conditions deux molécules de protéine seraient unies à une molécule d'astaxanthine.

(1) P. MEUNIER, communication personnelle.

La couleur du chromoprotéide est variable selon les espèces : bleu-noir (carapace d'*Astacus gammarus*), vert (œufs et ovaires d'*Astacus gammarus*), bleu (*Hétérocope saliens*), vert brun (*Gammarus pulex*), violet rouge (*Dendrodoa grossularia*) (40), violet bleu (*Aristeomorpha foliacea*), violet rouge (*Aristeus antennatus*).

STERN et SALOMON (92) ont étudié l'« ovoverdine » des œufs et des ovaires de *Homarus americanus* : le chromoprotéide a un pH_i voisin de 7 et sa couleur est stable entre pH 4 et 8. Il est réversiblement dissociable en astaxanthine et protéine par chauffage modéré pendant de courts intervalles et en l'absence d'air.

BALL (1) a également isolé des œufs de deux autres espèces de Crustacés (*Lepas fascicularis* et *L. anatifera*) un chromoprotéide bleu qui présente le même phénomène de dissociation thermique réversible, dissociation qui peut être aussi obtenue par acidification ménagée de la solution aqueuse refroidie du chromoprotéide en présence de sulfate d'ammonium.

Récemment, WALD et coll. (107) ont réussi à extraire le chromoprotéide bleu-noir de la carapace du Homard en traitant celle-ci par une solution étendue d'acide citrique. Ils lui ont donné le nom de « crustacyanine ». La crustacyanine en solution dans un tampon au véronal de pH 7 chauffée à 60° C subit également une dissociation réversible, la couleur passant du bleu au pourpre.

La chaleur, les acides forts, les alcalis, l'acétone, l'alcool, en dénaturant la protéine, permettent d'extraire facilement l'astaxanthine de ces divers chromoprotéides.

Celle-ci se dissout aisément dans la pyridine d'où, par addition d'eau, elle cristallise en tablettes étincelantes [F = 216° C (40)].

SPECTRE D'ABSORPTION

La première donnée spectroscopique est celle de KUHN et SORENSEN (47) qui ont décrit un spectre à trois maxima pour l'astaxanthine (476, 493 et 513 $m\mu$ dans la pyridine). Selon WALD (105), ces mesures sont certainement entachées d'erreur : TISCHER (97) par spectrophotométrie a établi que le spectre de l'astaxanthine libre ou estérifiée présente une large bande unique. Il est comparable à celui de l'astacine, mais par rapport à ce dernier il est décalé vers les courtes longueurs d'onde de 4 à 7 $m\mu$, suivant la nature du solvant ; pour l'astaxanthine libre, le maximum est situé à 470 $m\mu$ dans l'hexane et à 492 $m\mu$ environ dans la pyridine.

Parmi les caroténoïdes dont la constitution est établie de façon sûre, l'astaxanthine et l'astacine sont les seuls qui présentent un spectre d'absorption à maximum unique (1).

L'agitation de la solution d'astaxanthine dans l'éther de pétrole avec de l'alcool à 85 % entraîne tout le pigment dans la phase alcoolique : l'astaxanthine est entièrement hypophasique.

Le sel de potassium bleu obtenu par action de la potasse à l'abri de l'air est caractéristique de l'astaxanthine. En présence d'oxygène, la couleur vire instantanément au rouge par transformation en astacine. Cette propriété permet l'identification de l'astaxanthine.

En solution dans un mélange à 1 : 4 de benzol et d'éther de pétrole, l'astaxanthine est adsorbée sur sucre de canne (KUHN et SORENSEN) d'où elle se laisse éluer par le benzol. On peut également utiliser l'alumine comme adsorbant, le solvant étant alors l'éther de pétrole et l'éluant l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol.

Plusieurs esters de l'astaxanthine ont été obtenus par synthèse partielle : KUHN et SORENSEN ont préparé le diacétate, le dicaprylate et le dipalmitate, ce dernier ayant été isolé de l'hypoderme du homard par KARRER, LEWE et HUBNER (41) et d'abord considéré comme un dipalmitate d'astacine. Le monopalmitate d'astaxanthine a aussi été préparé par KUHN, STENE et SORENSEN (49).

Seul de tous ces dérivés, l'acétate est hypophasique, les autres sont épiphassiques (40).

(1) La glycyémérine isolée par FABRE et LEDERER (17) de *Pectunculus glycymeris* présente un spectre d'absorption très voisin de celui de l'astacine mais décalé par rapport à celui de cette dernière d'une dizaine de $m\mu$ vers les courtes longueurs d'ondes. La glycyémérine qui se distingue de l'astacine par l'absence de caractère acide est de constitution encore inconnue.

EULER et HELSTROM (16) ont isolé d'*Asteria rubens* un caroténoïde à caractère acide qu'ils ont dénommé acide astérinique. Celui-ci présente un spectre d'absorption à maximum unique ($\lambda = 480 m\mu$ dans la pyridine). Mais RÜBEL (84) a montré qu'il s'identifie vraisemblablement à l'astacine.

Quant à la mytiloxanthine trouvée par SCHEER (85) dans le muscle de *Mytilus californianus* à côté de la zéaxanthine, elle ne semble se distinguer de l'astacine que par un point de fusion moins élevé.

CHAPITRE II

L'ASTAXANTHINE DANS LES ORGANISMES VIVANTS

D'abord considérée comme un caroténoïde des animaux, l'astaxanthine a été mise en évidence également chez des végétaux. Dans les organismes, l'astaxanthine se rencontre libre, estérifiée ou liée à une protéine. Dans un certain nombre de cas, d'ailleurs, on n'a pas caractérisé l'astaxanthine elle-même mais l'astacine et il n'est pas alors possible de dire si celle-ci représente le pigment naturel ou son produit d'oxydation.

D'autre part, on n'a pas jusqu'ici rencontré chez les plantes de chromoprotéide du type de l'ovoverdine des œufs de homard [McKINNEY (59)].

Le tableau ci-dessous donne une liste des espèces animales et végétales où a été caractérisée l'astaxanthine (ou l'astacine).

TABLEAU I (1)

Répartition de l'astaxanthine (ou de l'astacine) chez les êtres vivants.

I. - ALGUES VERTES

Haematococcus pluvialis * [KUHN, STENE et SORENSEN (48), TISCHER (98)].

II. - PROTOZOAIRES

Euglena heliorubescens * [TISCHER (97)].

III. - SPONGIAIRES

Axinella crista-galli [KARRER et SOLMSEN (44)].

(1) La majeure partie des documents de ce tableau a été empruntée à KUHN, STENE et SORENGEN (48). Les organismes où l'astaxanthine a été identifiée sans ambiguïté sont marqués d'un astérisque.

IV. - ARTHROPODES

1° Crustacés

a) Malacostracés :

1. Schizopoda Euphausia [DRUMMOND et WALTER (11)].

2. Décapodes :

Astacus gammarus * [KUHN et LEDERER (45), KUHN et SORENSEN (47)] ;

Homarus americanus * [STERN et SALOMON (92)] ;

Maja squinado [KUHN, LEDERER et DEUTSCH (46)] ;

Palinurus vulgaris [FABRE et LEDERER (17)] ;

Portunus puber [FABRE et LEDERER (17)] ;

Nephrops Species [FABRE et LEDERER (17)] ;

Leander serratus [FABRE et LEDERER (17)] ;

Cancer pagurus [FABRE et LEDERER (17)] ;

Nephrops norvegicus [BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY et LOVERN (5)] ;

Potamobius astacus [WILLSTAEDT (111)] ;

Aristeomorpha foliacea * [GRANGAUD, CHECHAN, M^{re} MASONET (25)] ;

Eupagurus Prideauxii [LEDERER (54)].

b) Copépodes :

Calanus finmarchicus [LEDERER (54)] ;

Heterocope saliens [SORENSEN (89)].

c) Phyllopoètes :

Holopedium gibberum [SORENSEN (89)].

d) Arthrostracés :

Gammarus pulex * [SORENSEN (89)].

e) Cirripèdes :

Lepas fascicularis * [BALL (1)] ;

Lepas anatifera * [BALL (1)].

2° Insectes

Locusta * [GOODWIN et SRISUKH (23)] ;

Schistocerca * [GOODWIN et SRISUKH (23)] ;

Leptinotarsa * [MANUNTA (62)].

V. - MOLLUSQUES

Lima excavata [SORENSEN (89)].

VI. - ECHINODERMES

Ophidiaster ophidianus [KARRER et BENZ (36)] ;
Echinaster sepositus [KARRER et SOLMSSSEN (44)].

VII. - TUNICIERS

Dendrodoa grossularia [LEDERER (54)] ;
Halocynthia papillosa [LEDERER (54)].

VIII. - POISSONS

Beryx decadactylus (peau) [LEDERER (52)] ;

Carassius auratus (peau) [LEDERER (52)] ;

Cyclopterus lumpus (foie) [SORENSEN (88)] ;

Lophius piscatorius (foie) [SORENSEN (87)] ;

Regalecus glesne * (foie) [SORENSEN (87), KUHN, STENE et SORENSEN (48)] ;

Salmo salar (muscle) [SORENSEN (88)] ;

Salmo trutta * (muscle) [SORENSEN et STENE (91)] ;

Sebastes marinus (peau) [LEDERER (53)] ;

Perca fluviatilis (nageoires) [LEDERER (53)].

IX. - REPTILES

Clemmys insculpta (rétine) [WALD et ZUSSMAN (109)].

X. - OISEAUX

Phasianus colchicus * [BROCKMANN et VOLKER (4), KUHN, STENE et SORENSEN (48)].

XI. - MAMMIFÈRES

Balaenoptera musculus (graisse) [SCHMIDT-NIELSEN, SORENSEN et TRUMPY (86), BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY et LOVERN (5)].

ÉTUDE DU PIGMENT D'ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Aristeomorpha foliacea, Crustacé décapode de la tribu des Penaeidae est une grosse crevette rouge foncé pêchée en Méditerranée à des profondeurs de 2 à 300 mètres et au delà. Vendue en quantités abondantes sur les marchés des ports algériens de juin à octobre, période où la pêche au chalut n'est autorisée qu'en dehors des eaux territoriales, elle est beaucoup plus rare en hiver.

Pour l'étude du pigment qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été identifié, nous nous sommes inspiré des techniques antérieurement élaborées pour d'autres espèces de Crustacés par KUHN et LEDERER (45), LEDERER (53), KUHN et SORENSEN (47), KUHN, STENE et SORENSEN (48).

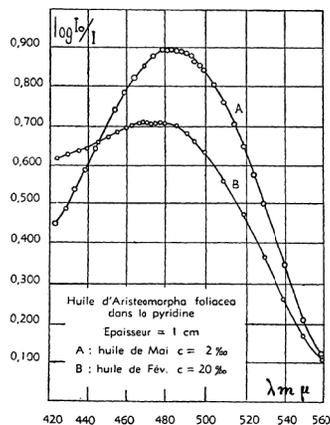
Nous avons étudié le pigment présent dans l'huile extraite des hépato-pancréas et le pigment extrait de l'hypoderme rouge qui tapisse intérieurement la carapace et revêt la poche stomacale.

1° PRÉPARATION DE L'HUILE D'HÉPATO-PANCRÉAS.

Les hépato-pancréas extraits des céphalothorax de 1 kg. d'*Aristeomorpha* sont broyés avec du sulfate de sodium anhydre, puis la masse est épuisée par l'acétone (200, 100 et 100 cm³). La solution acétonique placée dans une ampoule à décantation est additionnée d'éther de pétrole (50 cm³) et d'eau (75 cm³). Après agitation et repos, l'éther de pétrole qui a entraîné la totalité du pigment est séparé, lavé à l'eau et séché sur sulfate de soude anhydre. On chasse ensuite le solvant par chauffage au bain-marie (sans dépasser 40° C) et distillation sous pression réduite en atmosphère d'azote.

On obtient ainsi par kg. de crevettes de 5 à 8 g. d'une huile qui est rouge foncé pour les extractions effectuées entre mai et octobre, orangée et beaucoup moins concentrée en pigment pour les extractions d'octobre à mai. Les spectres d'absorption (fig. 1) objectivent ces différences qualitatives et quantitatives entre les huiles d'été et d'hiver (24).

Fig. I.



2° PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE L'HYPODERME (1) ET DU CONJONCTIF PÉRISTOMACAL.

L'hypoderme qui tapisse la face interne des carapaces et le conjonctif qui enveloppe la poche stomacale peuvent être facilement détachés par curetage. L'épuisement à l'acétone fournit une liqueur rouge que l'on traite par l'eau et l'éther de pétrole. Ce dernier est séparé, lavé, séché et évaporé comme ci-dessus. L'extrait obtenu est beaucoup moins abondant que dans le cas des hépato-pancréas mais considérablement plus concentré en pigment.

IDENTIFICATION DU PIGMENT :

2 grammes d'huile d'hépato-pancréas (extrait de juillet) sont dissous dans 200 cm³ d'éther de pétrole.

La solution est versée lentement et aspirée sur une colonne d'alumine de 20 cm. de haut et de 2 cm. de diamètre. Le pigment est retenu à la partie supérieure de la colonne. Après développement par l'éther de pétrole (200 cm³) on obtient le chromatogramme suivant (2), (3) :

a) zone rose	(1 cm. d'épaisseur)
b) » rouge	(0,2 cm. »)
c) » rose	(1 cm. »)
d) » rouge violacé	(0,5 cm. »)
e) » jaune orangé	(0,15 cm. »)

L'élution est effectuée par agitation de l'alumine colorée avec de l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol, puis le solvant est chassé par distillation sous pression réduite et en atmosphère inerte. Le résidu est alors saponifié par la potasse alcoolique à 15 % durant quatre heures et à 20° C. Le pigment est ensuite séparé par addition d'eau et d'éther de pétrole : après séjour à la glacière il se rassemble à l'interphase sous forme de flocons rouges. Ceux-ci sont isolés et purifiés par dissolution dans l'alcool chaud, refroidissement et filtration. On dilue avec une solution de carbonate de sodium à 10 % puis on agite avec de l'éther de pétrole. Le pigment se rassemble de nouveau à la surface de contact des deux liquides ; on le sépare et on poursuit la purification par remise en solution dans l'alcool suivie de relargage par le carbonate de sodium. On répète

(1) Le terme « d'hypoderme » semble consacré par l'usage (40), (48). En réalité le pigment est localisé dans les chromatophores situés dans le derme.

(2) Les huiles d'hiver donnent un chromatogramme tout à fait semblable ; seules semblent varier les proportions relatives des divers constituants.

(3) Alumine pour chromatographie selon BROCKMANN.

trois fois cette suite d'opérations puis on remet les flocons en suspension dans l'alcool à 50 %. Après acidification par l'acide acétique le précipité rouge vire au violet noir. On reprend par l'éther de pétrole et on chromatographie sur alumine. Le pigment est énergiquement retenu à la partie supérieure de la colonne formant une zone violette de 1,5 à 2 mm. seulement d'épaisseur. On développe à l'éther de pétrole puis on élue avec du méthanol contenant 5 % de potasse. Après addition d'eau et d'acide acétique, on extrait le pigment par le chloroforme ; l'évaporation du solvant sous pression réduite laisse déposer des cristaux violet noir au sein d'une masse amorphe rouge. La masse énorme des lipides qui accompagnent le pigment dans l'huile d'hépatopancréas ne nous a pas permis de pousser plus avant la purification.

A partir de l'extrait de l'hypoderme ou du conjonctif des poches stomacales, il a été par contre possible d'obtenir ce même pigment bien cristallisé : après extraction et saponification, le sel de potassium séparé est lavé avec un peu d'alcool à 50 % puis d'éther de pétrole, remis en suspension dans l'alcool aqueux et acidifié par l'acide acétique : les flocons rouges se transforment en une masse violet noir. On sépare celle-ci, et fait recristalliser le pigment à partir de la pyridine aqueuse.

Le caractère acide du pigment, son comportement vis-à-vis de la potasse et de l'éther de pétrole, l'aspect des cristaux, leur solubilité dans la pyridine (solution rouge sang), dans l'acide sulfurique concentré (coloration bleu foncé), dans le chloroforme (solution rouge orangé donnant une coloration bleu vert avec le réactif au trichlorure d'antimoine) permettent d'identifier le caroténoïde isolé à l'astacine. Ce fait est confirmé par la détermination du point de fusion (228° C) et le spectre d'absorption à bande large et à maximum unique ($\lambda = 500 \text{ m}\mu$ dans la pyridine).

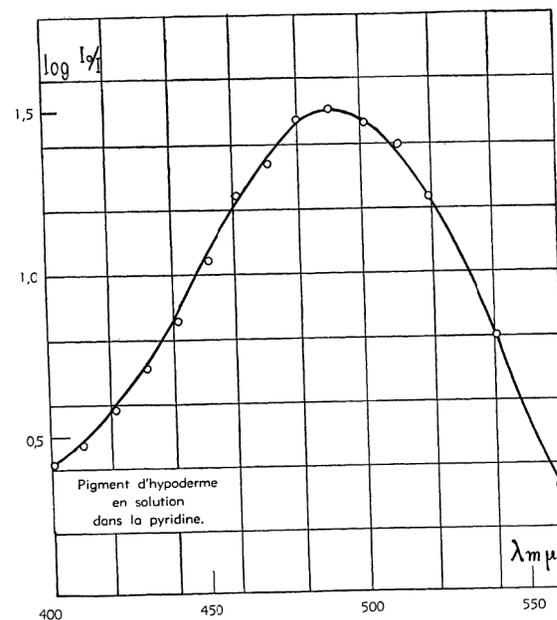
Il était vraisemblable d'ailleurs que le pigment naturel était, non l'astacine elle-même, mais, comme chez le Homard, l'astaxanthine sous forme d'esters. Effectivement, l'extrait de l'hypoderme des carapaces remis en solution dans la pyridine fournit un spectre d'absorption caractéristique des esters de l'astaxanthine avec son maximum à 490 $\text{m}\mu$ (25) (fig. II) (1).

(1) Une tentative d'isolement du pigment de l'huile par condensation avec le réactif « T » de GIRARD et SANDULESCO n'a pas été couronnée de succès. Ce résultat négatif a été confirmé au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon par M. MALLEIN, que nous tenons à remercier ici.

L'incapacité du pigment à se condenser avec le réactif « T » semble indiquer l'absence de fonctions cétoniques libres et l'hypothèse qui paraît actuellement la plus vraisemblable est que les esters d'astaxanthine présents dans l'huile d'Aristeomorpha sont des esters de la forme énolique et non des esters de la forme cétonique.

Quant à l'huile d'hépatopancréas, la différence des chromatogrammes avant et après saponification montre également que son pigment naturel n'est pas non plus l'astacine mais qu'il se transforme en celle-ci au cours des opérations d'isolement. Pourtant le spectre de l'huile d'hépatopancréas a son maximum situé non à 490 $\text{m}\mu$ comme dans le cas du pigment d'hypoderme mais à 484 $\text{m}\mu$. En outre, le sommet plus étalé est pratiquement en plateau entre 480 et 490 $\text{m}\mu$, ce qui fait pressentir l'existence de plusieurs constituants. L'aspect du chromatogramme, formé de cinq zones individualisées, apporte une première confirmation à cette hypothèse.

Fig. II (1).

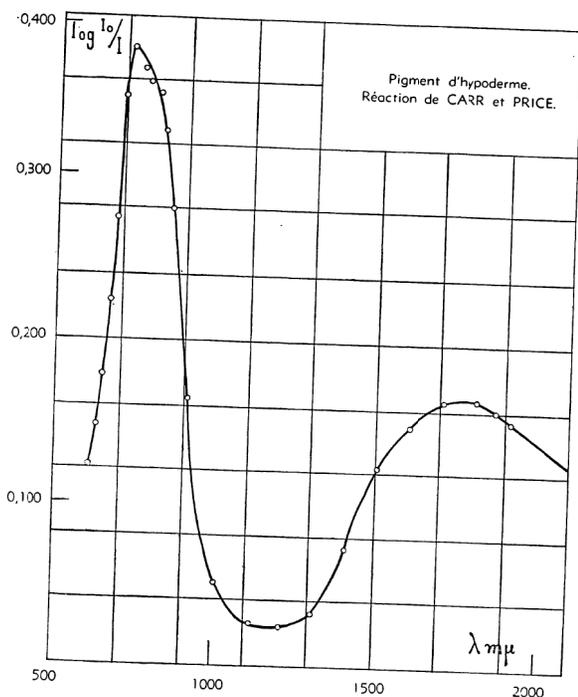


Chacune des zones du chromatogramme a été séparée et le pigment a été élué par agitation de l'alumine colorée avec de l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol. Après évaporation du solvant en atmosphère inerte et remise en solution dans la pyridine, les spectres de chaque fraction ont été enregistrés (7).

(1) Ce spectre et celui représenté figure III ont été enregistrés au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lyon grâce à l'amabilité de MM. JOUANNEAU et ZWINGELSTEIN à qui nous exprimons nos vifs remerciements.

Les courbes spectrophotométriques sont toutes en forme de cloche. Celles correspondant aux zones *a* et *b* ont un maximum étalé entre 465 et 468 m μ . Pour la zone *c*, le sommet, mieux défini, se situe à 482 m μ , quant à la fraction *d*, son spectre présente un sommet en plateau de 480 à 490 m μ ce qui suggère son hétérogénéité ; il est vraisemblable qu'elle est formée par le mélange du constituant prédominant dans la fraction *c* (λ max = 482 m μ) et du constituant caractérisé dans l'hypoderme des carapaces (λ max = 490 m μ). En ce qui concerne la zone *e*, sa faible épaisseur (0,15 cm.) n'a pas permis de l'isoler sans entraîner avec elle un peu de la zone *d* ; sa constitution paraît intermédiaire entre celle de *c* et de *d*.

Fig. III.



La chromatographie permet donc de dissocier le pigment de l'huile d'hépatopancréas⁽¹⁾ en au moins trois constituants diffé-

(1) La chromatographie sur alumine de l'extrait d'hypoderme en solution dans l'éther de pétrole donne un chromatogramme où l'on peut encore reconnaître les mêmes zones que dans le cas de l'huile d'hépatopancréas mais où domine la zone *d*.

rents caractérisés par des maxima d'absorption distincts situés respectivement vers 470, 482 et 490 m μ . Cependant la similitude d'allure des différentes courbes et le fait que tous ces constituants se transforment en astacine par autoxydation, montrent qu'il ne peut s'agir que de substances très voisines. On doit même se demander en premier lieu si l'adsorption à divers niveaux de la colonne d'alumine des différentes substances lipidiques n'est pas la raison de cette hétérogénéité apparente du chromatogramme et si ces substances lipidiques éluées en même temps que le pigment de chacune des zones ne sont pas responsables d'un déplacement du spectre. Cette interprétation ne semble pourtant pas devoir être retenue ; en effet l'addition de 10 % d'huile de ricin à chacun des éluats ne produit aucun décalage appréciable des maxima, seule la densité optique subit une diminution générale.

La présence d'un mélange de plusieurs esters d'un même pigment ne saurait pas davantage rendre compte d'écarts aussi importants entre les sommets des différentes courbes.

L'éventualité de l'existence de plusieurs pigments, chimiquement différents, mais de constitution assez proche cependant pour expliquer leur commune oxydation en astacine doit également être examinée. Mais cette oxydabilité implique sans doute la présence de groupements — CH — CO — dans la molécule, ce qui conduit



à envisager la présence à côté de l'astaxanthine d'isomères de position, le composé possédant la structure du 4,4'-dihydroxy-3,3'-dicéto- β -carotène entre autres.

Sans qu'il soit actuellement possible d'écarter de façon certaine cette interprétation, les récents progrès sur la structure des caroténoïdes suggèrent une hypothèse plus séduisante : celle de la présence dans l'huile d'hépatopancréas de plusieurs stéréoisomères de l'astaxanthine ou de ses esters. La possibilité d'existence d'un même pigment sous plusieurs formes stéréoisomères (isomères *cis-trans*.) est un fait indiscutablement établi pour plusieurs caroténoïdes et l'on sait aujourd'hui que dans la série des provitamines A la configuration stérique ne va pas sans influencer quantitativement l'activité biologique (113), (114).

Le tableau ci-dessous donne la liste des caroténoïdes pour lesquels l'existence de plusieurs stéréoisomères a été reconnue et étudiée :

TABLEAU II

Bixine [HERZIG et FALTIS (33), KARRER et coll. (37)].
 Crocétine [KUHN et WINTERSTEIN (50)].
 β-Carotène [GILLAM et EL RIDI (19), (20), ZECHMEISTER et coll. (115)].
 α-Carotène [GILLAM, EL RIDI et KON (21), ZECHMEISTER et coll. (115), ZSCHEILE et coll. (116)].
 Capsanthine [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Lycopène [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Cryptoxanthine [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Xanthophylle [STRAIN (95), ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Zéaxanthine [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Physaliène [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Taraxanthine [ZECHMEISTER et TUZSON (115)].
 Capsorubine [ZECHMEISTER et CHOLNOKY (115), POLGAR et ZECHMEISTER (78)].
 γ-Carotène [HUNTER et SCOTT (34), ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Pro-γ-Carotène [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Celaxanthine [LE ROSEN et ZECHMEISTER (55)].
 Fucoxanthine [STRAIN et MANNING (96)].
 Polycopène [ZECHMEISTER et coll. (115)].
 Gazaniaxanthine [ZECHMEISTER et SCHROEDER (115)].
 Spirilloxanthine [ZECHMEISTER et coll. (115)].

Jusqu'à présent, l'existence de formes stéréoisomères n'a pas été signalée dans le cas de l'astaxanthine. Pour pouvoir affirmer de façon définitive que le pigment des huiles d'Aristeomorpha présente un nouvel exemple de stéréoisomérisation dans la série des caroténoïdes il faudrait réussir la conversion d'une forme dans l'autre. Cependant, les différents moyens utilisés pour d'autres caroténoïdes, action de l'iode, de la lumière, ébullition à reflux de la solution du pigment dans un solvant organique risquent d'altérer profondément l'astaxanthine à cause de son extrême fragilité. Il n'est pas du tout certain que, dans nos recherches ultérieures, nous réussissions cette conversion.

En l'absence de cette donnée décisive, l'existence de formes stéréoisomères de l'astaxanthine chez *Aristeomorpha foliacea* demeure donc encore hypothétique.

*
**

En résumé, le pigment caroténoïde essentiel d'*Aristeomorpha foliacea* est l'astaxanthine. Nous l'avons, en effet, identifiée sans ambiguïté dans l'hypoderme des carapaces et le conjonctif péristomacal. Elle est également présente dans l'huile d'hépatopancreas, accompagnée de formes voisines qui sont vraisemblablement des stéréoisomères de la configuration entièrement trans.

Il était intéressant de rechercher, chez *Aristeomorpha*, à côté de l'astaxanthine, la présence éventuelle d'axérophtol et de carotènes. Chez les Crustacés, en effet, tandis que la vitamine A n'est généralement pas décelable, les carotènes sont au contraire souvent présents mais à l'état de traces : LEDERER (54), chez *Calanus finmarchicus*, petit Copépode des mers du Nord, n'a pu caractériser l'axérophtol et a trouvé une teneur en carotènes de 0,4 mg. seulement pour 500 g. d'animaux.

Avec CHECHAN, M^{me} MASSONET et ODIER (26), CHECHAN et M^{me} MASSONET (25), nous avons effectué chez *Aristeomorpha* la recherche de ces facteurs, aussi bien dans l'huile d'hépatopancreas que dans l'hypoderme des carapaces, en utilisant la technique spectro-photométrique et la réaction de CARR et PRICE. Les résultats obtenus peuvent se résumer de la façon suivante :

En ce qui concerne la vitamine A :

- 1° Les déterminations spectrophotométriques dans l'ultra-violet n'ont en aucun cas révélé les plus petites quantités d'axérophtol;
- 2° La réaction de CARR et PRICE, moins spécifique mais plus sensible que la spectrophotométrie, exécutée sur les insaponifiables, a confirmé les résultats précédents.

Quant aux carotènes, la chromatographie sur alumine des divers extraits n'a permis de mettre en évidence aucun autre pigment que ceux des cinq zones décrites ci-dessus et le spectre dans le visible de ces zones examinées séparément ou globalement ne révèle pas trace du système à trois maxima caractéristique des carotènes.

La conclusion qui se dégage de l'ensemble des mesures effectuées par spectrophotométrie et à l'aide de la réaction de CARR et PRICE est que, dans la limite de sensibilité de ces méthodes, ni la vitamine A, ni les carotènes ne se trouvent en quantité décelable dans les extraits étudiés. Cette circonstance a été particulièrement favorable à la mise en évidence des propriétés vitaminiques A de l'astaxanthine qui, jusqu'ici, avaient été complètement méconnues.

CHAPITRE III

IMPORTANCE BIOLOGIQUE DE L'ASTAXANTHINE

Tellement autoxydable que son existence même a été méconnue durant près de huit ans et qu'on a d'abord considéré comme un pigment naturel ce qui, au moins le plus souvent, n'était que son produit d'oxydation, l'astaxanthine se situe à part dans la série des caroténoïdes.

Son apparition chez les Crustacés dont la nourriture ne doit pas contenir de quantités importantes de ce pigment, son utilisation par les poissons qui consomment les crustacés, posent la question de son origine et de sa destinée.

L'existence d'astaxanthine dans les cellules photosensibles d'organismes rudimentaires comme ceux des Protozoaires (105), ou hautement évolués comme ceux des Oiseaux (108), souligne la généralité de son intervention dans les mécanismes de photoréception.

Mais ces problèmes, s'ils font clairement apparaître l'importance biologique de l'astaxanthine n'en sont pas pour autant résolus.

A. ORIGINE ET DESTINÉE DE L'ASTAXANTHINE DANS LE MONDE VIVANT :

1° ORIGINE DE L'ASTAXANTHINE DES CRUSTACÉS.

Le caractère exceptionnel de la présence de l'astaxanthine chez les végétaux, opposé à sa fréquence chez les Crustacés, conduit à admettre pour ces derniers l'aptitude à la synthèse du caroténoïde. L'opinion générale, discutée et reprise par SORENSEN (90), est cependant que les Crustacés sont incapables d'effectuer cette synthèse « de novo » mais que le pigment animal résulte de l'oxydation du β -carotène ou de certaines xanthophylles alimentaires. Fox (18) admet que cette conception est valable et doit, selon toute proba-

bilité, être admise pour les pigments du même type rencontrés chez les Coelentérés, les Eponges, les Mollusques, les Echinodermes et d'autres Invertébrés. La présence constante de caroténoïdes acides ou acidogènes chez la plupart des Invertébrés suggère en effet, à partir de caroténoïdes non oxygénés ou moins oxygénés que l'astaxanthine, un mode unique d'oxydation partielle sans ouverture des cycles de β -ionone.

Mais si la réalité d'un tel processus ne fait guère de doute, aucune donnée expérimentale n'éclaire pour l'instant les mécanismes biochimiques qu'il implique.

Une autre question qui, à notre connaissance, n'a pas été jusqu'ici posée de façon explicite est celle du devenir de la vitamine A ingérée par les Crustacés. En dehors des Algues et des Diatomées, sources de carotènes et de xanthophylles, ces « fossoyeurs de la mer » que sont les crustacés consomment en effet des cadavres de poissons qui constituent un apport important en axérophthol. Pourtant, dans les tissus des crustacés, la vitamine A n'est pas décelable [DRUMMOND et GUNTHER (10), LEDERER (54), GILLAM, EL RIDI et WIMPENNY (22), GRANGAUD, CHECHAN, M^{lle} MASSONET et ODIER (26)], à l'exception du tissu oculaire où elle a été mise en évidence en particulier chez le Crabe et le Homard [WALD (104)]. Mais s'il est vrai que la concentration locale en vitamine est élevée, la quantité totale est extrêmement faible rapportée à l'organisme entier, ce qui donne à penser que la majeure partie, sinon la totalité de l'axérophthol alimentaire, doit être transformée. Effectivement, nous avons extrait chez *Aristeomorpha foliacea* les lipides totaux des poches gastriques et de leur contenu ; dans l'insaponifiable de l'extrait, la réaction de CARR et PRICE [technique cinétique de MEUNIER et RAOUL (72)] donne une concentration en axérophthol de l'ordre de 30 μ g. par gramme. Il y a donc lieu de se demander — sans que cette hypothèse repose pour l'instant sur une base expérimentale — si les molécules de la vitamine A ingérée ne peuvent pas, elles aussi, être utilisées à la biosynthèse de l'astaxanthine.

2° L'ASTAXANTHINE ET LA BIOGÉNÈSE DE LA VITAMINE A DES POISSONS

Le problème de la genèse de la vitamine A des poissons n'a pas jusqu'ici reçu de solution satisfaisante : certaines espèces, dont le foie et les viscères renferment des réserves énormes d'axérophthol, se nourrissent essentiellement de Crustacés. Or, chez ceux-ci, nous venons de le rappeler, la vitamine A est pratiquement absente et

le carotène ne s'y trouve qu'à l'état de traces ; parfois même, comme chez *Aristeomorpha foliacea* (26), il fait complètement défaut. A moins, ce qui est peu probable, que les poissons n'édifient leur vitamine A par synthèse totale, ils doivent utiliser les précurseurs de nature caroténoïde présents dans leur nourriture. L'attention se tourne alors immédiatement vers l'astaxanthine (ou l'astacine) [cf. LEDERER (54)]. S'il n'existe aucune preuve directe de la transformation de l'astaxanthine en vitamine A par les poissons, un certain nombre d'arguments sont en faveur de ce processus.

Les travaux de LOVERN, EDISBURY et MORTON (56), EDISBURY, LOVERN et MORTON (13), ont révélé la présence de quantités parfois considérables de vitamine A dans l'intestin de certains poissons et l'intérêt de l'étude de cette vitamine intestinale s'est accru depuis que MATTSON, MEHL et DUEL (65), WIESE, MEHL et DUEL (110) ont établi que, chez le rat, la synthèse de l'axérophthol à partir de provitamine s'effectue non dans le foie mais dans l'intestin. En supposant pour cette synthèse une analogie des mécanismes chez tous les vertébrés, il est permis d'attendre des recherches sur la vitamine A de l'intestin des poissons des renseignements sur la biogénèse de ce facteur.

Nous avons étudié, avec M^{lles} R. MASSONET et H. LARROQUE (30), la répartition de la vitamine A chez un Gadidé : *Merluccius vulgaris*. Les résultats obtenus sur dix-sept merluches de 350 à 500 g. pêchés en Méditerranée entre le 29 avril et le 19 mai font apparaître :

1° Que chez les différents sujets examinés, la teneur en vitamine A des foies, d'une part, et des intestins, d'autre part, est le plus souvent élevée mais extrêmement variable. Rapportée au gramme d'insaponifiable, cette teneur varie pour le foie entre 1.300 et 51.000 U. I. et pour l'intestin entre 2.500 et 250.000 U. I. ;

2° Que pour un même sujet, la teneur en vitamine A du foie et celle de l'intestin sont le plus souvent très différentes. Rapportée au gramme de tissu, la concentration en vitamine est, dans la moitié des cas, plus élevée dans l'intestin que dans le foie, la quantité de vitamine A de l'intestin entier étant même parfois supérieure à celle accumulée dans la totalité du foie. Si l'on compare les fractions insaponifiables de l'intestin et du foie, ces différences sont encore plus notables : pour quatorze des dix-sept animaux examinés, la concentration en vitamine A de l'insaponifiable est plus élevée dans l'intestin que dans le foie, l'écart étant souvent considérable.

Ces faits évoquent, pour la vitamine A de l'intestin, une signification autre que celle d'une simple réserve. L'absence de corrélation entre les taux de vitamine hépatique et intestinale, l'amplitude des écarts de concentration enregistrés pour cette dernière et sa localisation, suggèrent l'hypothèse qu'elle représente un produit soumis aux fluctuations de l'approvisionnement en provitamines alimentaires.

Or, *Merluccius vulgaris* poursuit les bancs de crevettes dont il fait sa pâture ⁽¹⁾. La plupart des espèces de celles-ci sont, en Méditerranée, fortement pigmentées et riches par conséquent en astaxanthine. Bien que ce caroténoïde ne s'accumule pas chez *Merluccius*, il n'est pas possible de ne pas établir une relation entre l'astaxanthine de sa nourriture et sa vitamine A intestinale. L'aptitude des poissons à absorber l'astaxanthine est en effet établie [ROSENBERG (83)] ; la présence de ce caroténoïde a été reconnue dans de nombreuses espèces (cf. tableau p. 27) et récemment STEVEN (94) a démontré son utilisation par la Truite : chez la truite vivant en liberté, les deux pigments caroténoïdes présents sont la lutéine et l'astaxanthine qui se trouvent en proportion égale. Les animaux élevés en aquarium conservent leur pigmentation normale à condition que leur régime alimentaire soit de même nature que celui des truites sauvages ; mais si le régime est composé de vers de terre et de viande hachée, l'astaxanthine disparaît complètement et seule subsiste la lutéine. Ici encore, bien que l'on ne possède aucun renseignement sur la destinée de l'astaxanthine, son utilisation ne peut faire de doute.

B. L'ASTAXANTHINE, NOUVEAU FACTEUR VITAMINIQUE A

Depuis la classique expérience de MOORE (74) établissant la relation physiologique entre les carotènes et la vitamine A, et les travaux de KARRER et de son école (42) démontrant la constitution et la parenté chimique de ces substances, s'est généralisée la notion que les provitamines A, c'est-à-dire les substances que l'organisme est capable de convertir en axérophtol, renferment dans leur molécule le radical axérophtyle représentant une molécule de vitamine A en puissance. Les corps dont la structure est autre, en particulier les caroténoïdes à cycle oxygéné, au nombre desquels figurent l'astacine et l'astaxanthine, sont considérés comme dépourvus de

(1) DIEUZEIDE, communication verbale.

propriétés vitaminiques A [cf. MORTON (75)] et incapables d'engendrer des substances douées de telles propriétés. Les seules exceptions connues jusqu'ici sont celle de l'époxyde de la vitamine A [KARRER et JÜCKER (39)] et de l'époxyde de rétinène [MEUNIER et FERRANDO (67), MEUNIER, MALLEIN et JOUANNEAU (71)], qui possèdent les propriétés physiologiques de la vitamine A, quoique atténuées.

Avant de rapporter les expériences qui nous ont permis de démontrer puis de préciser les propriétés vitaminiques A de l'astaxanthine, nous rappellerons les recherches préliminaires effectuées sur les huiles d'*Aristeomorpha foliacea*. Ce sont, en effet, ces recherches qui nous ont révélé l'existence d'un principe vitaminique A distinct de ceux jusqu'ici dénombrés et nous ont fait pressentir que ce facteur vitaminique nouveau n'était autre que le pigment caroténoïde rouge présent dans les huiles étudiées.

I. - ACTIVITÉ VITAMINIQUE A DES HUILES D'ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Les expériences qui mettent en évidence ces propriétés et qui ont été décrites dans un travail antérieur avec M^{me} MASSONET (27), (28) peuvent se résumer de la façon suivante :

a) *Préparation de l'huile* : celle-ci a été extraite de crevettes pêchées en juin et juillet. Les céphalothorax sont détachés et vidés de leur contenu dont on sépare la poche gastrique dans la crainte que les débris alimentaires qu'elle renferme ne constituent un apport exogène de vitamine. La masse est broyée avec du sulfate de soude anhydre puis épuisée par l'acétone. Les solutions acétoniques rassemblées sont additionnées d'éther de pétrole et d'eau. Après agitation et repos, on sépare la phase éthero-pétrolique qui est ensuite évaporée en atmosphère inerte et sous pression réduite. Ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus (p. 30) on obtient une huile épaisse fortement colorée en rouge, le rendement étant de 5 à 8 g. d'huile par kg de crevette.

b) *Essai biologique* : cette huile a été administrée à trois lots A, B, C, de rats albinos âgés de 75 à 90 jours, pesant de 60 à 70 g. nourris depuis le sevrage à l'aide du régime dépourvu de facteurs vitaminiques A préconisé par A. CHEVALLIER (8) et présentant une stabilisation de poids remontant à dix jours au moins en même temps qu'une xérophtalmie intense. Chaque animal a reçu par jour en plus du régime de base :

Ces faits évoquent, pour la vitamine A de l'intestin, une signification autre que celle d'une simple réserve. L'absence de corrélation entre les taux de vitamine hépatique et intestinale, l'amplitude des écarts de concentration enregistrés pour cette dernière et sa localisation, suggèrent l'hypothèse qu'elle représente un produit soumis aux fluctuations de l'approvisionnement en provitamines alimentaires.

Or, *Merluccius vulgaris* poursuit les bancs de crevettes dont il fait sa pâture (1). La plupart des espèces de celles-ci sont, en Méditerranée, fortement pigmentées et riches par conséquent en astaxanthine. Bien que ce caroténoïde ne s'accumule pas chez *Merluccius*, il n'est pas possible de ne pas établir une relation entre l'astaxanthine de sa nourriture et sa vitamine A intestinale. L'aptitude des poissons à absorber l'astaxanthine est en effet établie [ROSENBERG (83)] ; la présence de ce caroténoïde a été reconnue dans de nombreuses espèces (cf. tableau p. 27) et récemment STEVEN (94) a démontré son utilisation par la Truite : chez la truite vivant en liberté, les deux pigments caroténoïdes présents sont la lutéine et l'astaxanthine qui se trouvent en proportion égale. Les animaux élevés en aquarium conservent leur pigmentation normale à condition que leur régime alimentaire soit de même nature que celui des truites sauvages ; mais si le régime est composé de vers de terre et de viande hachée, l'astaxanthine disparaît complètement et seule subsiste la lutéine. Ici encore, bien que l'on ne possède aucun renseignement sur la destinée de l'astaxanthine, son utilisation ne peut faire de doute.

B. L'ASTAXANTHINE, NOUVEAU FACTEUR VITAMINIQUE A

Depuis la classique expérience de MOORE (74) établissant la relation physiologique entre les carotènes et la vitamine A, et les travaux de KARRER et de son école (42) démontrant la constitution et la parenté chimique de ces substances, s'est généralisée la notion que les provitamines A, c'est-à-dire les substances que l'organisme est capable de convertir en axérophtol, renferment dans leur molécule le radical axérophtyle représentant une molécule de vitamine A en puissance. Les corps dont la structure est autre, en particulier les caroténoïdes à cycle oxygéné, au nombre desquels figurent l'astacine et l'astaxanthine, sont considérés comme dépourvus de

(1) DIEUZEIDE, communication verbale.

propriétés vitaminiques A [cf. MORTON (75)] et incapables d'engendrer des substances douées de telles propriétés. Les seules exceptions connues jusqu'ici sont celle de l'époxyde de la vitamine A [KARRER et JÜCKER (39)] et de l'époxyde de rétinène [MEUNIER et FERRANDO (67), MEUNIER, MALLEIN et JOUANNETEAU (71)], qui possèdent les propriétés physiologiques de la vitamine A, quoique atténuées.

Avant de rapporter les expériences qui nous ont permis de démontrer puis de préciser les propriétés vitaminiques A de l'astaxanthine, nous rappellerons les recherches préliminaires effectuées sur les huiles d'*Aristeomorpha foliacea*. Ce sont, en effet, ces recherches qui nous ont révélé l'existence d'un principe vitaminique A distinct de ceux jusqu'ici dénombrés et nous ont fait pressentir que ce facteur vitaminique nouveau n'était autre que le pigment caroténoïde rouge présent dans les huiles étudiées.

I. - ACTIVITÉ VITAMINIQUE A DES HUILES D'ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Les expériences qui mettent en évidence ces propriétés et qui ont été décrites dans un travail antérieur avec M^{me} MASSONET (27), (28) peuvent se résumer de la façon suivante :

a) *Préparation de l'huile* : celle-ci a été extraite de crevettes pêchées en juin et juillet. Les céphalothorax sont détachés et vidés de leur contenu dont on sépare la poche gastrique dans la crainte que les débris alimentaires qu'elle renferme ne constituent un apport exogène de vitamine. La masse est broyée avec du sulfate de soude anhydre puis épuisée par l'acétone. Les solutions acétoniques rassemblées sont additionnées d'éther de pétrole et d'eau. Après agitation et repos, on sépare la phase éthero-pétrolique qui est ensuite évaporée en atmosphère inerte et sous pression réduite. Ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus (p. 30) on obtient une huile épaisse fortement colorée en rouge, le rendement étant de 5 à 8 g. d'huile par kg de crevette.

b) *Essai biologique* : cette huile a été administrée à trois lots A, B, C, de rats albinos âgés de 75 à 90 jours, pesant de 60 à 70 g. nourris depuis le sevrage à l'aide du régime dépourvu de facteurs vitaminiques A préconisé par A. CHEVALLIER (8) et présentant une stabilisation de poids remontant à dix jours au moins en même temps qu'une xérophtalmie intense. Chaque animal a reçu par jour en plus du régime de base :

Ces faits évoquent, pour la vitamine A de l'intestin, une signification autre que celle d'une simple réserve. L'absence de corrélation entre les taux de vitamine hépatique et intestinale, l'amplitude des écarts de concentration enregistrés pour cette dernière et sa localisation, suggèrent l'hypothèse qu'elle représente un produit soumis aux fluctuations de l'approvisionnement en provitamines alimentaires.

Or, *Merluccius vulgaris* poursuit les bancs de crevettes dont il fait sa pâture (1). La plupart des espèces de celles-ci sont, en Méditerranée, fortement pigmentées et riches par conséquent en astaxanthine. Bien que ce caroténoïde ne s'accumule pas chez *Merluccius*, il n'est pas possible de ne pas établir une relation entre l'astaxanthine de sa nourriture et sa vitamine A intestinale. L'aptitude des poissons à absorber l'astaxanthine est en effet établie [ROSENBERG (83)] ; la présence de ce caroténoïde a été reconnue dans de nombreuses espèces (cf. tableau p. 27) et récemment STEVEN (94) a démontré son utilisation par la Truite : chez la truite vivant en liberté, les deux pigments caroténoïdes présents sont la lutéine et l'astaxanthine qui se trouvent en proportion égale. Les animaux élevés en aquarium conservent leur pigmentation normale à condition que leur régime alimentaire soit de même nature que celui des truites sauvages ; mais si le régime est composé de vers de terre et de viande hachée, l'astaxanthine disparaît complètement et seule subsiste la lutéine. Ici encore, bien que l'on ne possède aucun renseignement sur la destinée de l'astaxanthine, son utilisation ne peut faire de doute.

B. L'ASTAXANTHINE, NOUVEAU FACTEUR VITAMINIQUE A

Depuis la classique expérience de MOORE (74) établissant la relation physiologique entre les carotènes et la vitamine A, et les travaux de KARRER et de son école (42) démontrant la constitution et la parenté chimique de ces substances, s'est généralisée la notion que les provitamines A, c'est-à-dire les substances que l'organisme est capable de convertir en axérophthol, renferment dans leur molécule le radical axérophthyle représentant une molécule de vitamine A en puissance. Les corps dont la structure est autre, en particulier les caroténoïdes à cycle oxygéné, au nombre desquels figurent l'astacine et l'astaxanthine, sont considérés comme dépourvus de

(1) DIEUZEIDE, communication verbale.

propriétés vitaminiques A [cf. MORTON (75)] et incapables d'engendrer des substances douées de telles propriétés. Les seules exceptions connues jusqu'ici sont celle de l'époxyde de la vitamine A [KARRER et JÜCKER (39)] et de l'époxyde de rétinène [MEUNIER et FERRANDO (67), MEUNIER, MALLEIN et JOUANNEAU (71)], qui possèdent les propriétés physiologiques de la vitamine A, quoique atténuées.

Avant de rapporter les expériences qui nous ont permis de démontrer puis de préciser les propriétés vitaminiques A de l'astaxanthine, nous rappellerons les recherches préliminaires effectuées sur les huiles d'*Aristeomorpha foliacea*. Ce sont, en effet, ces recherches qui nous ont révélé l'existence d'un principe vitaminique A distinct de ceux jusqu'ici dénombrés et nous ont fait pressentir que ce facteur vitaminique nouveau n'était autre que le pigment caroténoïde rouge présent dans les huiles étudiées.

I. - ACTIVITÉ VITAMINIQUE A DES HUILES D'ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Les expériences qui mettent en évidence ces propriétés et qui ont été décrites dans un travail antérieur avec M^{me} MASSONET (27), (28) peuvent se résumer de la façon suivante :

a) *Préparation de l'huile* : celle-ci a été extraite de crevettes pêchées en juin et juillet. Les céphalothorax sont détachés et vidés de leur contenu dont on sépare la poche gastrique dans la crainte que les débris alimentaires qu'elle renferme ne constituent un apport exogène de vitamine. La masse est broyée avec du sulfate de soude anhydre puis épuisée par l'acétone. Les solutions acétoniques rassemblées sont additionnées d'éther de pétrole et d'eau. Après agitation et repos, on sépare la phase éthéro-pétrolique qui est ensuite évaporée en atmosphère inerte et sous pression réduite. Ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus (p. 30) on obtient une huile épaisse fortement colorée en rouge, le rendement étant de 5 à 8 g. d'huile par kg de crevette.

b) *Essai biologique* : cette huile a été administrée à trois lots A, B, C, de rats albinos âgés de 75 à 90 jours, pesant de 60 à 70 g. nourris depuis le sevrage à l'aide du régime dépourvu de facteurs vitaminiques A préconisé par A. CHEVALLIER (8) et présentant une stabilisation de poids remontant à dix jours au moins en même temps qu'une xérophtalmie intense. Chaque animal a reçu par jour en plus du régime de base :

lot A (2 mâles, 3 femelles) 90 mg. d'huile
lot B (3 mâles, 2 femelles) 45 mg. d'huile
lot C (3 mâles, 3 femelles) 22 mg. d'huile

Simultanément, trois lots, D, E, F, de rats témoins, en tous points comparables aux précédents recevaient par animal et par jour :

lot D (2 mâles, 3 femelles) régime de base + 15 U. I. de vit. A
lot E (2 mâles, 2 femelles) régime de base + 4 U. I. de vit. A
lot F (3 mâles, 3 femelles) régime sans adjonction de vit. A

Les animaux des lots A et D ont rapidement repris une croissance normale, au dixième jour de traitement, l'augmentation moyenne de poids étant de 16 g. par animal pour les premiers et de 20 g. pour les seconds. L'augmentation au bout de ce temps n'était que de 10 g. en moyenne pour les rats du lot B et de 6 g. pour ceux du lot E. Quant à ceux des lots C et F (à l'exception d'un seul rat, du lot C, accusant au dixième jour une augmentation de poids de 4 g. qu'il devait perdre ensuite pour succomber au trente-cinquième jour de traitement) ils ont continué à dépérir et sont tous morts en moins de vingt-cinq jours après le début du traitement.

Le fait que les animaux des lots A et D aient repris dès le début du traitement une croissance normale indique que les lésions de carence n'avaient pas encore atteint un stade d'irréversibilité. D'autre part, la comparaison des lots A, B et C montre que pour les animaux ayant reçu l'huile d'*Aristeomorpha*, l'augmentation de poids est proportionnelle à la dose administrée ce qui exclut l'hypothèse d'un effet toxique de l'huile. Par conséquent, si les rats du lot C ont continué à dépérir parallèlement aux témoins carencés du lot F c'est qu'une dose quotidienne de 22 mg. d'huile n'apporte ni axérophthol ni provitamine A en quantité notable.

Or chez tous les animaux recevant de l'huile de crevette y compris les six rats du lot C on notait une atténuation indiscutable des signes de xérophtalmie moins de quatre jours après la première administration d'huile et la guérison complète des lésions oculaires en moins de quinze jours. Ce résultat nous a paru d'autant plus remarquable que chez les animaux témoins l'évolution a été entièrement différente ; seuls ceux du lot D ont guéri leur xérophtalmie (un peu moins rapidement toutefois que ceux recevant de l'huile de crevette). Quant à ceux du lot E on n'observait aucune atténuation des lésions trois semaines après le début du traitement en dépit de la reprise de poids enregistrée. Pour ce lot, l'évolution est d'ailleurs en parfait accord avec les données classiques [M^{me} L. RANDOIN (80)] : chez le rat carencé en vitamine A la guérison de

la xérophtalmie n'est, en effet, obtenue qu'avec des doses d'axérophthol ou de provitamines A nettement supérieures à la dose d'entretien [JAVILLIER et M^{lle} L. EMERIQUE (35)].

Ainsi l'huile d'*Aristeomorpha foliacea* (extraction d'été) possède une activité antixérophtalmique beaucoup plus accusée que l'action sur la reprise de poids du rat blanc carencé ne permettait de le prévoir. Ce résultat devait nous conduire à envisager dans l'huile étudiée la présence d'un nouveau facteur vitaminique A se distinguant précisément de tous les autres facteurs de ce groupe par la prédominance de l'action antixérophtalmique sur l'effet de la croissance (1).

Des expériences complémentaires du même type que les précédentes et destinées à mettre en évidence des variations saisonnières éventuelles ont montré que les huiles extraites de crevettes pêchées en hiver, beaucoup moins colorées que les huiles d'été et possédant des caractères spectraux nettement différents (cf. fig. 1) ne manifestaient pratiquement plus d'activité antixérophtalmique.

Cette disparition de l'activité vitaminique simultanément à d'importantes modifications spectrales et à une chute considérable de la concentration en pigment suggère que celui-ci pourrait s'identifier au principe antixérophtalmique. Des expériences ont donc été entreprises pour tenter de vérifier cette hypothèse.

II. - ACTIVITÉ ANTIXEROPHTALMIQUE DU PIGMENT CAROTÉNOÏDE D'ARISTEOMORPHA FOLIACEA

ESSAIS PRÉLIMINAIRES.

Dans un premier essai l'huile a été saponifiée par la potasse alcoolique à 15 % durant quatre heures à la température de 20° C. Par addition d'eau et d'éther de pétrole et séjour à la glacière, le sel de l'astacine se rassemble à l'interphase sous forme de flocons rouges que l'on sépare. Après les avoir lavés avec un peu d'alcool aqueux à 50 %, les flocons ont été mélangés à un volume d'huile végétale dévitaminée égal au volume de l'huile saponifiée. La préparation ainsi obtenue a été administrée à des rats carencés en vitamine A dans les mêmes conditions que dans les expériences antérieures. Même à la dose de 90 mg. par animal et par jour, à l'exception d'une

(1) Il est regrettable que nous n'ayons pu au cours de cette étude pratiquer d'examen biomicroscopiques. On sait en effet [6] que l'utilisation du biomicroscope permet, chez le rat blanc carencé en vitamine A de dépister précocement les lésions cornéennes et d'en suivre l'évolution avec précision. Pour remédier à ce défaut d'appareillage nous avons toujours fait débiter le traitement au stade de la carence où l'ulcération de la cornée était manifeste.

amélioration légère et transitoire de l'atteinte oculaire chez deux sujets, aucune action sensible sur l'évolution des signes de carence n'a été enregistrée. Ce résultat est en accord avec les données classiques et confirme que l'astacine est dépourvue de propriétés vitaminiques A.

Un deuxième essai a été effectué en faisant ingérer à des rats carencés des ovaires d'*Aristeomorpha* simplement broyés et remis en suspension dans de l'huile végétale dévitaminée : comme dans l'expérience précédente, aucune atténuation des lésions de xérophtalmie n'a été obtenue. Ainsi que nous l'avons indiqué, dans les ovaires le pigment est un chromoprotéide aisément dissociable en protéine et astaxanthine libre. L'extrême facilité avec laquelle l'astaxanthine non estérifiée s'oxyde en astacine suffit sans doute à expliquer cet échec.

Dans l'huile d'hépatopancréas le pigment se trouve sous forme d'esters et l'on pouvait penser que sa résistance à l'oxydation étant plus grande son comportement serait peut-être différent de celui du pigment des ovaires.

Un nouvel essai a donc été tenté en administrant à l'animal carencé le pigment de l'huile séparé non plus par saponification mais par chromatographie sur alumine.

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DU PIGMENT DE L'HUILE D'HÉPATO-PANCRÉAS ET PRÉPARATION D'UNE SOLUTION ACTIVE

a) PRÉPARATION DE LA SOLUTION.

Comme pour l'étude du pigment de l'huile d'hépatopancréas et son identification (cf. p. 31) 2 g. d'huile (extraction de juillet) ont été dissous dans 200 cm³ d'éther de pétrole. La solution a été filtrée lentement sur une colonne d'alumine pour chromatographie de 20 cm. de haut et de 2 cm. de diamètre. Le pigment retenu à la partie supérieure de la colonne a été lavé avec 200 cm³ d'éther de pétrole puis élué par agitation de l'alumine colorée avec de l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol. Après centrifugation et séparation de l'éluat, on y a dissout 1 g. d'huile végétale dévitaminée préalablement additionnée de 2 mg. d' α -tocophéol destiné à jouer le rôle d'antioxygène vis-à-vis du pigment ; puis le solvant a été chassé sous pression réduite en atmosphère inerte. On a ainsi obtenu 1,10 g. environ de résidu huileux dont la concentration en pigment mesurée à l'aide d'un photocolorimètre sur une dilution chloroformique est sensiblement la même que celle de l'huile de crevette. Le rendement est donc de 50 % seulement. Il est possible cependant

d'obtenir une élution quantitative en prolongeant la durée d'agitation de l'alumine avec le mélange éther de pétrole-méthanol et surtout en renouvelant à trois ou quatre reprises le liquide éluant. Pour éviter au maximum les risques d'altération du pigment au cours des opérations d'isolement, il nous a paru préférable de nous en tenir à un seul épuisement au détriment du rendement.

C'est dans le même sentiment de prudence, dicté par les observations ⁽¹⁾ et les échecs antérieurs que l'adjonction d'antioxygène à la préparation a été jugé nécessaire et que le véhicule huileux préalablement additionné de tocophéol a été ajouté à l'éluant avant évaporation du solvant.

b) ESSAI BIOLOGIQUE.

Deux lots A et B de six rats albinos chacun, carencés dans les mêmes conditions que dans les expériences antérieures ont reçu alors que la stabilisation de poids remontait à plus de dix jours et que la xérophtalmie était profondément installée

— lot A : régime de base + 40 mg. de la préparation par animal et par jour.

— lot B : régime de base + 40 mg. du véhicule huileux par animal et par jour.

Chez les témoins (lot B) l'aggravation des signes de carence est allée en s'accroissant et les animaux sont morts, moins de trois semaines après la première administration de véhicule huileux, atteints d'une xérophtalmie en pleine évolution.

Pour les rats du lot A au contraire une atténuation de la xérophtalmie était notée dès le troisième jour du traitement, et, suivant les sujets, les lésions oculaires pouvaient être considérées comme guéries entre le septième et le neuvième jour. Pourtant, aucune reprise appréciable de poids n'était enregistrée et les animaux devaient succomber dans les vingt à vingt-cinq jours après la première administration de pigment.

La chromatographie ne permet pas d'extraire le pigment sans entraîner avec lui d'autres constituants de l'huile et par conséquent de le séparer et de l'administrer à l'état de pureté. Cependant la séparation chromatographique permet d'établir que l'activité vita-

⁽¹⁾ Au cours d'un essai biologique durant l'été 1948, six rats carencés traités à l'huile de crevette (45 mg. par animal et par jour) et pratiquement guéris ont fait simultanément une brusque poussée de xérophtalmie. Au moment de cet accident, le flacon renfermant l'huile était aux trois quarts vide, ce qui donnait à penser à une oxydation du principe actif. Effectivement, la substitution à l'huile devenue inactive d'un échantillon conservé jusque là à l'abri de l'air a amené une régression rapide des lésions oculaires et leur guérison en quatre à cinq jours.

minique est proportionnelle à la concentration en pigment, et l'hypothèse que la propriété antixérophtalmique de la préparation puisse appartenir à une substance autre que le pigment lui-même semble devoir être écartée : il ne saurait en effet s'agir alors que d'un composé incolore présent en même temps que le pigment dans l'huile d'été, disparaissant comme lui de l'huile d'hiver, adsorbé sur alumine au même niveau et élué par le même solvant. Aussi le résultat de l'essai biologique paraît-il suffisant pour affirmer l'activité antixérophtalmique des esters de l'astaxanthine présents dans l'huile d'hépatopancréas d'*Aristeomorpha foliacea* sous plusieurs formes probablement stéréoisomères. Les expériences complémentaires qui vont être décrites dans les pages suivantes confirment cette conclusion.

ACTIVITÉ VITAMINIQUE

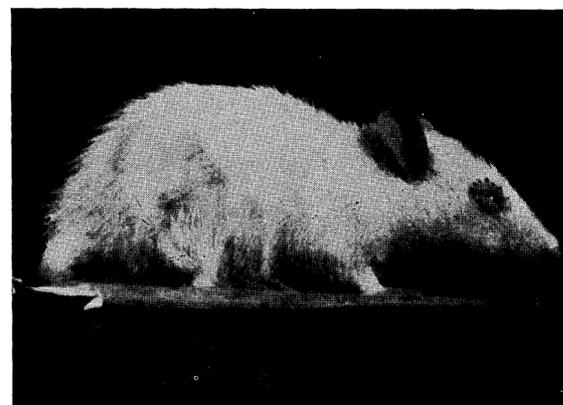
DU PIGMENT EXTRAIT DE L'HYPODERME D'ARISTEOMORPHA

La membrane conjonctive, désignée improprement sous le terme d'hypoderme et qui, chez *Aristeomorpha*, tapisse, au niveau du céphalo-thorax, la face interne de la carapace, est beaucoup moins riche en lipides que l'hépatopancréas, de sorte que le pigment y est beaucoup plus concentré que dans cet organe. De plus, ainsi que nous l'avons montré avec C. CHECHAN et M^{me} R. MASSONET, son spectre d'absorption est tout à fait caractéristique des esters de l'astaxanthine (cf. p. 33).

Les membranes conjonctives provenant de 1 kg de crevettes ont été détachées par curetage, broyées avec du sulfate de soude anhydre et épuisées par l'acétone. Les solutions acétoniques ont été rassemblées, puis additionnées d'eau et d'éther de pétrole. Après agitation et repos, la solution éthéro-pétrolique a été séparée et le pigment en a été extrait par chromatographie sur alumine. Comme dans l'expérience précédente, l'éluat a été effectué en une seule extraction par agitation de l'alumine colorée avec le mélange éther de pétrole-méthanol. Après addition à l'éluat de 5 cm³ d'huile végétale dévitaminée contenant 2 % d' α -tocophérol, le solvant a été évaporé en atmosphère inerte sous pression réduite. Dans ces conditions, la concentration en pigment de l'huile résiduelle obtenue est à peu près la même que celle des diverses préparations utilisées dans les essais biologiques antérieurs.

Le schéma de ce nouvel essai a été exactement le même que celui des expériences précédentes : neuf rats carencés ont reçu par animal

Fig. IV.



Animal carencé.



Le même animal après une semaine de traitement.

et par jour, en plus du régime de base ⁽¹⁾, 40 mg. de la solution huileuse du pigment d'hypoderme, tandis que six rats témoins continuaient à recevoir le régime de base seul.

Alors que chez les témoins l'accentuation des signes de carence se poursuivait jusqu'à l'issue fatale, chez les neuf rats traités les lésions oculaires s'amélioraient rapidement et étaient guéries chez

⁽¹⁾ Régime dépourvu de facteurs vitaminiques A préconisé par A. CHEVALLIER (8).

tous les animaux huit à neuf jours après la première administration du pigment (fig. 4). Cependant, trois des animaux traités devaient mourir respectivement aux douzième, quinzième et seizième jours de traitement ; les six autres, qui paraissaient un peu plus résistants, ont maintenu leur poids en plateau pendant vingt jours sans cependant manifester une amélioration sensible de l'état général : on notait en effet chez les six sujets un état de misère physiologique se manifestant en particulier par des signes de paralysie du train postérieur et chez l'un d'eux par l'apparition d'un énorme abcès dans la région du cou.

Ces six animaux ont été sacrifiés au vingtième jour de traitement et ont constitué l'un des lots utilisés pour l'étude de la localisation du pigment dans l'organisme du rat traité.

Ainsi le résultat de cette nouvelle expérience, en accord avec celui obtenu par administration du pigment extrait de l'huile d'hépto-pancréas, confirme la propriété antixérophtalmique des esters de l'astaxanthine.

III. - LOCALISATION DE L'ASTAXANTHINE DANS L'ORGANISME DU RAT TRAITÉ

Mise en évidence dans la rétine.

L'activité vitaminique A des esters de l'astaxanthine une fois mise en évidence, il était naturel de rechercher le pigment dans l'organisme du rat traité afin de préciser sa localisation et éventuellement sa mise en réserve. Quatre expériences successives ont été instituées pour conduire cette étude.

La première a consisté à administrer à sept rats adultes normaux de notre élevage, recevant un régime composé de blé dur et de salade, 90 mg. d'huile d'hépto-pancréas d'*Aristeomorpha foliacea* (extraction de septembre) par animal et par jour, durant un mois. Au bout de ce temps, les animaux ont été sacrifiés et le pigment a été recherché dans les yeux d'une part, dans les foies d'autre part. En outre, dans ces derniers, a été également recherchée et dosée la vitamine A.

Il convient de noter qu'au cours de l'expérience ne s'est manifesté aucun signe d'intolérance vis-à-vis de l'huile de crevette, dont l'innocuité a été confirmée lors de l'autopsie des animaux traités.

Etude des yeux.

Les yeux ont été rapidement énucléés après la mort et broyés avec du sulfate de soude anhydre. La masse a été épuisée à l'acétone

(40 cm³. en quatre fois). Les solutions acétoniques ont été rassemblées, diluées avec 20 cm³. d'eau et agitées vigoureusement avec 20 cm³. d'éther de pétrole. Après repos, la phase éthéro-pétrolique a été séparée, lavée à l'eau, séchée au sulfate de soude anhydre, filtrée et ramenée par évaporation sous pression réduite en atmosphère inerte à un volume de 5 cm³.

La solution, colorée en jaune orangé pâle, a été versée goutte à goutte et aspirée lentement sur une colonne d'alumine de 20 cm. de haut et de 0,5 cm. de diamètre, préalablement imbibée d'éther de pétrole. Le pigment a été retenu à 3 mm. du sommet formant un anneau rose grisâtre. Après lavage du chromatogramme avec 10 cm³. d'éther de pétrole, on a versé goutte à goutte 2 cm³. d'éther de pétrole additionnés d'une goutte d'acide acétique. Cette acidification a provoqué un virage au rose cyclamen de l'anneau coloré qui est descendu lentement le long de la colonne en s'étalant légèrement.

Les yeux de sept rats témoins, comparables aux précédents mais n'ayant pas reçu d'huile de crevette, traités de la même façon, ont fourni une solution éthéro-pétrolique presque incolore. Celle-ci versée sur alumine n'a donné lieu à la formation d'aucun anneau coloré, seule la zone grisâtre des trois millimètres supérieurs de la colonne a été perceptible. Cependant, le chromatogramme a été lavé comme le précédent avec 10 cm³. d'éther de pétrole, puis on y a versé 2 cm³. d'éther de pétrole acidifiés par l'acide acétique : aucune teinte rose n'est apparue.

Il paraît donc incontestable que chez les rats traités le pigment de l'huile d'*Aristeomorpha* ou un produit de transformation de celui-ci se retrouve au niveau de la rétine (1).

Etude des foies.

De chacun des foies, une prise de 1,5 g. a été prélevée et saponifiée par la potasse alcoolique. La présence de vitamine A a été mise en évidence dans la solution chloroformique de l'insaponifiable et le dosage, effectué sur une partie aliquote de cette solution [réaction de CARR et PRICE, technique cinétique de MEUNIER et RAOUL (72)], a indiqué une teneur moyenne de 75 U. I. par gramme de tissu hépatique (de 70 à 83 U. I. suivant les sujets) (2). Quant au reste de l'organe, finement divisé, il a été broyé avec du sulfate de soude

(1) Il convient en effet de préciser que l'examen des yeux énucléés montre que seule la région rétinienne est pigmentée.

(2) Dans le foie des rats témoins on a trouvé une teneur moyenne de 84 U. I. de vitamine A par gramme de tissu hépatique.

anhydre, puis la masse a été épuisée par l'acétone. Les solutions acétoniques diluées ont été agitées avec de l'éther de pétrole et la solution éthéro-pétrolique lavée, séchée, filtrée a été ramenée par évaporation en atmosphère inerte sous pression réduite à un volume de 5 cm³.

La solution jaune pâle ainsi obtenue par traitement de 10 g. de tissu hépatique a été chromatographiée sur alumine et a donné, à quelques millimètres du sommet de la colonne, un anneau orangé ressemblant à celui obtenu avec l'extrait des yeux mais plus diffus et plus pâle ; par acidification est bien apparue la teinte rose cyclamen, mais à peine perceptible.

Ainsi ne se retrouve dans le tissu hépatique de l'animal que des traces de pigment, ce qui indique une inaptitude à la mise en réserve.

Dans l'hypothèse qu'une compétition entre axérophtol et astaxanthine aurait pu entraver la fixation de celle-ci par la cellule hépatique, on pouvait penser que les résultats seraient différents chez le rat carencé en vitamine A. Une deuxième expérience a donc été exécutée en administrant l'huile à la dose de 40 mg. par animal et par jour, non plus à des rats normaux mais à des animaux soumis depuis le sevrage au régime dépourvu de facteurs A et parvenus au stade de la stabilisation de poids et de l'installation de la xérophtalmie.

Après deux semaines de traitement, les quatorze animaux du lot, qui avaient recommencé à grossir lentement et dont les yeux étaient redevenus sains, ont été sacrifiés et traités exactement comme les précédents.

Les 5 cm³. de la solution dans l'éther de pétrole du pigment des yeux, filtrés sur alumine, ont donné, comme dans l'expérience précédente, un anneau rouge orangé à 3 ou 4 mm. du sommet, mais beaucoup plus net ⁽¹⁾. Après développement du chromatogramme avec 10 cm³. d'éther de pétrole, l'alumine colorée a été séparée et le pigment en a été élué par quatre épuisements avec chaque fois 2 cm³. d'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol. Les liquides d'éluion rassemblés dans un tube cylindro-conique ont été évaporés sous pression réduite en atmosphère inerte, puis le résidu a été dissous dans 1 cm³. de potasse alcoolique à 15 %. Après quatre heures de saponification à la température de 20° C, addition de 2 cm³. d'eau et de 2 cm³. d'éther de pétrole et séjour à la glacière, le pigment s'est rassemblé à l'interphase sous forme de flocons orangés. Ceux-ci ont été séparés, remis en suspension dans 2 cm³. d'alcool

(1) Ce qui s'explique par le nombre deux fois plus grand des animaux de ce lot.

à 50 %, acidifiés par une goutte d'acide acétique et repris par agitation avec 5 cm³. d'éther de pétrole. La solution éthéro-pétrolique séparée a été filtrée sur colonne d'alumine : le pigment a été vigoureusement adsorbé, formant au sommet de la colonne une zone rouge violacé de 4 mm. d'épaisseur.

Le comportement du pigment extrait des yeux saponifié est donc identique, quoique à une autre échelle, à celui du pigment présent dans l'huile d'*Aristeomorpha foliacea* qui se transforme en astacine au cours de la saponification.

Dans le foie des animaux traités, seules des traces infimes de pigment ont été retrouvées, ce qui confirme l'incapacité de l'organisme du rat de constituer des réserves hépatiques de principe anti-xérophtalmique. Quant à la vitamine A, ainsi qu'il fallait s'y attendre, sa présence n'a pu être décelée dans le foie.

La question se posait alors de savoir s'il en serait de même après administration de doses plus élevées d'huile de crevette : les essais biologiques antérieurs ayant en effet montré qu'une dose quotidienne de 90 mg. d'huile par animal rétablissait une croissance sensiblement normale (cf. ci-dessus p. 44), il convenait de rechercher si cet effet de croissance n'était pas dû à la présence dans l'huile de traces de carotènes ou d'autres provitamines passées inaperçues à l'analyse.

L'expérience suivante a donc eu pour objet de trancher cette question.

Deux lots A et B de six rats chacun ont reçu depuis le sevrage en plus du régime de base habituel :

— lot A : 90 mg. d'huile de crevette par animal et par jour.

— lot B : 3 U. I. de vitamine A par animal et par jour.

Les animaux des deux lots après une croissance normale ont été sacrifiés au 180^e jour et examinés comme ci-dessus. Le pigment de l'huile ou un produit de transformation voisin de celui-ci a été retrouvé dans la rétine des rats du lot A ainsi que, en quantités infimes, dans leur foie. Mais dans cet organe, la vitamine A n'a pu être décelée, alors que dans le foie des rats du lot B (3 U. I. de vitamine A *pro die*) une réserve de 75 U. I. de vitamine A par gramme de tissu hépatique s'était constituée.

Ce résultat est donc en accord avec ceux de l'analyse et confirme que l'huile d'hépto-pancréas d'*Aristeomorpha foliacea* ne renferme ni carotènes, ni autres provitamines. La question de savoir si l'effet de croissance obtenu par administration de fortes doses d'huile doit être attribué à l'astaxanthine ou au contraire à d'autres constituants de l'huile sera examinée ultérieurement.

Une dernière expérience du même type que les précédentes a enfin été exécutée en administrant à six rats carencés le pigment extrait de l'hypoderme des carapaces. Cette expérience avait pour but de contrôler si le pigment d'hypoderme, distinct par son spectre d'absorption de celui d'hépto-pancréas et doué néanmoins des mêmes propriétés antixérophtalmiques, se localisait comme ce dernier dans l'organisme du rat traité. Les six rats en expérience ont reçu pendant trois semaines, par animal et par jour, 40 mg. d'une solution du pigment d'hypoderme dans de l'huile végétale dévitaminée additionnée d' α -tocophérol. Au bout de ce temps, les animaux ont été sacrifiés, les yeux et les foies ont été prélevés et examinés comme dans les expériences précédentes.

Comme dans celles-ci, la vitamine A n'a pu être décelée dans le tissu hépatique et, seules, des traces de pigment y ont été retrouvées. Par contre, les quantités de pigment présentes dans les yeux étaient apparemment beaucoup plus grandes que dans les trois essais antérieurs. Ce résultat constitue un important argument d'ordre biologique en faveur de l'hypothèse selon laquelle les diverses formes du pigment isolées par chromatographie de l'huile d'hépto-pancréas sont des stéréoisomères de la forme normale (entièrement trans) présente dans l'hypoderme et qui paraît posséder l'activité la plus élevée.

CHAPITRE IV

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Trois faits essentiels se dégagent de l'ensemble des recherches exposées ci-dessus :

1° L'activité vitaminique A de l'astaxanthine, caroténoïde à noyau oxygéné, considérée, avant nos expériences, comme dépourvue de toute propriété vitaminique.

2° La dissociation de l'activité antixérophtalmique et de l'effet de croissance de ce nouveau facteur vitaminique chez le rat blanc carencé en vitamine A.

3° La présence de l'astaxanthine ou de l'un de ses produits de transformation dans la rétine des rats traités.

Ces résultats, qui, dans les pages précédentes, ont été rapportés de façon purement objective, posent cependant des problèmes qui méritent d'être brièvement discutés.

1° CONSTITUTION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ VITAMINIQUE DE L'ASTAXANTHINE

Il convient tout d'abord de se demander comment des propriétés vitaminiques aussi importantes et en apparence aussi faciles à mettre en évidence ont pu passer aussi longtemps inaperçues. Un certain nombre de faits tirés de nos propres expériences fournissent à cette question une réponse sinon décisive, du moins satisfaisante.

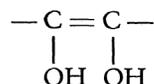
Il est incontestable que le matériel d'étude a joué en l'occurrence un rôle déterminant : l'absence totale de carotènes qui a, pour ces recherches, constitué un facteur essentiel, apparaît comme assez exceptionnelle chez les Crustacés⁽¹⁾.

En second lieu, nous avons mentionné les échecs enregistrés au cours des essais biologiques d'une part avec l'astacine, produit d'oxydation de l'astaxanthine, et d'autre part avec l'extrait pig-

(1) Cette caractéristique n'est cependant pas l'apanage exclusif d'*Aristeomorpha foliacea*. M^{lle} R. MASSONET (63) a en effet montré qu'il en est de même chez *Aristeus antennatus*, espèce voisine appartenant également à la tribu des Penaeidae.

mentaire des ovaires où l'astaxanthine se trouve en liaison protéique : c'est uniquement lorsque l'astaxanthine est administrée sous forme d'esters que ses propriétés vitaminiques peuvent se manifester et, même sous cette forme, l'oxydabilité est telle que les plus grandes précautions sont nécessaires pour éviter la disparition de l'activité. On ne doit pas en conclure d'ailleurs que ce sont les esters de l'astaxanthine eux-mêmes qui possèdent les propriétés vitaminiques mises en évidence, car ils doivent subir l'hydrolyse au cours de l'absorption intestinale.

Reste alors à tenter de comprendre la raison des propriétés vitaminiques de l'astaxanthine, aussi exceptionnelles pour un caroténoïde à noyau oxygéné. Et l'on pense immédiatement à la présence dans la molécule du groupe —CHOH—CO— ou plutôt de sa forme énolique



Dans l'astaxanthine, la double liaison du groupement éné-diol est conjuguée avec l'ensemble du système polyénique et cette position privilégiée, si elle rend incontestablement compte de la fragilité de l'édifice moléculaire, explique-t-elle peut-être aussi l'activité vitaminique du nouveau biocatalyseur. Cette conception trouve une base expérimentale dans les récents travaux de HERISSET (32) sur le pouvoir antioxygène comparé du carotène, de la vitamine A et de l'astaxanthine (1) : nettement supérieur à celui du carotène, le pouvoir antioxygène de l'astaxanthine est du même ordre que celui de la vitamine A elle-même.

2° DISSOCIATION DE L'ACTIVITÉ ANTIXÉROPHALMIQUE ET DE L'EFFET DE CROISSANCE DE L'ASTAXANTHINE CHEZ LE RAT BLANC CARENCÉ EN VITAMINE A

C'est précisément la prédominance de l'activité antixérophtalmique sur l'effet de croissance manifestée par les huiles d'été d'*Aristeomorpha foliacea* qui a permis de découvrir les propriétés vitaminiques de l'astaxanthine : ces huiles en effet guérissent la xérophtalmie du rat blanc carencé à une dose de 20 mg. par animal et par jour qui n'a aucun effet appréciable sur la reprise de poids. Par conséquent, à certaines doses au moins, existe une complète « dissociation des deux caractères dont la coexistence est considérée comme spécifique de l'activité vitaminique A » (29).

(1) Que cet auteur désigne sous le synonyme d'haematochrome.

A dose plus élevée cependant (90 mg. par animal et par jour), les huiles d'été manifestent une action indiscutable sur la croissance : ce fait a été constaté dès nos premières expériences et l'hypothèse alors émise a été que cette action devait être vraisemblablement attribuée à la présence de petites quantités de carotènes. L'impossibilité de déceler à l'analyse la moindre trace de carotène et surtout l'absence de toute réserve hépatique de vitamine A chez des rats ayant reçu des quantités d'huile de crevette suffisantes pour leur assurer une croissance normale doit faire rejeter définitivement cette interprétation.

La question se pose alors de savoir si l'effet obtenu sur la reprise de poids par administration de fortes doses d'huile active doit être également attribuée à l'astaxanthine ou à d'autres facteurs de croissance. Les travaux de M^{me} RANDOIN et NETTER (82), de M^{me} RANDOIN et LE GALLIC (81), de DUBOULOZ, MARVILLE et CHEVALIER (12), ont en effet montré que certains régimes pourtant dépourvus d'axérophthol et de carotènes possèdent une activité vitaminique A. On doit donc se demander si avec les huiles actives d'*Aristeomorpha foliacea* il n'en est pas de même : avec le pigment séparé de l'huile ou extrait de l'hypoderme par chromatographie, nous n'avons pas — aux doses utilisées équivalant à 40 mg. d'huile — observé d'effet sensible et durable sur la reprise de poids ou d'action favorable bien nette sur l'état général. Cependant des expériences complémentaires sont encore nécessaires pour pouvoir dire si oui ou non l'astaxanthine à forte dose possède à côté de propriétés antixérophtalmiques intenses une faible action sur la croissance.

Quelle que soit d'ailleurs la réponse de ces expériences à venir il ne saurait être mis en doute que l'astaxanthine, différente par sa constitution chimique des autres facteurs du groupe A, s'en distingue également par les caractéristiques de son activité vitaminique.

En l'absence d'un test permettant une évaluation quantitative de l'intensité des lésions oculaires il n'est pas possible de définir une unité d'activité antixérophtalmique. On peut cependant admettre que 20 mg. de l'huile utilisée dans l'expérience rapportée page 44 exercent vis-à-vis des lésions oculaires une action curative équivalente à celle de 15 à 20 U. I. de vitamine A. L'activité de 1 g. de cette huile serait donc approximativement égale à celle de 800 ou 1.000 U. I. de vitamine A, c'est-à-dire à celle de 300 γ environ de biocatalyseur. Mesurée par spectrophotométrie (cf. fig. 1) la concentration en astaxanthine de l'huile est de l'ordre de 1,5 mg. par gramme (1). L'activité antixérophtalmique de l'astaxanthine

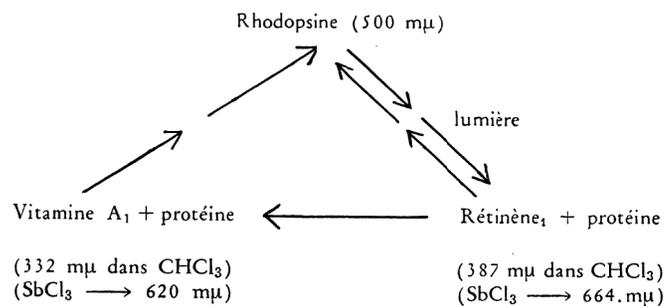
(1) En prenant E = 3300 (KARRER et JUCKER [40]).

serait donc cinq fois plus faible que celle de l'axérophtol. Mais il ne s'agit là que d'évaluations très imprécises qui ne fournissent qu'un ordre de grandeur.

3° L'ASTAXANTHINE ET LE PROBLÈME DE LA VISION

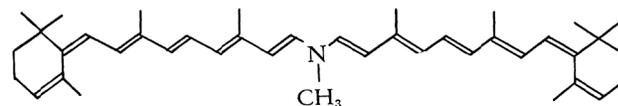
Le rôle de l'astaxanthine dans les phénomènes de photo-réception chez les organismes inférieurs comme les protistes est bien connu et a fait l'objet de nombreuses études [ENGELMAN (14), MAST (64), LAURENS et HOOKER (51), TISCHER (97)]. Mais la découverte de WALD et ZUSSMAN (109) de ce caroténoïde dans la rétine de certains oiseaux met en lumière son importance dans les processus visuels d'animaux supérieurs (75). Les expériences rapportées ci-dessus indiquent que l'astaxanthine peut également intervenir dans la constitution du pigment rétinien des Mammifères, en remplacement de la vitamine A qui en est le constituant normal.

Ce fait mérite d'être examiné à la lumière des acquisitions récentes sur la structure de la rhodopsine (9), (106), pigment rétinien photosensible des Mammifères, des Oiseaux, des Amphibies et de certains Poissons (101), (102). La rhodopsine est un hétéroprotéide qui doit sa couleur et sa photosensibilité à son groupement prosthétique de nature caroténoïde (57), (103). Par irradiation de la rétine se produit un clivage de l'hétéroprotéide et formation, par l'intermédiaire de composés orangés [« transient orange » et « indicator yellow » de LYTHGOE (57), (58)] de rétinène₁ [aldéhyde de la vitamine A₁, MORTON et GOODWIN (76)] qui est jaune, puis de vitamine A₁ incolore. Dans la rétine la rhodopsine peut être resynthétisée de deux manières : rapidement, à partir du rétinène₁ et plus lentement à partir de la vitamine A₁. D'où pour le cycle de la rhodopsine le schéma suivant proposé par WALD (106) :

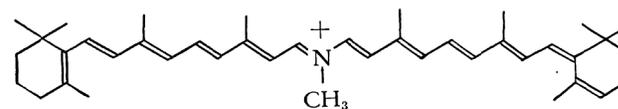


L'examen d'un tel schéma ne permet pas d'entrevoir comment un caroténoïde à noyau oxygéné et à 40 atomes de carbone tel que l'astaxanthine pourrait, dans la succession des réactions du cycle, jouer le rôle dévolu à la vitamine A ou au rétinène qui ne possèdent que 20 atomes de carbone. Cependant WALD (106) a fait remarquer que le décalage des spectres d'absorption de la vitamine A₁ (max. 300 mμ environ) ou de rétinène₁ (max. 380 mμ environ en solution aqueuse neutre dans la digitonine) par rapport à celui de la rhodopsine (max. 500 mμ) est tel que le groupement chromophore de cette dernière doit posséder un nombre de doubles liaisons conjuguées sensiblement deux fois plus élevé que celui de l'axérophtol ou de son aldéhyde : le groupement prosthétique de l'hétéroprotéide serait donc constitué par l'union de deux molécules de rétinène₁ ou de vitamine A₁.

D'autre part, BALL, COLLINS, MORTON et STUBBS (3), BALL, COLLINS, DALVI et MORTON (2) ont montré récemment que le rétinène est capable de se combiner avec de nombreuses amines pour donner des composés analogues à « l'indicator yellow » par leurs caractères spectraux et leur sensibilité aux variations de pH. COLLINS et MORTON admettent que le composé formé par action de la méthylamine sur le rétinène en milieu alcalin est constitué d'une molécule d'amine liée à deux molécules de rétinène selon le schéma (9) :

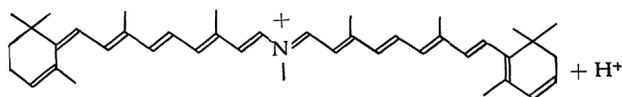


en milieu alcalin (λ max. = 365 mμ).



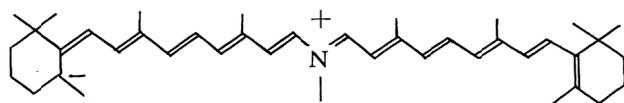
en milieu acide (λ max. = 450 mμ).

COLLINS et MORTON considèrent qu'il s'agit là d'analogues structuraux de « l'indicator yellow » auquel ils proposent d'attribuer la structure suivante (9) :



Protéine.

Ils émettent l'hypothèse que la conversion de la rhodopsine en « indicator yellow » est une oxydation comportant la perte de deux électrons, ce qui les conduit à suggérer pour représenter le groupement chromophore de la rhodopsine le schéma ci-dessous :



Protéine.

où il apparaît que l'ensemble des doubles liaisons constitue un système entièrement conjugué (9). COLLINS et MORTON soulignent cependant que ces schémas doivent être considérés comme hypothétiques. L'avenir dira quel est leur degré d'exactitude.

Quoiqu'il en soit, les travaux qui viennent d'être résumés permettent d'entrevoir la possibilité pour l'astaxanthine de se substituer à la vitamine A ou à l'un de ses dérivés dans la constitution du pigment rétinien : la présence d'un système à 13 doubles liaisons conjuguées dans l'édifice moléculaire, la faculté d'ionisation et l'oxydabilité de ses groupements éne-diols, la propriété pour le caroténoïde de s'unir aux protéines (cf. schéma p. 22) paraissent constituer les qualités requises pour remplir cette fonction. Des recherches ultérieures sont cependant nécessaires pour confirmer cette interprétation.

D'un tout autre point de vue, la mise en évidence de l'astaxanthine dans la rétine du rat carencé en vitamine A et traité à l'huile de crevette fait apparaître une relation, assez inattendue, entre l'altération du pigment rétinien et les manifestations de xérophtalmie. La xérophtalmie est en effet d'ordinaire considérée [cf. HEILBRON, JONES et BACHARACH (31)] comme une manifestation secondaire de l'atteinte générale des épithéliums, tout à fait comparable aux processus infectieux tels que la formation d'abcès si fréquente dans la carence en vitamine A.

Les expériences sur la localisation de l'astaxanthine dans l'orga-

nisme du rat traité établissent que le caroténoïde marque électivement son activité ou du moins la manifeste d'abord au niveau de l'œil et de ses annexes. En particulier le développement d'énormes abcès dans la région du cou ou de l'abdomen a été fréquemment observé chez des animaux dont les yeux et les paupières étaient redevenus parfaitement sains. Sans doute l'incapacité de la cellule hépatique du rat à mettre en réserve l'astaxanthine est-elle la raison profonde de cet effet partiel du biocatalyseur, sa concentration dans la rétine lui permettant d'assurer l'intégrité de l'appareil oculaire. Cependant il serait actuellement imprudent de présenter cette interprétation autrement que comme une hypothèse de travail.

D'ailleurs, la discussion qui vient d'être faite de l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au cours de ces recherches a eu pour seul but de préciser quelques-uns des problèmes posés par l'inscription au nombre des facteurs vitaminiques A d'un nouveau représentant du groupe : l'astaxanthine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'astaxanthine (3,3'-dihydroxy-4,4'-dicéto- β -carotène) a été identifiée chez *Aristeomorpha foliacea*. Crustacé Décapode de la tribu des *Penaeidae*.

La présence de ce caroténoïde a été reconnue dans la membrane conjonctive rouge qui tapisse la face interne de la carapace et entoure la poche gastrique, ainsi que dans l'huile extraite de l'hépatopancréas.

Dans l'huile d'hépatopancréas le pigment se trouve sous plusieurs formes ne se distinguant que par la position du maximum d'absorption de leur spectre. Ces différentes formes s'apparentent par la facilité de leur commune transformation en astacine, dérivé d'oxydation de l'astaxanthine : il ne peut donc s'agir que d'isomères de position ou plus vraisemblablement de stéréoisomères.

L'huile d'hépatopancréas d'*Aristeomorpha foliacea* administrée au rat blanc carencé en vitamine A manifeste une forte activité antixérophtalmique à une dose où pourtant aucun effet sur la reprise de poids n'est enregistré. L'intensité de cette action antixérophtalmique varie parallèlement à la concentration de l'huile en astaxanthine : la teneur en pigment diminue considérablement en hiver, en même temps l'activité vitaminique disparaît. Cette constatation suggère que l'astaxanthine est le facteur antixérophtalmique.

Effectivement, l'activité vitaminique se retrouve dans une préparation du pigment séparé de l'huile par chromatographie. De plus le pigment extrait de l'hypoderme des carapaces possède les mêmes propriétés. L'astaxanthine doit donc être considérée comme un nouveau facteur vitaminique A caractérisé par son activité électivement antixérophtalmique, son action sur la reprise de poids étant nulle ou seulement très faible. La détermination de la concentration en pigment des préparations actives montre que la guérison de la xérophtalmie chez le rat carencé en vitamine A est obtenue avec des doses d'astaxanthine comparables aux doses curatives d'axérophtol.

L'étude de la localisation du nouveau biocatalyseur dans l'organisme du rat carencé en vitamine A et traité avec des préparations actives révèle sa présence dans la rétine, ce qui laisse supposer que l'astaxanthine est susceptible, chez ce Mammifère, de suppléer l'axérophthol dans les processus visuels. Dans le foie des animaux en expérience, seules des traces du caroténoïde ont été retrouvées, ce qui montre l'incapacité de la cellule hépatique du rat à constituer des réserves d'astaxanthine.

BIBLIOGRAPHIE

1. BALL, E. G., *J. biol. Chem.*, 1944, 152, 627.
2. BALL, S., COLLINS, F. D., DALVI, P. D. et MORTON, R. A., *Biochem. J.*, 1949, 45, 304.
3. BALL, S., COLLINS, F. D., MORTON, R. A. et STUBES, A. L., *Nature*, Lond., 1948, 161, 424.
4. BROCKMANN, H. et WOLCKER, D., *Z. physiol. Chem.*, 1934, 224, 193.
5. BURKHARDT, G. N., HEILBRON, I. M., JACKSON, H., PARRY, E. G. et LOVERN, J. A., *Biochem. J.*, 1934, 28, 1698.
6. CHAIX-AUDEMARD, M^{me} P., L'avitaminose A en clinique, *Thèse Médecine*, Lyon, 1931.
7. CHECHAN, C., GRANGAUD, R. et MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1025.
8. CHEVALIER, A., La Vitamine A : in *Traité de Physiologie normale et pathologique*, publié sous la direction de G. H. ROGER et Léon BINET, 22, (suppl.), 237.
9. COLLINS, F. D. et MORTON, R. A., *Biochem. J.*, 1950, 47, 10, 18.
10. DRUMMOND, J. C. et GUNTHER, G., *J. Exptl. Biol.*, 1934, 11, 203.
11. DRUMMOND, J. C. et WALTER, R. MC, *J. Exptl. Biol.*, 1934, 12, 105.
12. DUFOULOZ, P., MARVILLE, R. et CHEVALIER, C., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 30, 112.
13. EDISBURY, J. R., LOVERN, J. A. et MORTON, R. A., *Biochem. J.*, 1938, 32, 118.
14. ENGELMAN, T. W., *Arch. ges. Physiol.*, 1882, 29, 387.
15. EULER, H. v., GUNTHER, G., MALMBERG, M. et KARRER, P., *Helv. Chim. Acta*, 1938, 21, 1619.
16. EULER, H. v., et HELLSTROM, H., *Z. physiol. Chem.*, 1934, 223, 105.
17. FABRE, R. et LEDERER, E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 105.
18. FOX, D. L., *Ann. Rev. Biochem.*, 1947, 16, 443.
19. GILLAM, A. E. et EL RIDI, M. S., *Nature*, Lond., 1935, 136, 914.
20. GILLAM, A. E. et EL RIDI, M. S., *Biochem. J.*, 1936, 30, 1735.
21. GILLAM, A. E., EL RIDI, M. S. et KON, S. K., *Biochem. J.*, 1937, 31, 1605.
22. GILLAM, A. E., EL RIDI, M. S. et WIMPENNY, J., *J. Exptl. Biol.*, 1939, 16, 71.
23. GOODWIN, T. W. et SRISUKH, S., *Nature*, Lond., 1948, 161, 525.
24. GRANGAUD, R., CHECHAN, C. et MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 143, 1179.
25. GRANGAUD, R., CHECHAN, C. et MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1022.
26. GRANGAUD, R., CHECHAN, C., MASSONET, M^{lle} R. et ODIER, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, 32, 245.
27. GRANGAUD, R. et MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 227, 568.
28. GRANGAUD, R. et MASSONET, M^{lle} R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 231.
29. GRANGAUD, R. et MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Ac. Sc.*, 1950, 230, 1319.
30. GRANGAUD, R., MASSONET, M^{lle} R. et LARROQUE, M^{lle} H., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 143, 1181.
31. HEILBRON, J. M., JONES, W. E. et BACHARACH, A. L., *Vitamins and Hormones*, 1944, 2, 155.
32. HERISSET, A., *C. R. Ac. Sc.*, 1946, 223, 47.
33. HERZIG, J. et FALTIS, F., cités par KARRER, P. et JUCKER, E. [40].
34. HUNTER, R. F. et SCOTT, A. D., *Biochem. J.*, 1941, 35, 31.
35. JAVILLIER, M. et EMERIQUE, M^{lle} L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 13, 771.
36. KARRER, P. et BENZ, F., *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, 412.
37. KARRER, P. et coll., cités par KARRER, P. et JUCKER, E. [40], p. 45.
38. KARRER, P. et coll., cités par KARRER, P. et JUCKER, E. [40], p. 233.
39. KARRER, P. et JUCKER, E., *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1105.
40. KARRER, P. et JUCKER, E., Carotinoïde, *Verl. Birkhauser*, Basel, 1948.
41. KARRER, P., LÖWE, L., et HUBNER, H., *Helv. Chim. Acta*, 1935, 18, 96.
42. KARRER, P., MORF, R. et SCHOPP, K., *Helv. Chim. Acta*, 1931, 14, 1036.
43. KARRER, P., MORF, R. et SCHOPP, K., *Helv. Chim. Acta*, 1931, 14, 1431.
44. KARRER, P. et SOLMSEN, U., *Helv. Chim. Acta*, 1935, 18, 915.
45. KUHN, R. et LEDERER, E., *Ber.*, 1933, 66, 488.
46. KUHN, R., LEDERER, E. et DEUTSCH, A., *Z. physiol. Chem.*, 1933, 220, 229.

47. KUHN, R. et SORENSEN, N. A., *Ber.*, 1938, 71, 1879.
48. KUHN, R., STENE, J. et SORENSEN, N. A., *Ber.*, 1939, 72, 1688.
49. KUHN, R., STENE, J. et SORENSEN, N. A., *Ber.*, 1939, 72, 1701.
50. KUHN, R. et WINTERSTEIN, A., *Ber.*, 1933, 66, 209.
51. LAURENS, H. et HOOKER, H. D., Jr., *J. Exptl. Zool.*, 1920, 30, 345.
52. LEDERER, E., *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 118, 542.
53. LEDERER, E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 554.
54. LEDERER, E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 567.
55. LE ROSEN, A. L. et ZECHMEISTER, L., *Arch. Biochem.*, 1942, 1, 17.
56. LOVERN, J. A., EDISBURY, J. R. et MORTON, R. A., *Nature Lond.*, 1937, 140, 266.
57. LYTHGOE, R. J., *J. Physiol.*, 1937, 89, 331.
58. LYTHGOE, R. J. et QUILLIAM, J. P., *J. Physiol.*, 1938, 94, 399.
59. MACKINNEY, G., *Ann. Rev. Biochem.*, 1940, 9, 459.
60. MAC MUNN, Ch. A., *Proc. Roy. Soc.*, 1883, 35, 370.
61. MALY, R., cité par KARRER, P. et JUCKER, E. [40].
62. MANUNTA, C., *Nature Lond.*, 1948, 162, 298.
63. MASSONET, M^{lle} R., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1023.
64. MAST, S. O., *J. Exptl. Zool.*, 1917, 22, 471.
65. MATTSON, F. H., MEHL, J. W. et DUEL, H. J., Jr., *Arch. Biochem.*, 1947, 15, 66.
66. DE MEREJKOWSKI, C., *C. R. Ac. Sc.*, 1881, 93, 1029.
67. MEUNIER, P. et FERRANDO, R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 227.
68. MEUNIER, P., FERRANDO, R., JOUANNETEAU, J. et THOMAS, M^{lle} G., *C. R. Ac. Sc.*, 1949, 228, 1254.
69. MEUNIER, P., FERRANDO, R., JOUANNETEAU, J. et THOMAS, M^{lle} G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1413.
70. MEUNIER, P., FERRANDO, R. et PERROT-THOMAS, M^{me} G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, 32, 50.
71. MEUNIER, P., MALLEIN, R. et JOUANNETEAU, J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 965.
72. MEUNIER, P., et RAOUL, Y., *Le diagnostic chimique des avitaminoses*, Masson et Cie édit., Paris, 1942.
73. MEUNIER, P. et VINET, M^{lle} A., *Chromatographie et mésométrie*, Masson et Cie édit., Paris, 1947.
74. MOORE, T., *Biochem. J.*, 1930, 24, 692.
75. MORTON, R. A., *The Application of Absorption Spectra to the Study of Vitamins, Hormones and Coenzymes*, Adam Hilger édit., London, 1942.
76. MORTON, R. A. et GOODWIN, T. W., *Nature Lond.*, 1944, 153, 405.
77. MOSELEY, H. N., cité par KUHN, R. et LEDERER, E. [45].
78. POLGAR, A. et ZECHMEISTER, L., *Amer. Soc.*, 1944, 66, 186.
79. POUCHET, G., *C. R. Ac. Sc.*, 1872, 74, 757.
80. RANDOIN, M^{me} L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, 17, 67.
81. RANDOIN, M^{me} L. et LE GALLIC, P., *C. R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 635.
82. RANDOIN, M^{me} L. et NETTER, R., *C. R. Ac. Sc.*, 1934, 198, 395 et 2120.
83. ROSENBERG, H. R., *Chemistry and Physiology of the Vitamins*, Interscience pub., New York, 1945.
84. RUBEL, F., cité par KARRER, P. et JUCKER, E. [40].
85. SCHEER, B. T., *J. Biol. Chem.*, 1940, 136, 275.
86. SCHMIDT-NIELSENS S., SORENSEN, N. A. et TRUMPY, B., cités par KUHN, R. et coll. [48].
87. SORENSEN, N. A., cité par KUHN, R. et coll. [48].
88. SORENSEN, N. A., *Z. physiol. Chem.*, 1935, 235, 8.
89. SORENSEN, N. A., cité par KUHN, R. et coll. [48].
90. SORENSEN, N. A., cité par FOX, D. L. [18].
91. SORENSEN, N. A. et STENE, J., cités par KUHN, R. et coll. [48].
92. STERN, K. G. et SALOMON, K., *Science*, 1937, 86, 310.
93. STERN, K. G. et SALOMON, K., *J. Biol. Chem.*, 1938, 122, 461.
94. STEVEN, D. M., *Nature Lond.*, 1947, 160, 540.
95. STRAIN, H. H., *J. Biol. Chem.*, 1938, 127, 191.
96. STRAIN, H. H. et MANNING, W. M., *Amer. Soc.*, 1942, 64, 1235.
97. TISCHER, J., *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 230, 257.
98. TISCHER, J., *Z. Physiol. Chem.*, 1937, 250, 147.
99. VEZZI, G., cité par KUHN, R. et LEDERER, E. [45].
100. VERNE, J., cité par KUHN, R. et LEDERER, E. [45].
101. WALD, G., *Nature Lond.*, 1937, 139, 587.
102. WALD, G., *Nature Lond.*, 1937, 139, 1017.

103. WALD, G., *J. gen. Physiol.*, 1938, 21, 795.
104. WALD, G., *Amer. J. Physiol.*, 1941-42, 133, 235.
105. WALD, G., *Vitamins and Hormones*, 1943, 1, 195.
106. WALD, G., *Documentia Ophthalmologica* (Advances in Ophthalmology), 1949, 3, 94.
107. WALD, G., NATHANSON, N., JENCKS, W. P. et TARR, E., *Biol. Bull.*, 1948, 95, 249.
108. WALD, G. et ZUSSMANN, H., *Nature Lond.*, 1937, 140, 197.
109. WALD, G. et ZUSSMANN, H., *J. Biol. Chem.*, 1938, 122, 449.
110. WIESE, C. E., MEHL, J. W. et DUEL, H. J., Jr., *Arch. Biochem.*, 1947, 15, 76.
111. WILLSTAEDT, H., cité par KUHN, R. et coll. [48].
112. WYCKOFF, R. W. G., *Science*, 1937, 86, 311.
113. ZECHMEISTER, L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 956.
114. ZECHMEISTER, L., *Vitamins and Hormones*, 1949, 7, 57.
115. ZECHMEISTER, L. et coll., cités par KARRER, P. et JUCKER, E. [40], p. 48.
116. ZSCHEILE, F. et coll., cités par KARRER, P. et JUCKER, E. [40], p. 48.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Préface</i>	11
<i>Introduction</i>	17
CHAPITRE I	
Constitution et propriétés physique et chimique de l'astacine	19
Caractères de l'astaxanthine et de ses dérivés	21
CHAPITRE II	
L'astaxanthine chez les êtres vivants	27
Etude du pigment d' <i>Aristeomorpha foliacea</i> (<i>Penaeidae</i>)	29
CHAPITRE III	
Origine et destinée de l'astaxanthine dans le monde vivant	39
L'astaxanthine nouveau facteur vitaminique A	42
Activité vitaminique A des huiles d' <i>Aristeomorpha foliacea</i>	43
Activité antixérophtalmique du pigment caroténoïde d' <i>Aristeomorpha foliacea</i>	45
Activité du pigment extrait de l'huile d'hépto-pancréas	46
Activité du pigment extrait de l'hypoderme	48
Localisation de l'astaxanthine dans l'organisme du rat traité. Mise en évidence dans la rétine	50
CHAPITRE IV	
Discussion des résultats	55
Constitution chimique et activité vitaminique de l'astaxanthine	55
Dissociation de l'activité antixérophtalmique et de l'effet de croissance de l'astaxanthine chez le rat blanc carencé en vitamine A	56
L'astaxanthine et le problème de la vision	58
<i>Conclusions générales</i>	63
<i>Bibliographie</i>	65