

N° D'ORDRE
237

THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Renée MASSONET

Assistante à la Faculté de Médecine d'Alger

PREMIERE THESE :

RECHERCHES SUR LA BIOCHIMIE DE L'ASTAXANTHINE

DEUXIEME THESE :

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 22 Avril 1958 devant la Commission d'Examen

MM. CORDIER	Président
MENTZER	Examineurs
CHOPIN	
DESSAUX	

L Y O N

1958

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyen honoraire : M. LONGCHAMBON

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. FROMAGEOT
LOCQUIN
De LARAMBERGUE

MM. DEUVRE
SOLLAUD

Doyen : M. DOUIN

Assesseur : M. EYRAUD H.

PROFESSEURS

MM. LONGCHAMBON, Minéralogie.
DOUIN, Botanique.
DEJARDIN, Physique générale.
EYRAUD H., Calcul diff. et
intégral.
THIBAUD, Physique atomique.
CORDIER, Physiologie.
KUHNER, Botanique.
PRETTRE, Chimie industrielle.
DUFAY, Astronomie.
AUMERAS, Chimie.
COLONGE, Chimie organique.
BERNARD, Physique.
BOIDIN, Botanique.
COURTY, Chimie physique.

MM. MALECOT, Mécanique ration-
nelle et appliquée.
FLANDRIN, Géologie appliquée.
JANIN, Physique.
MENTZER, Chimie biologique.
NIGON, Zoologie expérimentale.
GAUTHIER H., Géologie.
VIRET, Géologie.
MOUSSA, Systématique des
noyaux atomiques.
BRACONNIER, Mathématiques.
WAUTIER, Zoologie.
CUEILLERON, Chimie.
BOUTILLIER, Minéralogie.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. CHOPIN, Chimie biologique.
JAFFARD, Mathématiques.
LONCHAMP, Physique.
EYRAUD C., Chimie minérale,
LAFOUCRIERE, Physique nu-
cléaire.
LAVIOLETTE, Zoologie.

MM. DESSAUX, Physiologie.
MESNARD, Physique générale.
GRANDMONTAGNE, Physique
générale.
TEICHNER, Chimie industrielle.
GIGOUT, Géologie.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Mme FIASSON, Zoologie.
MM. PENNANEACH, Mathématiques.
GAUTHIER J., Chimie.
DAVID, Géologie.
STRIFFLING, Météorologie et
Physique du Globe.

MM. MAZENOT, Géologie.
MURET, Botanique.
FIASSON, Zoologie.
TRANCHAT, Physique.

Secrétaire : M. ROUX

X-66075

AVANT-PROPOS

C'est aux conseils éclairés de M. le Docteur Béguet, chef de service à l'Institut Pasteur d'Algérie, qui nous a fait bénéficier de sa grande érudition, que nous devons notre orientation vers les disciplines de laboratoire. Nous tenons à lui exprimer ici notre respectueuse admiration.

Assistante au laboratoire de Chimie biologique depuis de longues années, nous voudrions associer dans un même sentiment de gratitude,

M. le Professeur Giberton qui nous y a accueillie, encouragée, guidée et nous a prodigué avec ses conseils affectueux les critiques les plus avisées.

M. le Professeur Etori : c'est auprès de lui que nous avons acquis le meilleur de nos connaissances biochimiques. Pour tout ce que nous lui devons, qu'il soit assuré de nos sentiments affectueusement reconnaissants.

M. le Professeur Grangaud qui, dès le début de ses recherches sur l'astaxanthine nous a fait l'honneur de nous y associer et à qui cette thèse doit tout. Pour la confiance qu'il nous a toujours témoignée, l'amicale et réconfortante sollicitude qu'il nous a prodiguée en toutes circonstances, qu'il soit assuré de notre profonde affection.

Nous voudrions mentionner tout spécialement M. Césaire, chef de Travaux à l'École de Médecine de Dakar qui a suivi avec amitié les joies et les soucis de ce travail.

Enfin, nous ne saurions trop insister sur l'atmosphère de confiance et de cordialité du laboratoire où tous les travailleurs sont unis par des liens d'amitié. Nous adressons à chacun nos remerciements amicaux.

Nous tenons tout particulièrement à adresser nos remerciements :

— à M. le Professeur Chechan avec qui nous avons eu l'honneur de collaborer, qui a suivi avec un amical intérêt le développement de ce travail, nous a aidé de ses conseils éclairés en nous faisant bénéficier de sa grande expérience ;

— à M. le Professeur Dieuzeide, Directeur de la Station d'Aquiculture et de Pêche de Castiglione, pour l'intérêt qu'il a toujours témoigné à ces recherches, ses précieux conseils et l'identification des espèces de notre matériel d'étude ;

A MES MAITRES

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

— à Mlle Hamon, Chef de Travaux de Biologie générale à la Faculté des Sciences d'Alger qui nous a toujours accordé son amicale sympathie et nous a prodigué en toutes circonstances de bienveillants et de judicieux conseils.

*
**

C'est un grand honneur pour nous que M. le Professeur Cordier ait bien voulu marquer son intérêt pour ce travail et accepter la présidence de notre jury de thèse. Nous ne saurions trop lui dire notre respectueuse gratitude.

Nous voudrions aussi exprimer notre reconnaissance à M. le Professeur Mentzer, à M. le Professeur Chopin et à M. le Professeur Dessaux qui ont bien voulu accepter de juger notre travail.

Qu'il nous soit enfin permis d'évoquer avec émotion la mémoire du Professeur Meunier qui avait bien voulu, dès le début de ces recherches sur l'astaxanthine leur marquer un bienveillant intérêt et leur accorder sa confiance.

RECHERCHES SUR LA BIOCHIMIE
DE L'ASTAXANTHINE

— à Mlle Hamon, Chef de Travaux de Biologie générale à la Faculté des Sciences d'Alger qui nous a toujours accordé son amicale sympathie et nous a prodigué en toutes circonstances de bienveillants et de judicieux conseils.

*
**

C'est un grand honneur pour nous que M. le Professeur Cordier ait bien voulu marquer son intérêt pour ce travail et accepter la présidence de notre jury de thèse. Nous ne saurions trop lui dire notre respectueuse gratitude.

Nous voudrions aussi exprimer notre reconnaissance à M. le Professeur Mentzer, à M. le Professeur Chopin et à M. le Professeur Dessaux qui ont bien voulu accepter de juger notre travail.

Qu'il nous soit enfin permis d'évoquer avec émotion la mémoire du Professeur Meunier qui avait bien voulu, dès le début de ces recherches sur l'astaxanthine leur marquer un bienveillant intérêt et leur accorder sa confiance.

RECHERCHES SUR LA BIOCHIMIE
DE L'ASTAXANTHINE

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

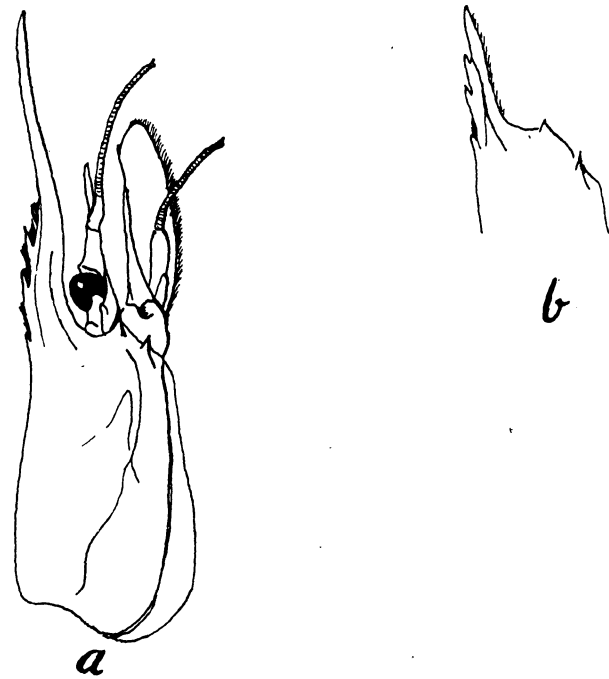


Fig. 2. — *Aristeus antennatus* - RISSO

- a) Carapace de la femelle
- b) Rostre du mâle
- c) Maxille I

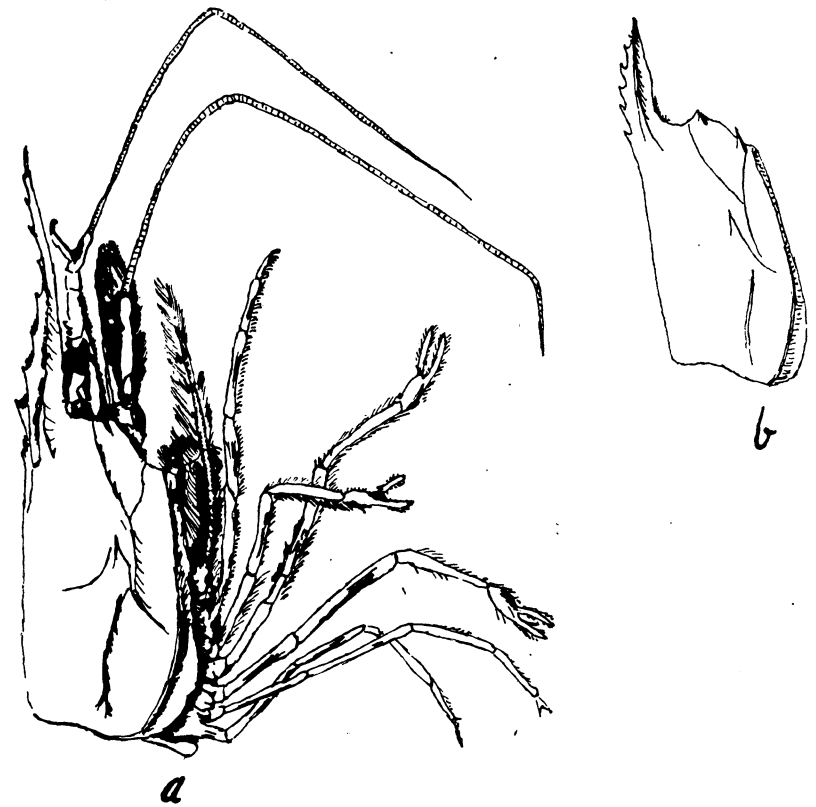


Fig. 1. — *Aristeomorpha foliacea* - RISSO

- a) Cephalothorax de la femelle
- b) Rostre du mâle
- c) Maxille I

MATERIEL D'ETUDE

Les espèces de crustacés qui ont fourni les pigments étudiés appartiennent à l'ordre des décapodes. Ce sont :

— trois Penaeidae :

Aristeomorpha foliacea, Risso
Aristeus antennatus, Risso
Parapenaeus longirostris, H. Lucas ;

— un Pandalidae :

Plesionika edwardsii, Brandt ;

— un Scyllaridae :

Scyllarus latus, Latr.

A titre de comparaison nous avons effectué quelques déterminations sur *Squilla mantis*, Latr., qui est un stomatopode et nous avons cru devoir rapporter les données bibliographiques relatives à la teneur en vitamine A de diverses espèces d'Euphausiacés.

A. — REPARTITION GEOGRAPHIQUE DONNEES ECOLOGIQUES (1)

— *Aristeomorpha foliacea*, Risso.

En dehors des côtes algériennes, cette crevette est rencontrée en quelques points de la Méditerranée (Sardaigne, Sicile) et, dans l'Atlantique, on la retrouve au large des côtes marocaines. Elle ne paraît pas remonter au-dessus de 400 mètres. Le chalut qui ramène de grosses quantités d'*Aristeus antennatus* par des fonds de 300, 350 et 400 mètres, pêche fort peu d'*Aristeomorpha foliacea*.

— *Aristeus antennatus*, Risso.

Cet animal paraît assez localisé dans la Méditerranée, les régions tempérées et subtropicales de l'Atlantique oriental depuis le Portugal jusqu'aux îles du Cap Vert. C'est une espèce meso-abyssale. Les chalutiers sur les côtes algériennes en font de fructueuses pêches entre 300 et 400 mètres et seulement à ces profondeurs.

— *Parapenaeus longirostris*, H. Lucas.

Très répandue en Méditerranée, cette espèce est capturée au large d'Alger et d'Oran, entre 200 et 300 mètres. Elle est abondante au Maroc entre 200 et 400 mètres (Gruvel) (96). On la rencontre aussi à partir de 70 à 80 mètres.

(1) Ces brefs rappels ont été empruntés essentiellement à Argilas (2) et à Dieuzeide (43).

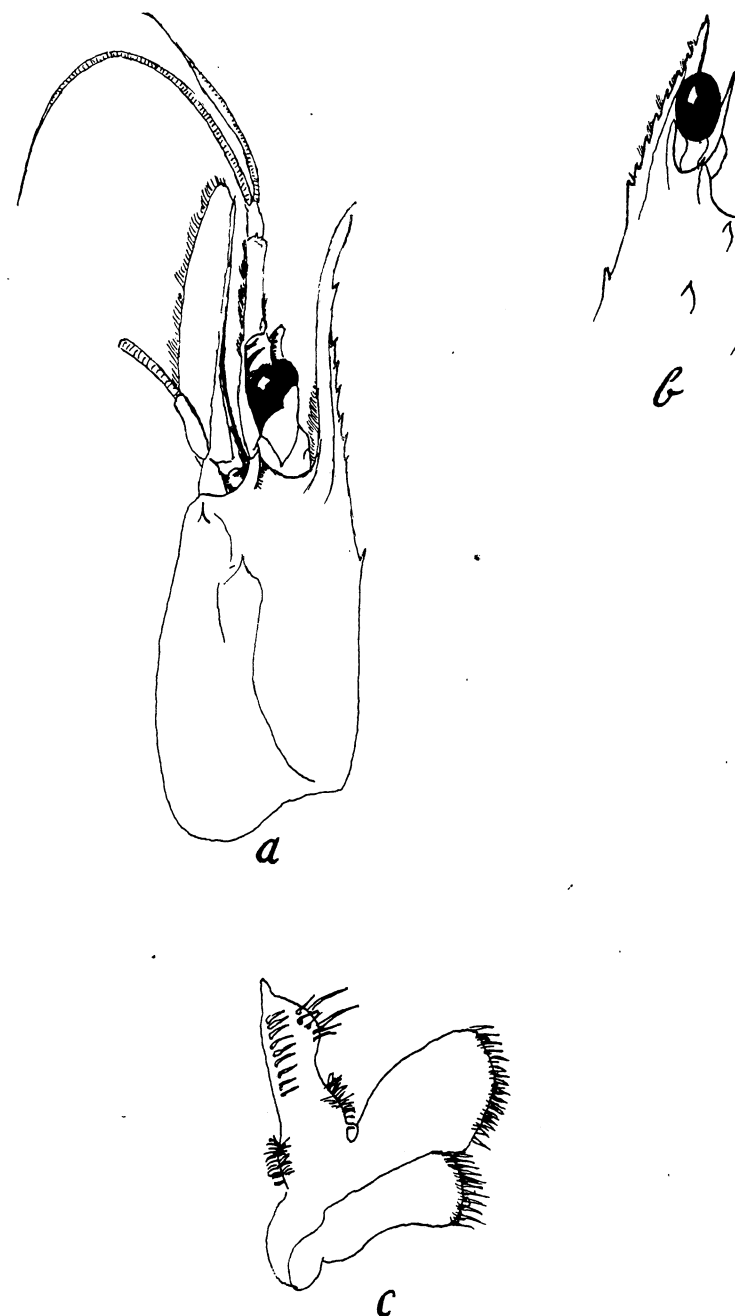


Fig. 3. — *Parapenaeus longirostris* - H. LUCAS

- a) Carapace de la femelle
- b) Rostre du mâle
- c) Maxille I

— *Plesionika edwardsii*, Brandt.

Cette espèce est capturée avec *Aristeus antennatus* et *Aristeomorpha foliacea* par des fonds entre 200 et 500 mètres.

— *Scyllarus latus*, Latr.

Cette espèce trouvée en Méditerranée se rencontre aussi dans l'Atlantique ; elle vit au voisinage des fonds, entre 4 et 10 mètres.

— La Squille (*Squilla mantis*, Latr.) vit sur des fonds sablo-vaseux, mais surtout vaseux, au voisinage du littoral et ne descend guère au-delà de 100 mètres. C'est un carnassier menant une vie fousseuse, mais chassant d'autres crustacés pendant la nuit.

B. — MORPHOLOGIE

C'est à Bouvier (10), que l'on doit le premier travail d'ensemble sur la morphologie des penaeidae. Argilas (2) sous la direction de Boutan a spécialement étudié les espèces des côtes algériennes. Dieuzeide (43) a consacré une monographie à ces mêmes espèces. C'est à ses recherches sur la faune du fond chalutable de la baie de Castiglione (44) qu'ont été empruntées les données se rapportant aux Pandalidae.

— *Aristeomorpha foliacea* est une crevette de grande taille atteignant 20 centimètres de long. Elle est facile à reconnaître par les seuls caractères du rostre qui porte dorsalement 9 dents chez la femelle, 6 chez le mâle (figure 1). *Aristeomorpha foliacea* est rouge sombre, avec des reflets violacés. La pigmentation inégale, est plus intense dans la région branchiale et la région marginale de la partie inférieure de la carapace. Le pigment rouge est localisé dans les chromatophores du derme dont les pseudopodes s'allongent jusqu'à la couche externe de la carapace ou épicuticule. Sous la carapace, se trouve une couche épidermique surmontant le derme (*); une membrane conjonctive sépare le derme de la cavité centrale. La poche stomacale (constituée par l'union d'une poche cardiaque et d'une poche pylorique) et l'intestin sont entièrement enveloppés d'une gaine conjonctive elle-même fortement pigmentée. On retrouve également ce pigment rouge au niveau des branchies et des appendices (antennules, antennes, maxillipèdes, maxilles).

Si l'on élimine par grattage le conjonctif rouge enveloppant la poche stomacale, celle-ci se présente sous forme d'une membrane bleue tirant sur le mauve. Les glandes génitales d'abord blanchâtres, deviennent progressivement colorées au fur et à mesure du développement des œufs ; grisâtres au premier stade, les œufs évoluent vers le violet à la maturation.

— *Aristeus antennatus*, Risso : sa taille est généralement un peu inférieure à celle d'*Aristeomorpha* ; on trouve cependant des spécimens atteignant 20 centimètres. Le rostre porte trois dents sur le bord dorsal dans les deux sexes, ce qui différencie nettement *Aristeus antennatus* d'*Aristeomorpha foliacea* (figure 2).

(*) L'ensemble est appelé improprement hypoderme.

Aristeus antennatus est d'un rouge lavé avec des taches violacées au niveau de la carapace céphalothoracique et de l'abdomen. Chez *Aristeus antennatus*, les œufs passent du rose cyclamen au mauve franc à la maturation.

— *Parapenaeus longirostris*, H. Lucas : cette espèce est nettement plus petite que les deux précédentes. Elle mesure en moyenne 8 à 10 centimètres. Son rostre est à 8 dents et présente des différences sexuelles peu marquées (figure 3). C'est une crevette rose pâle. Comme chez les deux autres Penaeidae, on trouve entourant la poche gastrique, une gaine conjonctive pigmentée en rouge. Les glandes génitales et leur contenu ont une coloration bleu-verdâtre dont l'intensité s'accroît au fur et mesure du développement des œufs.

— *Plesionika edwardsii*, Brandt (ancien *Pandalus narval* H. Milne-Edwards) : C'est un Pandalidae de petite taille et de couleur rose-pâle ; il se reconnaît à la longueur de son rostre et aux dentures de celui-ci (figure 4).

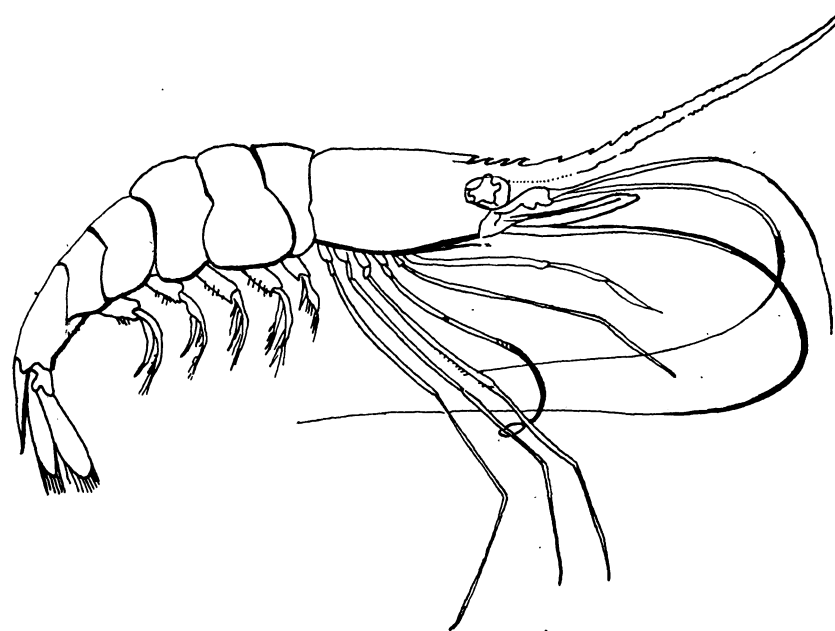


FIG. 4 - *Plesionika edwardsii* Brandt

A l'inverse des Penaeidae, les Pandalidae portent leurs œufs ; ils se présentent sous forme d'une masse granuleuse bleu vif tout à fait caractéristique. Les femelles sont œuvées de janvier à mai.

— *Scyllarus latus*, Latr. est un Décapode atteignant 30 à 40 centimètres de long. Sa couleur est rouge brun. La femelle porte ses œufs.

— *Squilla mantis*, Latr. est un Stomatopode dont la taille est de 12 à 15 centimètres. L'abdomen est très large proportionnellement au céphalothorax ; la carapace, relativement courte, ne recouvre que les quatre premiers segments thoraciques. Le rostre est constitué par une petite plaque articulée. Les appendices thoraciques sont très particuliers ; la deuxième paire de péreiopodes est représentée par une patte ravisseuse de grande taille. La pigmentation rouge orangée est très inégalement répartie : certains articles sont fortement pigmentés tandis que d'autres sont incolores. Les segments thoraciques sont

— *Plesionika edwardsii*, Brandt.

Cette espèce est capturée avec *Aristeus antennatus* et *Aristeomorpha foliacea* par des fonds entre 200 et 500 mètres.

— *Scyllarus latus*, Latr.

Cette espèce trouvée en Méditerranée se rencontre aussi dans l'Atlantique ; elle vit au voisinage des fonds, entre 4 et 10 mètres.

— La Squille (*Squilla mantis*, Latr.) vit sur des fonds sablo-vaseux, mais surtout vaseux, au voisinage du littoral et ne descend guère au-delà de 100 mètres. C'est un carnassier menant une vie fousseuse, mais chassant d'autres crustacés pendant la nuit.

B. — MORPHOLOGIE

C'est à Bouvier (10), que l'on doit le premier travail d'ensemble sur la morphologie des penaeidae. Argilas (2) sous la direction de Boutan a spécialement étudié les espèces des côtes algériennes. Dieuzeide (43) a consacré une monographie à ces mêmes espèces. C'est à ses recherches sur la faune du fond chalutable de la baie de Castiglione (44) qu'ont été empruntées les données se rapportant aux Pandalidae.

— *Aristeomorpha foliacea* est une crevette de grande taille atteignant 20 centimètres de long. Elle est facile à reconnaître par les seuls caractères du rostre qui porte dorsalement 9 dents chez la femelle, 6 chez le mâle (figure 1). *Aristeomorpha foliacea* est rouge sombre, avec des reflets violacés. La pigmentation inégale, est plus intense dans la région branchiale et la région marginale de la partie inférieure de la carapace. Le pigment rouge est localisé dans les chromatophores du derme dont les pseudopodes s'allongent jusqu'à la couche externe de la carapace ou épicuticule. Sous la carapace, se trouve une couche épidermique surmontant le derme (*) ; une membrane conjonctive sépare le derme de la cavité centrale. La poche stomacale (constituée par l'union d'une poche cardiaque et d'une poche pylorique) et l'intestin sont entièrement enveloppés d'une gaine conjonctive elle-même fortement pigmentée. On retrouve également ce pigment rouge au niveau des branchies et des appendices (antennules, antennes, maxillipèdes, maxilles).

Si l'on élimine par grattage le conjonctif rouge enveloppant la poche stomacale, celle-ci se présente sous forme d'une membrane bleue tirant sur le mauve. Les glandes génitales d'abord blanchâtres, deviennent progressivement colorées au fur et à mesure du développement des œufs ; grisâtres au premier stade, les œufs évoluent vers le violet à la maturation.

— *Aristeus antennatus*, Risso : sa taille est généralement un peu inférieure à celle d'*Aristeomorpha* ; on trouve cependant des spécimens atteignant 20 centimètres. Le rostre porte trois dents sur le bord dorsal dans les deux sexes, ce qui différencie nettement *Aristeus antennatus* d'*Aristeomorpha foliacea* (figure 2).

(*) L'ensemble est appelé improprement hypoderme.

Aristeus antennatus est d'un rouge lavé avec des taches violacées au niveau de la carapace céphalothoracique et de l'abdomen. Chez *Aristeus antennatus*, les œufs passent du rose cyclamen au mauve franc à la maturation.

— *Parapenaeus longirostris*, H. Lucas : cette espèce est nettement plus petite que les deux précédentes. Elle mesure en moyenne 8 à 10 centimètres. Son rostre est à 8 dents et présente des différences sexuelles peu marquées (figure 3). C'est une crevette rose pâle. Comme chez les deux autres Penaeidae, on trouve entourant la poche gastrique, une gaine conjonctive pigmentée en rouge. Les glandes génitales et leur contenu ont une coloration bleu-verdâtre dont l'intensité s'accroît au fur et mesure du développement des œufs.

— *Plesionika edwardsii*, Brandt (ancien *Pandalus narval* H. Milne-Edwards) : C'est un Pandalidae de petite taille et de couleur rose-pâle ; il se reconnaît à la longueur de son rostre et aux dentelures de celui-ci (figure 4).

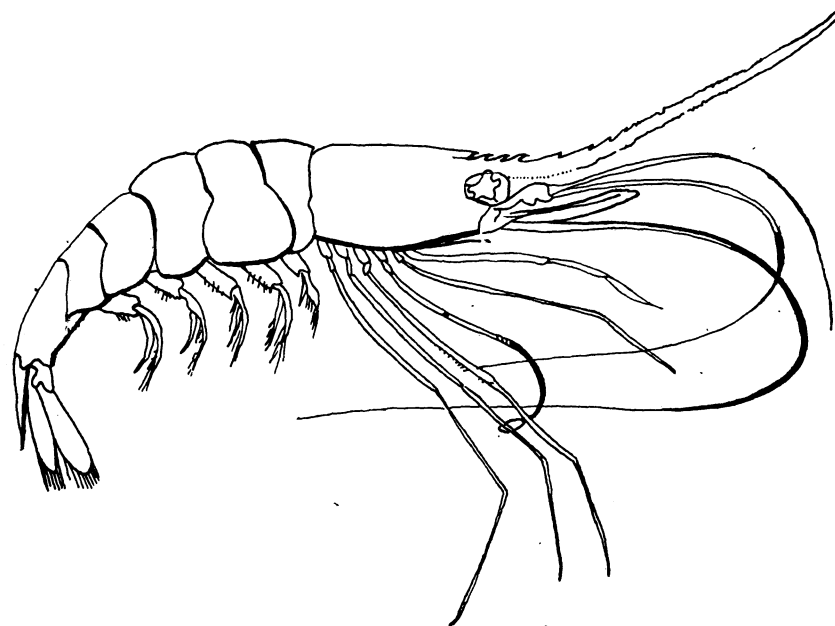


FIG. 4 - *Plesionika edwardsii* Brandt

A l'inverse des Penaeidae, les Pandalidae portent leurs œufs ; ils se présentent sous forme d'une masse granuleuse bleu vif tout à fait caractéristique. Les femelles sont œuvées de janvier à mai.

— *Scyllarus latus*, Latr. est un Décapode atteignant 30 à 40 centimètres de long. Sa couleur est rouge brun. La femelle porte ses œufs.

— *Squilla mantis*, Latr. est un Stomatopode dont la taille est de 12 à 15 centimètres. L'abdomen est très large proportionnellement au céphalothorax ; la carapace, relativement courte, ne recouvre que les quatre premiers segments thoraciques. Le rostre est constitué par une petite plaque articulée. Les appendices thoraciques sont très particuliers ; la deuxième paire de péreiopodes est représentée par une patte ravisseuse de grande taille. La pigmentation rouge orangée est très inégalement répartie : certains articles sont fortement pigmentés tandis que d'autres sont incolores. Les segments thoraciques sont

également plus colorés que les segments abdominaux. La distribution du pigment au niveau de la poche gastrique est très différente de celle des Penaeidae : la masse conjonctive rouge est présente seulement à la base de la poche. Les œufs, abondants, sont retenus par la femelle au niveau des premiers appendices abdominaux.

Toutes ces espèces sont riches en pigments dont l'étude qui va suivre montrera d'ailleurs l'étroite parenté.

C. — ETUDE BIOLOGIQUE

Le principal pigment caroténoïde des crustacés a été successivement décrit sous les noms de crustacéorubine (117), de zooérythrine (165), de vitellorubine (150), de tétronérythrine (148), d'haematochrome (104) et enfin d'astacène (ou astacine) (131). Kuhn et Sorensen (132) cependant montrent que la plupart des procédés d'extraction provoquent une altération et que l'astacène est en réalité un produit d'oxydation du pigment naturel auquel ils ont donné le nom d'astaxanthine.

La constitution chimique de l'astaxanthine établie par les travaux de Karrer (120) montre que c'est le 3 — 3' dihydroxy 4 — 4' dicéto β carotène. Tischer (225) en a le premier fixé les caractéristiques spectrales (spectre à large bande avec un maximum unique situé à λ = 492 mμ dans la pyridine (*).

L'astaxanthine, qui est très largement répandue dans la nature se rencontre dans un nombre considérable d'espèces animales et végétales (133), (121), (161), (67). Chez les crustacés, le pigment existe à la fois sous forme libre, estérifiée et sous forme de chromoprotéides diversement colorés, tels que l'ovoverdine des œufs (217) et la crustacyanine de la carapace du homard (237). Dans toutes les espèces que nous avons étudiées, nous avons identifié l'astaxanthine et mis en évidence la présence des trois formes. Avant d'en rapporter les caractères physico-chimiques (cf. p. 27) il convient de discuter une autre question d'importance : celle de la présence éventuelle des carotènes et de la vitamine A chez les crustacés.

1° VITAMINE A ET CAROTENES CHEZ LES CRUSTACES

a) VITAMINE A

Historique

La question de la présence éventuelle de la vitamine A chez les crustacés mérite en effet d'être examinée avec le plus grand soin, car elle peut permettre d'aborder le problème général de l'origine de ce facteur vitaminiqne dans le règne animal.

Lederer (136), Euler, Hellstrom et Klussmann (53), ne trouvent pas de vitamine A chez les Copépodes ; Kon et Thompson (127) (128), Fisher, Kon et Thompson (59) obtiennent le même résultat négatif sur trois espèces de Copépodes, ainsi que sur deux espèces d'Amphipodes et une de Cladocère.

Wald (234), le premier démontre la présence de vitamine A dans les yeux du homard. Fisher, Kon et Thompson (60) retrouvent la vitamine chez quatorze espèces des Décapodes.

(*) Le spectre à trois maxima (476, 493 et 513 mμ, dans la pyridine) décrit par Kuhn, Stène et Sorensen (133) est selon Wald (235) certainement entaché d'erreur.

Les Euphausiacés, ordre voisin des Décapodes ont été très soigneusement étudiés par Kon (124), Fisher et coll. (58) (60). En effet les Euphausiacés sont abondants dans le « Krill » dont se nourrissent les baleines. Aussi bien dans les espèces pêchées que dans celles prélevées dans l'estomac, les teneurs en vitamine A se sont révélées considérablement plus élevées que chez tous les autres crustacés examinés. Le tableau ci-dessous (tableau I) reproduit d'après Kon, souligne ce fait que, du point de vue de leur teneur en vitamine A les Euphausiacés occupent une place tout à fait prépondérante.

Dans la mesure où la localisation a été précisée, c'est toujours au niveau de l'œil que se trouve la quasi-totalité de la vitamine (Fisher, Kon et Thompson (58) (60), Batham, Fisher, Henry, Kon et Thompson (5), Fisher, Kon, Plack et Thompson (61). Les tableaux II, III, IV sont suggestifs à cet égard.

TABLEAU I
(d'après KON (126))

Teneurs en Vitamine A des Crustacés marins

Espèces ou groupes	μg p. g.	Localités	Nom ordinaire
Meganyctiphanes norvegica	78	A.M.	Euphausiacé
Thysanoessa raschii	51,3	A	»
Thysanoessa inermis	16,5	A	»
Thysanoessa gregaria	14,1	A	»
Stylocheiron elongatus	3,9	A	»
Stylocheiron maximum	3,9	P	»
Euphausia pacifica	3,3	P	»
Nematoscelis difficilis	3,3	P	»
Thysanoessa spinifera	2,8	P	»
Onisimus plautus	2,8	A	Amphipode
Euphausia superba	2,0	An	Euphausiacé
Syrrhøe crenulata	0,87	A	Amphipode
Caridea (17 espèces)	0,81	A, P, M	Crevettes
Anomura (7 »)	0,3	A, M	Pagures
Penaeidae	0,15	A, M	Crevettes
Isopoda (3 »)	0,09	A, M	Isopodes
Copepoda (3 »)	0,09	A	Copépodes
Brachyura (9 »)	0,03	A, P, M	Crabes
Astacura (2 »)	0,02	A	Homards
Mysidacea (5 »)	néant	A, M	Mysidacées
Branchiopedia	»	A	Branchiopodes

An : Antarctique

P : Pacifique

A : Atlantique

M : Méditerranée.

TABLEAU II

(d'après BATHAM et coll. (5))

Distribution de la vitamine A dans les organes
des Euphausiacés et des Décapodes

Espèces	Poids moyen d'un spécimen		Vitamine A contenue dans un spécimen		Vita- mine A des yeux p. 100
	corps entier	yeux	corps entier	yeux	
	mg.	mg.	µg.	µg.	
Meganyctiphanes norvegica	60,0	2	0,33	0,3	99
»	280,0	4	1,3	1,26	99
»	400,0	6	4,4	4,3	98
»	500,0	9	7,5	7,35	98
Thysanoessa raschii	60,0	1	1,65	1,6	98
Carcinus maenas	4.100,0	10	0	0,45	100
Eupagurus bernhardus	4.100,0	10	0	0,15	100

TABLEAU III

(d'après KON (126))

Distribution de la vitamine A dans les organes
des Euphausiacés et des Décapodes

Espèces et organes	Vitamine A		Quantité tot. de Vitam. A ds les yeux
	par organe µg.	par g. d'organe µg.	
Thysanoessa raschii			
Corps moins les yeux	0,03	0,15	—
Yeux	0,96 paire	363,0	97
Meganyctiphanes norvegica			
Corps moins les yeux	0,15	0,36	—
Yeux	2,45	429,0	94
Crangon allmani			
Corps moins les yeux	0,05	0,15	—
Yeux	0,06	36,3	55
Eupagurus bernhardus			
Corps moins les yeux	0	0	—
Yeux	0,36	20,5	100
Nephrops norvegicus			
Corps moins les yeux	0,54	0,009	—
Yeux	0,36	0,84	40
Cancer pagurus			
Corps moins les yeux	0,3	0,03	—
Yeux	0	0	0
Maia squinado			
Corps moins les yeux	0	0	—
Yeux	0,63	21,6	100

TABLEAU IV

(d'après KON (126))

Distribution de la vitamine A dans les organes
de Meganyctiphanes norvegica (Euphausiacés)

Organes	Poids moyen en mg.	Lipides p. 100	Vitamine A en gr. par organe	Vitamine A en µg. par gr.
Hépatopancréas	22	18	0	0
Estomac	3	8,6	0	0
Yeux (paire)	4	3,6	0,66	166
Reste du corps	249	2,1	0,03	0,12
Total	278	3,4	0,69	2,46

L'examen de ces résultats fait apparaître qu'en dehors des Euphausiacés caractérisés par des teneurs exceptionnelles, la vitamine A n'existe chez les autres crustacés qu'à l'état de traces (0,15 µg. par gramme chez les Penaeidae, cf. tableau I) ou fait complètement défaut. Lorsqu'elle est présente, elle est essentiellement concentrée au niveau de l'œil, la quasi totalité de la vitamine de l'organisme tout entier étant contenue dans cet organe.

Partie expérimentale

Matériel et techniques.

La recherche et le dosage de la vitamine A sont effectués par la réaction de Carr et Price (19) au trichlorure d'antimoine en solution chloroformique. On mesure l'absorption au spectrophotomètre de Beckman en suivant la décoloration en fonction du temps suivant la technique de Meunier et Raoul (167) (*). Pour les mesures en série, un photocolimètre à cellule photoélectrique a été également utilisé : des contrôles expérimentaux ont permis de vérifier que la sensibilité et la fidélité de l'appareil permettaient les dosages avec une précision suffisante.

La technique a été élaborée pour la recherche de la vitamine A dans l'hépatopancréas d'Aristeomorpha foliacea. Le mode opératoire qui va être décrit est valable pour tous les autres organes et tissus. Lorsque des variantes devront être introduites, elles seront mentionnées à propos de chaque cas particulier. Toutefois signalons dès maintenant que pour chaque extrait un contrôle a été effectué par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

(*) La mesure est effectuée à $\lambda = 620 \text{ m}\mu$ (E = 5070)
1 %
1 cm

ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Hépatopancréas.

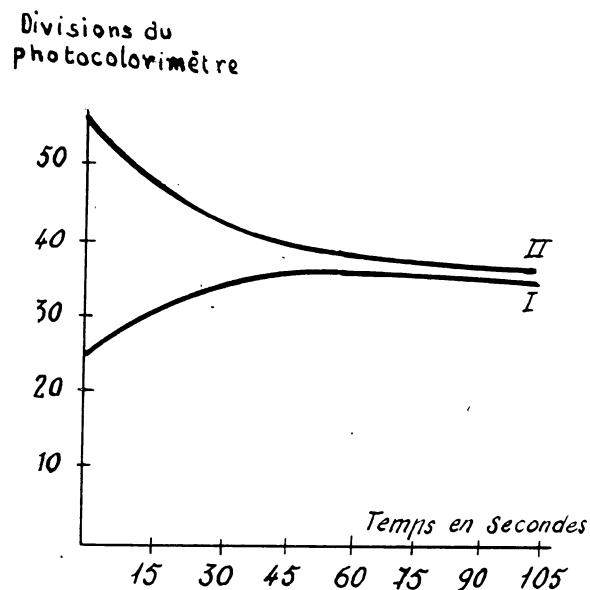
Saponification : 10 g. d'hépatopancréas sont saponifiés par la potasse en solution aqueuse à 60 p. 100 (1 ml. par gramme de tissu) selon la technique de Lewis et Bodansky (140). La saponification est poursuivie au bain-marie pendant 20 minutes et sous atmosphère d'azote. Le contenu du ballon est rapidement refroidi, repris par un mélange alcool — eau (1 : 2) et épuisé trois fois à l'éther de pétrole. Les solutions éthéro-pétroliques réunies, lavées à l'eau distillée, puis à la potasse aqueuse à 3 p. 100 et de nouveau à l'eau distillée (50, 50 et 50 ml. d'eau distillée) sont déshydratées par contact avec du sulfate de sodium anhydre. La solution éthéro-pétrolique est finalement évaporée sous vide partiel et en atmosphère d'azote. Le résidu est repris par 1 ml. de chloroforme rectifié et conservé sur chlorure de calcium.

Réaction de Carr et Price : A la solution chloroformique, on ajoute 0,5 ml. d'anhydride acétique, puis 5 ml. de réactif de Carr et Price. Une coloration se développe dont on mesure l'absorption à la 15^e seconde, les suivantes de 30 en 30 secondes jusqu'à 2 minutes. On construit la courbe cinétique et on extrapole graphiquement au temps zéro.

Résultats : On constate d'emblée que, ni la couleur, ni la cinétique ne sont caractéristiques de la vitamine A (168). En effet, on obtient une coloration verdâtre qui vire au vert franc en augmentant d'intensité et l'allure seule de la courbe montre qu'il ne peut s'agir de vitamine A (fig. 5 - courbe I).

Contrôle expérimental (77). Il consiste à effectuer le dosage sur la même huile additionnée de quantités connues de vitamine A.

A 10 g. d'hépatopancréas, on ajoute 30 µg. de vitamine A et l'on saponifie dans les conditions précédemment décrites. La réaction de Carr et Price développe une couleur franchement bleue à l'origine, la courbe cinétique descendante est caractéristique. L'interprétation de cette courbe conduit aux résultats suivants : au temps 120 sec. la courbe d'être descendante et donne un plateau (fig. 5' - courbe II).



Si l'on défalque la hauteur du plateau (correspondant à l'absorption de base) la valeur de l'absorption, ainsi corrigée, correspond uniquement à la vitamine A ; or, la valeur trouvée est celle de la quantité introduite, aux erreurs expérimentales près. Ce contrôle confirme les résultats enregistrés ci-dessus ; la vitamine A est absente de l'hépatopancréas.

Hypoderme.

La vitamine A a été recherchée sur une prise d'essai de 10 g. selon la technique décrite ci-dessus.

Aucune trace de vitamine n'a été décelée.

Poche pylorique.

La poche est débarrassée par grattage du conjonctif péristomacal qui l'enveloppe et est vidée de son contenu.

La poche et le contenu sont traités séparément. On opère sur 5 g. Le résultat est négatif sur les deux échantillons.

Conjonctif péristomacal.

On traite 10 g. de conjonctif. Le résultat est négatif.

Chair.

Le prélèvement est de 20 g. ; la recherche est effectuée sur un échantillon prélevé dans le céphalothorax et sur un échantillon prélevé dans l'abdomen. Les résultats sont négatifs.

Carapace.

La recherche est effectuée sur 30 g. de carapaces finement broyées. Le résultat est négatif.

Intestin.

La prise d'essai est de 5 g. : la réaction de Carr et Price est positive, le taux de vitamine A est de 6,0 à 6,6 µg.

Il convient toutefois de faire une remarque importante : le contenu de l'intestin n'a pu être vidé avant la saponification. Il n'a donc pas été possible de déterminer si la vitamine trouvée appartenait au tissu intestinal ou provenait du contenu.

Oufs.

5 g. d'œufs ont été traités : la réaction de Carr et Price est faiblement positive, 1,2 à 1,5 µg. par gramme de tissu.

Yeux.

La méthode qui vient d'être décrite a été également utilisée. A titre de vérification, nous avons éliminé le pigment par chromatographie et procédé ensuite au dosage dans les conditions habituelles.

La prise d'essai est de 2 g. : la réaction de Carr et Price est franchement positive ; la concentration en vitamine est plus élevée dans les espèces pêchées pendant l'été ; les taux d'hiver oscillent entre 1,8 et 2,5 µg. par gramme, ceux d'été entre 6 à 9,5 µg. par gramme (cf. tableau V).

ARISTEOMORPHA FOLIACEA

Hépatopancréas.

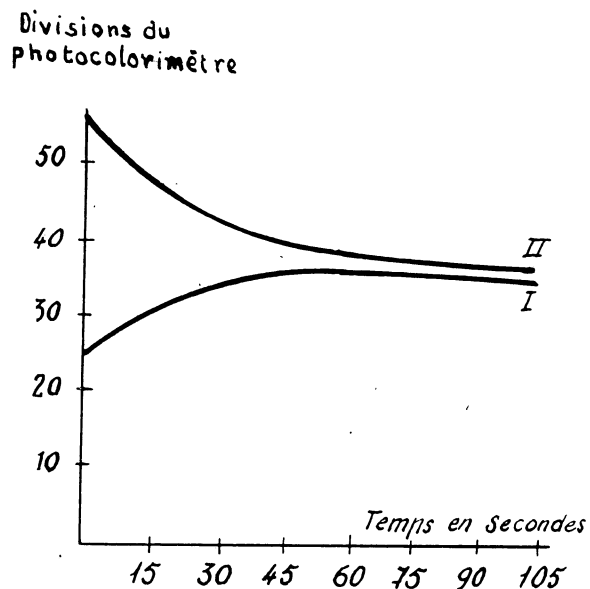
Saponification : 10 g. d'hépatopancréas sont saponifiés par la potasse en solution aqueuse à 60 p. 100 (1 ml. par gramme de tissu) selon la technique de Lewis et Bodansky (140). La saponification est poursuivie au bain-marie pendant 20 minutes et sous atmosphère d'azote. Le contenu du ballon est rapidement refroidi, repris par un mélange alcool — eau (1 : 2) et épuisé trois fois à l'éther de pétrole. Les solutions éthéro-pétroliques réunies, lavées à l'eau distillée, puis à la potasse aqueuse à 3 p. 100 et de nouveau à l'eau distillée (50, 50 et 50 ml. d'eau distillée) sont déshydratées par contact avec du sulfate de sodium anhydre. La solution éthéro-pétrolique est finalement évaporée sous vide partiel et en atmosphère d'azote. Le résidu est repris par 1 ml. de chloroforme rectifié et conservé sur chlorure de calcium.

Réaction de Carr et Price : A la solution chloroformique, on ajoute 0,5 ml. d'anhydride acétique, puis 5 ml. de réactif de Carr et Price. Une coloration se développe dont on mesure l'absorption à la 15^e seconde, les suivantes de 30 en 30 secondes jusqu'à 2 minutes. On construit la courbe cinétique et on extrapole graphiquement au temps zéro.

Résultats : On constate d'emblée que, ni la couleur, ni la cinétique ne sont caractéristiques de la vitamine A (168). En effet, on obtient une coloration verdâtre qui vire au vert franc en augmentant d'intensité et l'allure seule de la courbe montre qu'il ne peut s'agir de vitamine A (fig. 5 - courbe I).

Contrôle expérimental (77). Il consiste à effectuer le dosage sur la même huile additionnée de quantités connues de vitamine A.

A 10 g. d'hépatopancréas, on ajoute 30 µg. de vitamine A et l'on saponifie dans les conditions précédemment décrites. La réaction de Carr et Price développe une couleur franchement bleue à l'origine, la courbe cinétique descendante est caractéristique. L'interprétation de cette courbe conduit aux résultats suivants : au temps 120 sec. la courbe d'être descendante et donne un plateau (fig. 5' - courbe II).



Si l'on défalque la hauteur du plateau (correspondant à l'absorption de base) la valeur de l'absorption, ainsi corrigée, correspond uniquement à la vitamine A ; or, la valeur trouvée est celle de la quantité introduite, aux erreurs expérimentales près. Ce contrôle confirme les résultats enregistrés ci-dessus ; la vitamine A est absente de l'hépatopancréas.

Hypoderme.

La vitamine A a été recherchée sur une prise d'essai de 10 g. selon la technique décrite ci-dessus.

Aucune trace de vitamine n'a été décelée.

Poche pylorique.

La poche est débarrassée par grattage du conjonctif péristomacal qui l'enveloppe et est vidée de son contenu.

La poche et le contenu sont traités séparément. On opère sur 5 g. Le résultat est négatif sur les deux échantillons.

Conjonctif péristomacal.

On traite 10 g. de conjonctif. Le résultat est négatif.

Chair.

Le prélèvement est de 20 g. ; la recherche est effectuée sur un échantillon prélevé dans le céphalothorax et sur un échantillon prélevé dans l'abdomen. Les résultats sont négatifs.

Carapace.

La recherche est effectuée sur 30 g. de carapaces finement broyées. Le résultat est négatif.

Intestin.

La prise d'essai est de 5 g. : la réaction de Carr et Price est positive, le taux de vitamine A est de 6,0 à 6,6 µg.

Il convient toutefois de faire une remarque importante : le contenu de l'intestin n'a pu être vidé avant la saponification. Il n'a donc pas été possible de déterminer si la vitamine trouvée appartenait au tissu intestinal ou provenait du contenu.

Œufs.

5 g. d'œufs ont été traités : la réaction de Carr et Price est faiblement positive, 1,2 à 1,5 µg. par gramme de tissu.

Yeux.

La méthode qui vient d'être décrite a été également utilisée. A titre de vérification, nous avons éliminé le pigment par chromatographie et procédé ensuite au dosage dans les conditions habituelles.

La prise d'essai est de 2 g. : la réaction de Carr et Price est franchement positive ; la concentration en vitamine est plus élevée dans les espèces pêchées pendant l'été ; les taux d'hiver oscillent entre 1,8 et 2,5 µg. par gramme, ceux d'été entre 6 à 9,5 µg. par gramme (cf. tableau V).

b) CAROTENES

Historique

Euler, Hellström et Klussman (54) montrent que parmi trois pigments isolés de *Calanus finmarchicus* l'un est du carotène. Lederer (136) constate que ce pigment est effectivement présent en même temps que l'astacine (astaxanthine). Il en trouve 0,4 mg. pour 120 mg. d'astacine dans 500 grammes de Copépodes.

En ce qui concerne les Décapodes, des traces de carotène ont été signalées par Kuhn et Lederer (131), par Kuhn, Lederer et Deutsch (130) (*Maia squinado*) par Goodwin et Srisukh (69), (*Homarus vulgaris* et *Nephrops norvegicus*), par Kon et Thompson (127), (128) (*Pandalus bonieri*, *Crangon vulgaris*).

Chez les Euphausiacés, Wagner (232) avait cru pouvoir affirmer la présence de quantités élevées de carotène. La question était importante car les Euphausiacés constituent la majeure partie du « Krill » dont se nourrissent les baleines et l'on sait que l'on trouve chez celles-ci d'énormes réserves de vitamine A. Les résultats de Wagner étaient donc susceptibles de faire admettre que le carotène devait être considéré comme la principale source d'approvisionnement des baleines en vitamine A. Cependant les conclusions de Wagner sont discutables en raison des procédés d'identification mis en œuvre. Kon (125) reprenant cette étude et utilisant les ressources de l'analyse chromatographique et de la spectrophotométrie, souligne l'absence presque totale de carotènes chez les Euphausiacés des océans arctique et antarctique aussi bien sur le matériel prélevé dans l'estomac des baleines que sur des animaux pêchés directement.

*Partie expérimentale***Techniques.**

L'identification des carotènes est basée essentiellement sur leur comportement vis-à-vis des adsorbants et sur leurs caractères spectraux. La technique d'extraction qui conduit à la mise en solution des pigments dans l'éther de pétrole est décrite ci-dessus (cf. page 33).

L'examen spectrophotométrique direct de la solution éthéro-pétrolique d'organes ou de tissus ne révèle pas le système à 3 maxima caractéristique des carotènes (78). On peut cependant redouter que l'abondance de l'astaxanthine qui absorbe dans un domaine voisin de longueur d'onde n'empêche de déceler le pigment si celui-ci ne se trouve qu'en petite quantité. C'est pourquoi, une séparation chromatographique est indispensable. En effet, ainsi que l'a montré Lederer (136) les carotènes sont moins fortement retenus sur colonne d'alumine que les pigments caroténoïdes oxygénés du type de l'astacine (ou de l'astaxanthine).

Effectivement, nous avons vérifié que lorsqu'on chromatographie sur alumine une solution éthéro-pétrolique renfermant à la fois de l'astaxanthine (libre ou estérifiée) et des carotènes, ceux-ci descendent lentement le long de la colonne pour se retrouver finalement dans le filtrat tandis que l'astaxanthine reste adsorbée à la partie supérieure du chromatogramme.

Dans aucun des extraits examinés (*Aristeomorpha foliacea*, *Aristeus antennatus*), il n'a été trouvé la moindre trace de carotènes.

2° L'ASTAXANTHINE CHEZ LES CRUSTACES

Ainsi que nous venons de le montrer, dans les espèces étudiées, la vitamine A se localise essentiellement au niveau des yeux, les autres organes ou tissus n'en contenant pas en dehors des ovaires mûrs où des traces ont été décelées. Quant au carotène, il est complètement absent. Au contraire, l'astaxanthine s'y trouve en grande quantité, principalement chez *Aristeomorpha foliacea* qui est la plus fortement pigmentée des espèces que nous avons examinées. Elle est également abondante chez *Aristeus antennatus* et, chez ces deux Penaeidae, le pigment se trouve principalement localisé dans l'hypoderme et le conjonctif péristomacal.

a) ASTAXANTHINE LIBRE ET ESTERIFIÉE

On trouve peu de renseignements sur la coexistence et les relations d'équilibre pouvant exister entre les diverses formes dans les différents tissus ou organes. En effet, quand il s'agit de petits crustacés, l'extraction est faite sur l'animal entier (*Calanus finmarchicus*, Lederer (136), *Holopedium gibberum*, *Daphnia magna*, *Gammarus pulex*) Sorensen (215).

En ce qui concerne les Décapodes, leur taille permet en général d'étudier séparément les divers tissus ou organes : Kuhn et Lederer (131), montrent que le pigment extrait de l'hypoderme de *Homarus vulgaris* et de *Nephrops norvegicus* est sous forme estérifiée tandis que dans la carapace, les formes libre et estérifiée coexistent. Pour Goodwin et Srisukh (69), reprenant cette étude sur les mêmes espèces, le pigment de l'hypoderme est bien de l'astaxanthine estérifiée. Cependant pour eux, la forme libre serait seule présente dans la carapace. Ces données sont donc en partie contradictoires.

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE**Matériel et techniques.**

a) dissection. — On prélève séparément dans chaque espèce les carapaces, l'hypoderme, le conjonctif péristomacal, l'hépatopancréas, les glandes génitales. Les tissus ou organes sont immédiatement recouverts de sulfate de sodium anhydre qui les déshydrate et permet en outre de protéger la masse de l'oxydation.

b) extraction. — Le tissu enrobé de sulfate de sodium est finement broyé et épuisé par l'acétone. On renouvelle les épuisements plusieurs fois. Les solutions acétoniques rassemblées dans une ampoule à décantation sont additionnées d'eau distillée et d'éther de pétrole. Les proportions d'eau et d'éther dépendent de la quantité d'eau du tissu et des lipides présents (136). Quand il s'agit d'hypoderme et de conjonctif péristomacal, les proportions les plus favorables sont les suivantes : à 1.000 ml. de solution acétonique, on ajoute 300 ml. d'eau et 200 ml. d'éther de pétrole. Dans le cas de solution acétonique d'hépatopancréas ou de glandes génitales plus chargées en lipides (10 - 11 % en moyenne), le passage en phase éthéro-pétrolique est favorisé par addition d'eau et d'éther de pé-

trole par parties égales (300 : 300). L'extraction des carapaces nécessite l'addition d'acide chlorhydrique à l'acétone. Après macération, la solution acétonique est traitée comme il est dit ci-dessus. Après agitation et repos, la phase éthero-pétrolique est séparée, lavée plusieurs fois à l'eau distillée et déshydratée par contact sur du sulfate de sodium anhydre.

Cette solution éthero-pétrolique contient à la fois l'astaxanthine libre et ses esters.

PARTAGE ENTRE SOLVANTS.

D'après leurs solubilités respectives dans l'éther de pétrole et dans le méthanol à 90 %, en sépare :

- d'une part, les pigments plus solubles dans l'éther de pétrole que dans le méthanol (pigments épiphasiques) ;
- d'autre part, les pigments plus solubles dans le méthanol que dans l'éther de pétrole (pigments hypophasiques).

Les esters de l'astaxanthine sont épiphasiques, l'astaxanthine libre est hypophasique.

La solution éthero-pétrolique des pigments est agitée avec du méthanol à 90 %. Deux phases se séparent. Après repos, on soutire la phase alcoolique et on épuise à nouveau l'éther de pétrole par une nouvelle agitation avec du méthanol. On répète ces épuisements jusqu'à ce que la phase alcoolique ne soit plus colorée de façon appréciable.

Les solutions méthyliques rassemblées sont agitées avec de l'éther de pétrole après addition d'eau. On obtient finalement deux solutions éthero-pétroliques :

- la première est une solution des esters ;
- la deuxième est de l'astaxanthine libre.

La mesure des densités optiques permet de déterminer facilement les concentrations relatives des deux solutions.

c) Résultats.

ARISTEOMORPHA FOLIACEA.

Dans le conjonctif péristomacal en hiver, l'astaxanthine libre et l'astaxanthine estérifiée existent en quantités équivalentes ; en été, les esters représentent seulement les 3/10 de la totalité du pigment.

Dans l'hypoderme, été comme hiver les 2/3 du pigment sont estérifiés.

Dans les carapaces, le pigment est toujours sous forme libre.

Aristeus antennatus.

Dans le conjonctif péristomacal, les formes libre et estérifiée sont présentes par parties égales en hiver ; en été, les esters représentent les 2/5 de la totalité du pigment.

Dans l'hypoderme, les 2/3 du pigment sont estérifiés (hiver et été).

Le pigment des carapaces est entièrement sous forme libre. L'ensemble de ces résultats est rassemblé dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU VII

Espèces	Epiphase			
	Janvier Mars	Avril Juin	Juillet Septembre	Octobre Décembre
Aristeus antennatus				
conjonctif péristomacal	1/1	2/3	2/3	1/1
hypoderme	2/1	2/1	2/1	2/1
carapace	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique
Aristeomorpha foliacea				
conjonctif péristomacal	1/1	3/7	3/7	1/1
hypoderme	2/1	8/3	8/3	1/1
carapace	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique	entièrement hypophasique

On voit que la répartition d'astaxanthine libre et d'astaxanthine sous forme d'esters est sensiblement la même pour les mêmes tissus dans les deux espèces. Par ailleurs, des variations saisonnières sont enregistrées et là encore, les résultats sont parallèles.

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE ET CARACTERES SPECTRAUX.

L'analyse chromatographique de chacune des deux fractions épiphasiqes et hypophasique révèle une complexité pigmentaire beaucoup plus grande que ne permettait de la prévoir le seul partage entre solvants.

Matériel et techniques.

Les colonnes à chromatographie sont munies d'un dispositif permettant d'opérer en atmosphère inerte. L'adsorbant est l'alumine d'activité II. Le contrôle de l'activité est effectué selon Brockmann (14). Si une réactivation est nécessaire, elle est obtenue facilement par un chauffage à 500° C. pendant 5 heures.

On verse sur la colonne d'alumine de l'éther de pétrole pur et rigoureusement anhydre, ce qui permet de s'assurer de l'homogénéité du tassement, puis en verse doucement la solution à analyser. On lave ensuite à l'éther de pétrole (400 ml. au moins si le volume de la solution est de 200 ml.) et on développe le chromatogramme à l'aide d'éther de pétrole additionné de 1 p. 1.000 de méthanol.

Après développement, chacune des zones révélées est soigneusement isolée et le pigment est élué par agitation de l'alumine colorée avec de l'éther de pétrole renfermant 5 % de méthanol.

Résultats :

ARISTEOMORPHA FOLIACEA.

I - Extrait de conjonctif péristomacal

Les chromatogrammes de l'extrait total, de l'extrait hypophasique et de l'extrait épiphase présentent plusieurs zones :

Extrait total sol. N° 1	}	A ₁ zone rouge	0,5 cm d'épaisseur
		A ₂ » orangé	1,0 cm »
		A ₃ » brique	0,6 cm »
		A ₄ » orangé jaune	0,3 cm »
		A ₅ » jaune	0,1 cm »
Solution épiphase sol. N° 2	}	A ₁ zone rouge	0,8 cm d'épaisseur
		A ₂ » saumon	1,5 cm »
		A ₃ » rouge orangé	1,0 cm »
		A ₄ » jaune orangé	0,8 cm »
		A ₅ » jaune	0,3 cm »
Solution hypophasique sol. N° 3	}	A ₁ zone rouge sombre	1,0 cm d'épaisseur
		A ₂ » rose	2,5 cm »
		A ₃ » rose orangé	0,8 cm »
		A ₄ » jaune orangé	0,7 cm »

II - Extrait d'hypoderme

Le développement fait également apparaître plusieurs zones.

Solution épiphase sol. N° 4	}	A ₁ zone rouge	0,5 cm d'épaisseur
		A ₂ » rouge orangé	1,5 cm »
		A ₃ » orangé	0,8 cm »
		A ₄ » jaune	0,1 cm »
Solution hypophasique sol. N° 5	}	A ₁ zone rouge	0,5 cm d'épaisseur
		A ₂ » orangé	1,5 cm »
		A ₃ » rose	0,8 cm »
		A ₄ » jaune orangé	0,5 cm »

ARISTEUS ANTENNATUS.

I - Extrait de conjonctif péristomacal

Extrait total sol. N° 6	}	A ₁ zone rose rouge	0,6 cm d'épaisseur
		A ₂ » rouge orangé	1,0 cm »
		A ₃ » vieux rose	2,0 cm »
		A ₄ » orangé jaune	0,8 cm »
		A ₅ » jaune	0,2 cm »
Solution épiphase sol. N° 7	}	A ₁ zone rouge	0,6 cm d'épaisseur
		A ₂ » rouge orangé	1,2 cm »
		A ₃ » rouge clair	0,4 cm »
		A ₄ » jaune orangé	0,2 cm »
		A ₅ » jaune	0,1 cm »
Solution hypophasique sol. N° 8	}	A ₁ zone rouge clair	
		A ₂ » rose saumon	
		A ₃ » rouge orangé	
		A ₄ » jaune orangé	

II - Extrait d'hypoderme

Epiphase sol. N° 9	}	A ₁ zone rouge sombre	0,8 cm d'épaisseur
		A ₂ » rose violacé	0,5 cm »
		A ₃ » rose orangé	1,5 cm »
		A ₄ » jaune orangé	0,8 cm »

III - Extrait de carapace

Extrait total sol. N° 10	}	A ₁ zone rouge sombre	0,9 cm d'épaisseur
		A ₂ » rose saumon	1,5 cm »
		A ₃ » rouge clair	0,5 cm »
		A ₄ » orangé	2,0 cm »
		A ₅ » jaune	0,3 cm »

L'examen des résultats montre l'hétérogénéité du pigment en apparence homogène. D'ailleurs, la chromatographie d'un extrait total d'hépatopancréas d'Aristeomorpha foliacea avait révélé cette hétérogénéité (77), elle a été également retrouvée avec des extraits entiers provenant de conjonctif péristomacal et de carapace.

Les données spectrophotométriques se rapportant à ces diverses fractions sont rassemblées dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

N° de la solution	Zones maximum d'absorption dans la pyridine m _μ		N° de la solution	Zones maximum d'absorption dans la pyridine m _μ	
1	A 1	490	6	A 1	490
	A 2	484		A 2	488
	A 3	490		A 3	478
	A 4	482		A 4	484
	A 5	470		A 5	482
2	A 1	490	7	A 1	488 - 490
	A 2	472		A 2	483
	A 3	488		A 3	493
	A 4	484		A 4	484
	A 5	480		A 5	482
3	A 1	488	8	A 1	488
	A 2	480		A 2	478
	A 3	482		A 3	484
	A 4	482		A 4	480
	A 5	472			
4	A 1	488 - 490	9	A 1	488
	A 2	488		A 2	480
	A 3	484		A 3	482
	A 4	478		A 4	478
5	A 1	488 - 490	10	A 1	490
	A 2	484		A 2	480
	A 3	478		A 3	488
	A 4	470		A 4	484
				A 5	482

b) STERÉOISOMERES

L'analyse chromatographique révèle donc l'existence aussi bien dans l'hypophase que dans l'épiphase ou les extraits entiers, de cinq pigments différents. Il s'agit de substances qui sont chimiquement identiques car la saponification les transforme toutes en astacine. Cette identité chimique de substances qui ne se distinguent que par leurs caractères spectraux nous avait permis d'avancer avec C. Chechan et R. Grangaud (22), qu'il devait s'agir d'un nouveau cas d'isomérisie cis-trans de l'astaxanthine. Chez de nombreux caroténoïdes, le fait est déjà démontré (246), (219), (247), mais l'existence de formes stéréoisomères de l'astaxanthine n'avait jusqu'ici pas été signalée. Récemment, R. Grangaud et Mme P. Chardenot (75) en ont apporté la démonstration : le pigment épiphase de conjonctif péristomacal d'Aristeus antennus, présentant un spectre à bande étroite et à maximum unique situé à 488 m_μ dans la pyridine a été soumis à l'ébullition à reflux. Après 6 heures, d'importantes modifications des caractères spectraux sont constatées avec l'apparition de deux sommets à 484 et 492 m_μ dans la pyridine. La chromatographie sur alumine sépare en outre 4 zones superposées nettement individualisées.

Un contact prolongé plusieurs jours sur alumine provoque des transformations identiques : en abandonnant à l'obscurité une solution éthéro-pétrolique du pigment, on observe également, après quelques semaines, la formation d'isomères.

Une démonstration décisive qu'il s'agit bien de formes stéréoisomères est donnée par le fait qu'en utilisant les moyens physiques qui viennent d'être décrits, chacune de ces formes isolée se transforme en toutes les autres. Appliquées à des solutions d'astaxanthine libre, les mêmes techniques d'isomérisation (action du temps, de l'ébullition, de la chromatographie) ont conduit aux mêmes résultats (21).

L'identité des caractères chromatographiques et spectroscopiques des pigments ainsi préparés et de ceux mis en évidence chez *Aristomorpha foliacea* permet de conclure que ces stéréoisomères peuvent préexister dans les milieux naturels (75).

c) CHROMOPROTEIDES

Avant qu'ait été précisée leur nature par les travaux de Kuhn et Lederer (131), Kuhn et Sorensen (132), Stern et Salomon (217), et par les études physicochimiques de Wald (237), l'existence de chromoprotéides de l'astaxanthine avait été signalée par divers auteurs :

Dans une série de mémoires Verne (228), (229), (230), insiste sur le fait que « le pigment rouge des crustacés se trouve dans la carapace et les œufs liés à des protides et forme ainsi des complexes hydrosolubles ».

Lwoff (146), Teissier (22), Brown (15), rapportent des observations analogues.

Kuhn et Lederer, loc. cit., séparent le groupement prosthétique du chromoprotéide vert des œufs de homard qu'ils considèrent d'abord comme un « ester de l'astacine » ; ils lui donnent le nom d'ovoester.

Stern et Salomon, loc. cit., entreprennent l'étude de ce chromoprotéide qu'ils dénomment ovooverdine. Kuhn et Sorensen, loc. cit., montrent que son groupement prosthétique n'est pas en réalité un ester de l'astacine mais un pigment nouveau pour lequel ils proposent le nom d'astaxanthine. Ils établissent en outre que la coloration bleue de la carapace est due également à la présence d'un chromoprotéide. Le changement de couleur du bleu au rouge qui se produit lorsque la carapace est plongée dans l'eau bouillante résulte de la libération du groupement prosthétique provoquée par la floculation de la protéine. Wald (237), parvient à extraire ce chromoprotéide qu'il désigne sous le nom de crustacyanine.

Les techniques utilisées par Stern et Salomon pour l'ovooverdine, et surtout par Wald pour la crustacyanine sont d'application générale. C'est à elles qu'il a été fait appel pour l'étude physicochimique qui va suivre. Aussi l'exposé de cette étude sera-t-elle précédée d'une brève analyse de ces travaux.

Caractères physicochimiques de l'ovooverdine (Stern et Salomon (217)).

Les œufs de homard sont triturés avec du sable et de l'eau distillée.

L'ovooverdine est précipitée de ses solutions par addition à saturation de sulfate de sodium, d'ammonium ou de magnésium. Dans un tampon à l'acétate ou aux phosphates, elle est stable entre pH 4 et pH 8.

Son spectre dans le visible montre un maximum à 470 m μ , et un à 640 m μ . Stern et Salomon montrent que le pigment est instable et est facilement dissocié :

La pyridine, les acides minéraux, les bases provoquent la rupture de la liaison protéique : les solutions bleues virent au rouge ; la réaction étant irréversible.

La chaleur produit également cette dissociation, mais celle-ci peut être réversible si l'élévation de température ne dépasse pas 60 à 70° C. et n'est pas trop prolongée.

Caractères physicochimiques de la crustacyanine (Wald - 237).

Dans la carapace du homard, le chromoprotéide est associé à des sels de calcium et ne se laisse pas extraire par l'eau distillée. Il est obtenu par macération dans une solution d'acide citrique dilué.

Le pigment est précité de sa solution par le sulfate d'ammonium à 40 % et redissous par dilution ou dialyse. Le spectre présente une large bande avec maximum à 625 m μ . Son point isoélectrique se situe aux environs de pH 4,5.

Les acides minéraux, l'alcool, l'acétone à chaud font virer les solutions du bleu au rouge, le maximum d'absorption se déplaçant vers 460 m μ .

La chaleur provoque les modifications suivantes : à 60°, dans un tampon au véronal de pH 7, la couleur passe du bleu (λ max. = 625 m μ), au rouge (λ max. = 530 m μ). On observe des modifications comparables sous l'effet de variations de pH.

Pour la crustacyanine de Wald comme pour l'ovooverdine de Stern et Salomon, le groupement prosthétique est l'astaxanthine.

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

— Chromoprotéides de *Plesionika edwardsii*, Brandt.

Pigment des œufs : les œufs mûrs se présentent sous forme d'une masse granuleuse bleue retenue par les pattes abdominales dont elle peut être facilement détachée.

5 g. d'œufs sont broyés avec du sab'e et repris par 40 ml. d'eau distillée. Par décantation et filtration, on obtient une solution fortement teintée et limpide. Son spectre présente une bande large, unique avec un maximum à 635 m μ dans la pyridine (cf. fig. 6).

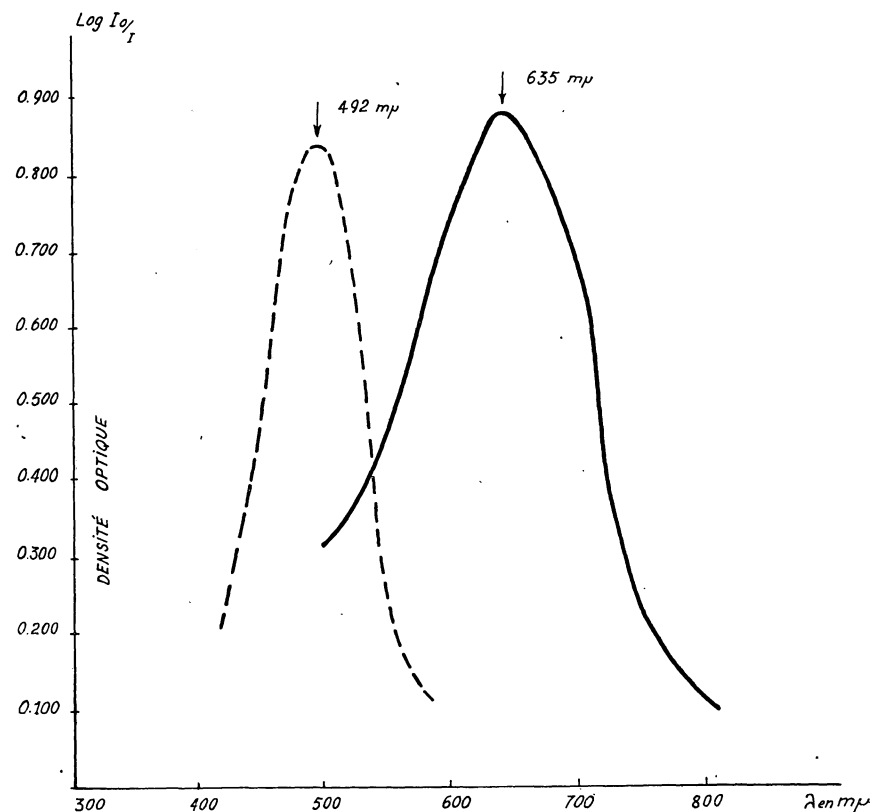


Fig. 6. — Plesionika Edwarsi - BRANDT
Spectre d'absorption du chromoprotéide
et de son groupement prosthétique

— — — Chromoprotéide
- - - - - Groupement prosthétique

a) Influence du pH.

Par mélange de la solution aqueuse avec des tampons acéto-acétiques M/15, on n'observe aucune dissociation jusqu'à pH 4. C'est au-dessous de ce pH que la teinte vire du bleu au rose, le changement étant réversible. Les acides minéraux provoquent une dissociation irréversible par dénaturation de la protéine.

b) Action de la température.

Un tube à essai contenant la solution est immergé dans un thermostat réglé à 70° C. On observe un virage au rose, et un retour au bleu par refroidissement. Si l'on chauffe à 100° C. la transformation est irréversible.

c) Action des solvants organiques.

On agite la solution aqueuse avec différents solvants organiques :

L'éther de pétrole ne provoque aucun changement de coloration de la solution aqueuse.

La pyridine précipite la protéine rouge orangé, on ajoute de l'éther de pétrole ; le pigment passe en solution.

La solution éthéro-pétrolique est divisée en 2 parties : l'une est agitée avec du méthanol à 90 % ; le pigment passe entièrement dans la phase méthylique. L'autre partie est évaporée sous pression réduite, en atmosphère d'azote. Le résidu est repris par la pyridine. Le spectre enregistré montre une bande large unique à 492 m μ caractéristique de l'astaxanthine (cf. fig. 6).

Les œufs immaturés ont une consistance visqueuse et une coloration plus pâle que les œufs mûrs. On obtient à partir de ces œufs une solution légèrement opalescente. Les variations du pH, l'action de la température, l'action des solvants organiques, provoquent les modifications de coloration enregistrées avec les œufs mûrs, le groupement prosthétique est séparé par addition de pyridine ou par traitement à l'acétone et l'éther de pétrole. Il présente le spectre caractéristique de l'astaxanthine (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

Pigment extrait du conjonctif péristomacal. Dans le tissu conjonctif péristomacal, une partie du pigment peut également être extraite en solution aqueuse.

5 g. de tissu conjonctif sont refroidis à - 15° C. La masse congelée est broyée avec du sable, et reprise par 40 ml. d'eau distillée ; une partie du pigment passe en solution aqueuse qui se colore en rose. C'est encore un chromoprotéide dont les caractères physicochimiques sont comparables à ceux des précédents. Le groupement prosthétique est isolé par traitement à la pyridine ou par le mélange acétone-éther ; il présente ici encore un maximum d'absorption à 492 m μ dans la pyridine.

— Chromoprotéides d'Aristeomorpha foliacea.

Pigment des œufs. Les œufs sont prélevés dans les ovaires (*) 5 g. d'œufs sont obtenus en solution aqueuse par le procédé décrit pour les œufs de Plesionika edwarsii. La solution aqueuse améthyste présente un spectre à large bande (λ max. = 600 m μ dans la pyridine).

a) Action du pH.

On additionne la solution aqueuse de solutions tampons de pH variés. C'est seulement au-dessous de pH 4 que l'on observe un virage au brun orangé (réversible).

L'addition d'acides minéraux provoque également un virage, mais la réaction alors est irréversible.

b) Action de la température.

La solution est chauffée au voisinage de 70° C. La teinte vire à l'orangé en passant par des teintes intermédiaires ; par refroidissement, la teinte initiale reparait. A 100° le virage est irréversible.

c) Action des solvants organiques.

La solution est agitée avec de la pyridine qui se colore en rouge (la protéine précipite) ; avec le mélange acétone-éther, le pigment rouge orangé passe en solution éthéro-pétrolique. La solution est évaporée ; le résidu repris par la pyridine présente un spectre d'absorption à bande unique (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

(*) Les peneidea ne portent pas leurs œufs.

— Chromoprotéides d'*Aristeus antennatus*.

Pigment des œufs. La solution aqueuse obtenue par le procédé habituel est rose cyclamen (max. d'absorption à 504 m μ).

a) Action du pH.

On observe un virage à partir de pH 4. Le changement est réversible. L'addition d'acides minéraux et d'acide acétique provoque une coloration orangée. La réaction est alors irréversible.

b) Action de la température.

Par chauffage à 70° C., la solution vire du cyclamen à l'orangé ; la teinte initiale reparait par refroidissement. A 100°, on observe un coagulum rouge brique.

c) Action des solvants organiques.

On étudie successivement, l'action de la pyridine, de l'acétone, et de l'éther de pétrole : la protéine précipite avec la pyridine et l'acétone. Le groupement prosthétique est détaché, la solution agitée avec de l'éther de pétrole lui cède son pigment. Le groupement prosthétique est caractérisé par son spectre à maximum unique (492 m μ dans la pyridine).

Pigment du conjonctif péristomacal. Le pigment est extrait par le procédé décrit pour le conjonctif de *Plesionika edwardsii*. La solution obtenue est rose.

L'action des variations de pH, de la température, des solvants organiques aboutissent aux mêmes observations : le groupement prosthétique, libéré par action de la pyridine, ou de l'acétone (qui coagule la protéine) est caractérisé par son spectre : (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

Chromoprotéides de *Parapenaeus longirostris*.

Pigments des œufs. La solution aqueuse est vert clair. On étudie ici aussi :

- l'action du pH : on observe un virage à l'orangé à pH inférieur à 4 ;
- l'action de la température : la coloration passe du vert à l'orangé, la réaction est réversible au-dessous de 70° C. (en passant par les mêmes teintes intermédiaires) ; elle est irréversible au-dessous de 70° C. ;
- l'action des solvants organiques : la pyridine, l'acétone coagulent la protéine ; le pigment libéré est l'astaxanthine (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

— Chromoprotéides de *Scyllarus latus*.

Pigment des œufs. La solution aqueuse est jaune orangé ; elle vire à l'orangé brique par l'action des acides, de la chaleur, des sol-

vants organiques. Son groupement prosthétique est l'astaxanthine (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

— Chromoprotéides de *Squilla mantis*.

Pigment du conjonctif sous-oesophagien. Quelques grammes de conjonctif sont prélevés et triturés, une partie passe en solution aqueuse. L'addition d'acétone provoque un précipité et la libération du groupement prosthétique que l'on fait passer en solution éthero-pétrolique. La solution éthero-pétrolique présente le spectre caractéristique de l'astaxanthine (λ max. = 492 m μ dans la pyridine).

L'ensemble des résultats spectrophotométriques est reporté sur le tableau IX.

Il en ressort que — mise à part la gamme très étendue de coloration — tous ces chromoprotéides possèdent des caractères physico-chimiques tout à fait comparables : les modifications du pH, les variations de la température, l'action de divers solvants, des acides et des bases produisent le même effet : la libération réversible ou non du groupement prosthétique qui est dans tous les cas l'astaxanthine sous sa forme entièrement « trans ».

Ces résultats sont en tous points superposables à ceux obtenus par Stern et Salomon (217) sur l'ovoverdine des œufs de homard, et par Wald (237) sur la crustacyanine. On peut également remarquer d'après les observations faites sur les œufs immatures et sur les œufs mûrs, que le groupement prosthétique reste le même au cours de l'ontogénèse. Cette constatation est à rapprocher de celle faite par Ball (4), qui, étudiant les différents stades de *Lepas fascicularis* et *Lepas anatifera* a constaté que les œufs sont roses tandis que les larves à l'éclosion sont bleues : dans les deux cas, le groupement prosthétique est l'astaxanthine. Selon Ball (4), la variation de couleur traduirait une modification dans la nature des liaisons entre groupement prosthétique et protéine.

Quoiqu'il en soit, il résulte de cet ensemble de faits expérimentaux, que par combinaisons avec des protéines l'astaxanthine est susceptible de donner un grand nombre de complexes hétéroprotéiques très diversement colorés.

Il s'agit là incontestablement d'un groupe de substances dont la spécificité est indépendante de la nature du groupement prosthétique (l'astaxanthine sous sa forme entièrement trans), et il est logique de suggérer le terme d'astaxanthino-protéides pour désigner les différents représentants de ce groupe (73).

d) TECHNIQUES DE PREPARATION DES EXTRAITS

L'étude de la nature et des caractères physico-chimiques du pigment permet de préciser la technique de préparation des extraits à utiliser pour l'expérimentation biologique.

TABEAU IX

Organes	Max. d'absorption dans la pyridine m μ .					
	Aristeo- morpha foliacea	Aristeus antennatus	Plesionika edwardsii	Squilla mantis	Parape- naeus longi- rostris	Scyllarus latus
CEUFS						
mûrs						
solution aqueuse	494-600	504	635	»	»	492
groupement prosthétique *	492	492	492	492	492	
immatures						
solution aqueuse	492	520	635	»	»	492
groupement prosthétique		492	492	492	492	
CONJONCTIF PERISTOMACAL						
solution aqueuse	520	520	»	»	»	»
groupement prosthétique *	492	492	492	492	»	»
HYPODERME						
solution aqueuse	492	492	»	»	»	»
groupement prosthétique *						
POCHE STOMACALE						
solution aqueuse	600	520	»	»	»	»
groupement prosthétique *	492	492	»	»	»	»

(*) Dans la pyridine.

Deux types d'extraits ont été préparés :

- 1°) des extraits huileux d'esters d'astaxanthine :
- 2°) des extraits aqueux d'astaxanthino-protéides.

1° Préparation des extraits huileux :

La solution épiphasique du conjonctif péristomacal ou d'hypoderme est chromatographiée. Le chromatogramme est développé et les esters de l'astaxanthine correspondant à la forme trans sont élués par de l'éther de pétrole additionné de méthanol (cf. ci-dessus, p. 35).

A la solution éthéro-pétrolique est ajoutée une quantité d'huile végétale (dévitaminée) calculée suivant la densité optique de la solution, pour obtenir un extrait huileux de concentration voulue en pigment. La quantité de tocophérol utilisée comme anti-oxygène est de 28 mg. par gramme d'huile. L'éther de pétrole est chassé par distillation sous pression réduite et en atmosphère inerte.

Il a été vu antérieurement que la vitamine A et les carotènes sont absents du conjonctif péristomacal et de l'hypoderme des espèces ayant fourni les extraits.

Les deux expériences ci-dessous montrent que si des traces de ces facteurs avaient échappé à la recherche chimique et spectrophotométrique, la technique de chromatographie suivie pour l'isolement des esters de l'astaxanthine excluerait la possibilité de leur contamination par la vitamine ou les carotènes.

Expérience 1 : Etude du comportement chromatographique des esters de la vitamine A (91).

Expérience 2 : Etude du comportement chromatographique de la vitamine A alcool.

Expérience 1 :

Le pigment de 0,5 g. de conjonctif péristomacal d'Aristeus antennatus a été mis en solution dans 200 ml. d'éther de pétrole. On y ajoute 9 μ g. de vitamine A sous forme d'une solution standardisée d'esters. La solution est filtrée sur colonne d'alumine. Le pigment est retenu à la partie supérieure de la colonne. Après lavage avec 200 ml. d'éther de pétrole, la zone pigmentée a été éliminée et le reste a été divisé en quatre tronçons : le premier de 3 cm, et les trois autres de 5 cm.

L'alumine de chacun a été agitée avec de l'éther de pétrole additionné de 10 % de méthanol. Les éluats, lavés à l'eau distillée, séchés sur sulfate de sodium anhydre ont été évaporés sous pression réduite

et en atmosphère d'azote, puis repris par 1 ml. de chloroforme ; il en a été de même de l'éther filtré à travers la colonne. Dans chaque extrait, la vitamine A a été recherchée et dosée par la réaction de Carr et Price.

Dans le tronçon (3 cm.) situé au-dessus de la zone pigmentée, il n'a pas été retrouvé d'axérophtol. Dans les trois tronçons de 5 cm., on en a trouvé respectivement de haut en bas : 1,5, 2,4 et 3,6 μg . (fig. 7, a). L'extrait du filtrat n'a donné aucune coloration par addition du réactif de Carr et Price. Ainsi, sur les 9 μg . ajoutés, 7,5 ont été retrouvés, étaliés sur les trois quarts inférieurs de la colonne et séparés du pigment par une zone de 3 cm.

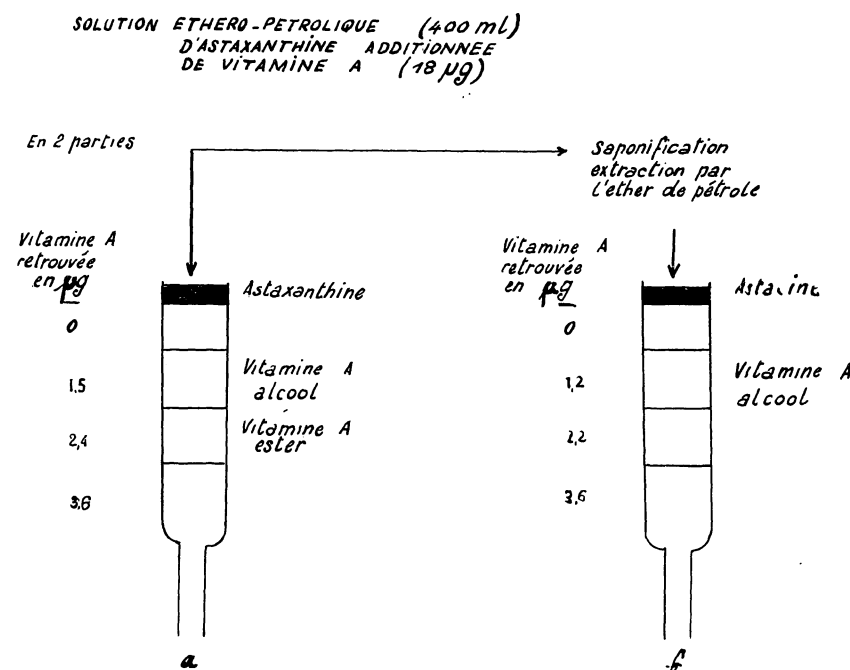


Fig. 7. — Schéma de séparation chromatographique de l'astaxanthine et de la vitamine A

a. - Expérience 1

b. - Expérience 2

Expérience 2:

On prépare comme dans l'expérience précédente une solution éthéro-pétrolique de conjonctif (200 ml.) additionnée de 9 μg . de vitamine A. Cette solution est saponifiée ; l'insaponifiable repris par l'éther de pétrole est chromatographié sur alumine. Selon cette technique, l'astaxanthine est transformée en astaxanthine qui reste adsorbée au sommet de la colonne. La colonne est tronçonnée comme dans l'expérience 1, et comme dans celle-ci, la vitamine A est recherchée

dans chacun des tronçons : les quantités retrouvées sont respectivement de haut en bas : 0, 4,2, 2,2 et 0,6 μg . (fig. 7 b).

Les schémas de séparation soulignent les comportements chromatiques différents de l'astaxanthine et de ses esters, de la vitamine A et de ses esters. Ces résultats en accord avec ceux de Kon (124) montrent que la seule chromatographie sur alumine sépare l'astaxanthine libre et estérifiée de la vitamine libre et de ses esters. Quant aux carotènes, nous avons déjà souligné ci-dessous (cf. p. 31) que lorsqu'ils sont présents, ils filtrent lentement à travers la colonne. On peut donc conclure, en toute sécurité, en ce qui concerne les extraits ainsi préparés pour l'étude de l'activité de l'astaxanthine qu'ils ne peuvent, en aucun cas, renfermer la moindre trace de vitamine A ou de carotènes.

Préparation d'extraits huileux d'astacine.

200 ml. de solution hypophysique obtenue à partir de conjonctif péristomacal sont saponifiés par addition de 100 ml. de potasse alcoolique à 15 %. On poursuit la saponification pendant 4 heures à la température de la pièce ; on ajoute alors 300 ml. d'eau et 200 ml. d'éther de pétrole. L'astacine (selde potassium) précipité sous forme de flocons rouges qui se rassemblent à l'interphase « éther de pétrole — solution hydroalcoolique ».

Après filtration, les flocons sont lavés avec 200 ml. d'alcool à 50 % et ensuite à l'éther de pétrole (20 ml.) puis à l'eau distillée.

La masse pâteuse est mise en suspension dans l'huile végétale dévitaminée.

Préparation d'extraits aqueux d'astaxanthino-protéides.

Les solutions aqueuses d'astaxanthine-protéides sont obtenues suivant la technique décrite ci-dessus (cf. p. 34) mais le solvant est non plus de l'eau distillée, mais du sérum physiologique (CINa à 9 pour 1.000).

D. — TECHNIQUE DES ESSAIS BIOLOGIQUES

1° ANIMAL REACTIF

De nombreuses espèces animales ont été utilisées pour aborder l'étude des propriétés biologiques de substances douées d'activité vitaminique A. En effet, pour les oiseaux et la plupart des mammifères, la vitamine A est indispensable et l'amplitude des besoins en a été fixée pour la plupart des espèces : poulet, With et Wanscher (242), chat, Guilbert et Hart (97), porc, Nelson (179), singe, Day (42), Truscott et Van Wagemen (226), chien, Crimm et Short (35), Morgan (174), Guilbert et coll. (98), Bradfield et Smith (12) ; mais en fait, les seules espèces chez lesquelles ont été abordés la plupart des aspects du problème de l'avitaminose A sont, avec le cobaye, Mannering (151), Bentley et Morgan (7), Chevallier et Baert (26), la souris, Mc Carthy et Cerecedo (147), Sherman et coll. (207), Paul et Paul (185) et le rat. L'animal-réactif le plus souvent cité est le

rat albinos : *Mus norvegicus albinus*. C'est lui qui a été exclusivement utilisé dans nos expériences, notre élevage étant constitué par une seule variété, de pure souche Wistar, dont nous suivons la lignée depuis 1949.

REGIMES,

Le régime alimentaire a été choisi pour répondre à plusieurs conditions ; il doit fournir un apport calorifique suffisant, être bien équilibré et renfermer les principes spécifiquement indispensables au développement et à la reproduction ; en particulier, les apports en vitamines doivent être soigneusement contrôlés, des états de subcarence entraînant des conséquences plus ou moins graves pour la descendance. Cependant, en ce qui concerne la vitamine A, le surdosage doit être évité de façon à limiter l'importance des réserves hépatiques.

Après plusieurs essais, c'est le blé qui a été choisi comme source exclusive de céréales, son déséquilibre phospho-calcique a été toutefois compensé par l'adjonction de lactate de calcium ; de la caséine est ajoutée en complément.

Le blé est distribué moulu mélangé au lactate de calcium et à la caséine de sorte que notre régime est très voisin de celui préconisé par L. Randoïn et J. Causeret (192). Sa composition est la suivante :

Blé moulu	93,0
Caséine commerciale	5,0
Chlorure de sodium	0,5
Lactate de calcium	1,5

Les femelles gestantes reçoivent en outre une préparation à base de germe de blé incorporé au régime dans la proportion de 5 %. Le régime est complété par de la salade deux fois par semaine (régime E 6).

Avec ce régime, utilisé depuis plusieurs années, l'élevage est maintenu en excellente santé et la descendance assurée de façon satisfaisante.

ORGANISATION MATERIELLE DE L'ELEVAGE.

Nous nous limiterons aux données générales et à quelques précisions essentielles.

Les animaux disposent d'un local aéré par un système de ventilation et dont la température est maintenue aux environs de 20° C.

Les cages sont métalliques et de deux types :

- des cages individuelles pour les sujets en expérience à tiroir et plancher mobiles ;
- des cages disposées en batteries qui groupent les animaux destinés à la reproduction.

Pour obtenir une bonne reproduction, les quelques règles générales suivantes sont observées :

Dans une même cage, on réunit deux femelles et un mâle âgés de 60 à 90 jours (la maturité sexuelle est atteinte chez le rat Wistar entre le 50° et le 60° jour pour les deux sexes (141). Dès le 18° jour, les femelles sont isolées (la durée de la gestation est de 21 jours), et reçoivent des débris de coton cardé et du papier filtre qui leur permettent de préparer un nid.

Les cages des femelles gestantes sont mises à part, elles sont l'objet de soins spéciaux, et on veille, en particulier, à ce qu'elles ne manquent pas d'eau.

Il est admis (122) (123) que les croisements consanguins ne sont pas nuisibles, qu'ils dépendent seulement du patrimoine héréditaire et qu'en sélectionnant les sujets destinés à la reproduction, les lignées sont normales. Notre expérimentation dans ce domaine a confirmé cette opinion.

Tous les animaux étant marqués, enregistrés et suivis à l'aide de fiches individuelles, les femelles stériles ou celles qui, après deux mise-bas successives ont détruit leurs portées sont écartées. Une femelle donne de quatre à cinq portées, la deuxième et la troisième sont les plus nombreuses (6 à 8 petits) ; à la cinquième portée, le nombre de petits diminue. Les femelles cessent de reproduire entre le 15 et le 18° mois.

2° CONDITIONS D'ETUDE DE LA CARENCE EN VITAMINE A.

a) REGIMES SYNTHETIQUES

Les différents types de régime utilisés par les divers expérimentateurs correspondent à des compositions sensiblement analogues. Leur valeur énergétique totale est comparable, les différences portent seulement sur la nature des protides, des glucides et des lipides.

L. Randin et S. Queuille (195), utilisant comme source de protides le peptone du muscle, la caséine ou la levure de bière, ont montré que la nature des protides n'a pas d'influence sur la marche de l'avitaminose A. Simonnet (212), Penau et Simonnet (186) utilisent la peptone du muscle. Coward (30), Chevallier (24) la caséine. Le taux de ces protides varie entre 15 et 17 %. Après plusieurs essais préliminaires, nous avons arrêté notre choix sur la caséine ; du point de vue de sa composition, la caséine est une protéine qui donne toute satisfaction ; sa forme commerciale, livrée moulue est de qualité constante ; enfin, elle se prête facilement aux opérations de dévitamination.

En ce qui concerne les glucides, une étude comparative de l'influence de leur nature sur les processus de carence est due à L. Randoïn et S. Queuille (196). Le galactose et le lactose sont toxiques à fortes doses pour le jeune rat ; le lévulose et le glucose sont peu favorables. Avec le maltose, le saccharose et la dextrine, le développement et l'entretien de l'organisme sont satisfaisants (163). Les régimes de K. Coward sont à base d'amidon de riz, ceux de Lewis et Bodansky (140) d'amidon de pommes de terre, Chevallier (24) utilise la dextrine ou le saccharose. Ces régimes renfermant de 58 à 73 % de glucides. Mouriquand et Chaix (178) ont par ailleurs montré qu'une variation dans les proportions de glucides était sans influence sur l'apparition de la xérophtalmie.

Nous avons écarté l'amidon (d'un emploi coûteux) et expérimenté avec des régimes à base de dextrine ou de saccharose ; nous avons constaté que les animaux parvenus à un stade avancé de la carence manifestaient une certaine aversion pour le régime sucré. La dextrine a donc été adoptée ; toutefois, un régime à base de saccharose est distribué aux jeunes, les premiers jours du sevrage ; en effet, la dextrine forme souvent un véritable empois qui engue le jeune.

En ce qui concerne les lipides, les recherches de Drummond (47), de Simonnet (211), d'Emerique (49), de Randoïn et Netter (194), ont établi que les différentes huiles alimentaires donnent des résultats comparables ; ce sont les huiles d'arachides et d'olives qui

sont le plus souvent utilisées ; nous avons choisi l'huile d'arachides.

Les éléments minéraux sont inclus dans les régimes sous forme de mélanges salins dont la formule d'Osborne et Mendel (*) représente la composition la plus courante.

Nous avons finalement adopté le régime dont la formule est la suivante (régime R 12) :

Dextrine	63,5
Caséine	17,0
Mélange salin d'Osborne et Mendel ..	4,0
Levure de bière sèche	3,5
Huile d'arachides	12,0

• Papier filtre ad libitum.

Les besoins en vitamine du groupe B sont couverts par la levure de bière ; l'apport en vitamine D est assurée par l'irradiation du régime.

Les différents temps de la préparation du régime ont pour but d'obtenir un mélange de composition constante totalement privé de facteurs vitaminiques A. Ceux-ci étant présents dans la caséine et dans l'huile d'arachides, ces produits doivent subir un traitement préalable de purification.

Traitement de la caséine — Il consiste à éliminer la vitamine A par traitement à l'alcool à 90° dans un appareil à extraction (Kumagawa) pendant 5 heures. La caséine est ensuite séchée à l'étuve à 70° C.

Traitement de l'huile. — Il comporte un chauffage suivi de plusieurs épaissements à l'alcool à 90° C. L'huile, étalée en couche mince dans un large cristalliseur est chauffée pendant 8 heures à 120° C. ; elle est brassée et aérée au cours du chauffage. Après refroidissement, elle est épuisée par agitation avec 3 fois son volume d'alcool à 90° ; l'opération est répétée 3 fois. Après décantation et séparation de la

(*) Mélange salin d'OSBORNE et MENDEL (183).

Carbonate de calcium	134,8
Carbonate de magnésium	24,2
Carbonate de sodium	34,2
Carbonate de potassium	141,3
Acide phosphorique	103,2
Acide chlorhydrique	53,4
Acide sulfurique	9,2
Acide citrique	111,1
Citrate ferrique	6,34
Iodure de potassium	0,02
Sulfate de magnésium	0,079
Fluorure de sodium	0,0248
Alun de potasse	0,0245

phase alcoolique, on distille sous pression réduite pour chasser l'alcool. L'huile ainsi traitée (*) est conservée en flacons bruns.

Préparation du régime. — Le mélange complet est préparé pour plusieurs repas d'avance sauf en ce qui concerne l'incorporation d'huile qui est faite chaque matin, avant la distribution de la ration. C'est à la suite de plusieurs observations que ce protocole de préparation a été définitivement adopté : en effet lorsque l'huile est incorporée à l'avance, elle forme avec la dextrine de petits granules pâteux que l'animal mange moins volontiers ; or, il est essentiel d'obtenir une alimentation suffisante afin d'éviter que des troubles nutritionnels dus à une cause tout à fait indépendante viennent se surajouter à ceux de la carence et interférer avec eux.

Le mélange étant prêt, il est exposé en fines couches au rayonnement d'une lampe à U.V. pendant trente minutes. Cette irradiation est considérée comme suffisante pour produire la quantité de vitamine D suffisante.

La ration quotidienne est, au moment du sevrage, d'environ 10 g. pour l'adulte elle s'élève à 15 ou 20 g. La couverture des besoins énergétiques (43 calories pour le jeune, 65 à 85 calories pour l'adulte) est ainsi assurée en même temps que celle de tous les principes indispensables : acides aminés, acides gras, sels minéraux et vitamines à l'exclusion de la vitamine A.

b) AVITAMINOSE EXPERIMENTALE.

Le régime est administré au rat à partir du sevrage. Les rats sont sevrés entre le 25° et le 30° jour, au moment où ils pèsent entre 29 et 30 g. Il est essentiel pour que l'évolution soit régulière que ces conditions soient très strictement réalisées.

L'administration du régime carencé n'a pas d'influence au début sur la croissance et l'augmentation de poids est régulière. Au bout de 4 à 5 semaines la courbe de poids ascendante s'infléchit pour atteindre un plateau entre le 40° et le 45° jour de carence ; après une dizaine de jours de stabilisation, le poids décline et l'animal meurt entre le 60° et le 70° jour de carence. Quant aux signes de xérophtalmie, ils débutent macroscopiquement par une diminution de la fente palpébrale ; alors que chez le Wistar normal, on observe régulièrement de l'exophtalmie, chez le rat carencé, le globe oculaire s'enfonce dans l'orbite. Bientôt se manifeste, en même temps qu'un œdème des paupières, un dessèchement de la cornée qui s'opacifie ; en contraste avec ce signe, les sécrétions augmentent et deviennent hémorragiques (**). Les ulcères de la cornée apparaissent ensuite, ils prennent une ampleur considérable, les perforations cornéennes ne sont pas rares.

(*) Après épaissement le produit est soumis au contrôle suivant : on épuise (cas de la caséine) ou en dissout (cas de l'huile) dans le chloroforme 20 gr. de produit ; la réaction de Carr et Price ne doit donner aucune coloration.

(**) Nous avons pu constater que des exsudats hémorragiques provoqués par un traumatisme accidentel avant le 20° jour de carence n'accéléraient pas l'évolution de la xérophtalmie. Les observations de Chaix (20), de Courbières (29) ont conduit à des remarques analogues.

Si les divers auteurs sont d'accord quant à la régularité de cette évolution — la description que nous venons d'en donner représentant le schéma classique — ils divergent sur le moment de l'apparition de la xérophtalmie. En fait, les divergences tiennent essentiellement aux moyens d'observation mis en œuvre conduisant à les détecter de façon plus ou moins précoce. Selon Steenbock et Coward (216), les premiers signes de xérophtalmie coïncident avec l'arrêt de croissance ; pour Osborne et Mendel (184), les lésions oculaires peuvent apparaître quand la courbe de poids est encore stationnaire. Chaix (20) a pu montrer grâce à la mise en œuvre de techniques biomicroscopiques que les signes oculaires précèdent en réalité de 8 à 10 jours l'apparition des lésions macroscopiques. Cet auteur a pu ainsi conclure que la xérophtalmie représente le signe le plus précoce de la carence en vitamine A.

Dans les conditions que nous avons définies, nos observations sont en accord avec ces données : la xérophtalmie apparaît régulièrement chez nos animaux entre le 30^e et le 38^e jour de carence tandis que l'arrêt de l'accroissement pondéral ne se manifeste qu'à partir du 40^e jour (poids moyen des femelles : 70 g., poids moyen des mâles : 75 à 80 g.). Les observations ci-dessous extraites de notre expérimentation montrent qu'il en est bien ainsi (fig. 8 et 9).

Rat mâle : sevré à 30 jours, poids 30 g. :

- 32^e jour de carence : yeux clignotants ;
- 35^e jour de carence : sécrétions abondantes, cornées mates ;
- 38^e jour de carence : début d'ulcère à l'œil gauche, ulcère à l'œil droit (fig. 12) ;
- 45^e jour de carence : ulcère aux deux yeux.

Rat femelle : sevré à 30 jours, poids 30 g. :

- 32^e jour de carence : léger exsudat aux deux yeux ;
- 35^e jour de carence : cornées mates ;
- 38^e jour de carence : sécrétions hémorragiques à l'œil gauche, début d'ulcère à l'œil droit ;
- 50^e jour de carence : ulcères aux deux yeux.

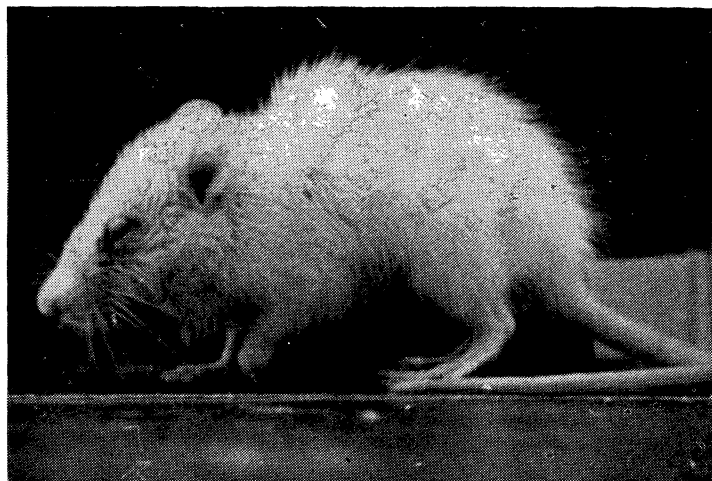


Fig. 8 : 35^e jour de carence

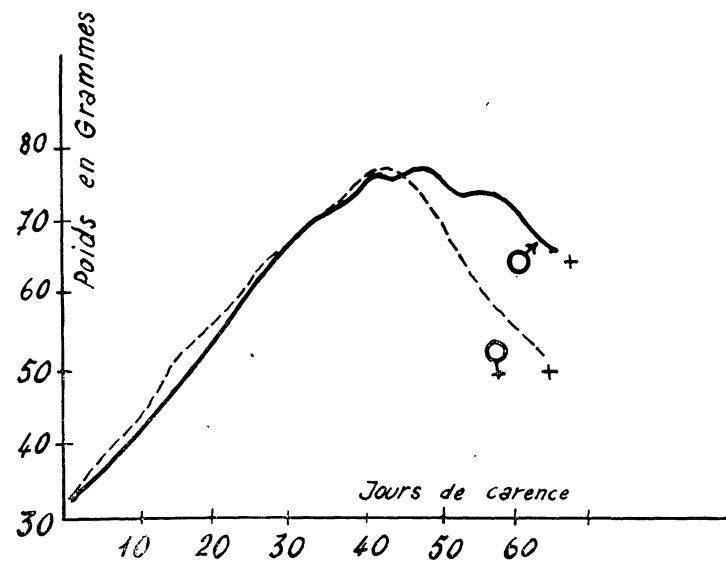


Fig. 9

Ce tableau de l'avitaminose A est classique et nous ne saurions trop insister sur la régularité de l'évolution qui vient d'être décrite.

La stabilisation de poids et la xérophtalmie s'accompagnent d'autres troubles tels que des anomalies de la dentition, des processus infectieux à divers niveaux que viennent confirmer les résultats d'autopsie. Le détail de nos observations dans ce domaine est rapporté au chapitre V consacré à l'étude anatomopathologique des animaux carencés en facteur A et des animaux traités à l'astaxanthine.

c) REVERSIBILITE DE LA CARENCE

Si, avant que la perte de poids ne soit trop accusée on administre, en quantité suffisante, un facteur doué d'activité vitaminique A, l'animal reprend du poids et ses yeux redeviennent progressivement sains. Au contraire, après un certain stade lorsque la perte de poids est trop importante et les lésions oculaires trop sévères, l'efficacité de la même préparation est nulle et l'évolution de la carence se poursuit comme si l'animal n'avait pas été traité. Il est donc essentiel de déterminer à quel stade les lésions sont encore susceptibles de régesser ; cependant il est très difficile de repérer le moment exact où chez les divers animaux en expérience, les lésions ont la même intensité ; de sorte que les auteurs sont loin d'être d'accord pour le choix du début de l'expérience.

La plupart des expérimentateurs se réfèrent au poids des animaux. Sherman et Munsell (208) proposent de commencer l'administration de la substance à tester après une stabilisation de poids d'une semaine. Javillier et Emerique (116) font ressortir que les animaux sont plus comparables entre eux, si l'on intervient après une perte de poids de 10 %.

Dans notre expérimentation, nous avons très régulièrement adopté cette règle, sauf cependant dans les cas exceptionnels où la carence évolue de façon aberrante :

1°) Il arrive parfois que l'on enregistre une apparition précoce des signes carenciels avec une stabilisation de poids à 50 grammes ; les animaux étant alors peu résistants, le traitement débute après seulement 5 à 6 jours de plateau.

2°) On constate aussi des carences retardées imputables sans doute à une réserve hépatique en vitamine A un peu plus abondante (cf. ci-dessous). Le poids se stabilise au-delà de la 6^e semaine ; dans ce cas, l'épreuve de cure débute après une vingtaine de jours de plateau.

La constatation de ces cas aberrants — dont le pourcentage dans notre schéma expérimental est toujours resté inférieur à 10 % — nous a incité à contrôler le niveau de la réserve hépatique des jeunes en expérience et à rechercher les conditions les plus favorables pour que cette réserve soit limitée et toujours sensiblement de même importance.

— Influence du régime de la mère pendant la gestation et pendant l'allaitement sur le niveau de la réserve hépatique du Rat au sevrage.

Il est établi que le niveau de la réserve hépatique du Rat à la naissance est supérieur quand celui de la mère est élevé pendant la gestation (37) (38) (39) (6) (103). Cependant, il n'y a pas proportionnalité et pour des réserves maternelles oscillant entre 2,7 et 6.000 µg., les variations de la vitamine dans le foie du jeune ne sont que de 0,15 à 0,3 µg.

Pendant la lactation, pour Henry et coll., le jeune stocke trois fois plus de vitamine quand la mère dispose à la mise-bas d'une réserve de 1.800 à 2.700 µg et est soumise pendant qu'elle allaite à un régime déficient en facteurs A. Il en stocke six fois plus si la réserve de la mère est basse, mais qu'elle reçoit un régime abondamment pourvu en vitamine A. Ces résultats soulignent que la réserve hépatique du Rat au sevrage dépend surtout de la quantité reçue par la mère pendant la lactation.

d) ETUDE DES VARIATIONS DE LA RESERVE HEPATIQUE EN VITAMINE A

Réserve hépatique du jeune au moment du sevrage.

Des femelles soumises à un régime limité en facteurs A sont accouplées à des mâles soumis à un régime normal ; pendant toute la durée de la gestation, les femelles reçoivent le régime limité (*). A la mise-bas, les mères avec leurs petits sont divisés en deux lots A et B :

- les mères du lot A reçoivent un régime pauvre en facteurs A (*) ;
- les mères du lot B reçoivent un régime riche en facteurs A (**).

Les petits sont sacrifiés lorsqu'ils pèsent 30 grammes, ce poids étant atteint vers le 30^e jour. Les foies sont prélevés et la vitamine A dosée selon la technique antérieurement décrite.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU X

Nbre de Rats	Nbre de jours de lactation	Sexe	Régime de la mère pendant l'allaitement	Poids du Rat en g.	Poids du foie en g.	Vitamine A	
						par g. en µg.	pour le foie en µg.
7	30	♂	pauvre en facteurs A	30	2,7	10,8	29
7	30	♀	»	30	2,4	11,1	26,6
7	30	♂	riche en facteurs A	30	2,6	17,0	44,2
7	30	♀	»	30	2,5	17,3	43,3

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Henry et coll. (103) et soulignent la nécessité de contrôler très soigneusement le régime de la mère pendant l'allaitement. Il était important de préciser en outre le temps que met l'animal, à partir du sevrage, pour épuiser ces réserves.

Décroissance de la réserve hépatique du jeune à partir du sevrage.

Trois portées (21 rats) sont allaités par des mères soumises au régime limité en facteurs A (régime E 6). On les sèvre quand ils

(*) Régime E 6.

(**) Régime E 6 supplémenté par trois rations de carottes par semaine.

atteignent 30 g. et on les soumet au régime carencé (régime R 12).

7 rats (3 ♀, 4 ♂) sont sacrifiés le jour du sevrage, on détermine leur réserve hépatique.

7 autres rats sont sacrifiés au 10^e jour de carence ; puis 7 autres au 18^e jour. La vitamine A est recherchée et dosée dans chacun des foies.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Nbre de Rats	Sexe	Jours de carence	Poids du Rat en g.	Poids du foie	Vitamine A par g. de foie en µg.	p. le foie entier en µg.
4	♂	0	30	2,7	10,8	29,0
3	♀	0	30	2,4	11,1	26,6
4	♂	10	42	3,7	4,5	16,6
3	♀	10	40	3,5	5,2	18,2
4	♂	18	50	5,2	0	0
3	♀	18	48	5,0	0	0

Ces résultats montrent que la réserve hépatique chez les mâles et chez les femelles est épuisée en moins de 20 jours si le régime de la mère, pendant l'allaitement est strictement contrôlé. Dans ces conditions, la xérophtalmie et l'arrêt de croissance qui sont en fait les signes de carence les plus manifestes s'observent alors régulièrement selon le schéma expérimental que nous avons décrit.

3° ETUDE DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE A

Deux méthodes permettent d'aborder cette étude :

- la méthode curative qui consiste à guérir les troubles causés par la carence
- la méthode préventive dans laquelle on administre la substance à tester à partir du sevrage : suivant le degré de son activité, elle prévient ou limite les troubles provoqués par l'avitaminose A.

Qu'il s'agisse de l'une ou l'autre méthode, l'utilisation de la substance active par l'organisme est sous la dépendance de plusieurs facteurs qu'il convient d'examiner avant d'aborder l'étude proprement dite des deux méthodes.

Forme chimique de la vitamine A administrée.

Tandis que Sobel et coll. (214), Kagan (119) ne trouvent pas de différence dans l'utilisation des formes libre et estérifiée, les travaux de Week et Sevigne (239), de Gray (94) et plus récemment de Esh et Sukhamoy Bhattacharya (52) ont montré que l'absorption est maximum quand il s'agit d'esters.

Nature du diluant employé :

Esh et Sukhamoy Bhattacharya ont également étudié l'influence du diluant sur l'absorption. La vitamine A (libre et sous forme d'acétate) est diluée dans l'huile d'arachide, de l'oléate d'éthyle ou mise en milieu aqueux. L'absorption est évaluée d'après le niveau de la réserve hépatique. Le pourcentage de vitamine A (acétate) absorbée est supérieur dans le cas de l'huile d'arachide (34,9 % stockées dans le foie) ; il est de 34,6 % dans le cas du milieu aqueux et seulement de 28,6 pour la dilution dans l'oléate d'éthyle. En ce qui concerne

l'axérophtol, les pourcentages respectifs sont de 30,3 (milieu aqueux), 17,1 (huileux), 25,0 (oléate d'éthyle).

Voie d'introduction :

Teulon, Marnay et Gounelle (223) ont comparé la mise en réserve hépatique de la vitamine A administrée par la bouche et par voie intramusculaire.

En ce qui concerne la voie d'introduction par injections intrapéritonéales, Chevallier, Augier et Choron (25) ont constaté que les phénomènes vaso-dilatateurs engendrés par la piqure sont très irréguliers et influencent notablement le processus d'absorption de la vitamine.

L'administration par voie rectale a été expérimentée par Randoïn, Hugot et Causeret (192) qui ont montré que la vitamine A peut être absorbée à ce niveau.

Protection exercée par un antioxydant :

Il est établi par de nombreux travaux que la vitamine A s'oxyde au cours du transit digestif. Dubouloz et Gasquy (45) administrant à des rats, privés de réserve hépatique de la vitamine sous forme de palmitate, constatant que le pourcentage mis en réserve est de 11 à 18 % en l'absence d'antioxydants, de 17 à 19 % en présence de tocophérol. Il y a deux moments du transit digestif où se produit un processus oxydatif : dans l'estomac et dans l'intestin. Pour Dubouloz, l'oxydation dans l'intestin est négligeable (46). Toutefois Hickman montre que lorsqu'il s'agit de petites doses, la destruction de la vitamine est importante (100). Davies et Moore (41), Moore et Sharman (172) ont étudié l'effet protecteur du tocophérol sur la réserve hépatique. Avec des doses équivalentes de vitamine A, accompagnées de quantités variables de tocophérol, les variations du niveau de la réserve hépatique sont considérables : le schéma ci-dessous souligne ces variations (fig. 10).

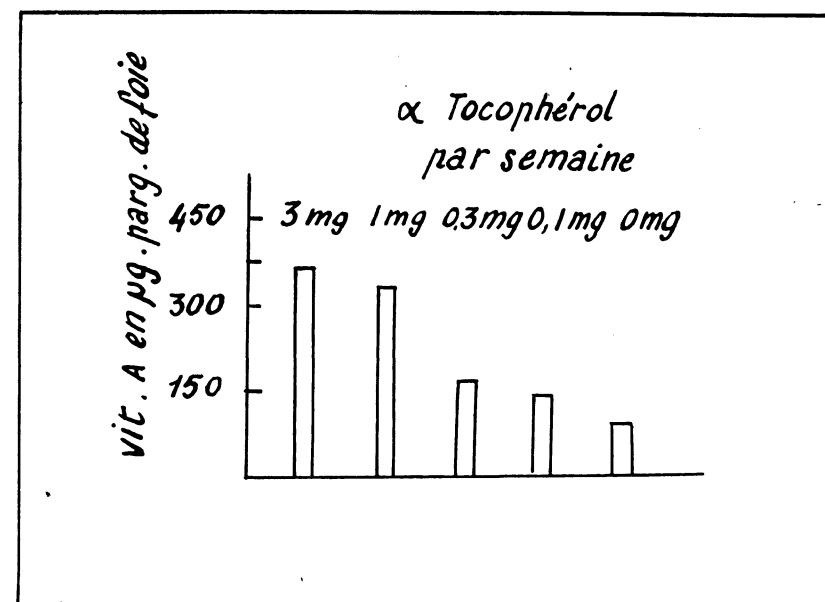


Fig. 10 : Teneur en vitamine A de foies de rats femelles après ingestion de 300 µg. de vitamine A par semaine (durée 6 mois et de doses variables de tocophérol (172)).

C'est en se basant sur le gain de poids et de la longévité que Hickmann étudie l'effet protecteur du tocophérol : le gain (rats mâles) en 28 jours est de 20,7, 28,8, 27,6 et 31,7 g. pour des doses de tocophérol respectivement égales à 0,05, 0,15, 0,5 et 1,5 mg. Des doses excédant 1,5 mg. seraient moins efficaces. Hebert et Morgan (100). En fait, le mécanisme d'action du tocophérol agissant comme antioxydant et par ailleurs facilitant l'absorption est complexe (171), (169), (188), (117), (107), (221), (145). De ce fait, les données que l'on rencontre concernant la dose optima de tocophérol sont assez divergentes. A titre de comparaison, ces données sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU XII

Tocophérol	Auteurs
1 mg. par semaine (délivré dans 20 mg. d'huile)	COWARD (30)
2 mg. par kg. (de rat) et par jour	BLAISOT (8)
3 mg. par semaine	MOORE et SHARMAN (172)
0,5 mg. par jour	HEBERT et MORGAN (100)
0,035 à 0,50 mg. par jour	MASON (153)
0,75 mg. (M. F. D.) (*)	»

(*) Mean Fertility Dose.

DONNEES PERSONNELLES :

Dans nos schémas expérimentaux, les conditions d'absorption sont strictement précisées et rigoureusement identiques quand il s'agit de deux lots d'animaux de comparaison.

- 1) la forme de vitamine A utilisée est un concentré d'esters (Flé-tase Spécia) ;
- 2) le diluant est de l'huile d'arachide dévitaminée par le procédé que nous avons décrit ci-dessus (cf. p. 44) ;
- 3) la vitamine ou la substance à tester est délivrée **per os** sous forme de gouttes ou par injections intra-péritonéales (l'administration est quotidienne) (**) ;

(**) Pour Coward et Key (34), les résultats obtenus sont identiques quand on délivre la même quantité de substance en deux doses par semaine. Dans notre expérimentation, nous avons adopté l'usage de la dose délivrée tous les jours pour deux raisons :

- a) les animaux sont tenus en main tous les jours à la même heure, et de ce fait les observations concernant chaque individu permettent de déceler toute anomalie dans leur comportement ;
- b) quand il s'agit d'extrait fraîchement préparé (esters d'astaxanthine, ou solutions de chromoprotéides) la préparation est faite tous les jours à partir de matériel frais et délivrée aussitôt.

- 4) du tocophérol est ajouté quand l'extrait est préparé (vitamine A ou substance à tester) et protège le produit actif à la fois pendant sa préparation et au cours du transit digestif.

a) METHODE CURATIVE

Le schéma de la méthode curative consiste lorsque la période de plateau est atteinte et que la xérophtalmie est en pleine évolution, à adjoindre au régime un extrait dont on veut étudier l'activité.

Si la quantité de substance administrée correspond à la dose d'entretien, la courbe de poids cesse de s'infléchir ; elle se stabilise au moins pendant quelques semaines et se trouve par conséquent parallèle à l'axe des temps. Si la dose est supérieure à celle d'entretien, la courbe de croissance fait un certain angle avec la parallèle à l'axe des temps ; cet angle est plus ou moins ouvert suivant la dose de substance active et la courbe de croissance est sensiblement une droite (si on limite l'observation à quelques semaines) et si l'on a pris des animaux assez jeunes pour que l'on ne se trouve pas encore dans la zone où la croissance revêt l'allure d'une logarithmique. Les conditions les plus favorables étant réalisées, l'angle maximum est d'environ 65°, Javillier (116).

Javillier s'est particulièrement préoccupé de savoir quelle courbe de croissance il est opportun de réaliser en vue d'un dosage. Il rejette celle qui délimite l'angle le plus ouvert, celle qui correspond à l'optima, au gain de poids quotidien le plus élevé (environ 2 g.) ; dans la zone proche de l'optimum (d'après l'auteur), la méthode manque de finesse. C'est dans la zone des petits « angles de croissance » que la méthode est la plus fine, c'est-à-dire que pour une faible dose d'apport vitaminique, il y a relativement plus de gain. Ce sont ces données qui ont conduit Javillier à choisir comme courbe de croissance à réaliser lors d'épreuves de dosages physiologiques, celle qui fournit un angle de croissance de 30°. Ceci correspond à un gain quotidien de poids d'environ 0,55 g.

Une durée de 30 jours est nécessaire, mais toutefois suffisante, pour que la réponse de l'animal, en ce qui concerne le poids, soit concluante ; Coward (30) poursuit l'épreuve pendant 5 semaines.

Il est admis que la guérison des lésions de xérophtalmie n'est obtenue qu'avec des doses supérieures à celles qui rétablissent une croissance normale (189), (30). Toutes les données que l'on rencontre dans la littérature sont parfaitement en accord sur ce point. Cependant, en valeur absolue, on trouve des écarts considérables ; ces divergences sont imputables au fait que les schémas expérimentaux ne sont pas toujours identiques.

Le tableau ci-dessous rassemble quelques données rencontrées dans la littérature.

(*) L'angle de croissance est celui qui est délimité par la droite, qui, partant du point de la courbe de croissance correspondant au début de l'épreuve, est parallèle à l'axe des temps, et par celle qui, partant du même point, atteint celui qui traduit le poids atteint au 30^e jour par l'animal.

TABLEAU XIII

Doses curatives exprimées par kg. de poids et par jour.

Vitamine A en $\mu\text{g.}$	Auteurs
6,0 - 12,0	HUME et CHICK (110)
3,8 - 4,6	GOSS et GUILBERT (70)
3,0	BAUMANN et coll. (6)
12,0	HORTON et coll. (109)
6,0	LEWIS et BODANSKY (140)

Recherches personnelles :

Les essais portent sur des lots de rats soumis au régime de carence à partir du sevrage. Quand les signes de carence sont manifestes, avec une stabilisation de poids remontant à 10 jours et la xérophtalmie intense, on répartit les animaux en deux lots homogènes et comportant autant de mâles que de femelles.

Les animaux reçoivent alors des doses quotidiennes correspondant à :

Rats du lot I : 0,6 $\mu\text{g.}$ de vitamine A, dilué dans 20 mg. d'huile d'arachides dévitaminée, additionnée de tocophérol (7 mg. par gramme d'huile).

Rats du lot II : 1,2 $\mu\text{g.}$ de vitamine A dilué dans 20 mg. de la même huile tocophérolée.

Les résultats de ces essais montrent qu'une dose de 0,6 $\mu\text{g.}$ par jour est insuffisante pour guérir la xérophtalmie, mais qu'elle provoque une légère reprise de poids. A la dose de 1,2 $\mu\text{g.}$, on observe, et la guérison des lésions de xérophtalmie, et une reprise de poids importante.

Les observations relatives à 4 animaux (2 ♀, 2 ♂), extraites de ces expériences objectivent ces résultats :

Rat ♂ N° 101 :

- Poids maximum avant traitement : 77 grammes.
- Durée du plateau : 10 jours.
- Poids au début du traitement : 69 grammes.
- Dose quotidienne de vitamine A : 0,6 $\mu\text{g.}$

Observations :

- 1^{er} jour : ulcère à l'œil gauche, cornée droite sèche ;
- 17^e jour : ulcères aux 2 yeux ;
- » » : poids : 72 grammes.

Rat ♂ N° 111 :

- Poids maximum avant traitement : 72 grammes ;
- Durée du plateau : 12 jours ;
- Poids au début du traitement : 63 grammes ;
- Dose quotidienne de vitamine A : 1,2 $\mu\text{g.}$

Observations :

- 1^{er} jour : ulcère (allongé) à l'œil droit, exsudat sanguinolent, cornée sèche et brune ;
- 15^e jour : l'ulcère à l'œil droit est réduit à un point, la guérison de l'œil gauche est complète.

Rat ♀ N° 112 :

- Poids maximum avant traitement : 65 grammes ;
- Durée du plateau : 7 jours ;
- Poids au début du traitement : 58 grammes ;
- Dose quotidienne de vitamine A : 0,6 $\mu\text{g.}$

Observations :

- 1^{er} jour : ulcère central (2 mm de diamètre) à l'œil droit, cornée gauche trouble, sécrétions aux 2 yeux ;
- 16^e jour : aucune amélioration ;
- » » : Poids : 63 grammes.

Rat ♀ N° 108 :

- Poids maximum avant traitement : 67 grammes ;
- Durée du plateau : 11 jours ;
- Poids au début du traitement : 59 grammes ;
- Dose quotidienne de vitamine A : 1,2 $\mu\text{g.}$

Observations :

- 1^{er} jour : ulcères aux 2 yeux (œil gauche plus atteint) ;
- 13^e jour : amélioration
- 17^e jour : ulcère de l'œil gauche en voie de cicatrisation, ulcère de l'œil droit réduit à un point de 2 mm, sécrétions diminuées ;

Poids : 70 grammes.

b) METHODE PREVENTIVE

La préparation active à tester ou le milieu naturel dans lequel la présence éventuelle de facteurs doués d'activité vitaminique est recherchée, est administrée dès le sevrage, en plus du régime synthétique.

En faveur de la méthode préventive, on peut remarquer que l'épreuve de la substance à tester est faite sur des animaux sains, et ne présentant pas, comme dans la méthode curative un état pathologique engendré par la carence et, selon Randoïn (190) « aggravé d'affections secondaires mal connues ».

Javillier (116) attire l'attention sur le fait que les effets de doses ne sont comparables que si la dose est rapportée à un même poids de

rat ; ce qui doit rester constant « c'est la proportion entre la quantité de matière expérimentée et le poids de matière vivante ». Goss et Guibert (70) ont apporté la preuve expérimentale que les besoins du rat étaient proportionnels à son poids (112).

Pour Lewis et Bodansky (140), Gosse et Guilbert (70), Hume et Chick (110), 5,4 à 6,6 μg . de vitamine par kg. de poids représenteraient la quantité minimum susceptible d'assurer une croissance normale, de prévenir la xérophtalmie et l'apparition de cellules kératinisées. Pour Paul et Paul (185), l'effet de croissance obtenu avec 6 μg . serait très au-dessous de la normale et 12 μg . au moins seraient nécessaires pour que la croissance et la longévité soient normales.

Le tableau ci-dessous rassemble quelques chiffres à cet égard.

TABLEAU XIV

Vitamine A en μg . par kg. d'animal	Auteurs
7,7	BRAUDE et coll. (13)
6,0	CALLISON et KNOWLES (17)
6,0	LEWIS et BODANSKY (140)
6,0	GOSS et GUILBERT (70)
6,0	HUME et CHICK (110)
30,0	SHERMAN et coll. (206)
30,0	PAUL et PAUL (185)

Recherches personnelles :

Des rates gestantes reçoivent un régime soigneusement contrôlé (régime E 6) ; il est maintenu après la mise-bas et pendant la période d'allaitement.

Les petits, au sevrage, sont sélectionnés et l'on écarte ceux dont le poids excède 30 grammes. On dispose alors d'animaux parfaitement homogènes et dont la réserve hépatique ne peut excéder un certain niveau.

Chaque essai porte sur 8 rats : 4 mâles et 4 femelles.

Les animaux sont soumis au régime carencé et reçoivent la préparation active sous forme de gouttes délivrées quotidiennement à chaque animal.

Essai I - Régime carencé + 20 mg. d'huile dévitaminée renfermant 0,15 μg . de vitamine A.

Essai II - Régime carencé + 20 mg. d'huile dévitaminée et 0,9 μg . de vitamine A.

Essai III - Régime carencé + 20 mg. d'huile dévitaminée et 1,5 μg . de vitamine A.

Essai IV - Régime carencé + 20 mg. d'huile dévitaminée et 4,5 μg . de vitamine A.

Lot témoin - Régime carencé + 20 mg d'huile dévitaminée.

L'expérience est poursuivie pendant 100 jours.

Les résultats suivants sont enregistrés :

— A la dose de 0,15 μg . les animaux se sont comportés comme les témoins en ce qui concerne la xérophtalmie, les troubles de xérophtalmie ont été observés dans les mêmes délais, et avec la même intensité.

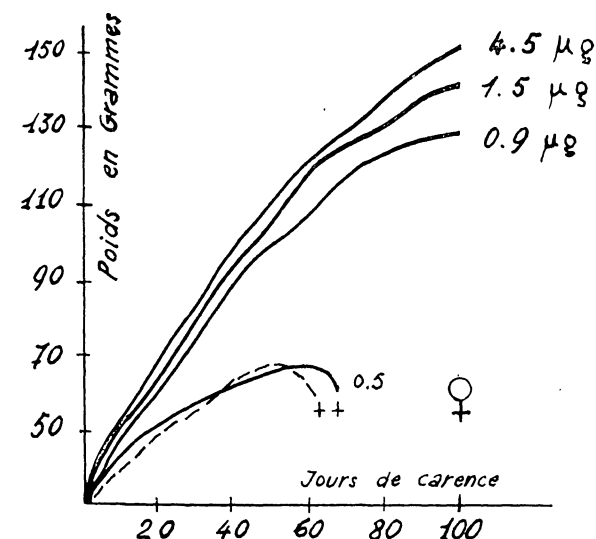
La courbe de poids traduit un effet de croissance supérieur à celui des animaux témoins jusqu'au 35^e jour. Au-delà de 35 jours, les courbes du Lot I et du Lot témoin se superposent ; on observe toutefois une survie d'une dizaine de jours pour le Lot à 0,15 μg . de vitamine.

— A la dose de 0,9 μg . aucun signe de xérophtalmie n'est observé. L'examen des frottis vaginaux ne décèle pas de colpokératose (cf. page 104). La croissance est presque normale (poids des femelles à 110 jours : 130 grammes ; poids des mâles : 140 g.).

— A la dose de 1,5 μg ., on ne relève ni xérophtalmie, ni colpokératose. L'effet de croissance est accentué par rapport aux animaux recevant 0,9 μg . (poids des femelles à 110 jours : 145 g. ; poids des mâles : 150 g.).

— A la dose de 4,5 μg ., la croissance et la longévité augmentent considérablement.

Les résultats sont exprimés par les courbes ci-dessous.



c) RELATION ENTRE LA DOSE DE VITAMINE A ADMINISTREE ET LA SURVIE

Pour Coward (30) parmi les tests classiques — reprises de croissance, guérison de la xérophtalmie et de la colpokératose — aucun n'est satisfaisant en raison de la difficulté de déterminer à quel moment du traitement la réponse physiologique peut être interprétée avec certitude. Pour cet auteur, le seul test valable serait celui de la

mort de l'animal et c'est seulement une question de temps qui en exclut l'application. Cependant, de nombreux auteurs se sont attachés à préciser la relation entre la dose de substance active et la survie.

Paul et Paul (185) donnent des précisions de chiffres : audessous de 0,3 g. de vitamine A par jour et par 100 g. d'animal, la survie n'excède pas 80 jours (± 2 jours) ; elle est de 234 jours (± 18) avec 0,6 μ g. et de 521 jours (± 21) avec 1,2 μ g. ; par l'administration de 6 μ g., la survie atteindrait 643 jours.

Sherman et coll. (207), (208) ajoutent à un régime normalement pourvu en facteurs A, 0,9 μ g. de vitamine A **pro die** ; la survie est prolongée de 5 % pour les femelles, de 10 % pour les mâles. Avec des doses quatre fois supérieures, la survie augmente dans les mêmes proportions chez les femelles et chez les mâles.

Pour Lewis et Bodansky (140) au-dessus de certaines doses, l'effet de croissance est identique et pour des doses quotidiennes de 7,5 à 300 μ g. par jour, les courbes de poids sont sensiblement superposées.

DONNEES PERSONNELLES.

a) essais curatifs :

Des rats parvenus au stade de la stabilisation de poids sont traités par 0,6 μ g. de vitamine A **pro die**. La survie n'excède pas 100 jours pour les femelles, 110 jours pour les mâles.

Au-dessous de 0,6 μ g. la survie chez les deux sexes est toujours inférieurs à 90 jours.

b) essais préventifs :

Pour une dose de 0,15 μ g. **pro die**, la moyenne des jours de survie est de 80 jours pour les mâles, 85 jours pour les femelles.

Avec des doses de 0,6 μ g. les femelles ne survivent pas au-delà de six mois, la longévité des mâles est de 7 à 8 mois.

Enfin, avec des doses de 0,9 μ g., la longévité dépasse 18 mois, les animaux toutefois se stabilisent autour du 5^e mois.

DISCUSSION

Dans les essais biologiques, qu'il s'agisse d'expériences de type curatif ou de type préventif utilisées pour l'étude de la carence en vitamine A, les résultats obtenus n'ont de signification que si le schéma expérimental est rigoureusement codifié et si, pour diminuer le coefficient d'incertitude apporté par les fluctuations individuelles (*), le nombre d'animaux est suffisamment élevé.

Dans toutes nos expériences, au cours desquelles près de 1.000 rats ont été suivis, nous avons veillé avec le plus grand soin :

1°) à ce que chaque expérience comporte un nombre d'animaux égal ou supérieur à 12 ;

2°) à ce que chaque lot soit composé d'autant de mâles que de femelles ;

(*) Estimé à 25 % d'après Sherman et Batchelder (204) ; 30 % d'après Chevallier (23).

3°) à assurer des conditions climatiques favorables ; en effet, les variations de température qui retentissent toujours de façon très marquée sur le Rat blanc, sont particulièrement funestes aux animaux carencés (51) ;

4°) à contrôler quotidiennement la nutrition de l'animal. Il est classiquement admis (Simonnet) que les animaux conservent un appétit normal jusqu'à ce que soit atteinte, au cours de la carence, la période de poids stationnaire. Nous avons cependant constaté que pour qu'il en soit ainsi, il est nécessaire de flatter l'appétit de l'animal en renouvelant sa ration deux fois par jour, en substituant fréquemment la dextrine au saccharose (et inversement) pour varier la saveur du régime.

C'est en observant strictement ces conditions que le coefficient individuel est réduit au minimum et que les résultats sont obtenus avec la plus grande régularité.

CHAPITRE II

ACTIVITE ANTIXEROPHTALMIQUE
DE L'ASTAXANTHINE

Dans le présent chapitre vont être rapportées les expériences qui démontre l'activité vitaminique de l'astaxanthine. Nous rappellerons tout d'abord les résultats obtenus par administration d'huile d'hépatopancreas, de conjonctif péristomacal et d'hypoderme, l'étude de l'activité de ces extraits ayant été rapportée dans une monographie d'ensemble de R. Grangaud (72).

C'est une observation fortuite qui a permis d'établir, dans les huiles de Crustacés, l'existence d'un facteur vitaminique nouveau. L'administration au Rat blanc carencé en vitamine A, d'huiles d'hépatopancreas d'*Aristeomorpha foliacea* à la dose de 20 mg. par animal et par jour, provoquait la guérison rapide des lésions de xérophtalmie sans que, parallèlement, n'ait été enregistrée la moindre reprise de poids.

Dans ces expériences, l'absence d'effet de croissance ne pouvait être attribuée à une action toxique de l'huile, car des doses quotidiennes de 90 mg. provoquaient alors une nette reprise de poids (81).

Par ailleurs dès ces premières expériences, il a été constaté que l'activité était proportionnelle à la concentration en pigment : les huiles d'été fortement pigmentée étant seules actives (76).

A ce stade des recherches, la question de l'identification du principe actif s'est donc trouvée posée ; l'un des moyens d'approche, pour préciser l'identité de ce principe a été d'étendre l'expérimentation à d'autres extraits provenant d'espèces voisines et possédant des caractères physico-chimiques assez proches. C'est la raison qui nous a incité à étudier les huiles d'*Aristeus antennatus* dont l'équipement pigmentaire est très voisin de celui d'*Aristeomorpha foliacea*.

A. — ETUDE DE L'ACTIVITE D'HUILES D'HEPATO-PANCREAS D'ARISTEUS ANTENNATUS

Les huiles ont été extraites d'hépatopancreas de crevettes pêchées en février et en juin.

L'extraction a été effectuée suivant la technique précédemment décrite (cf. p. 27).

Comme dans le cas d'*Aristeomorpha foliacea*, les huiles de juin sont rouges sang, celles de février sont jaune orangé pâle.

Essai curatif.

Quatre lots A, B, C, D, de rats nourris depuis le sevrage avec le régime synthétique R. 12 (cf. p. 44) et présentant en plus d'une stabilisation de poids d'au moins 10 jours, des signes de xérophtalmie, ont reçu :

Lot A : 3 ♀, 3 ♂ : régime synthétique seul ;

Lot B : 3 ♀, 3 ♂ : régime synthétique + 4,5 µg. de vitamine A ;

Lot C : 3 ♀, 3 ♂ : régime synthétique + 20 mg. d'huile de juin ;



Fig. 12 : Huile d'été. Début de traitement



Fig. 13 : Huile d'été. 20^e jour de traitement.

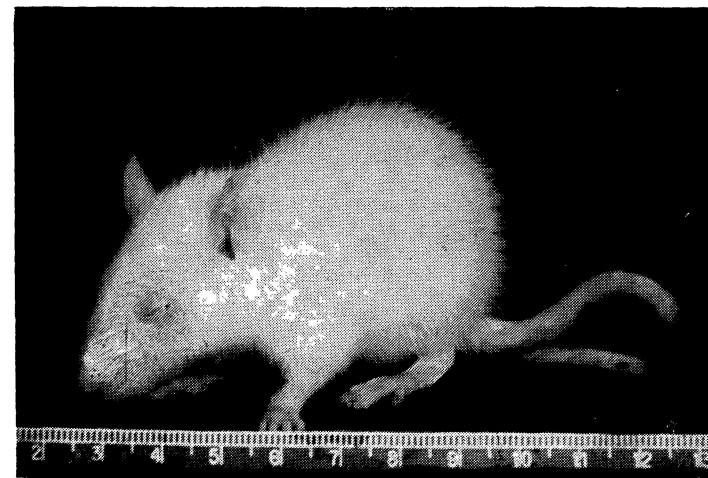


Fig. 14 : Huile d'hiver. 20^e jour de traitement.

Lot D : 3 ♀, 3 ♂ : régime synthétique + 20 mg. d'huile de février.

Au début du traitement, les animaux étaient âgés de 70 à 80 jours et pesaient entre 65 et 75 g.

Les animaux du lot A (régime synthétique seul) sont tous morts entre le 15 et le 28^e jour après l'apparition des premiers symptômes de carence. Chez les animaux du lot B, les lésions de xérophtalmie se sont progressivement atténuées et la guérison a été obtenue en 12 à 15 jours. Les rats du lot C (20 mg. d'huile de juin *pro die*) ont tous guéri leur xérophtalmie en moins de 12 jours, l'amélioration étant déjà manifeste après 4 jours de traitement. Pourtant aucun n'a repris de poids de façon appréciable et ils sont tous morts les yeux guéris, dans les 25 jours qui ont suivi la première administration d'huile (fig. 12 et 13). Enfin, les rats du lot D (20 mg. d'huile de février *pro die*) se sont en tous points comportés comme ceux du lot A : aucune activité de l'huile n'a été enregistrée (fig. 14).

En résumé, ces expériences démontrent l'activité antixérophtalmique d'huile d'*Aristeus antennatus* à des doses où la reprise de poids est cependant nulle. Les variations saisonnières enregistrées sont exactement superposables à celles antérieurement observées chez *Aristeomorpha foliacea* ; elles fournissent donc un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de la nature pigmentaire du principe anti-xérophtalmique présent dans les huiles d'été.

Ces expériences ont été complétées par des essais de type préventif. Nous avons souligné ci-dessus les avantages d'une telle méthode particulièrement précieuse dans le cas de l'étude d'un facteur nouveau.

Essai préventif (82).

Trente rats Wistar, âgés de 25 à 30 jours et pesant entre 29 et 30 g. ont été sevrés et divisés en cinq lots de six animaux recevant quotidiennement :

- Lot A : régime synthétique seul ;
- Lot B : régime synthétique + 0,15 µg. de vitamine A ;
- Lot C : régime synthétique + 0,9 µg. de vitamine A ;
- Lot D : régime synthétique + 10 mg. d'huile d'*Aristeus antennatus* ;
- Lot E : régime synthétique + 90 mg. d'huile d'*Aristeus antennatus*.

Après une trentaine de jours, les animaux se sont rapidement scindés en plusieurs groupes :

- chez les animaux du lot A (régime de base seul) les signes de xérophtalmie sont apparus et sont allés en s'intensifiant jusqu'à la mort, aucun des rats de ce lot n'ayant survécu au-delà du 50^e jour de carence ;
- pour le lot B (0,15 µg. de vitamine A), l'atteinte oculaire s'est également manifestée vers le 30^e jour et les lésions de xérophtalmie, quoique moins sévères que chez les animaux du lot A ont persisté jusqu'à la mort survenue avant le 60^e jour de carence ;



Fig. 15 - Lot A : Régime de base seul, 38^e jour de carence

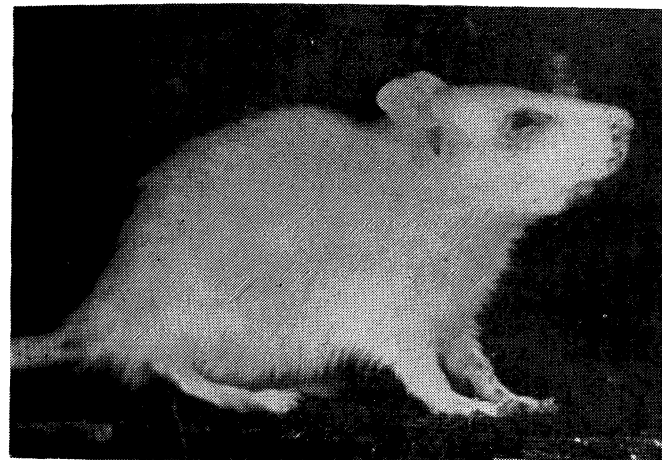


Fig. 16 - Lot B : Régime de base + 0,15 µg. de vitamine A, 38^e jour de carence.



Fig. 17 - Lot C : Régime de base + 0,9 µg. de vitamine A, 38^e jour de carence.

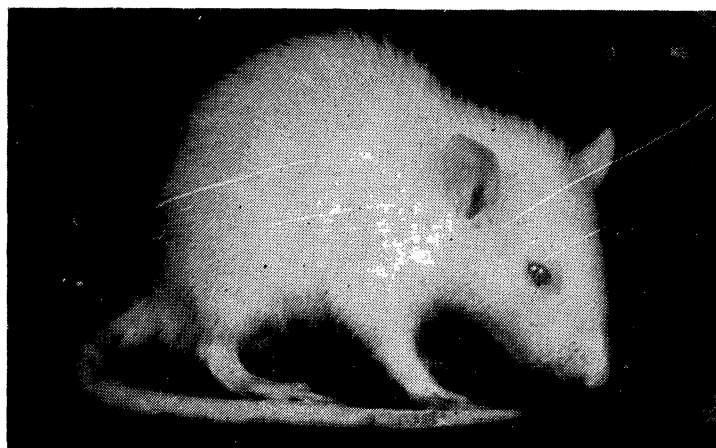


Fig. 18 - Lot D : Régime de base + 10 mg. d'huile d'Aristeus antennatus,
38^e jour de carence.



Fig. 19 - Lot E : Régime de base + 90 mg. d'huile d'Aristeus antennatus,
38^e jour de carence.

- les rats des lots C (0,9 µg. de vitamine A) et E (90 mg. d'huile) n'ont présenté aucun signe de carence ; leurs yeux sont demeurés parfaitement sains.
- enfin, les rats du lot D (10 mg. d'huile) se sont écartés des animaux des groupes A et B d'une part, et des groupes C et E d'autre part.

En effet, les animaux de ce lot se sont comportés en ce qui concerne la croissance et la survie, comme les animaux des lots A et B, et ils n'ont pas dépassé le 56^e jour de carence. Cependant, ils n'ont à aucun moment présenté des signes de xérophtalmie ; les figures ci-jointes (fig. 16, 17, 18, 19) objectivent ces faits et soulignent que les effets d'une petite dose d'huile d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus sont comparables à ceux enregistrés par l'administration de 0,9 µg. de vitamine A. Nous verrons par ailleurs (cf. chapitre III), les observations relatives à la croissance et à la survie de ces animaux ; mais il est intéressant de faire dès maintenant la remarque suivante : tandis que 0,15 µg. de vitamine A administrée *pro die* manifeste une légère action sur la croissance, mais ne suffit pas à prévenir l'apparition et l'installation de la xérophtalmie, l'huile d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus, à une dose qui cependant n'exerce aucune action sur l'augmentation de poids, prévient l'atteinte oculaire.

La conclusion de ces expériences en accord avec celles poursuivies parallèlement avec *Aristeomorpha foliacea*, est que l'activité antixérophtalmique est étroitement liée à la concentration en pigment. Dans une étude avec R. Grangaud et C. Chechan (77), nous avons montré qu'il s'agit de l'astaxanthine (3, 3' dihydroxy, 4, 4' dicéto-β-carotène). En présence de ce résultat qui se trouve en désaccord avec les données classiques (176), il était nécessaire de vérifier si le produit d'oxydation de l'astaxanthine, l'astacine (3, 4 - 3', 4' tétracéto-β-carotène) possède ou non une activité vitaminique.

—O—

B. — ETUDE DES EFFETS D'ADMINISTRATION D'ASTACINE

L'astacine est facilement obtenue à l'état de sel de sodium qui se présente sous forme de flocons rouges (cf. p. 41). Après sa mise en solution dans l'huile dévitaminée, on obtient un extrait fortement coloré en rouge.

Essai curatif.

Le schéma expérimental est celui précédemment décrit.

12 rats Wistar (6♀, 6♂) soumis dès le sevrage au régime privé de vitamine A et présentant des signes de carence manifestes, sont divisés en 2 lots (A et B) et reçoivent, par animal et par jour :

Lot A (4 ♀, 4 ♂) : régime de base (R. 12) + 50 mg. d'astacine en suspension dans 80 mg. d'huile dévitaminée.

Lot B (2 ♀, 2 ♂) : régime de base + 80 mg. d'huile dévitaminée.

Le traitement est poursuivi pendant 25 jours ; aucune amélioration de la xérophtalmie n'est enregistrée (83). Par ailleurs, l'action sur la croissance est nulle.

Chez tous les animaux du lot A, l'évolution de la xérophtalmie, la chute de poids et la survie ont été comparables à celles des animaux du lot B, soumis au seul régime carencé.

Cette expérience a donc confirmé les données classiques : l'astacine est dépourvue d'activité vitaminique A.

C. — ETUDE DE L'ACTIVITE DES ESTERS DE L'ASTAXANTHINE

Matériel technique.

La technique de préparation de ces esters par la méthode chromatographique a été décrite dans le chapitre I (cf p. 39). Nous avons vu (cf. p. 40) que la seule chromatographie sur alumine sépare l'astaxanthine libre et estérifiée de la vitamine A et de ses esters, si en dépit des contrôles chimiques et spectrophotométriques, on admet que ceux-ci peuvent être présents dans les huiles étudiées.

Après séparation chromatographique, les esters d'astaxanthine sont mis en solution dans l'huile d'arachide dévitaminée, additionnée d' α tocophérol. La concentration en astaxanthine de l'huile correspond à 20 μ g. pour 100 mg. d'huile additionnée de 2,8 mg. d'acétate d' α tocophérol. L'activité de ces esters est testée dans des expériences de type curatif et de type préventif.

Essais curatifs (85) - Protocole expérimental.

Deux lots A et B de rats Wistar soumis depuis le sevrage au régime carencé et présentant en plus d'une stabilisation de poids d'au moins 10 jours, des troubles de xérophtalmie, reçoivent, par animal et par jour :

Lot A (5 ♀, 3 ♂) : régime de base + 15 μ g. d'esters d'astaxanthine en solution dans 80 mg. d'huile dévitaminée additionnée d' α tocophérol (28 mg. par g. d'huile).

Lot B (3 ♀, 3 ♂) : régime de base + 80 mg. d'huile dévitaminée additionnée d' α tocophérol (28 mg. par g. d'huile).

La solution huileuse des esters est délivrée au compte gouttes **per os**.

Les animaux témoins reçoivent l'huile seule dans les mêmes conditions.

Résultats expérimentaux.

Chez les animaux du lot B (témoins) l'évolution de la carence s'est manifestée par l'intensité croissante des lésions de xérophtalmie, une perte de poids et la mort est survenue entre le 68^e et le 87^e jour de carence.

Chez les animaux du lot A, les observations suivantes étaient enregistrées :

— 2 animaux (femelles) présentaient au début du traitement, une vascularisation de la cornée avec ulcère central (O. G.) de 2 à 3 mm de diamètre, un ulcère à son début (O.D.). Les paupières étaient rouges et tuméfiées (fig. 20).



Fig. 20.

L'amélioration a été manifeste dès le 3^e jour de traitement ; la guérison a été obtenue en moins de 12 jours (fig. 21).



Fig. 21.

— 2 rats (1 ♀, 1 ♂) plus atteints présentaient une exulcération (O. D. et O. G.). Au 3^e jour de traitement, aucune amélioration n'est constatée (examen macroscopique) ; on observe, au contraire une aggravation (hémorragie O.D.).

Au 4^e jour, on note une très légère amélioration : légère régression des exsudats, cornée moins purulente.

Au 5^e et 6^e jour, l'amélioration est manifeste : les exsudats sèchent.

Au 7^e jour, on observe une réduction de l'ulcère O.G. (de la femelle).

Au 15^e jour, la cicatrisation est presque totale chez les deux animaux.

2 rats (1 ♀, 1 ♂) présentent une perforation centrale avec hernie de l'iris (O. G. ♀, O. D. ♂) — l'amélioration n'apparaît qu'au 8^e jour ; la guérison est lente mais progressive ; elle est totale au 25^e jour de traitement ; seule persiste une taie de la cornée ; par ailleurs, les processus infectieux au niveau des paupières (croûtelles, exsudats sanguinolents) ont complètement disparu dès le 17^e jour.

— 1 rat (♀) présente au début du traitement des troubles de xérophtalmie moins sévères que ceux des animaux cités ci-dessus : on observe seulement une cornée mate ; une fente palpébrale réduite, des exsudats au niveau des paupières. La guérison est obtenue en 6 jours.

Essais préventifs - Protocole expérimental.

Vingt-quatre rats Wistar, âgés de 25 à 30 jours et pesant entre 29 et 30 g. sont sevrés et divisés en 3 lots A, B et C.

Les animaux de chaque lot reçoivent par jour :

Lot A (3 ♀, 3 ♂) : régime de base seul.

Lot B (3 ♀, 3 ♂) : régime de base + 80 mg. de solution huileuse tocophérolée d'astaxanthine (50 µg.).

Lot C (3 ♀, 3 ♂) : régime de base + 80 mg. d'huile tocophérolée renfermant 0,9 µg. de vitamine A.

Tous les animaux reçoivent aussi la même quantité d'huile dévitaminée additionnée de tocophérol (20 mg. par g. d'huile) délivrée au compte gouttes tous les jours à la même heure. Pour éviter une surcharge lipidique au moment du sevrage où la diarrhée est quelquefois observée, on réduit à 10 % (au lieu de 12) le taux de l'huile du régime. Les animaux sont surveillés attentivement et pesés tous les jours pendant la période de 10 jours qui suit le sevrage, puis régulièrement tous les cinq jours pendant la durée de l'expérience. Elle est poursuivie pendant plusieurs mois.

Résultats.

Chez les animaux du lot témoin (lot A) les signes de xérophtalmie sont apparus vers le 30^e jour après le sevrage et sont allés en s'aggravant jusqu'à la mort survenue entre le 50^e et le 56^e jour.

Parmi les animaux du lot C, deux d'entre eux ont présenté des signes discrets de xérophtalmie (clignotements des paupières — diminution de la fente palpébrale) ; toutefois, aucun processus infectieux n'a été constaté.

Les animaux du lot B (50 µg. d'astaxanthine) n'ont, à aucun moment, présenté de signes de xérophtalmie. Cette expérience de longue durée a été poursuivie pendant 135 à 150 jours pour les femelles (mortes spontanément) et 210 jours pour les mâles (sacrifiés). Les cornées sont restées brillantes ; aucun signe d'irritation des paupières n'a été observé.

D. — ETUDE DE L'ACTIVITE DES CHROMOPROTEIDES (158)

Les expériences qui vont être décrites ont eu pour but de vérifier l'activité de l'astaxanthine engagée dans un complexe protéique. Le groupement prosthétique en est réversiblement détachable et nous avons mis le fait en évidence sur des extraits aqueux d'astaxanthinoprotéides d'œufs de diverses espèces.

1^o ESSAI PRELIMINAIRES

Un premier essai a été effectué en faisant ingérer à des rats carencés des ovaires avec œufs mûrs, mis en suspension dans de l'huile végétale dévitaminée (84).

— Des œufs d'Aristeomorpha sont broyés au mortier : on mesure la quantité d'huile ajoutée de telle sorte que la concentration finale en œufs est de 1 g. pour 150 mg. d'huile, le taux d'astaxanthine calculée est de 60 µg. par g. d'œuf (*).

Essai curatif.

16 rats carencés, parvenus au stade de la stabilisation de poids et présentant des signes de xérophtalmie intense, sont divisés en deux lots A et B qui reçoivent *per os*, par animal et par jour :

Lot A (4 ♀, 4 ♂) : régime de base + 500 mg. d'œufs (30 µg. d'astaxanthine) et 80 mg. d'huile végétale dévitaminée.

Lot B (4 ♀, 4 ♂) : régime de base + 80 mg. d'huile dévitaminée. Après 18 jours de traitement, aucune amélioration n'est enregistrée ; les animaux du lot A comme ceux du lot B manifestent des signes carenciels de plus en plus accentués.

Pour interpréter ce résultat négatif, en apparente contradiction avec l'activité manifestée par les esters de l'astaxanthine, nous avons suggéré qu'au cours du transit digestif, le pigment, rapidement libéré de sa copule protéique, devait être transformé par oxydation en astaxine inactive. Cette hypothèse a été vérifiée dans un deuxième essai, dans lequel une solution huileuse d'astaxanthine libre est additionnée d'α tocophérol qui joue le rôle d'antioxydant.

2^o ADMINISTRATION PER OS DU GROUPEMENT PROSTHETIQUE DETACHE DE SA COPULE PROTEIQUE

Dans cet essai, le matériel de départ est un chromoprotéide en solution aqueuse, extrait du conjonctif péristomacal d'Aristeus antennatus. Le tissu est broyé avec du sable et du sérum physiologique (CLNa à 9 ‰). — 100 ml. de solution aqueuse sont agités avec de l'acétone et de l'éther de pétrole (30 ml.).

Le groupement prosthétique passe en solution éthéro-pétrolique, le taux de pigment calculé par la mesure de sa densité optique correspondant à 50 µg. pour la totalité de la solution. Après addition d'huile végétale dévitaminée (400 mg.) et d'α tocophérol (12 mg.) elle est évaporée en atmosphère d'azote et sous pression réduite.

Essai curatif.

14 rats soumis au régime de base depuis le sevrage et présentant des signes de carence accusés (xérophtalmie intense et stabilisation

(*) Pour cette détermination, les œufs ont été agités avec de l'acétone. Après passage du pigment dans l'éther de pétrole, la concentration en astaxanthine de la solution est calculée par la mesure de sa densité optique en prenant E $\frac{1\%}{1\text{ cm.}} = 3.300$ (120).

de poids) sont divisés en deux lots A et B, qui reçoivent par animal et par jour :

Lot A (4 ♀, 4 ♂) : régime de base + 80 mg. de solution huileuse d'astaxanthine (10 µg.).

Lot B (3 ♀, 3 ♂) : régime de base + 80 mg. d'huile dévitaminée.

Dès le 4^e jour, les rats du lot A amorcent un début de réparation. La guérison est obtenue en 10 jours en moyenne (min. 8, max. 12 jours). Chez les animaux du lot témoin, lot B, on constate l'aggravation des lésions oculaires.

Il était donc naturel d'étudier les propriétés vitaminiques des chromoprotéïdes en les administrant non plus *per os*, mais par injections intrapéritonéales.

3^o ADMINISTRATION D'EXTRAITS AQUEUX PAR INJECTIONS INTRAPERITONEALES

Matériel et techniques.

On prépare des solutions aqueuses d'œufs de *Plesionika edwardsii*, d'*Aristeus antennatus*, de *Scyllarus latus* et de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*.

1,5 gramme d'œufs ou de tissu sont broyés avec du sable et additionnés de sérum physiologique, la concentration finale en astaxanthine est de 80 µg. pour 30 ml. de solution.

On injecte 3 ml. par jour et par animal ce qui correspond à 150 mg. de matériel frais. Ces 150 mg. renferment, dans le cas des œufs d'*Aristeus antennatus*, 0,2 µg. de vitamine A (cf. tableau VI), moins de deux centièmes de microgrammes pour les œufs de *Scyllarus latus*, et des traces non dosables dans les œufs de *Plesionika edwardsii*.

Les solutions sont administrées à raison de deux injections de 1,5 ml. par jour à des rats carencés présentant des signes de xérophtalmie en pleine évolution.

Résultats expérimentaux.

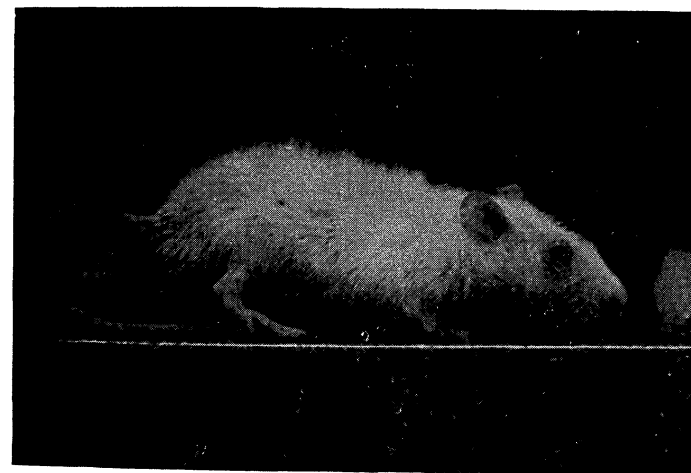
Les solutions injectées ont amené en quelques jours et dans tous les cas, la guérison des lésions oculaires. Les figures 22 et 23 objectivent les résultats dont l'ensemble est réuni dans le tableau suivant.

TABLEAU XVI

Matériel étudié	Nombre d'animaux	Guérison de la xérophtalmie
Œufs de <i>Plesionika edwardsii</i>	3 ♂,	en 13 jours
Œufs d' <i>Aristeus antennatus</i>	2 ♀, 1 ♂	en 6 jours
Œufs de <i>Scyllarus latus</i>	2 ♀, 1 ♂	en 13 jours
Conjonctif péristomacal d' <i>Aristeus antennatus</i>	2 ♀, 1 ♂	en 11 jours
Sérum humain	1 ♀, 4 ♂	aggravation ou état stationnaire au 10 ^e jour.



Début de traitement



Après 13 jours

Fig. 22. — Injections d'extrait aqueux d'œufs de *Plesionika edwardsii*



Début de traitement



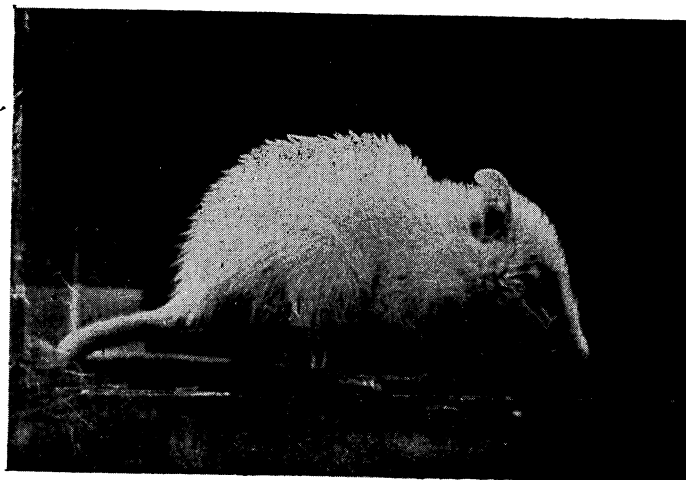
Après 6 jours

Fig. 23. — Injections d'extraits aqueux d'œufs d'Aristeus

C'est à titre de contrôle que nous avons tenu à injecter à des rats témoins de la vitamine A sous une forme hydrosoluble aussi comparable que possible à celle présente dans les œufs de crustacés. Il nous a paru que du sérum sanguin où la vitamine est engagée dans des cénapses lipoprotéidiques conviendrait parfaitement pour ce contrôle. Les volumes injectés quotidiennement aux rats témoins correspondraient à 0,55 μg . d'axérophtol, soit 2 à 3 fois plus que dans le soluté. Chez ces animaux, les lésions de xérophtalmie allaient en s'aggravant ; pratiquement stationnaires chez un seul des animaux traités, elles ne marquaient cependant aucune tendance à l'amélioration (fig. 24).



Début de traitement



Après 12 jours

Fig. 24. — Injections de sérum humain

En résumé, les solutions aqueuses de chromoprotéides manifestent en injections intrapéritonéales chez le Rat blanc carencé en vitamine A la même activité antixérophtalmique que des solutions huileuses d'esters de l'astaxanthine administrées *per os*.

Il apparaît donc au terme de ce chapitre que, considérés du seul point de vue de la xérophtalmie, 5 μg . d'astaxanthine manifestent une activité comparable à celle qui est obtenue avec 0,9 μg . de vitamine A. Quel que soit le mode d'administration (*per os* ou par injection intrapéritonéale) l'astaxanthine amène toujours la guérison des lésions oculaires dans des délais très courts. Quand les altérations de la cornée atteignent un stade avancé allant jusqu'à l'ulcère et même la perforation, la réparation s'amorce beaucoup plus tôt qu'il n'est constaté dans des cas analogues traités par la vitamine A.

Deux résultats, obtenus dans des conditions expérimentales différentes de ceux rapportés ci-dessus et qui, pour cette raison n'ont pas été donnés avec l'ensemble, méritent cependant d'être mentionnés car ils sont particulièrement démonstratifs.

1° L'épreuve de l'astaxanthine (10 μ g.) est instituée après l'échec d'un traitement à la vitamine A (0,6 μ g. **pro die**) : on observe rapidement la réversibilité des lésions.

2° On substitue à l'administration d'astaxanthine après guérison, un traitement à la vitamine A (0,6 μ g. **pro die**) : les signes de xérophtalmie réapparaissent.

Ces faits ne font que confirmer la forte activité antixérophtalmique de l'astaxanthine antérieurement établie.

ESSAI DE TRAITEMENT PAR APPLICATION LOCALE

D'après ce qui vient d'être exposé, l'astaxanthine manifeste une forte action antixérophtalmique quelle que soit la voie d'introduction. Il était donc intéressant d'étudier l'action du pigment par application locale.

On sait qu'en ce qui concerne la vitamine A et les carotènes, on rencontre dans la littérature de nombreuses observations à ce sujet, et les résultats expérimentaux montrent, en particulier, que la vitamine A intervient pour hâter le processus de réparation d'un tissu qui a été lésé. On retrouve l'application comme topique de la vitamine A en laryngologie (63), en dermatologie (40), (197), (215) en ophtalmologie. En 1934, Balachoski (3) a expérimenté l'action du carotène dans les conjonctivites. Sur des lésions provoquées par incision de la conjonctive (chez le lapin) Heinsius (102) fait des instillations de vitamine A en solution dans différents véhicules huileux. Des résultats favorables sont obtenus dans tous les cas.

Protocole expérimental.

La préparation utilisée est une solution huileuse d'esters d'astaxanthine.

Six rats carencés, présentant des signes de xérophtalmie à divers degrés, reçoivent, au niveau de la cornée, des instillations quotidiennes de 4 gouttes de la préparation. Le traitement est poursuivi pendant 15 jours.

Aucune amélioration n'a été enregistrée, même chez des sujets présentant des signes de xérophtalmie à leur début.

CHAPITRE III

ACTION DE L'ASTAXANTHINE SUR LA CROISSANCE DU RAT BLANC CARENCE EN VITAMINE A

Dès l'expérience princeps, (80), le facteur vitaminique mis en évidence dans les huiles d'hépto-pancréas se distinguait par son activité électivement antixérophtalmique, l'action sur la croissance du Rat carencé étant faible ou nulle. Or, on sait que par administration de vitamine A c'est l'inverse qui est observé, la courbe de poids redevient ascendante avant que ne se manifeste une amélioration des lésions oculaires.

L'éventualité de la présence d'une substance toxique inhibant l'effet de croissance était à exclure puisqu'à fortes doses, les huiles d'hépto-pancréas exercent à la fois une action antixérophtalmique et une action sur la croissance (81), (82), (155).

Le fait que ces fortes doses d'huiles sont parfaitement tolérées écartait naturellement l'hypothèse de toxicité, mais n'apportait cependant pas la preuve que le pigment à forte dose est seul responsable de l'activité enregistrée. En effet, ces fortes doses de pigment sont nécessairement accompagnées de fortes doses de lipides et il était permis de se demander s'ils participent ou non à l'action sur la croissance.

La comparaison des effets biologiques des huiles d'été et des huiles d'hiver était susceptible de préciser les rôles respectifs du pigment et des lipides.

En effet, dans les huiles d'hiver, le pigment n'existe qu'à l'état de traces ; il est à la concentration de 1 à 1,5 mg. par g. dans les huiles d'été.

A. — ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE DES HUILES D'ETE ET DES HUILES D'HIVER EXTRAITES DE L'HEPATO-PANCREAS D'ARISTEUS ANTENNATUS

Matériel et techniques.

Les extraits d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus sont préparés en été et en hiver et conservés en petits flacons de verre brun, soigneusement bouchés et maintenus à la chambre froide.

Les essais biologiques sont de type curatif et conduits parallèlement de façon à rendre rigoureusement semblables les conditions expérimentales des animaux traités aux huiles d'hivers et des animaux traités aux huiles d'été.

16 Rats Wistar sont soumis au régime carencé à partir du sevrage. La répartition des animaux en deux lots A (huile d'été) et B (huile d'hiver) est soigneusement étudiée pour qu'ils soient parfaitement homogènes : lorsque deux rats carencés, de même sexe atteignent le même poids, en présentant des atteintes oculaires comparables, l'un est traité par les huiles d'hiver, l'autre par les huiles d'été. En définitive, on dispose de deux lots (A et B) de 8 animaux comparables au moment où le traitement est administré :

Lot A (4 ♀, 4 ♂) : régime de base + 20 mg. d'huile de mai **pro die** (*).

Lot B (4 ♀, 4 ♂) : régime de base + 20 mg. d'huile de février.

Lot C (4 ♀, 4 ♂) : régime de base seul.

(*) De concentration en astaxanthine égale à 15 µg.

Résultats expérimentaux.

Les rats témoins (lot C) sont tous morts entre le 50^e et le 60^e jour de carence ; ceux du lot B (huile de février) se sont comportés comme ceux du lot témoin ; aucune activité de l'huile n'a été enregistrée : les courbes de croissance ont continué à s'infléchir et les animaux sont morts dans les 30 jours qui ont suivi le début du traitement .

Il ressortait de cette expérience :

- 1^o que les huiles d'hiver à la dose de 20 mg. **pro die** sont totalement inactives ;
- 2^o qu'à la même dose, les huiles pigmentées d'été à forte activité antixérophtalmique, ne manifestaient aucune action sur la croissance.

Cependant, l'actimination de doses relativement considérables (90 mg. **pro die**) permet de rétablir une croissance presque normale chez l'animal carencé (81). Pour tenter de mieux apprécier ces différents résultats, un essai de type préventif était entrepris, encadré par des essais témoins à la vitamine A.

B. — ETUDE DE L'ACTIVITE DES HUILES D'ETE COMPAREE A CELLE DE LA VITAMINE A

30 rats Wistar âgés de 25 à 30 jours et pesant entre 29 et 30 g. ont été sevrés et divisés en cinq lots de 6 animaux. A partir du sevrage (essais type « préventif ») ils ont reçu :

- Lot A : régime de base seul ;
- Lot B : régime de base + 0,15 µg. de vitamine A.
- Lot C : régime de base + 0,9 µg de vitamine A ;
- Lot D : régime de base + 10 mg. d'huile de mai d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus ;
- Lot E : régime de base + 90 mg. de la même huile.

Chacun des animaux reçoit en outre 2 mg. d'α tocophérol par semaine.

Les résultats ont été les suivants :

1^o Les rats des lots C (0,9 µg. de vitamine A) et E (90 mg. d'huile) ont poursuivi une croissance normale pour atteindre un plateau vers le 110^e jour de traitement, la moyenne des poids étant de 135 g. pour le lot C et de 132 g. pour le lot E.

2^o Les rats des lots A (témoins), B (0,15 µg. de vitamine A) et D (10 mg. d'huile) ont montré des courbes de poids s'infléchissant vers le 20^e jour après le sevrage pour atteindre leur maximum entre le 40^e et le 45^e jour de traitement. A ce stade, la moyenne des poids était :

- pour le lot A (témoins) de 59 g ;
- pour le lot B de 63 g. ;
- pour le lot D de 60 g.

Les animaux du lot A (régime de base seul) n'ont pas survécu au delà du 50 jour de carence ; ceux du lot B (0,15 µg. de vitamine A) sont morts vers le 60^e jour de carence (poids moyen 64 g.). Enfin, les rats du lot D (régime de base + 10 mg. d'huile d'Aristeus antennatus) n'ont pas dépassé le 56^e jour de carence.

C. — ETUDE COMPAREE DE L'ACTION DE L'ASTAXANTHINE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ET DANS DIFFERENTS MILIEUX LIPIDIQUES

Les résultats obtenus par l'administration de fortes doses d'huiles entières soulèvent plusieurs objections concernant le rôle éventuel des lipides. Les expériences suivantes ont eu pour objet :

- 1° de dissocier l'action des lipides de celle du pigment en administrant celui-ci (isolé par chromatographie) dans une huile végétale dévitaminée ;
- 2° de comparer l'action d'extraits plus ou moins concentrés en astaxanthine, en solution dans le même volume d'huile végétale dévitaminée ;
- 3° de mettre en parallèle les effets des mêmes doses de pigment administrés dans des véhicules huileux différents.

Essais préventifs.

Ces essais ont été effectués en utilisant :

- soit des extraits de titre variable en astaxanthine dans le même véhicule huileux ;
- soit des extraits de même titre en astaxanthine dans des huiles différentes.

Préparation des extraits.

Parmi ces extraits, trois ont été préparés à partir de pigment isolé par chromatographie de solutions d'hypoderme et de conjonctif péristomacal (extrait n° 1, 2 et 3) ; seul, l'extrait n° 5 est obtenu en utilisant une solution épiphasique soumise ensuite à la chromatographie.

Extrait n° 1. — 200 ml. de solution éthéro-pétrolique (de pigment chromatographié), renfermant 200 µg d'astaxanthine sont additionnés de 1 g. d'huile végétale dévitaminée tocophérolée (à 28 mg. par g.). On soumet à la distillation sous pression réduite et en atmosphère d'azote. La concentration en astaxanthine est de 20 µg. pour 100 mg. d'huile.

Extrait n° 2. — 800 ml de la même solution (800 µg. d'astaxanthine) sont évaporés en présence de 1 g. d'huile végétale dévitaminée tocophérolée. La concentration en astaxanthine est de 80 µg. pour 100 mg. d'huile.

Extrait n° 3. — A partir de 200 ml. de solution éthéro-pétrolique additionnés de 1 g. d'huile d'hépto-pancréas d'hiver et de 28 mg. de tocophérol, on obtient un extrait dont la concentration en astaxanthine est de 5 µg. pour 100 mg. d'huile.

Extrait n° 4. — Une solution éthéro-pétrolique, obtenue par agitation d'un extrait acétonique d'hépto-pancréas d'hiver est additionnée d'une quantité d'α tocophérol et distillée sous pression réduite en atmosphère d'azote. L'extrait huileux obtenu renferme 28 mg. de tocophérol par g. d'huile.

Extrait n° 5. — Une solution épiphasique de conjonctif péristomacal est soumise à la chromatographie. Le pigment élué en solution éthéro-pétrolique, est additionné d'huile végétale dévitaminée et d'α tocophérol. La concentration en astaxanthine de l'extrait est de 50 µg. pour 100 mg. d'huile.

Conduite des expériences.

Des rats Wistar sont sevrés et partagés en 6 lots homogènes comprenant chacun 4 mâles et 4 femelles. Chacun des animaux est nourri au régime carencé (régime R 12) et reçoit quotidiennement *per os* :

- Lot 1 : 5 µg. d'astaxanthine dans 25 mg. d'huile végétale dévitaminée.
- Lot 2 : 20 µg. d'astaxanthine dans 25 mg. d'huile végétale dévitaminée.
- Lot 3 : 5 µg. d'astaxanthine dans 100 mg. d'huile d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus d'hiver.
- Lot 4 : 100 mg. d'huile d'hépto-pancréas d'Aristeus antennatus d'hiver.
- Lot 5 : 50 µg. d'astaxanthine dans 100 mg d'huile végétale dévitaminée.
- Lot 6 : 0,9 µg. de vitamine A dans 100 mg. d'huile végétale dévitaminée.

Un lot d'animaux témoins 3 ♀, 3 ♂ reçoit seulement le régime de base. Chaque extrait est additionné d'α tocophérol en quantité calculée correspondant à une dose quotidienne de 0,7 mg. par animal. L'administration des extraits débute dès le sevrage et est poursuivie pendant 100 jours. Des lots témoins sont conduits parallèlement : la survie des animaux carencés n'excédant pas 60 jours, on soumet au cours de l'expérience d'autres rats au régime de carence.

La résultats sont objectivés sur les figures 25 et 26.

Analyse et discussion des résultats.

1° La comparaison des résultats obtenus par administration *pro die* de 5 µg. d'astaxanthine (dans 20 mg. d'huile dévitaminée) et de 20 µg. dans la même quantité d'huile montre un parallélisme de poids chez les femelles des deux lots jusqu'au 60° jour, chez les mâles jusqu'au 70° jour. C'est seulement par la prolongation du traitement que l'on enregistre un accroissement de poids chez les animaux traités à 20 µg. : le poids moyen des mâles au 80° jour de traitement dépasse d'une dizaine de g. celui des mâles recevant 5 µg. de pigment. Le poids des femelles recevant 5 µg. se stabilise à partir du 60° jour et décline ensuite entre le 70° et le 75° jours, tandis qu'avec 20 µg., elles atteignent le 75° jour avec un excédent de poids de 12 à 15 g.

2° Les différences enregistrées entre le lot 1 à 5 µg. dans l'huile végétale et le lot 3 à 5 µg. dans l'huile d'hépto-pancréas sont les suivantes : jusqu'au 70° jour de traitement (âge 100 jours) la croissance du lot 3 (♀ et ♂) est supérieure à celle du lot 1 ; au-delà de 70 jours, le poids se stabilise chez les animaux des deux lots, les animaux du lot 3 conservant un excédent d'une dizaine de g. chez les mâles comme chez les femelles.

3° La comparaison du lot 3 (à 5 µg. d'astaxanthine et 100 mg. d'huile d'hépto-pancréas) et du lot 4 à l'huile d'hépto-pancréas seule (100 mg.) montre un accroissement de poids parallèle jusqu'au 60° jour, l'influence de l'addition d'astaxanthine ne se manifestant qu'à partir du 60° jour ; au-delà les animaux traités à l'huile d'hépto-pancréas déclinent, leur survie n'excédant pas le 80° jour chez les femelles, le 55° jour chez les mâles. Un essai complémentaire avec les rats recevant une dose double d'huile d'hépto-pancréas (200 mg.) a confirmé l'inactivité de ces huiles sur la croissance, avec des courbes sensiblement superposables à celles des animaux recevant 100 mg. d'huile.

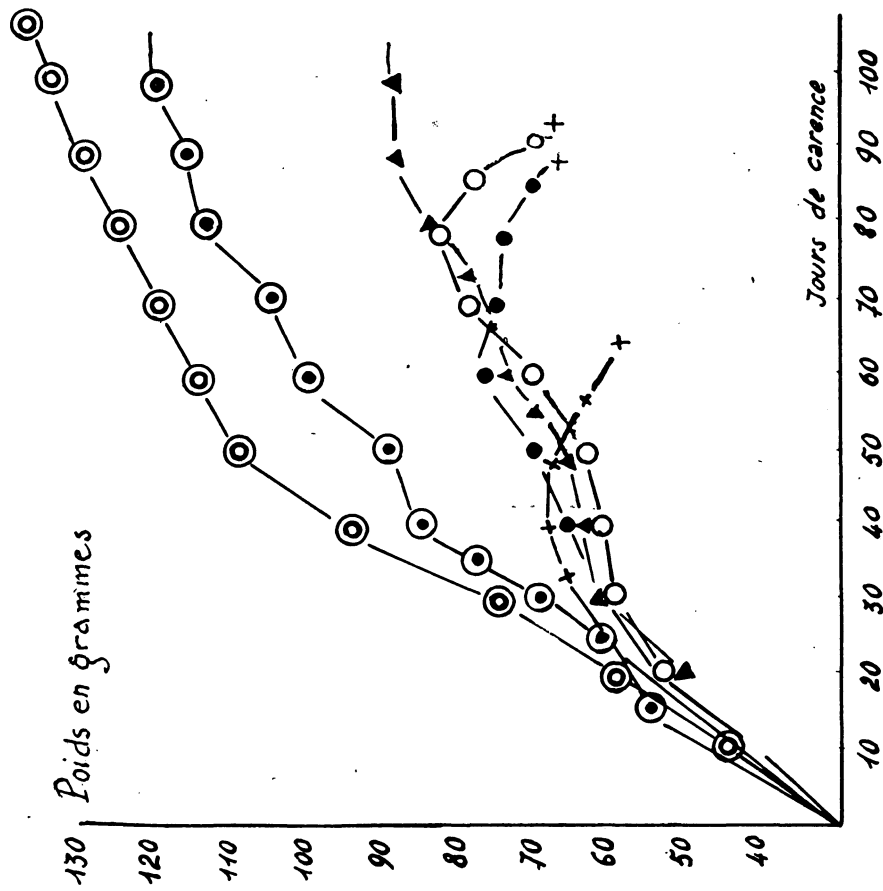


FIG. 25 : Courbes de croissance des rats ♂ à l'Asaxanthin

- LOT 1 : ○
- LOT 2 : ▲
- LOT 3 : ○
- LOT 4 : +
- LOT 5 : ○
- LOT 6 : ○

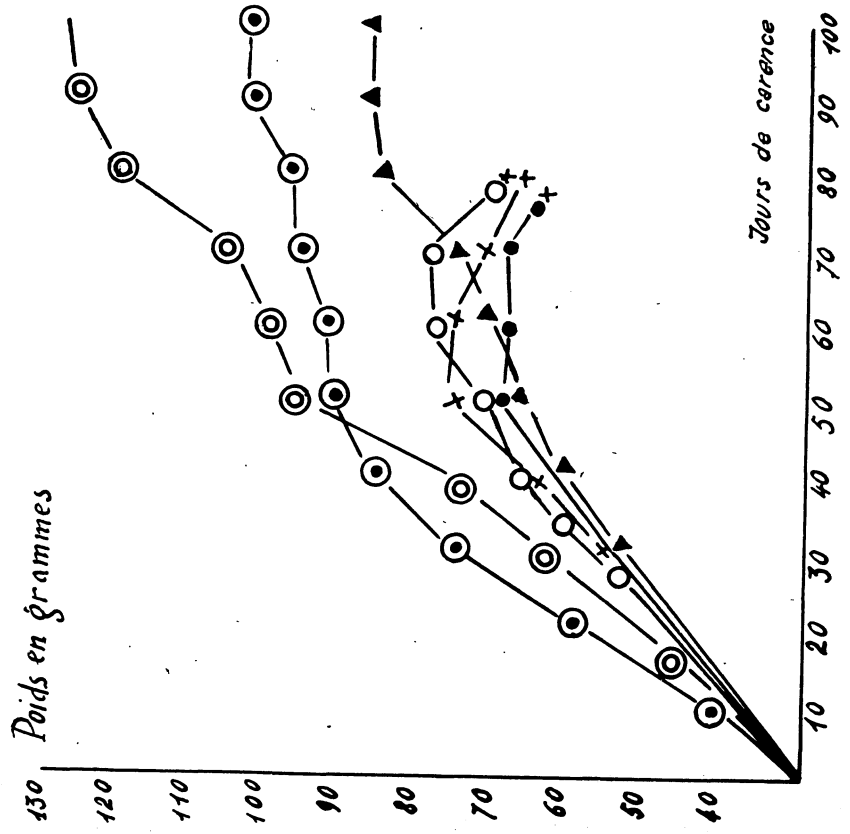


FIG. 26 : Courbes de croissance des rats ♀ à l'Asaxanthine

- LOT 1 : ●
- LOT 2 : ▲
- LOT 3 : ○
- LOT 4 : +
- LOT 5 : ●
- LOT 6 : ○

Les courbes de croissance (fig. 25 et fig. 26) objectivent ces résultats et mettent en évidence les faits suivants :

1° L'astaxanthine ne manifeste un léger effet de croissance qu'à la dose de 20 μg . par animal et par jour, dose plus de 4 fois supérieure à celle capable de guérir les lésions oculaires.

2° L'utilisation du pigment paraît légèrement meilleure quand le véhicule huileux est un extrait d'hépto-pancréas.

3° L'huile d'hépto-pancréas administrée seule, ne manifeste aucun effet de croissance, le nombre de jours de survie des animaux traités étant sensiblement égal à celui des animaux témoins.

4° Si l'on confronte les courbes de croissance des animaux ayant reçu 50 μg . d'astaxanthine (lot 5) avec celles des animaux à 0,9 μg . de vitamine A (lot 6), on constate qu'elles sont sensiblement parallèles avec toutefois un décalage d'une dizaine de g. (au-dessous) pour le lot 5.

Essais curatifs.

Dans ces essais, la dose de 50 μg . d'astaxanthine est administrée par animal et par jour et ses effets sur la reprise éventuelle de poids comparés avec la reprise enregistrée chez les animaux recevant 0,6 et 1,2 μg . de vitamine A également à titre curatif.

L'extrait administré est préparé à partir de pigment épiphase chromatographié et mis en solution dans l'huile végétale dévitaminée additionné de tocophérol (20 mg. par g.).

Conduite de l'expérience.

30 rats sont soumis depuis le sevrage au régime de base (régime R 12) et traités quand les signes de carence sont manifestes (stabilisation de poids remontant à 10 jours, lésions de xérophtalmie intenses). On répartit les animaux en 4 lots A, B, C, D. Chacun des animaux reçoit par jour et **per os** :

Lot A (4 δ , 4 φ) régime de base + 50 μg . d'astaxanthine dans 100 mg. d'huile tocophérolée.

Lot B (4 φ , 4 δ) régime de base + 0,6 μg . de vitamine A et 100 mg. d'huile tocophérolée.

Lot C (4 φ , 4 δ) régime de base + 1,2 μg . de vitamine A et 100 mg. d'huile tocophérolée.

Lot témoin (3 φ , 3 δ) régime de base + 100 mg. d'huile tocophérolée.

Résultats.

On enregistre une légère reprise de poids sensiblement de même amplitude pour les rats des lots A (50 μg . d'astaxanthine) et B (0,6 μg . de vitamine A) (fig. 27, courbes A, B). La courbe représentative de la croissance du lot C (1,2 μg . de vitamine) se détache nettement des deux autres et au 10^e jour de traitement, elle traduit un excédent de poids d'une dizaine de g. sur le poids des animaux des lots A et B.

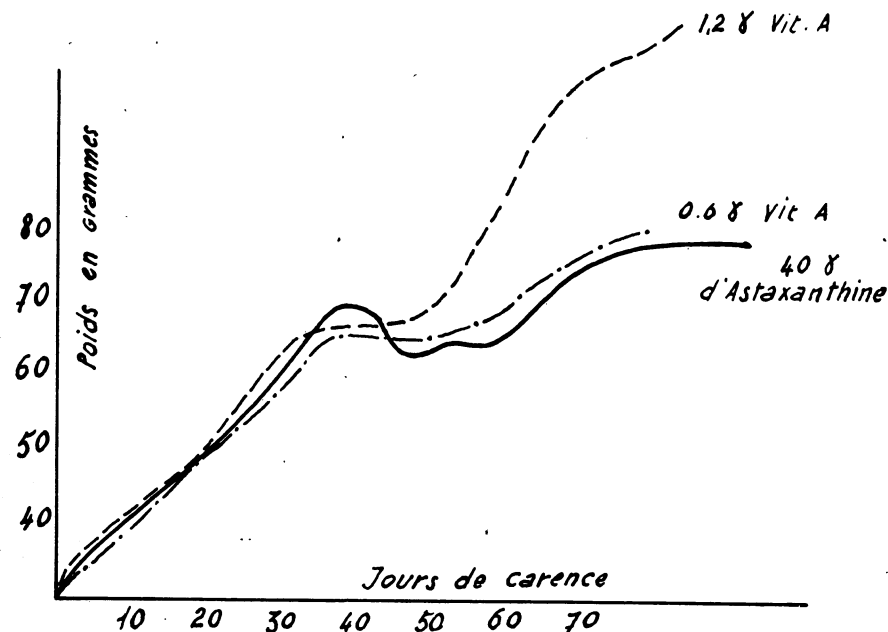


Fig. 27.

Au 20^e jour de traitement, les courbes des animaux des lots A et C continuent à être parallèles et tendent vers un plateau ; par contre, la courbe des animaux du lot C reste ascendante et au 20^e jour, les écarts de poids entre la courbe C et les courbes A et B atteignent une vingtaine de grammes.

Au 55^e jour, les courbes A et B sont en plateau, les animaux des deux lots s'étant stabilisés aux environs de 65 g. ; ceux du lot C atteignant alors 68 g., pour les femelles, 75 g. pour les mâles.

En résumé, administrés à titre préventif, 50 μg . d'astaxanthine sont susceptibles d'exercer une action sur la croissance du même ordre de grandeur que celle de 0,9 μg . de vitamine A. Cependant un traitement curatif de 50 μg . provoque une reprise de poids seulement comparable à celle enregistrée avec 0,6 μg . de vitamine A.

D. — ETUDE DE L'ACTION DES CHROMOPROTEIDES

La technique de préparation des extraits et la conduite des expériences sont décrites au chapitre II. Tous les essais sont de type curatif.

CHROMOPROTEIDES ADMINISTRES PER OS.

Oeufs d'Aristeomorpha foliacea. — 8 rats carencés (4 φ , 4 δ) présentant des courbes de poids en plateau (poids moyen mâles 78 g., femelles 68 g.) reçoivent par animal et par jour 80 mg. de préparation huileuse d'oeufs (10 μg . d'astaxanthine)

Aucun effet de croissance n'est enregistré ; à l'exception d'un sujet (femelle) une chute de poids s'amorce chez tous les animaux, entre le

3^e et 4^e jour de traitement l'inflexion de la courbe s'accroît à partir du 4^e jour et les animaux meurent entre le 13^e et le 20^e jour de traitement. Le poids moyen des mâles est de 65 g., celui des femelles est de 57 g.

Solution aqueuse de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*. Dans cette expérience, le groupement prosthétique du chromoprotéide est délivré en solution huileuse. On administre la préparation à 14 rats carencés (7 ♀, 7 ♂). Au 10^e jour de traitement, les courbes de croissance ne traduisent aucun changement, à l'exception d'un mâle chez lequel un accroissement de 3 g. est enregistré.

Entre le 10^e et le 15^e jour, on observe une chute de poids ; progressive chez 4 animaux, elle est brutale chez les deux autres. La survie est de 60 à 70 jours à l'exception du mâle mentionné ci-dessus, dont la mort ne survient qu'au 80^e jour.

CHROMOPROTEIDES ADMINISTRES PAR INJECTIONS.

Solution aqueuse d'œufs de *Plesionika edwardsii*. On injecte 3 ml. de solution aqueuse à des rats carencés (3 ♂) présentant une stabilisation de poids remontant respectivement à 8, 11, 12 jours (poids 78, 80, 83 g.).

Après trois jours de traitement, la courbe de croissance cesse d'être une droite, une chute de poids se produit par paliers, la mort des animaux survient entre le 21^e et le 28^e jour de traitement (poids 60, 64, 69 g.).

Solution aqueuse d'œufs d'*Aristeus antennatus*. Trois animaux sont injectés (2 ♀, 1 ♂).

— femelle n° 1 : poids de début 68 g. stabilisé depuis 10 jours. Au 6^e jour de traitement (*) aucun effet de croissance n'est enregistré. Au 10^e jour, le poids décline, l'animal meurt au 12^e jour, poids 58 g. ;

— femelle n° 2 : poids de début 66 g. ; entre la 1^{re} et la 12^e injection — 6 jours de traitement — on relève une perte de poids de 2 g. suivie d'une stabilisation de poids de 15 jours. Au delà, l'animal décline, la mort survient au 29^e jour de traitement, l'animal pèse alors 56 g. ;

— mâle : poids de début 84 g. Au 10^e jour de traitement on enregistre une perte de poids de 6 g., suivie d'un plateau qui se maintient pendant 30 jours à 78 g. Le déclin est ensuite rapide, l'animal meurt 9 jours plus tard, son poids est de 64 g.

(*) 3 ml. par jour en 2 injections de 1,5 ml., renfermant chacune 4 μ g. d'astaxanthine.

Solution aqueuse de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*.

2 ♀, 2 ♂, sont traités par injections, poursuivies respectivement pendant 12, 30 et 35 jours. Le poids est stationnaire chez tous les animaux pendant 20 à 25 jours. Il décline progressivement et la mort survient entre 30 et 35 jours, les chutes de poids atteignent de 12 à 20 g.

Sérum humain.

Le sérum injecté renferme 0,52 μ g. par ml. (*). 6 rats (4 ♂, 2 ♀) carencés, parvenus au stade de la stabilisation de poids sont partagés en deux groupes A et B.

Le groupe A reçoit par animal et par jour une injection de 0,3 ml. de sérum (0,15 μ g. de vitamine A).

Le groupe B reçoit 1 ml. en 2 injections de 0,5 ml. (0,52 μ g. de vitamine A).

Le poids des animaux du lot A reste stationnaire les 4 premiers jours ; une légère reprise est observée à partir du 5^e jour (de l'ordre de 3 à 4 g.).

Les animaux du groupe B accusent une augmentation de poids de 6 à 9 g.

En résumé, administrée à titre curatif, l'astaxanthine ne manifeste un effet de croissance notable qu'à la dose de 50 μ g. ; quand les animaux sont traités à titre préventif et avec des doses au moins équivalentes à 50 μ g., l'effet de croissance est suffisant pour les conduire à l'âge adulte.

(*) Le sérum utilisé renferme 0,52 μ g. de vitamine A par ml. Cette teneur élevée avait été obtenue par surcharge grâce à l'absorption massive de vitamine A par le sujet donneur.

CHAPITRE IV

ASTAXANTHINE ET FONCTIONS

DE REPRODUCTION

Les expériences rapportées au chapitre précédent établissent qu'il est possible, avec des doses suffisamment élevées d'astaxanthine, d'obtenir une croissance normale chez des animaux par ailleurs carencés en vitamine A. Les animaux ainsi conduits à l'âge adulte, ont un poids de sujets sains et un état de santé apparemment excellent. De tels sujets permettent donc l'étude d'une authentique carence en vitamine A et non plus d'une subcarence, et il est alors possible de préciser dans quelle mesure l'astaxanthine possède la propriété de s'opposer aux manifestations de la carence. Les expériences qui vont être décrites ont eu pour objectif d'explorer les fonctions de reproduction.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des troubles fonctionnels de la reproduction chez le rat carencé en vitamine A ; mais la difficulté réside dans le fait que les animaux doivent parvenir à l'âge adulte sans avoir constitué de trop grandes réserves en vitamine A, ce qui aurait pour conséquence des carences trop tardives. Les expérimentateurs s'attachent donc à donner à partir du sevrage un régime qui ne renferme que des quantités limitées en facteurs A ; mais toutes choses égales d'ailleurs, étant donné que les besoins et, par voie de conséquence, l'utilisation et la mise en réserve dans le foie varient avec l'âge (118), le poids de l'animal (116), (70), (112), le sexe (9), (173) il n'est pas certain que la réserve hépatique soit absolument nulle au moment où l'animal parvient à l'âge de la maturité sexuelle et est alors soumis au régime privé de facteurs A. De ce fait, les conditions expérimentales réalisées sont celles d'une subcarence et non celles d'une carence totale.

Dans les expériences qui vont être décrites, les animaux soumis au régime carencé en vitamine A à partir du sevrage, sont conduits à l'âge adulte par la seule administration d'astaxanthine, leur réserve hépatique en axérophtol est nulle et l'étude de la carence en vitamine A est ainsi abordée sur des bases nouvelles.

Rappel de données sur le cycle sexuel de la Rate.

Le rat Wistar normal atteint l'âge de la maturité sexuelle entre 50 et 60 jours, Longs et Evans (141).

Durant la phase d'activité génitale, l'ovaire et le tractus femelle sont le siège de processus cycliques dont l'ensemble constitue le cycle sexuel. De l'examen de 2.000 cycles, Evan et Bishop (56), (57) ont montré que dans 71 % des cas, la durée du cycle est de 4 à 5 jours, dans 82 %, entre 4 et 6 jours ; la durée moyenne est de 5,4 jours. L'étude du cycle est abordée par plusieurs méthodes : la plus couramment utilisée est celle des frottis vaginaux. On prélève les sécrétions vaginales à l'aide d'une sonde cannelée préalablement trempée dans une solution de sérum physiologique (ClNa à 9 ‰). Le frottis est déposé sur une lame que l'on examine au microscope directement ou après fixation et coloration à l'hématéino-érythrosine. Pendant la durée du cycle, des modifications des éléments figurés des sécrétions caractérisent quatre phases :

1) le di-oestrus qui dure environ 48 heures, le frottis comprend des cellules vaginales nucléées et de nombreux leucocytes ;

2) le pro-oestrus d'une durée de 12 heures environ ; le frottis

est très caractéristique par son uniformité : il comprend uniquement des cellules nucléées ;

3) l'oestrus dure en moyenne 48 heures. Le frottis est formé de nombreuses cellules anucléées, disposées au début de l'oestrus en larges placards, puis les cellules apparaissent isolées, fortement éosinophiles ;

4) le méta-oestrus dure en moyenne de 6 à 10 heures ; de grandes cellules basophiles apparaissent. Des cellules acidophiles, de taille moyenne sont également visibles. Les leucocytes sont de plus en plus nombreux.

A. — TROUBLES DES FONCTIONS DE REPRODUCTIONS CHEZ LE RAT CARENCE EN VITAMINE A

1° INFLUENCE DE LA CARENCE SUR LE CYCLE SEXUEL

Evans et Bishop (56) ont les premiers montré la répercussion, sur le processus du cycle, des déséquilibres alimentaires et en particulier de la carence en facteur A. Les examens des sécrétions vaginales décèlent un cycle anormal : alors que chez la rate normale, on ne trouve de cellules anucléées disposées en larges placards qu'au début de l'oestrus, chez la rate carencée, ces cellules kératinisées apparaissent pendant toute la durée du cycle ; on assiste à un véritable oestrus permanent. Ce phénomène est désigné sous le nom de colpokératose, Holweg et Dohrn (108). La colpokératose apparaît toujours et de façon précoce dans l'avitaminose A, ce qui a suggéré à Coward (32), une méthode biologique de dosage de la vitamine A, basée sur les modifications des sécrétions vaginales : l'examen des frottis poursuivi pendant 10 jours consécutifs permet de conclure à un cycle normal ou anormal.

Observations personnelles.

1) Des rates sont soumises depuis le sevrage à un régime de subcarence (0,6 µg. de vitamine A **pro die**). A partir de la maturité sexuelle, le cycle est régulièrement suivi par la méthode des frottis vaginaux.

L'examen microscopique montre un processus de cycle anarchique.

2) Des rates sont traitées depuis le sevrage par 0,6 µg. de vitamine A **pro die**. On suspend l'administration de vitamine à l'âge de la maturité sexuelle. Les signes de carence (xérophtalmie — poids stabilisé) apparaissent vers le 20^e jour ; on procède alors à l'examen des frottis vaginaux ; dans tous les cas il a été observé la présence constante de cellule kératinisées.

3) L'examen des sécrétions de rates soumises à un régime additionné de 1,7 µg. de vitamine A (**pro die**) montre les éléments figurés normaux pour chaque phase du cycle.

2 INFLUENCE DE LA CARENCE SUR LA REPRODUCTION

a) CHEZ LA FEMELLE

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des troubles provoqués par l'avitaminose A chez le rat. Lorsque des animaux sont totalement privés de ce facteur, on observe la stérilité de la femelle (211), (180), (99), (152). Si la carence n'est pas totale, les femelles peuvent être fécondées mais la gestation n'est pas conduite à terme. Evan et coll. (57) : dans le cas d'une déficience permettant encore le développement embryonnaire, on observe une gestation prolongée, une parturition difficile et la mort foetale. Mason (54).

Suivant le stade où intervient la carence, la mise-bas peut encore se produire. Giroud (66) a montré alors, chez diverses espèces de mammifères et le rat en particulier l'apparition de troubles du développement du squelette chez l'embryon. Cannon (18) a observé des malformations et des anomalies du développement. Andersen (1) a signalé des faits analogues et en particulier des hernies du diaphragme ; Wilson et Warkany (241) des altérations de l'appareil urogénital telles que la kératinisation de l'urètre à la naissance ; mais c'est surtout au niveau de l'œil que les malformations dues à la carence maternelles sont les plus fréquemment constatées. Warkany et Schraffenberger (238) signalent des yeux dépourvus de chambre antérieure, l'iris et le procès ciliaire non développés, une structure anarchique de la rétine, les animaux naissent aveugles.

Observations personnelles - Protocole expérimental.

Essai I. -- Trois femelles soumises au régime de base à partir du sevrage, reçoivent par animal et par jour 0,6 µg. de vitamine A ; au 40^e jour (âge 70 jours) on suspend l'administration de vitamine. On procède à des séries d'examen de frottis vaginaux ; au 20^e jour de carence, les cellules kératinisées sont décelées plusieurs jours consécutifs. Les femelles sont alors accouplées à des mâles normaux.

Essai II. -- Six femelles reçoivent en plus du régime de base à partir du sevrage 0,9 µg. de vitamine A ; à l'âge de 80 jours elles sont accouplées à des mâles normaux.

Essai III. -- Six femelles (lot témoin) nourries au régime de base, reçoivent par animal et par jour 1,7 µg. de vitamine A. Elles sont accouplées à des mâles normaux.

Les femelles des essais I, II, III, reçoivent en outre 7 mg. par semaine d'α-tocophérol.

Les résultats sont les suivants :

Dans l'essai I (0,6 µg. de vitamine) deux femelles sur six ont été fécondées ; la gestation a paru évoluer normalement jusqu'au 20^e jour ; les rates ont alors saigné abondamment, leur poids fait une chute brusque.

Dans l'essai II, les 6 femelles ont donné des portées mort-nées.

L'essai III a conduit à des portées normales.

Doses minimales nécessaires pour obtenir un cycle sexuel normal et rétablir les fonctions de reproduction.

Les données que l'on rencontre dans la littérature montrent des divergences notables entre les divers auteurs en ce qui concerne les doses curatives ; en effet elles dépendent essentiellement de la durée de la carence. Pour Coward (31), si l'animal n'a pas été soumis au régime de carence plus d'une vingtaine de jours, une dose faible de vitamine suffit à rétablir un cycle normal.

Simonnet (211) fait intervenir « l'âge physiologique » de l'animal lié à l'âge des divers tissus et organes ; pour cet auteur, les réponses à une même dose administrée à la suite d'une carence de même durée divergent d'un individu à un autre.

Pour une carence totale mais de courte durée, on admet généralement qu'une dose de 1,2 µg. par jour représenterait une dose curative (110), (185), (30).

On rencontre beaucoup plus de données en ce qui concerne la dose préventive qui correspond à la couverture des besoins de l'animal, dans les circonstances normales, et pour l'état physiologique particulier que représente la gestation. Pour la plupart des expérimentateurs (185), (70), (31), une dose quotidienne de 0,7 à 0,8 µg. délivrée à partir du sevrage préviendrait la colpokératose ; la reproduction exigerait des doses deux et trois fois supérieures (185) et à des doses plus élevées on augmenterait le temps de la reproduction (205).

Les résultats que nous avons enregistrés dans des expériences de type préventif nous ont conduit à des conclusions analogues :

— un minimum de 1,5 µg. par jour est nécessaire et suffisant pour obtenir des portées, non seulement viables, mais normales et robustes (de 5 à 6 petits d'un poids moyen à la naissance).

Au-dessous de ces doses minimales, le cycle n'est plus normal, les fonctions de reproduction sont perturbées et les troubles s'accompagnent de lésions anatomopathologiques qui ne se localisent pas d'ailleurs uniquement à l'appareil génital.

L'étude complète fera l'objet du chapitre V. Nous nous limiteront donc pour l'instant à la description des lésions de l'appareil génital.

Anatomopathologie de l'appareil génital des femelles carencées.

En 1931, Green (95) signale que les rates gestantes soumises à un régime carencé présentent rapidement de l'infection des voies génitales. Pour Mellamby (164), plus de 40 % des rates carencées accusent des hémorragies vaginales et utérines. Richards (198) signale des faits analogues et la fréquence des kystes de l'utérus.

Observations personnelles.

15 rates sont soumises à partir du sevrage, à un régime carencé en facteurs A pendant 40 à 45 jours ; la réserve hépatique étant nulle (cf. p. 61) on administre des doses quotidiennes minimales (moins

de 0,6 µg.) **pro die**, correspondant en somme à la dose d'entretien.

On sacrifie les animaux ; l'autopsie montre entre le 55^e et le 75^e jour de carence :

- hémorragie du vagin (chez 2 femelles) ;
- congestion de l'utérus (chez 1 femelle) ;
- kystes de l'utérus (chez 2 femelles) ;
- infection du vagin (chez 2 femelles) ;
- abcès de l'utérus (chez 1 femelle).

Chez 3 autres femelles on a seulement noté l'apparence congestive des cornes utérines. Quatre rates ne présentaient rien d'anormal au niveau de l'appareil génital.

b) CHEZ LE MALE :

Toutes choses égales d'ailleurs, on sait que la réserve hépatique de la femelle est plus grande que celle du mâle, Moore, Sharman et Ward (178), les besoins du mâle doivent être plus élevés, puisque la mise en réserve correspond en fait à ce qui n'est pas utilisé par l'organisme. Ceci est à rapprocher des observations de Simonnet (211), qui montre que dans les mêmes conditions de carence, la sensibilité du mâle à la carence est plus grande que celle de la femelle. Pour une même durée de carence, il observe que les femelles sont encore fertiles tandis que les mâles sont inféconds.

Chez le mâle, la carence en facteur A a pour conséquence une atrophie des testicules au niveau desquels l'examen histologique révèle une réduction du diamètre des tubes séminifères et la disparition des éléments de la lignée germinale.

L'arrêt de la spermatogenèse peut être transitoire si la carence n'a pas été trop prolongée ; mais une carence totale prolongée provoque l'atrophie définitive de la glande. Evans (55), a montré qu'un mâle soumis à un régime carencé et recevant du tocophérol, devient stérile en trois mois ; par contre, si son régime est pourvu en facteur A, l'animal est fécond, même en l'absence de facteur E.

Anatomopathologie de l'appareil génital des mâles carencés.

Moore et Mark (170) ont montré des altérations de la prostate ; la réduction du poids des glandes endocrines provoquées par la carence a été soulignée par Sure (220) (154), Simonnet précisant les variations de poids de divers organes chez l'animal normal et chez l'animal carencé a mis en évidence l'atrophie des testicules, se traduisant par un abaissement pondéral atteignant 35 à 43 %.

Observations personnelles.

L'autopsie des mâles de notre expérimentation, par ailleurs inaptes à la fécondation, nous a fait enregistrer des observations analogues :

Les testicules de trois mâles en subcarence (0,6 µg. de vitamine A **pro die** à partir du sevrage) sacrifiés à 7 mois pesaient respectivement : 0,810 g., 0,900 et 0,950 g. Chez des mâles du même âge, au

taux quotidien de 1,8 µg. de vitamine et soumis au même régime de base, les poids des testicules étaient : 1,320 g., 1,400 et 1,510 g. Par ailleurs l'examen macroscopique, en dehors de l'atrophie, n'a pas révélé d'anomalie ou de lésions apparentes.

Les enseignements que nous avons tirés des travaux qui viennent d'être rapportés concernant les manifestations de la carence en vitamine A, et nos propres expériences nous ont permis d'établir un protocole expérimental pour l'exploration des fonctions de reproduction chez des animaux carencés en vitamine A et recevant des doses élevées d'astaxanthine.

B. — ETUDE DES FONCTIONS DE REPRODUCTION CHEZ LE RAT CARENCE EN VITAMINE A ET TRAITE A L'ASTAXANTHINE

Ainsi qu'il vient d'être rapporté, l'étude de la carence chez l'adulte et de sa réversibilité par l'administration d'un facteur actif pose plusieurs problèmes sur la mise au point des schémas expérimentaux. En particulier, en ce qui concerne la période des essais (*), il s'agit de trouver un compromis entre la dose de vitamine A suffisante pour conduire l'animal à l'âge adulte et celle qui risque d'entraîner une surcharge hépatique.

Or, par l'administration d'astaxanthine à partir du sevrage, ce problème se trouve simplifié et l'étude de l'éventuelle intervention de l'astaxanthine sur les fonctions de reproduction est de ce fait abordée avantageusement dans les conditions expérimentales suivantes :

- le rat parvient à l'âge adulte en présentant un poids normal et un état général apparemment excellent ;
- sa réserve hépatique en facteur A est entièrement nulle (**).

Il est donc possible de préciser dans quelle mesure l'astaxanthine possède la propriété de s'opposer aux manifestations de la carence en vitamine A.

Deux types d'expériences ont été entreprises :

- dans la première, les animaux reçoivent des huiles extraites de l'hépatopancréas (huiles d'été) d'*Aristeus antennatus* ;
- dans la deuxième, des esters d'astaxanthine en solution huileuse sont administrés.

(*) Période débutant au sevrage jusqu'à la maturité sexuelle.

(**) Elle est épuisée avant le 20^e jour de carence (cf. p. 61).

1° ADMINISTRATION D'HUILES ENTIERES (157)

Essai préliminaire :

— Un lot de 3 femelles (lot A) reçoit, à partir du sevrage, en plus du régime carencé, 90 mg. d'huile d'hépatopancréas d'Aristeus antennatus. Elles sont accouplées au 100° jour après le sevrage avec des mâles du même âge, soumis au même régime de base, mais recevant par jour et par animal 0,9 µg. de vitamine A.

— Parallèlement à cette expérience, un lot de trois mâles (lot B) reçoit à partir du sevrage et pendant 100 jours, en plus du régime carencé, 90 mg. d'huile d'hépatopancréas d'Aristeus antennatus (extraction de juillet). Ils ont été ensuite accouplés avec trois femelles du même âge, ayant reçu depuis le sevrage, en plus du régime carencé 0,9 µg. de vitamine A.

— Un lot de 3 mâles et 3 femelles (lot C) reçoit à partir du sevrage 0,9 µg. de vitamine A. Les résultats ont été les suivants :

Les trois femelles du lot A ont mis bas des portées mort-nées (*). Les animaux ont été sacrifiés au 5° mois : chez les femelles, la vitamine A n'a pu être décelée dans le tissu hépatique ; dans le foie des mâles des traces d'axérophtol étaient présentes.

Aucune des femelles du lot B n'a été fécondée. Les animaux ont été sacrifiés au 5° mois. Aucune trace de vitamine n'était présente. Chez les femelles, une réserve de 6 µg. au g. de tissu hépatique a été décelée.

TABLEAU XVII

Lots	Régime standard	Portées	Réserve hépatique de vitamine A
A : 3 mâles 3 femelles	0,9 µg. de vitamine A huile d'hépatopancréas d'Aristeus antennatus	avortements	traces néant
B : 3 mâles 3 femelles	huile d'hépatopancréas d'Aristeus antennatus - 0,9 µg. de vitamine A	néant	6 µg. p. g.
C : 3 mâles 3 femelles	0,9 µg. de vitamine A 0,9 µg. de vitamine A	néant	6 µg. p. g. 6 µg. p. g.

Ces expériences préliminaires font donc apparaître que chez le rat blanc carencé, il est impossible d'obtenir une reproduction normale par administration d'huile entière contenant de l'astaxanthine à

(*) Par ailleurs des frottis vaginaux effectués antérieurement accusaient une colpokératose manifeste.

des doses capables par ailleurs non seulement de prévenir et de guérir la xérophtalmie, mais encore d'assurer une croissance normale. Cependant le lot d'animaux à 0,9 µg. de vitamine A par animal et par jour n'ayant pas donné de descendance, on pouvait dès lors se demander si, dans ces expériences préliminaires, la quantité de vitamine A 0,9 µg. **pro die** administrée aux mâles du lot A et aux femelles du lot B n'était pas insuffisante pour permettre aux fonctions de reproduction de s'exercer normalement ; on pouvait également penser que l'addition de vitamine E au régime aurait pu conduire à des résultats différents.

Essai I. — Pour répondre à ces deux questions, des expériences ont été entreprises sur 5 nouveaux lots A, B, C, D, E composés chacun de trois mâles et de trois femelles. Chacun de ces lots recevait le régime de base carencé et 1 mg. d'α-tocophérol par semaine (*) et par animal. On administrait en outre :

Lot A : mâles et femelles reçoivent 90 mg. d'huile d'hépatopancréas (d'été) d'Aristeus antennatus.

Lot B : femelles : préparation de conjonctif péristomacal d'Aristeus antennatus de même concentration en astaxanthine que la préparation destinée au lot A.
mâles : 4,5 µg. de vitamine A **pro die**.

Lot C : femelles : 4,5 µg. de vitamine A **pro die**.
mâles : préparation de conjonctif péristomacal (cf. lot B).

Lot D : mâles et femelles : 1,5 µg. de vitamine A **pro die**.

Lot E : mâles et femelles : 4,5 µg. de vitamine A **pro die**.

Les résultats peuvent se résumer ainsi :

Le lot A n'a pas donné de portées.

Le lot B a donné des portées mort-nées.

Le lot C n'a pas donné de portées.

Les lots D et E ont donné des portées normales.

TABLEAU XVIII

Lots	Régime standard 1 mg. d'α-tocophérol par semaine	Portées	Réserve hépatique d'axérophtol
A : 3 mâles 3 femelles	huile d'hépatopancréas »	néant	néant néant
B : 3 mâles 3 femelles	4,5 µg. d'axérophtol huile de conjonctif péristomacal	avortements	75 µg. par g. néant
C : 3 mâles 3 femelles	huile de conjonctif péristomacal 4,5 µg. d'axérophtol	néant	60 µg. par g.
D : 3 mâles 3 femelles	4,5 µg. d'axérophtol 4,5 µg. d'axérophtol	portées normales	6 µg. par g. 5,4 µg. par g.
E : 3 mâles 3 femelles	4,5 µg. d'axérophtol 4,5 µg. d'axérophtol	portées normales	60 µg. par g. 66 µg. par g.

(*) Dose préconisée par Coward (30).

2^o ADMINISTRATION DES ESTERS DE L'ASTAXANTHINE (159), (160), (160 bis).

Matériel et technique.

Les esters d'astaxanthine sont préparés suivant la technique décrite ci-dessus et mis en suspension dans de l'huile végétale dévitaminée additionnée de tocophérol : la concentration en pigment est de 200 μ g. par gramme d'huile additionné de 25 mg. d' α tocophérol.

12 animaux : 6 ♀, 6 ♂ sont soumis depuis le sevrage au régime carencé et reçoivent en outre par animal et par jour 80 mg. de suspension huileuse d'esters d'astaxanthine (50 μ g.).

Cette dose est délivrée pendant 6 mois sans interruption. Durant ces 6 mois, deux types d'expériences ont été entreprises :

Dans la première, les 12 animaux sont divisés en 6 couples.

Dans la deuxième, deux lots ont été constitués : les 6 femelles de la première expérience, tout en continuant à recevoir la préparation des esters de l'astaxanthine, ont été accouplées à des mâles normaux (*) (lot A). Quant aux mâles, traités à l'astaxanthine, ils ont été accouplés à des femelles normales (*) (lot B).

Parallèlement des expériences sont entreprises avec un lot témoin (lot C) composé de 2 femelles et 2 mâles. Ces témoins reçoivent en plus du régime de base 4,5 μ g. de vitamine A et 2,5 mg. d' α tocophérol par animal et par jour.

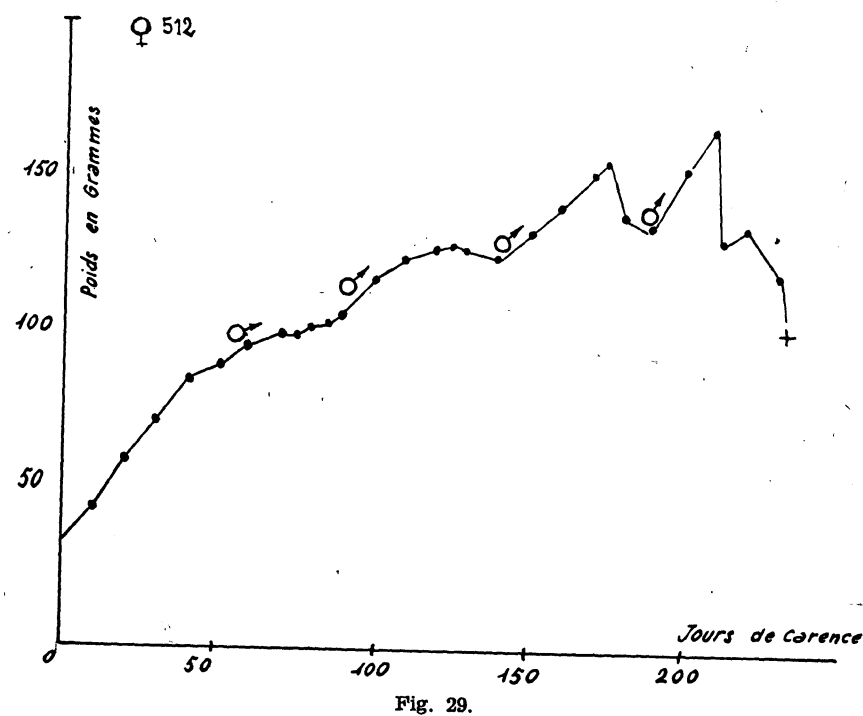
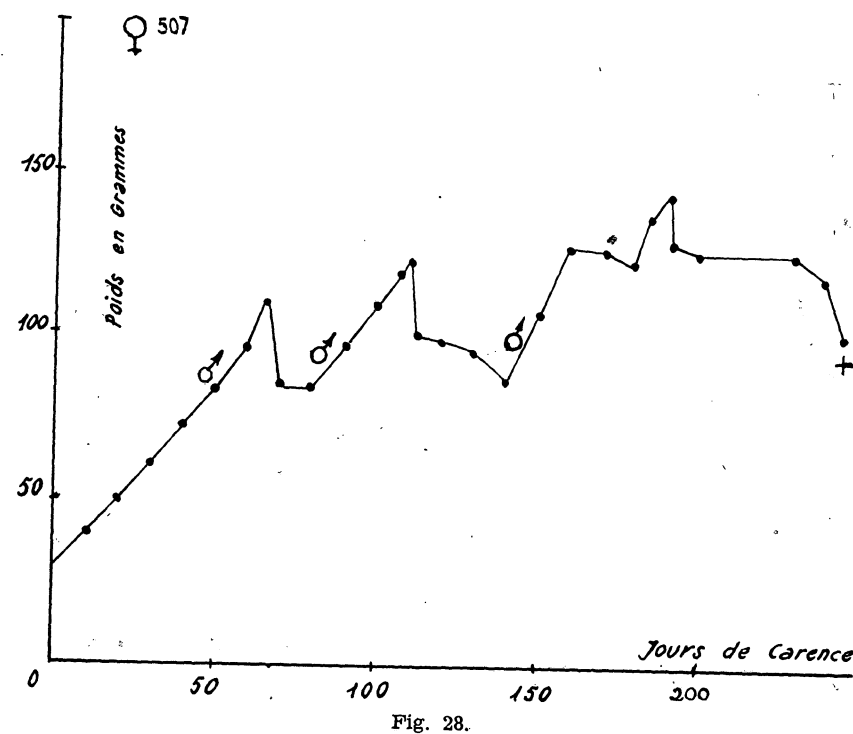
Première expérience : mâles et femelles recevant la préparation d'esters de l'astaxanthine :

5 femelles sur les 6 n'ont pas été fécondées. La sixième à l'âge de 85 jours a donné une portée viable de trois petits. Ces trois petits, soumis au régime carencé depuis le sevrage, ont présenté dès le 5^e jour des signes de xérophtalmie. L'administration d'esters de l'astaxanthine (à la dose de 50 μ g. par animal et par jour) a fait régresser en quelques jours les lésions oculaires. Cependant leur état général est demeuré précaire, et ils sont morts respectivement à 45, 110 et 120 jours. L'autopsie a confirmé les signes extérieurs d'avitaminose A : les trois animaux présentaient des abcès, l'un dans la région anale, l'autre dans l'anse duodénale, le troisième au niveau des glandes sous-maxillaires. On constatait chez l'un d'eux une hémorragie de la vessie et chez un autre une hémorragie intestinale.

Deuxième expérience.

Lot A (femelles traitées à l'astaxanthine, mâles recevant de la vitamine A). Toutes les femelles ont été fécondées ; alors que leur poids était précédemment en plateau, on a enregistré à partir du 10^e jour après la copulation, un accroissement pondéral atteignant jusqu'à 30 g. (courbes fig. 28, 29, 30 et 31).

(*) Les animaux reçoivent à partir du sevrage en plus du régime carencé 80 mg. d'huile végétale dévitaminée additionnée de 4,5 μ g. de vitamine A et 2,5 d' α tocophérol.



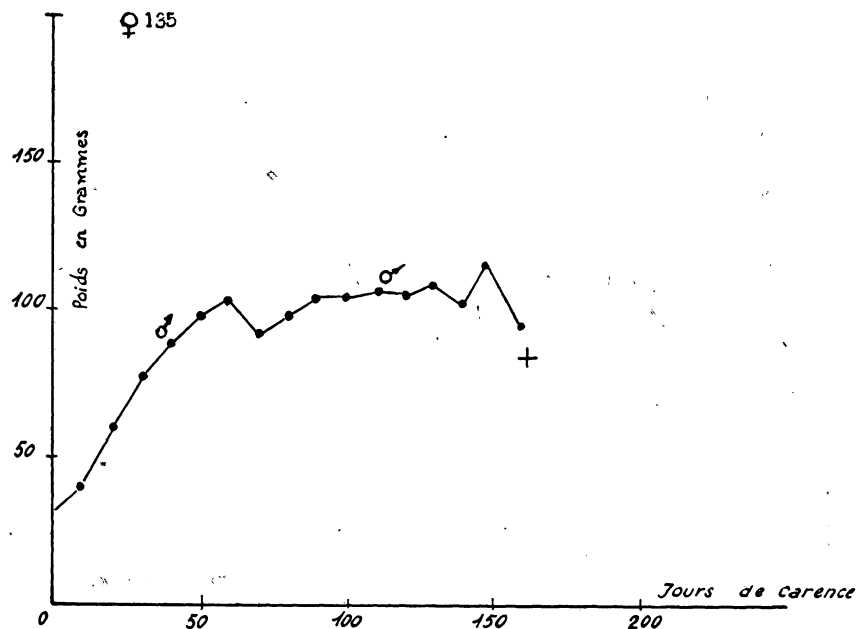


Fig. 30.

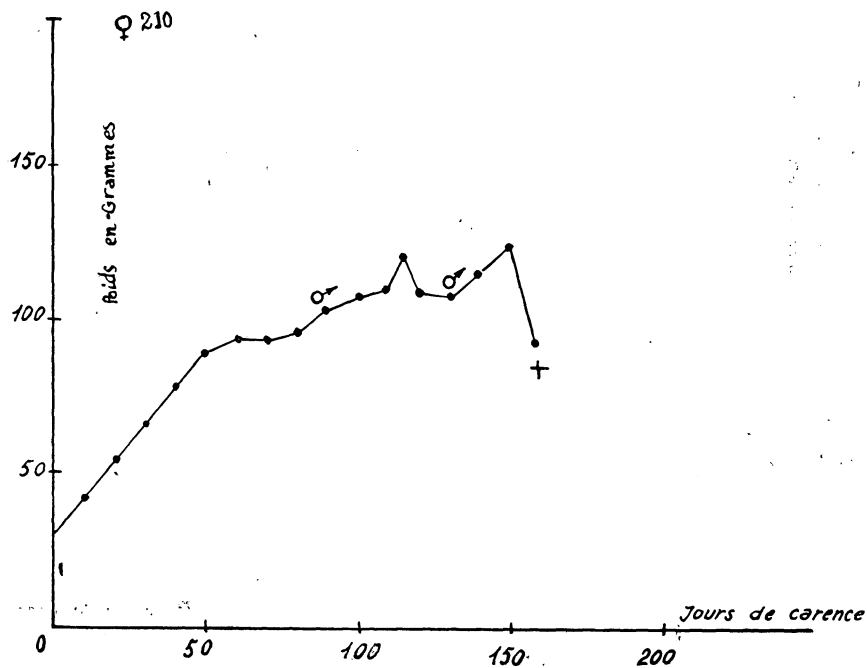


Fig. 31.

En même temps se manifestait un élargissement de la paroi abdominale signant la gestation. Cependant entre le 20^e et le 25^e jour, toutes les femelles gravides ont avorté ou mis bas des portées mort-nées, la chute de poids atteint jusqu'à 35 g. en 24 heures, l'avortement est accompagné d'abondantes hémorragies ; la femelle qui, seule dans la première expérience avait été fécondée s'est comportée comme ses congénères dans les expériences ultérieures.

Les accouplements ont été répétés trois fois (*) les mêmes phénomènes ont été observés. Cinq des femelles sont mortes âgées de 5 mois et demi et une à 6 mois. La sixième dont la maturité sexuelle avait été précoce a survécu 2 mois après le dernier avortement.

Les mâles ont été sacrifiés au 9^e mois.

Lot B (mâles traités à l'astaxanthine, femelles recevant de la vitamine A). Aucune des femelles n'a été fécondée. Les mâles ont été sacrifiés au 9^e mois. Leur poids s'était stabilisé à partir du 7^e mois, quatre d'entre eux ont décliné lentement, au 9^e mois les chutes de poids enregistrées sont de 20 à 30 g.

3^e EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES

L'autopsie des animaux morts spontanément ou sacrifiés a conduit aux observations suivantes :

1) Mâles : 18 mâles ont été examinés ; deux d'entre eux étaient morts spontanément, 16 ont été sacrifiés entre le 8^e et le 9^e mois. L'autopsie a révélé une dégénérescence des testicules chez 14 d'entre eux, le poids de la glande étant inférieur à 0,9 g.

2) Femelles : sur 18 sujets examinés, 13 sont morts spontanément entre le 5^e et le 6^e mois de traitement (âge 6 et 7 mois) ; 4 femelles ont été sacrifiées au 9^e mois, une femelle malade au 7^e mois. Les résultats d'autopsie sont les suivants : 4 d'entre elles présentaient des hémorragies utérines ; deux des kystes de l'utérus ; une, une hémorragie vaginale en même temps que des kystes suppurants au niveau de l'utérus ; chez trois autres, il a été observé de l'infection vaginale.

Chez ces femelles, on a relevé par ailleurs, d'autres processus infectieux (calculs de la vessie chez trois d'entre elles, volumineux abcès dans la région du cou).

4^e DISCUSSION

De ces résultats expérimentaux, il ressort que l'administration aussi bien d'huiles entières extraites de l'hépatopancréas que d'esters de l'astaxanthine ne permet pas d'assurer des fonctions de reproduction normales.

Le fait qu'au cours de la première expérience (*), une femelle a mis bas trois petits vivants peut être attribué à une puberté précoce (45 jours).

(*) Les femelles sont laissées 2 semaines au repos à la suite de chaque gestation.

(**) Première expérience aux esters de l'astaxanthine.

Il est donc logique d'admettre que cette femelle, au moment de la fécondation et au cours de la gestation disposait encore d'une petite réserve hépatique en vitamine A. Nous avons en effet montré ci-dessus que d'une façon générale chez les rats de notre élevage, la réserve hépatique est épuisée avant le 20^e jour de sevrage (âge des animaux : 50 jours).

Ces expériences établissent donc que l'astaxanthine, susceptible à fortes doses d'entretenir une croissance normale permettant de conduire des animaux à l'âge adulte, n'est cependant pas capable de se substituer à la vitamine A en ce qui concerne les fonctions de reproduction.

CHAPITRE V

LOCALISATION DE L'ASTAXANTHINE DANS L'ORGANISME DU RAT TRAITÉ

Etant donné les résultats enregistrés ci-dessus, c'est-à-dire essentiellement la dissociation de l'action antixérophtalmique et de l'action sur la croissance et sur les fonctions de reproduction, il était intéressant pour tenter d'approcher le problème général du mécanisme biochimique de l'activité vitaminique de l'astaxanthine d'étudier la localisation du pigment dans l'organisme du rat traité.

Il a été établi par R. Grangaud (70), que le pigment administré au rat carencé en vitamine A ne s'accumule pas dans le foie, mais se retrouve régulièrement au niveau de la rétine. Sa présence a été recherchée dans d'autres organes ou tissus, avec R. Grangaud et Th. Douard (89), et afin de préciser l'éventuelle spécificité de sa localisation et de comparer son comportement à celui d'un autre caroténoïde à noyau de β ionone oxygéné, les mêmes recherches ont été effectuées dans les organes de rats ayant reçu de la zéaxanthine.

Ces expériences ont été complétées par de nouveaux essais en augmentant la concentration en astaxanthine et en prolongeant la durée.

Enfin, nous avons cherché à déterminer si la localisation préférentielle à certains niveaux était liée à la forme chimique du pigment en comparant les résultats trouvés chez des animaux traités par l'astaxanthine libre et estérifiée ou par des chromoprotéides (administrés *per os* ou par injections).

A. — LOCALISATION DE L'ASTAXANTHINE ET DE LA ZEAXANTHINE (89)

MATERIEL ET TECHNIQUE.

Préparations administrées :

Astaxanthine : Il s'agit d'une solution huileuse de pigment isolé par chromatographie de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus* suivant la technique précédemment décrite et renfermant 7 mg. d' α tocophérol par g.

Zéaxanthine : Du maïs moulu est mis à macérer dans de l'acétone additionné d'alcool méthylique (500 : 50). La solution, diluée avec de l'eau, est reprise par l'éther de pétrole. Après déshydratation par contact sur du sulfate de sodium anhydre, la solution éthéro-pétrolique est distillée sous vide. On obtient un résidu pâteux (8,3 g. pour 225 g. de maïs).

Le résidu, remis en solution éthéro-pétrolique est chromatographié sur alumine. Le pigment est retenu à 5 à 6 mm du sommet formant une zone jaune de 12 mm de hauteur. Le développement par l'éther de pétrole additionné de méthanol (2 %) détache une fraction jaune qui passe dans le filtrat. Après lavage du chromatogramme avec de l'éther de pétrole, on isole la zone pigmentée restée sur la colonne, avec de l'éther de pétrole additionné de 5 % de méthanol. Après distillation sous vide on obtient un résidu huileux de 0,340 g. que l'on additionne de 2,5 mg. d' α tocophérol.

Conditions et durée d'administration des pigments.

Les essais ont porté aussi bien sur des animaux soumis au régime carencé en vitamine A depuis le sevrage que sur des sujets normaux alimentés avec du blé et de la salade (régime E 6).

Les tests sont de type préventif :

Soixante animaux ont reçu à partir du sevrage, en plus de leur régime, soit 20 à 30 μ g. d'astaxanthine sous forme d'extrait huileux, soit des doses variables de zéaxanthine en solution dans le même volume d'huile. Les essais ont été poursuivis pendant plusieurs semaines.

Recherche des pigments - Protocole expérimental.

A l'issue de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et les organes prélevés (yeux, hypophyse, thyroïdes, surrénales, ovaires). Dès leur prélèvement, ils sont soumis à l'extraction selon la technique habituelle (cf. p. 27). Pour cela, ils ont été finement broyés avec du sulfate de soude anhydre et épuisés à l'acétone. Les solutions acétoniques sont additionnées d'éther de pétrole et d'eau. La phase éthéro-pétrolique a été séparée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et chromatographiée sur alumine. La colonne utilisée est de 5 mm de diamètre : dans ces conditions la présence d'astaxanthine dans la solution examinée se traduit par l'apparition d'un anneau très net à la partie supérieure de la colonne, rose orangé dans le premier cas, jaune dans le second.

Après développement du chromatogramme par l'éther de pétrole, le pigment rose orangé, retenu au sommet de la colonne est acidifié par l'acide acétique : la teinte vire au rose cyclamen. Le pigment est identifié par ses caractères spectraux et par sa transformation en astacine.

Résultats.

a) En ce qui concerne l'astaxanthine, comme dans les expériences antérieures le pigment a été retrouvé dans les yeux au niveau de la rétine et, à l'état de traces dans le tissu hépatique. En outre, il a été possible de le déceler dans les hypophyses, les thyroïdes, les surrénales et les ovaires. Le pigment n'a été décelé ni dans les reins, ni dans le testicule.

b) En ce qui concerne la zéaxanthine, des traces de caroténoïde ont été décelées dans les hypophyses, les thyroïdes, les surrénales et les ovaires, Il n'en a pas été trouvé au niveau de l'œil et pas davantage dans le foie, le rein et le testicule (tableau XIX).

Ces résultats appellent quelques commentaires :

Pour l'astaxanthine, c'est incontestablement au niveau de l'œil que la localisation est la plus manifeste ; à la dissection, les rétines de rats ayant reçu le pigment présentent le plus souvent une teinte saumon qui révèle déjà la présence du caroténoïde avant toute extraction et dans bien des cas, l'extrait d'une seule paire d'yeux donne un chromatogramme encore parfaitement lisible.

Dans les surrénales, le pigment a été régulièrement retrouvé, mais en très faible quantité. Un animal cependant a présenté des glandes nettement hypertrophiées de couleur saumon, la teneur en caroténoïde était beaucoup plus élevée que chez les autres sujets et nous ne pouvons donner aucune explication de ce cas exceptionnel.

Dans les ovaires, la teneur en astaxanthine est extrêmement faible ; dans les premières expériences où l'animal ne reçoit que de très petites doses de pigment, l'astaxanthine est totalement absente ; toutefois, chez 8 femelles, recevant de 20 à 30 µg. d'astaxanthine, on en a retrouvé chez 4 d'entre elles.

Chez les animaux traités à la zéaxanthine, la recherche du caroténoïde a été effectuée au 45^e jour de traitement. Les rats étaient alors en pleine carence vitaminique A ; en particulier, les yeux présentaient d'énormes ulcères. Il est possible que le caroténoïde n'ait pu être décelé pour cette raison. A un stade moins avancé de la carence, le résultat eut pu être différent.

Une dernière remarque : l'astaxanthine n'a aucune tendance à s'accumuler dans le tissu hépatique. L'organisme du rat traité ne constitue aucune réserve, ce qui explique que l'interruption du traitement amène rapidement, souvent en deux ou trois jours, une intense poussée de xérophtalmie.

TABLEAU XIX

Organes	Astaxanthine				Zéaxanthine			
	régime normal		régime carencé		régime normal		régime carencé	
	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♂
Yeux	+	+	+	+	—	—	—	—
Hypophyses ..	+	+	+	+	—	—	—	—
Thyroïdes	+	+	+	+	+	+	+	+
Surrénales	+	+	+	+	+	+	+	+
Reins	—	—	—	—	—	—	—	—
Foie	traces	traces	traces	traces	—	—	—	—
Ovaires		+	—	+		+		
Testicules	—		—		—		—	

B. — LOCALISATION DE L'ASTAXANTHINE APRES ADMINISTRATION DE LA FORME ESTER

Dans cette deuxième série d'expériences, les rats examinés ont reçu de l'astaxanthine (test curatif) sous forme d'esters et à des doses 3 et 4 fois supérieures à celles administrées dans les premiers essais.

Les examens ont également porté sur des animaux traités par

ces mêmes extraits à des doses équivalentes, au cours d'expériences de type préventif et de longue durée.

Matériel et techniques.

Préparations administrées :

La technique de préparation des esters est celle précédemment décrite (cf. pp. 39 et 27) ; les esters sont délivrés en solution huileuse tocophérolée.

Conditions et durée d'administration du pigment :

a) Test curatif : l'extrait huileux a été administré à 12 rats carencés (6 ♀, 6 ♂) présentant des signes de carence manifestes ; chaque animal a reçu par jour 100 mg. d'huile renfermant 50 µg. d'astaxanthine (extrait n° 5). Le traitement a été poursuivi pendant 5 semaines (*).

b) Test préventif : 14 animaux (5 ♀, 9 ♂) ont reçu à partir du sevrage un extrait d'esters (extrait n° 5). Il est administré *per os* à la dose de 100 mg. (renfermant 50 µg. d'astaxanthine) par jour et par animal.

Le traitement est poursuivi pour les 5 femelles jusqu'à leur mort (spontanée), survenu au 5^e mois, 5^e 1/2, 6^e, et 6^e mois de traitement.

L'administration de l'extrait a été prolongée chez tous les mâles, sacrifiés après 7 mois de traitement sans interruption.

Recherches des pigments.

Le protocole expérimental est celui qui a été décrit dans l'expérience I. Chez les animaux morts spontanément ou sacrifiés, la recherche du pigment a été poursuivie comme précédemment sur les yeux, les foies, les thyroïdes, les hypophyses, les surrénales, les ovaires : elle a été complétée par des examens portant sur la rate, le rein, le poumon, l'encéphale, le sang, l'aponévrose.

L'extraction est faite sur la totalité de l'organe à l'exclusion du foie où l'on traite une partie aliquote (5 g.).

Les hypophyses (**) et les thyroïdes (**) sont extraites par 3 (mâles et femelles séparément). Les surrénales par paires. Pour le sang prélevé par ponction cardiaque 1 ml. est utilisé. La technique chromatographique est la même que celle précédemment décrite.

Résultats.

Animaux traités par la méthode curative :

L'astaxanthine est retrouvée régulièrement (sans aucune exception) dans les rétines, les hypophyses, les thyroïdes, les surrénales et les ovaires.

Chez les mâles comme chez les femelles, des traces infimes sont retrouvées dans le tissu hépatique. Dans le pancréas, le rein, la rate,

(*) Les lésions oculaires étaient guéries avant la 2^e semaine de traitement.

(**) Poids moyen de 3 hypophyses 10 à 11 mg.

Poids moyen de 3 thyroïdes 20 à 30 mg.

Poids moyen des surrénales (paire) 22 à 28 mg.

le poumon, le sang, l'encéphale, aucune trace de pigment n'a été décelée.

Animaux traités par la méthode préventive.

Les mêmes résultats ont été retrouvés en ce qui concerne les yeux (*), les hypophyses, les thyroïdes, les surrénales et les ovaires.

Le pigment n'a pas été retrouvé au niveau du rein, à l'exception d'un résultat positif chez une femelle. L'identité du pigment après chromatographie a été confirmée par les caractères spectraux (le spectre d'absorption est à large bande unique max. 490 m μ dans la pyridine).

Dans le foie, des traces infimes ont été retrouvées ; les recherches effectuées sur le pancréas, la rate, le poumon, l'encéphale et le sang ont été négatives.

Dans le tableau suivant (tableau XX) figure l'ensemble des résultats.

TABLEAU XX

Organes	Test curatif		Test préventif	
	6 ♀ durée 5 à 7 mois	6 ♂ durée 7 mois	5 ♀ durée 30 à 38 jours	9 ♂ durée 35 jours
Yeux	+	+	+	+
Hypophyses	+	+	+	+
Thyroïdes	+	+	+	+
Surrénales	+	+	+	+
Reins	néant**	néant	néant	néant
Ovaires	+		+	
Testicules		néant		néant
Vésicules séminales ..		néant		néant
Foie	traces	néant	traces	traces
Pancréas	néant	néant	néant	néant
Rate	néant	néant	néant	néant
Poumon	néant	néant	néant	néant
Sang	néant	néant	néant	néant
Encéphale	néant	néant	néant	néant
Aponévrose	néant**	néant	néant	néant

(*) Les animaux sacrifiés ou morts spontanément présentaient des yeux parfaitement sains.

(**) Résultat positif chez une femelle.

**C. — LOCALISATION DE L'ASTAXANTHINE APRES
TRAITEMENT PAR DES SOLUTIONS AQUEUSES
INJECTEES PAR VOIE INTRAPERITONEALES**

Préparations administrées :

Dans cette 3^e série d'expériences, les rats examinés ont reçu des chromoprotéides en solution aqueuse, préparés à partir d'œufs de différentes espèces (*Aristeus antennatus*, *Plesionika edwardsii*, *Scyllarus latus*) et à partir de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*.

Conditions et durée d'administration du pigment :

Les essais sont de type curatif ; la durée du traitement n'excédant pas 18 jours dans le cas général. Toutefois chez 3 animaux, après guérison, le traitement par injection de conjonctif péristomacal a été poursuivi pendant 35 jours ; les doses administrées correspondent pour chacun des essais à des quantités d'astaxanthine inférieure à 10 μ g.

Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après la dernière injection.

Résultats.

Les résultats sont superposables à ceux qui ont été enregistrés dans les expériences précédentes : au niveau des yeux, des hypophyses, et des surrénales, l'astaxanthine a été décelée et identifiée suivant le procédé déjà décrit.

Le pigment n'a pu être recherché dans les thyroïdes ; en effet 3 animaux sont morts en présentant des abcès dans la région thyroïdienne ; chez les autres animaux traités, le nombre de mâles ou de femelles survivants d'un même groupe n'atteignaient pas 3, l'examen des thyroïdes n'a pu être entrepris.

Dans les ovaires, il n'a pas été retrouvé de pigment. Chez un mâle ayant reçu des injections aqueuses de conjonctif péristomacal, le pigment était présent dans le testicule (35 jours de traitement).

Dans le tableau ci-dessous figure l'ensemble des résultats.

TABLEAU XXI

TEST CURATIF						
Organes	Pigment d'œufs de Pandalus	Pigment d'œufs d'Aristeus		Pigment d'œufs de Scyllarus	Pigment de conjonctif péritomacal d'Aristeus antennatus	
	durée : 18 jours	durée 8 jours		durée : 18 jours	durée : 35 jours	
	2 ♂	2 ♀	1 ♂	2 ♀	2 ♀	2 ♂
Yeux	+	+	+	+	+	+
Hypophyses ..	+	+	+	+	+	+
Thyroïdes	—	—	—	—	—	—
Surrénales	+	+	+	traces	traces	traces
Reins	néant	néant	néant	néant	néant	+
Ovaires		néant			néant	
Testicules	néant		néant	néant		+
Foie	néant	néant	néant	néant	néant	traces
Rate	néant	néant	néant	néant	néant	traces
Sang	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Encéphale	néant	néant	néant	néant	néant	néant

D. — DISCUSSION

Les résultats obtenus dans les trois séries d'expériences montrent que, dans les différentes conditions adoptées et dont les principales variables sont d'une part la quantité et la forme d'astaxanthine administrée, et d'autre part la voie d'introduction, le pigment est toujours localisé au niveau de la rétine, des hypophyses et des thyroïdes.

En ce qui concerne la rétine, le pigment y est relativement très abondant puisqu'une seule paire d'yeux donne une solution colorée suffisante pour en permettre l'identification par voie chimique ou par voie spectrale.

Dans les autres organes où l'astaxanthine est retrouvée, la concentration rapportée au gramme d'organe est extrêmement faible. Dans le foie en particulier le pigment n'est décelé qu'à l'état de traces ou est totalement absent. A cet égard l'astaxanthine ne se comporte pas comme la vitamine A qui constitue des réserves.

Il était dès lors intéressant de rechercher si le niveau de la réserve hépatique de rats au régime normal ou au régime carencé était modifiée par l'administration du pigment.

E. — RECHERCHE ET DOSAGE DE LA VITAMINE A DU FOIE DE RATS TRAITES PAR L'ASTAXANTHINE

La vitamine est recherchée à l'issue de différents types d'expériences, en vue de déterminer si l'administration de pigment est susceptible de modifier le niveau de la réserve hépatique.

Les foies de 4 lots de rats ont été examinés :

Lot I : rats soumis au régime normal de l'élevage (régime E 6 limité en facteur A).

Lot II : rats soumis au même régime additionné de 90 mg. de solution huileuse d'esters d'astaxanthine par animal et par jour.

Lot III : rats soumis au régime carencé en facteurs A (régime R 12) et recevant 90 mg. de solution huileuse d'esters d'astaxanthine par animal et par jour.

Lot IV : rats soumis au régime carencé (régime R 12) et recevant 0,9 µg. de vitamine A par animal et par jour.

Selon la technique déjà décrite, les foies sont prélevés et le dosage de la vitamine A effectué sur 5 g. de tissu.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau (Tableau XXII).

TABLEAU XXII

N° du lot	Nbre de rats		Régime	Trai-tement	Quantité admi-nistrée en µg.	Durée de l'expé-rience en jours	Vitamine A du foie en µg. par g.	
	♀	♂					♀	♂
I	6	7	E 6	O	0	30	23,9	22,6
II	7	7	E 6	As.	50	30	21,9	21,6
III	6	6	R 12	As.	50	35	0	0
IV	6	6	R 12	V. A	0,9	35	15	14,3

E : 6 : régime de blé + salade 2 fois par semaine.

R : 12 : régime carencé en facteur A.

As : astaxanthine.

V. A : vitamine A.

CHAPITRE VI

EXAMENS ANATOMO-PATHOLOGIQUES

Ce chapitre est consacré à l'étude des lésions anatomiques observées au cours de la carence en vitamine A et à celles également enregistrées chez les animaux carencés traités par l'astaxanthine.

On trouve déjà de nombreuses données dans la littérature, en ce qui concerne les observations anatomo-pathologiques au cours de la carence en vitamine A. La première partie de ce chapitre sera donc consacrée au rappel des travaux à ce sujet et à leur confrontation avec nos propres observations sur nos animaux témoins.

Dans la deuxième partie, seront examinés en détail les résultats d'autopsie de nos animaux traités à l'astaxanthine.

A. — EXAMENS ANATOMO-PATHOLOGIQUES DE RATS CARENCES EN VITAMINE A (*)

Wolbach et Howe (244) portant leur attention sur les lésions survenues au début de la carence montrent que celles-ci consistent principalement dans une transformation des épithéliums qui se stratifient progressivement. Cette constatation s'étend à tous les tissus épithéliaux au niveau des appareils respiratoire, digestif, génito-urinaire ; l'épithélium cubique se transforme en épithélium squameux avec des lésions de kératose.

Tous les tissus en général sont affectés par la carence, mais Wolbach (243) remarque que ces phénomènes de métaplasie épithéliale se manifestent très généralement dans le même ordre : les glandes salivaires, sous-maxillaires et parotides sont les premières affectées, puis la langue, le pharynx, le tractus respiratoire avec la trachée, les appareils génitaux et urinaires, l'œil et ses annexes glande de Harder, glande de Meibomian, la peau.

La kératinisation est rare au niveau du foie, des reins, des surrénales et de l'hypophyse.

Cette évolution de la carence, au niveau des différents appareils ou tissus concerne les animaux en croissance. Chez l'adulte, la kératinisation est moins générale et l'ulcération plus fréquente, Richards (198). Des travaux récents d'Irving et Richards (114) ont confirmé que la sensibilité des différents tissus à la carence varie avec l'âge.

Richards et Simpsons (198) se sont surtout préoccupés des lésions causées par la carence chez l'adulte : aucun processus infectieux n'est observé avant le 25^e jour ; les inflammations du coecum apparaissent d'abord (83 p. 100 des cas) ; elles s'étendent à l'intestin grêle et au duodenum ; la kératose de l'estomac apparaît plus tard et à partir de la 6^e semaine, on note la fréquence des abcès de la langue, des points hémorragiques et des ulcérations de la muqueuse gastrique.

(*) Une étude détaillée de cette question a été faite récemment par Wolbach (243) et Moore (169 bis).

Chez le jeune rat, Planel (187) souligne la fréquence des accidents bucco-pharyngiens, des ulcérations de la muqueuse du grêle ; aucune altération histologique n'est constatée au niveau du gros intestin ; il souligne aussi la fréquence de la kératose de la muqueuse oesophagienne et stomacale.

En ce qui concerne les voies respiratoires, Wolbach et Howe (248) signalent du catarrhe nasal, des infections pulmonaires et pleurales, Bradford (11), Coward, Key, Dyer et Morgan (33), des abcès du poumon.

Les altérations du tractus urinaires sont souvent constatées : kératinisation de l'épithélium de la vessie, des uretères, Hedenberg (101), des hémorragies vésicales, Busson (16).

La desquamation des cellules kératinisées est à l'origine de calculs, Wolbach, Osborne et Mendel (182) signalent la présence de ces calculs chez 10 % des animaux carencés. Van Leersum (227) dans des expériences déjà anciennes, relève 197 cas de lithiase vésicale sur 645 rats carencés (*). Clausen (27) attribue la formation de ces calculs à la fois à l'action conjuguée des avitaminoses A et D et à un déséquilibre minéral. Par ailleurs, les variations du métabolisme calcique ont été signalées dès 1933 par Emerique (50) qui souligne que chez le rat carencé en facteur A, la teneur globale en calcium est plus élevée que chez l'animal normal.

Au niveau des dents c'est au contraire un abaissement du taux de calcium que notent Smith et Lantz (213). En dehors de ces altérations de structure, Orten, Burn et Smith (181), Paul et Paul (185) signalent des modifications de la pigmentation : alors que chez le rat normal, on observe les incisives translucides et de teinte orangée, elles sont opaques et d'un blanc crayeux chez le rat carencé (245), (200).

En ce qui concerne l'os, c'est seulement chez le jeune rat que l'avitaminose A engendre des troubles graves. Giroud et Martinet (66) ont souligné la fréquence des malformations du squelette chez le jeune et chez l'embryon.

Les troubles engendrés par la carence au niveau des voies génitales ont été mentionnés dans un chapitre précédent : kératinisation précoce de la muqueuse vaginale, infections utérines et vaginales ; atrophie des glandes et de ses annexes chez le mâle. L'influence de la carence sur le poids des glandes endocrines a été soulignée par Simonnet (211), Sûre (220), Serfaty et Olivereau (201).

Recherches personnelles.

Les observations sur des sujets vivants et les résultats d'autopsie concernent :

1) Des rats témoins soumis au régime synthétique carencé en facteurs A, à partir du sevrage et morts spontanément entre le 60^e et le 80^e jour de carence.

2) Des rats soumis au même régime mais ayant reçu à partir du sevrage des doses de vitamine A de l'ordre de 0,6 µg. suffisantes pour les conduire à l'âge adulte.

(*) Calculs d'oxalate de calcium et de phosphate de magnésium ou de phosphate de chaux.

Animaux témoins :

a) observations du sujet vivant.

Sur une centaine d'animaux témoins, plus de soixante présentent des abcès au niveau des glandes sous-maxillaires et des glandes sublinguales. Sur une trentaine d'animaux, on note des abcès à l'abdomen. Quinze sujets manifestent de la paralysie du train postérieur.

b) résultats d'autopsie.

Au sacrifice des animaux ou à leur mort spontanée, on procède à l'examen immédiat des organes et à leur pesée.

On constate :

- dans la plupart des cas, chez les mâles comme chez les femelles une extrême maigreur ;
- chez les femelles, au niveau du vagin, des hémorragies et des phénomènes de suppuration (chez 20 à 30 % des sujets), des abcès en pleine évolution au niveau du sternum ou aux aisselles.

Animaux adultes :

Observations des sujets vivants.

Les abcès au niveau de la trachée dont la taille atteint fréquemment celle d'une noisette sont rencontrés chez plus de la moitié des animaux. Les femelles présentent des infections vaginales caractérisées par une paroi abdominale tendue, violacée, et humide. Des suintements hémorragiques sont souvent observés.

Résultats d'autopsie.

Chez les mâles et les femelles, le coecum (toujours volumineux chez l'animal normal) paraît encore dilaté ; on distingue macroscopiquement des points hémorragiques.

Des ulcères de l'estomac ont été enregistrés sur 6 adultes (mâles et femelles) appartenant à un lot de 12 animaux, morts ou sacrifiés le 65^e jour de carence.

L'autopsie révèle chez les femelles d'abondantes hémorragies vaginales, des kystes de l'utérus suppurants ou durcis, des abcès dilatant les cornes utérines.

Le foie est généralement sain ; cependant il a été constaté chez plusieurs sujets l'existence de petits nodules blanchâtres parsemant le tissu hépatique.

Des calculs de la vessie sont souvent observés plus fréquents chez les femelles que chez les mâles.

Plus rarement le poumon et le cerveau présentent des abcès (4 abcès du poumon, 2 abcès du cerveau sur une soixantaine d'adultes).

B. — EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES DE RATS CARENES TRAITES PAR L'ASTANXANTHINE

Les examens ont porté sur tous les animaux des expériences décrites dans les chapitres précédents morts spontanément ou sacrifiés.

Dans certains cas, on sacrifie l'animal dans les mêmes délais que ceux où le mort d'un témoin est enregistrée dans le but de confronter les agressions chez deux animaux de même âge. L'animal mort ou sacrifié est autopsié, ses organes prélevés sont pesés et examinés.

1^o RATS TRAITÉS PAR DES HUILES ENTIERES D'HEPATO-PANCREAS D'ARISTEUS ANTENNATUS

Test préventif :

Nombre d'animaux : 9 ♀, 9 ♂.

Durée du traitement : 178 jours.

Age des animaux à l'autopsie : 7 mois.

Femelles (9) :

- mortes spontanément (2) au 120^e et 140^e jour.
infection vaginale (chez les 2).
abcès dans l'intestin (1).
- sacrifiées au 178^e jour (7).
abcès au niveau de la trachée (2).
abcès au ventre (paroi abdominale) (1).
inflammation du coecum (3).
lithiase de la vessie (1).

Mâles (9) :

Deux sujets avaient présenté des abcès au cours du traitement : l'un au niveau du sternum (entre les aisselles) ; l'autre dans la région de l'oreille. Ces abcès avaient guéri spontanément ; on a noté cependant plusieurs récurrences d'abcès au niveau de l'arcade zygomatique.

Résultate d'autopsie :

- ulcération de la muqueuse stomacale (2).
abcès dans la région des glandes sous-maxillaires (2).
abcès du poumon (1).

Test curatif :

Nombre d'animaux : 26.

Durée du traitement 15 à 20 jours.

Age des animaux 90 à 95 jours.

Sur les animaux vivants, on a seulement noté des abcès du cou ou de l'aisselle ; de l'alopecie de la tête, des poils secs et hérissés sur le dos.

A l'autopsie on trouve chez deux femelles un abcès dans l'anse duodénale, des points hémorragiques dans l'intestin, des abcès des glandes maxillaires (apparents sur le vivant) un abcès au cerveau (1 ♂) ; un ulcère de l'estomac (portion pylorique chez une femelle) ; le foie (lobe médian) d'un mâle présentait un mouchetage grisâtre.

2° RATS TRAITES PAR LES ESTERS D'ASTAXANTHINE

Test préventif :

Nombre d'animaux : 12 (6 ♀, 6 ♂).

Durée du traitement : 161, 163, 165, 230, 260, 262 jours pour les femelles.
210, 215, 220, 240, 260 jours pour les mâles.

Observations :

femelles.

- mortes au 161° et 163° jour de traitement ;
infection vaginale chez les deux ;
vessie dilatée par des calculs (1) ;
- morte au 165° jour :
hémorragie utérine ;
abcès dans la région de l'oreille ;
- morte au 230° jour :
animal maigre ;
vessie entièrement remplie de calculs ;
kystes de l'utérus ;
abcès sous le cou ;
inflammation du coecum ;
- morte au 260° jour :
vessie dilatée par des calculs (grosseur de 2 à 6 mm) ;
hémorragie utérine ;
abcès dans la région sous-maxillaire ;
tumeur au cerveau ;
- morte au 262° jour ;
quelques calculs dans la vessie.

Mâles.

Les 6 mâles ont été sacrifiés ; (les esters d'astaxanthine avaient été administrés à partir du sevrage pendant 210, 215, 220, 240, 260 jours)

Les mâles sacrifiés au 210°, 215° et 220° jour de traitement présentaient une courbe de poids descendante, les trois autres une stabilisation de poids depuis le sixième mois de traitement.

Observations :

- mâle sacrifié au 210° jour de traitement ;
testicules atrophiés ;
abcès au cou ;
inflammation du coecum ;
animal maigre ;
- mâle sacrifié au 215° jour de traitement ;
testicules atrophiés ;
ulcère de l'estomac ;
animal maigre ;

- mâle sacrifié au 220° jour de traitement :
testicules atrophiés ;
abcès anse duodénale ;
animal maigre ;
- mâles sacrifiés au 260° jour de traitement (3) :
testicules atrophiés (chez les 3) ;
abcès région de l'oreille (1 animal) ;
coecum enflammé (chez les 3).

Test curatif :

Nombre d'animaux : 27.
Durée du traitement : 20 à 30 jours.
Age des animaux : 90 à 100 jours.

19 animaux présentent des abcès de la région sous-maxillaire, ou dans la région de l'oreille, ou au-dessous de l'œil — 1 seul animal présente une tumeur au cerveau, des kystes du foie (6 à 10 petits kystes, plus nombreux dans le lobe médian) chez 4 femelles et 2 mâles ; inflammation du coecum plus ou moins accentuée (chez 10 sujets), ulcères de l'estomac (chez 4 animaux 3 ♀, 1 ♂) calculs de la vessie (chez 1 mâle — durée du traitement 40 jours).

3° RATS TRAITES PAR INJECTIONS DE CHROMOPROTEIDES

Test curatif :

Pigment d'œufs de *Plesionika edwardsii*.

Nombre d'animaux : 2 mâles.
Durée du traitement : 18 jours.
Age des animaux : 110 jours.

- testicules atrophiés (chez les 2) ;
énorme abcès au cou (chez 1 sujet).

Pigment d'œufs d'*Aristeus antennatus*.

Nombre d'animaux : 3 (2 ♀, 1 ♂).
Durée du traitement : 8 jours.

Femelles :

- infection vaginale (1) ;
kyste utérin (chez la même) ;
abcès glande sous-maxillaire.

Mâle :

1 abcès au niveau de la thyroïde.
Pigment d'œufs de *Scyllarus latus*.
Nombre d'animaux : 2 femelles.
Durée du traitement : 18 jours.

Observation : abcès (énorme) sous le cou (1).

Pigment de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*.

Nombre d'animaux : 4 (2 ♀, 2 ♂).
Durée du traitement : 35 jours.

Femelles :

- abcès au cou (1) ;
surrénales hypertrophiées (1).

Mâles :

- testicules atrophiés (2) ;
ulcère de l'estomac (1) ;
abcès du pharynx (1).

4° DISCUSSION

La confrontation des deux séries d'exams, animaux carencés témoins et animaux carencés traités à l'astaxanthine appelle les commentaires suivants :

1° L'étude systématique des altérations provoquées par la carence en vitamine A montre que les lésions anatomo-pathologiques sont celles décrites classiquement par tous les expérimentateurs, aussi bien chez l'animal vivant que sur l'animal autopsié : colpokératose précoce, abcès sous-maxillaires affectant 60 à 70 % des sujets jeunes à partir du 25^e jour de carence, état de misère physiologique se traduisant par de la maigreur, de la prostration, de la paralysie du train postérieur ; chez l'animal adulte les abcès du cou, les infections vaginales et l'atrophie testiculaire affectent une forte majorité des sujets. Les ulcères de l'estomac, les cas de lithiase vésicale, moins généraux, sont cependant constatés fréquemment.

2° La comparaison des résultats entre les rats carencés témoins et les rats carencés traités à l'astaxanthine montre les mêmes processus infectieux quand le pigment est administré, à petite dose, à titre curatif, et l'état de misère physiologique est comparable à celui des animaux témoins. Les abcès des régions sous-maxillaires, la colpokératose, les infections vaginales s'observent avec la même fréquence. A l'exception de l'œil et de ses annexes, au niveau desquels l'administration d'astaxanthine a rétabli l'intégrité des tissus et a fait recéder les processus infectieux, les résultats d'autopsie sont entièrement comparables dans les deux cas.

Quand l'astaxanthine (également à titre curatif) est administrée à doses élevées (égales ou supérieures à 50 µg.), on constate déjà sur le vivant un ralentissement dans l'évolution des processus infectieux. Si la colpokératose est caractérisée dans tous les cas, l'autopsie révèle plus rarement des phénomènes de suppuration des voies génitales ; les mêmes constatations sont faites au niveau de l'appareil digestif où les lésions sont plus discrètes. Par ailleurs les états cachectiques sont plus rares.

Dans les expériences de type préventif, les résultats confirment que l'administration de fortes doses retarde l'apparition des lésions : chez les femelles traitées par des doses de 50 µg. *pro die* et dont la croissance a évolué presque normalement c'est seulement vers le 5^e mois de traitement que l'on constate des abcès du cou ; cependant prématurément la colpokératose est décelée, et après le 6^e mois de

carence (avec traitement), on observe des infections vaginales et des calculs de la vessie. Chez tous les mâles traités par 50 µg. d'astaxanthine à titre préventif, les processus infectieux ne sont pas observés jusqu'au 7^e mois et la survie des animaux est la même pour tous les sujets (supérieure au 8^e ou 9^e mois). Cependant l'appareil génital n'est pas épargné et l'atrophie testiculaire constatée dans la majorité des cas (*).

3° En ce qui concerne les observations sur les animaux ayant été traités par injections de chromoprotéides, les résultats rejoignent ceux qui ont été enregistrés chez les rats traités *per os* par de petites doses d'astaxanthine ou chez les rats témoins soumis au seul régime de base : là encore, on observe des états de misère physiologique accentués et, à l'autopsie des lésions ou des processus infectieux qui montrent que l'astaxanthine injectée à faible dose n'a exercé aucun effet de protection en dehors de l'appareil oculaire.

En résumé les perturbations constatées chez les animaux traités à l'astaxanthine s'apparentent à celles d'une carence ou d'une subcarence en vitamine A : les processus infectieux dont l'évolution et le siège sont identiques, se retrouvent toujours, affectant dans le même ordre d'apparition les tissus du même âge. Cependant l'œil et ses annexes sont parfaitement sains ce qui confirme, qu'à ce niveau l'astaxanthine remplit, comme la vitamine A une fonction essentielle dans la nutrition de la conjonctive et de la cornée. La localisation du pigment dans la rétine fait d'ailleurs prévoir la possibilité de son intervention dans la constitution de pigments rétinien (236), (72). Sans pouvoir préciser sur quel point un mécanisme enzymatique entre en jeu, il apparaît que l'astaxanthine pourrait agir sous forme d'un dérivé proche et sans coupure oxydante de la molécule. Cette hypothèse ne sera toutefois discutée qu'à la fin de la deuxième partie à la lumière des données acquises sur la biogenèse de la vitamine A des poissons et sur les expériences qui ont permis de suivre et d'interpréter la transformation de l'astaxanthine en vitamine A chez *Gambusia noltbrookii*.

(*) La dégénérescence testiculaire et celle des glandes annexes a été invoquée par Giroud et Desclaux (64) comme conséquence de la dénutrition. Dans nos expériences de longue durée de type préventif l'atrophie testiculaire a été constatée sans que par ailleurs se manifestent des signes de dénutrition.

L'atrophie testiculaire a été également signalée à la suite d'administration d'huiles de foies de poissons et attribuée aux acides gras de ces huiles (28), (166). Or, nous avons observé cette dystrophie dans des expériences où le pigment, isolé par chromatographie, était délivré non plus dans des huiles extraites de l'hépatopancréas de pénéidés, mais dans de l'huile d'arachide.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LA BIOGENESE
DE LA VITAMINE A DES POISSONS

La question de l'origine de la vitamine A des Poissons s'inscrit parmi les problèmes de Biologie générale qui, en dépit d'un nombre considérable de recherches n'ont pas encore reçu de solution entièrement satisfaisante.

Il n'est pas en effet actuellement démontré que l'apport alimentaire fournisse intégralement en nature ou sous forme de carotène l'axérophthol présent, parfois en grandes quantités, dans les viscères de certains poissons. D'après les données biologiques, les poissons se nourrissent de crustacés et ceux-ci de Diatomées ; or les Diatomées contiennent du carotène, n'ont pas de vitamine A (115) et on trouve, chez les Poissons, seulement de la vitamine A. Comme l'a fait remarquer Lederer, chez les Copépodes, qui constituent le maillon intermédiaire de la chaîne « Diatomées - Crustacés - Poissons », le carotène a presque disparu et la vitamine A « n'y est pas encore formée », ce qui suggère à l'auteur l'hypothèse de la possibilité d'une synthèse de la vitamine A par les Poissons, indépendante du carotène (137).

Il était donc logique de se demander si les Poissons ne sont pas capables d'utiliser comme précurseurs de la vitamine A des substances de nature caroténoïde présentes dans leur alimentation et, en particulier l'astaxanthine si largement répandue dans la faune aquatique (136), (132), (121), et particulièrement abondante chez les Crustacés.

A. — DONNEES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DE LA VITAMINE A DES POISSONS

Il est actuellement bien établi (Lederer, Kon) et contrairement à l'opinion de Wagner (cf. p. 26), que dans l'organisme des Crustacés, le carotène est le plus souvent absent ou est seulement présent à l'état de traces. Par contre nous avons vu que la vitamine A y a été caractérisée sans ambiguïté : Wald (234), Kon et Thomson (127), Fisher, Kon et Thomson (62) en ont démontré la présence dans la plupart des espèces qu'ils ont examinées ; nous-mêmes l'avons caractérisée chez les Peneidae et les Pandalidae et montré que la vitamine A qui n'est pas décelable dans le reste de l'organisme est cependant régulièrement présente dans les yeux (cf. tableau VI) quoique en quantités toujours faibles.

Il est donc indiscutable que les Crustacés sont susceptibles de fournir un apport alimentaire de vitamine A, certaines espèces étant même relativement riches en ce facteur : tel est le cas des Euphausiacés qui constituent le « krill » dont se nourrissent les baleines. Celles-ci ainsi que l'ont démontré Kon et coll. puisent donc dans leur nourriture les quantités de vitamine A préformée qui constituent leurs énormes réserves hépatiques ; mais si l'on se reporte au tableau I (cf. p. 19) il est facile de se convaincre qu'à cet égard les diverses espèces de Crustacés ne sont pas quantitativement équivalentes ; de ce point de vue, les Euphausiacés occupent une situation

privilegiée et parmi eux *Meganyctiphanes norvegica*, *Thysanoessa raschii* et *Thysanoessa inermis*, espèces particulièrement abondantes dans le « krill », présentent les teneurs vitaminiques les plus élevées. Chez d'autres Crustacés, au contraire, la vitamine A est essentiellement localisée au niveau des yeux et sa concentration rapportée à l'organisme entier est toujours faible (tableaux II, III, IV). Les travaux de Kon et coll. sont à cet égard en parfait accord avec nos propres observations sur les Peneidae et les Pandalidae (cf. tableau I). Le cas de la Baleine ne saurait donc être généralisé ; il n'est pas du tout certain que les Poissons se trouvent dans une situation comparable et qu'ils rencontrent toujours dans leur alimentation la vitamine A préformée en quantités suffisantes pour leur permettre à elle seule, d'assurer la couverture de leurs besoins et de constituer des réserves. Chez *Merluccius vulgaris* par exemple (90) les variations de concentration en vitamine sont particulièrement suggestives et l'on observe des écarts de 390 à 1.500 µg. par g. d'insaponifiable pour le foie et de 750 à 75.000 µg. pour l'intestin. Chez un même sujet, la teneur en vitamine rapportée au gramme de tissu est, dans la moitié des cas, plus élevée dans l'intestin que dans le foie : il arrive même que la quantité de vitamine de l'intestin entier, dont le poids est quatre à cinq fois inférieur à celui du foie, dépasse de beaucoup celle mise en réserve dans la totalité de cet organe (*).

Le cas de *Merluccius* n'est pas une exception et les travaux de Lovern, Edisbury et Morton (sur le flétan (142) montrent que la teneur en vitamine A des viscères est plus élevée que celle du foie. 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 vitamines hépatique et intestinale, l'amplitude des écarts de concentration enregistrés pour cette dernière et sa localisation au lieu même où s'effectue la conversion des provitamines en vitamine A (68), (209), (224), (240), (162) suggèrent l'hypothèse qu'elle représente un produit soumis aux fluctuations de l'approvisionnement en provitamines alimentaires.

Or, *Merluccius vulgaris* poursuit des bancs de crevettes dont il se nourrit ; celles-ci ne renferment pratiquement pas de carotène (cf. p. 26) et peu de vitamine A ; les espèces méditerranéennes (en particulier *Aristeomorpha foliacea* et *Aristeus antennatus*) sont fortement pigmentées et nous avons vu que le principal pigment est l'astaxanthine.

Pourtant, chez *Merluccius*, ce caroténoïde ne s'accumule pas comme chez de nombreux poissons. Bien plus, il n'est pas rare de trouver des crevettes à demi-digérées et complètement décolorées dans le tractus digestif. Certes, on peut imaginer que le pigment est simplement détruit au cours du transit digestif, mais il n'est pas non plus, à priori, exclu qu'il subisse une autre destinée. On peut rappeler à cet égard les expériences déjà anciennes de Mc Walter et Drummond, (149) qui dé-

(*) Lovern a enregistré des faits du même ordre et souligné que chez le flétan (pêche de mai, la teneur en vitamine A dans les viscères est plus élevée que celle du foie (144).

montrent que chez de jeunes poissons issus d'œufs renfermant un pigment caroténoïde (probablement l'astaxanthine.), la teneur en pigment décroît au cours du développement tandis que celle de vitamine A augmente parallèlement. Et il n'est pas non plus sans intérêt de rappeler les expériences de Steven (218), qui démontrent l'utilisation de l'astaxanthine par la truite : chez la truite vivant en liberté les deux pigments caroténoïdes principaux sont la lutéine et l'astaxanthine. Les animaux élevés en aquarium conservent leur pigmentation normale à condition que leur régime alimentaire soit de même nature ; mais si le régime est composé de vers de terre et de viande hachée, seule la lutéine subsiste, tandis que l'astaxanthine disparaît complètement (*) ; bien que l'on ne possède aucun renseignement sur sa destinée, son utilisation ne saurait donc faire de doute.

Quoi qu'il en soit, les observations qui viennent d'être rapportées suggèrent de suivre la destinée de l'astaxanthine dans l'organisme des Poissons par l'étude de la concentration en vitamine A du foie, des yeux et de l'intestin (86), (87).

B. — CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

1° MATERIEL D'ETUDE

Choix de l'animal réactif.

Nous nous sommes adressé à *Gambusia holbrooki* Grd, petit cyprinodontidé ovovivipare, originaire du Texas (dont la latitude est celle de l'Afrique du Nord) que Edm. et Et. Sergent (202), (203) ont importé en 1926. L'Institut Pasteur d'Algérie en assure l'élevage et favorise largement la diffusion dans les oueds et marais algériens car, en faisant disparaître les larves d'anophèles, *Gambusia* représente un moyen efficace de prophylaxie biologique dans la lutte antipaludique. Les *Gambusia* sont carnassiers, mais extrêmement voraces ; ils acceptent les nourritures les plus variées et ils se contentent parfaitement d'un régime exclusivement constitué de semoule.

Les femelles sont ovovivipares, les œufs éclosent au moment même de la ponte ; leur pullulation est rapide et abondante ; ils donnent 6 à 7 générations pour une saison, le nombre de jeunes atteignant jusqu'à la centaine dans une seule portée. On isole les femelles au moment de la ponte dans une enceinte grillagée immergée dans l'aquarium, car les gambouses pratiquent volontiers le cannibalisme.

La taille des femelles adultes ne dépasse guère 40 mm en moyenne et celles des mâles 30 mm. Il eut sans doute été plus rationnel de fixer notre choix sur un poisson de plus grande taille mais les avan-

(*) Lorsque la nourriture comporte de l'astaxanthine en quantité surabondante, il en résulte une « saumonisation » des animaux par mise en réserve du pigment dans le tissu musculaire. Avec R. Grangaud, R. Dieuzeide et Th. Douard, nous avons réalisé artificiellement cette saumonisation en nourrissant des truites arc-en-ciel avec du conjonctif péristomacal d'*Aristeomorpha foliacea* (79).

tages que présentent les gambouses pour le type d'expérience envisagé sont de plusieurs ordres.

— leur pullulation est rapide et abondante (*) et il est possible de disposer d'un nombre considérable d'animaux suivant les besoins ;

— ils se laissent facilement carencer en vitamine A.

Ces deux caractères sont essentiels pour l'étude du problème posé. Les premiers essais nous ayant montré tout le parti que l'on pouvait tirer d'un élevage de gambouses, et surtout les résultats s'étant montrés encourageants au delà de nos espoirs, les schémas expérimentaux suivants ont utilisé ce même animal réactif.

Sources d'astaxanthine et préparation des extraits.

Les extraits (esters d'astaxanthine) sont préparés à partir du conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus* suivant la technique déjà décrite, (cf. p. 39). Les esters d'astaxanthine obtenus en solution huileuse tocophérolée (2 mg. d' α tocophérol — comme anti-oxygène — par gramme d'huile) sont incorporés au régime des gambouses.

Régimes.

Dans les premiers essais, le régime de base était exclusivement constitué de semoule. Pour éviter les effets de carences multiples (en acides aminés indispensables et en facteurs vitaminiques), nous avons administré aux gambouses un régime complexe dont la composition est la suivante :

- semoule ou mie de pain blanc grillé, pulvérisé et tamisé. 85 %
- caséine dévitaminée 10 %
- levure de bière sèche irradiée 5 %
- vitamine D (calciférol cristallisé) : 100 U.I./g. de régime.

A chaque gramme de ce mélange est incorporé pour les animaux traités, 0,5 g. d'extrait huileux de pigment.

Protocoles expérimentaux.

Nous avons constaté que la carence en vitamine A peut être rapidement obtenue chez *Gambusia holbrooki* : après 30 jours d'un régime privé d'axérophtol, la vitamine A n'est plus décelée dans son organisme. Ce point établi, le protocole expérimental a été établi comme suit :

Les lots d'animaux en expérience sont soumis pendant 35 jours au régime de base carencé. Au bout de ce temps les témoins sont sacrifiés et la carence est contrôlée par la recherche de la vitamine A : on saponifie l'animal entier, ou les organes séparés (yeux, foies, intestins, œufs) et l'on effectue la réaction de Carr et Price selon la technique habituelle.

(*) A condition que l'eau soit au voisinage de 25° C.

On distribue alors aux animaux, soit des fragments de conjonctif péristomacal, soit le régime de base complexe additionné d'extrait huileux du pigment. A la fin de l'expérience les animaux sont sacrifiés et la vitamine A recherchée suivant la même technique que pour les témoins.

2° RESULTATS EXPERIMENTAUX

Essais préliminaires :

Premier essai : cinq gambouses (4 ♀, 1 ♂) ont été nourris pendant 35 jours à la semoule. Au bout de ce temps, deux mâles ont été sacrifiés. La réaction de Carr et Price effectuée sur l'insaponifiable de l'animal entier n'a révélé aucune trace de vitamine A. Les trois poissons restants ont reçu pendant les 26 jours suivants des fragments de conjonctif péristomacal. Ils ont été ensuite sacrifiés. La réaction de Carr et Price effectuée sur l'insaponifiable a mis en évidence la présence de vitamine A à la concentration de 3,6 µg. au gramme de tissu frais.

Deuxième essai : exécuté sur 10 animaux (cinq traités : 2 ♂, 3 ♀ et cinq témoins : 3 ♂, 2 ♀) cet essai a été conduit comme le précédent. La vitamine A n'a pas été décelée chez les témoins ; elle était présente au taux de 3,6 µg. par g. de tissu frais chez les gambouses traités.

Un troisième et un quatrième essai (4 animaux et 14 animaux) ont donné des résultats identiques : pas de vitamine A chez les témoins ; respectivement 3 µg. de vitamine A au gramme chez les animaux de la troisième expérience, 1,8 µg. chez les animaux de la quatrième.

Expériences définitives.

Première expérience :

11 animaux (4 ♂ et 7 ♀) reçoivent le régime de base pendant 35 jours. On constate sur 4 animaux, au terme de cette période, que la carence est totale (réaction de Carr et Price négative).

On traite alors les 7 animaux restants (2 ♂, 5 ♀) en incorporant au régime de base la solution huileuse de pigment extrait du conjonctif péristomacal. Le taux de vitamine A trouvé est de 1,5 µg. par g.

Deuxième expérience :

Les animaux (25 ♀ et 9 ♂) ont reçu le régime de base complexe. Au bout de 35 jours la carence ayant été vérifiée sur onze témoins (9 ♀ et 2 ♂), les animaux restants ont été traités pendant 26 jours comme ceux de la première expérience (régime de base additionné d'extrait huileux de pigment de conjonctif péristomacal), puis sacrifiés et disséqués en séparant les mâles et les femelles. Chez les mâles, la vitamine A était présente dans les yeux au taux de 10,2 µg. par g. d'organe frais ; elle n'a été décelée ni dans le foie, ni dans l'intestin. Chez les femelles, la vitamine A était également présente dans les yeux au taux de 10,5 µg. et aussi à l'état de traces dans l'intestin. Elle était absente dans les foies et les œufs.

Troisième expérience :

Les animaux de ce lot (37 ♂ et 20 ♀) ont été soumis au régime de base complexe pendant 35 jours au terme desquels il a été vérifié

sur onze témoins (3 ♂, 8 ♀) que la carence était totale. Les animaux restant ont reçu pendant 25 jours le régime de base additionné d'extrait huileux de pigment d'hypoderme.

Chez les mâles, le taux de vitamine A trouvé était pour les yeux de 8,4 µg. par g. Des traces de vitamine étaient présentes dans le foie et l'intestin ; chez les femelles, il a été trouvé 12 µg. de vitamine A par gramme dans les yeux. Aucune trace n'a été décelée dans le foie et l'intestin.

Les résultats ont été groupés dans les tableaux suivants :

TABLEAU XXIII
Essais préliminaires

Nombre d'animaux	Durée de la carence	Durée du traitement	Source d'astaxanthine	Vitamine A par gramme en µg.
Témoins : 2	35 jours	—	—	néant
Traités : 3	»	26 jours	C*	3,6 µg. **
Témoins : 5	»	—	—	néant
Traités : 5	»	26 jours	C*	3,6 µg. **
Témoins : 2	»	—	—	néant
Traités : 2	»	26 jours	C*	3,0 µg. **
Témoins : 5	»	—	—	néant
Traités : 9	»	26 jours	C*	1,8 µg. **

(*) C : fragments de conjonctif péristomacal.

(**) Le dosage a été effectué sur les animaux entiers.

TABLEAU XXIV

Conversion de l'astaxanthine en vitamine A chez *Gambusia Holbrooki* Grd.

Nombre d'animaux	Durée de la carence	Durée du traitement	Source d'astaxanthine	Vitamine A par gramme en µg.		
Témoins : 4	35 jours	—	—	néant		
Traités : 7	»	26 jours	E.C. *	1,5 µg. **		
				yeux	foie	intestin
Témoins : 11	»	—	—	néant	néant	néant
Traités : 7 ♂	»	26 jours	E.C. *	10,2	néant	néant
16 ♀	»	26 jours	E.C. *	10,5	néant	traces
Témoins : 11	»	—	—	néant	néant	néant
Traités : 34 ♂	»	26 jours	E.H. *	8,4	traces	traces
12 ♀	»	26 jours	E.H. *	12,0	néant	néant

(*) E.C. : extrait huileux de conjonctif péristomacal.

E.H. : extrait huileux d'hypoderme.

(**) Le dosage a été effectué sur les animaux entiers.

3^o DISCUSSION DES RESULTATS

a) DEMONSTRATION DE LA TRANSFORMATION DE L'ASTAXANTHINE EN VITAMINE A.

Les essais préliminaires ont montré que, chez des gambouses nourries avec de la semoule, la vitamine A cesse régulièrement d'être décelable après moins de 35 jours de régime. Lorsqu'on prolonge la carence les animaux dépérissent et meurent en général en moins de trois mois après avoir présenté des signes de misère physiologique : les nageoires sont dentelées, la nageoire caudale, normalement étalée en éventail, se referme en un mince pinceau, le corps se replie en arc de cercle, donnant à l'animal une attitude caractéristique. Si, après 35 jours, on substitue au régime carencé des fragments de conjonctif péristomacal d'*Aristeus antennatus*, aucun de ces symptômes de carence n'apparaît et, après 25 jours, la vitamine A est décelable en quantité notable dans l'organisme de l'animal traité. C'est donc que dans le conjonctif péristomacal d'*Aristeus* — où ne se trouvent, ni vitamine A préformée, ni carotène — existe un facteur doué de propriétés provitaminiques A pour *Gambusia holbrooki* Grd. Il était vraisemblable que la provitamine mise en évidence n'était autre que l'astaxanthine étant donné la richesse du conjonctif péristomacal d'*Aristeus* en ce facteur.

L'administration aux animaux carencés de ce pigment séparé par chromatographie permet de démontrer qu'il en est bien ainsi : la technique de préparation de l'extrait actif exclut, en effet, l'éventualité de la participation d'une substance autre que l'astaxanthine pour rendre compte de la formation de vitamine A observée.

La technique d'identification et de dosage utilisée (réaction de Carr et Price, technique cinétique) permet d'affirmer, sans aucun doute que la substance qui a pris naissance chez les Poissons traités est bien de la vitamine A.

Ces premiers résultats expérimentaux ont permis de conclure que l'astaxanthine est une provitamine pour *Gambusia holbrooki* Grd., mais ne précisait pas s'il s'agit exclusivement de vitamine A₁ ou d'un mélange de vitamines A₁ et A₂.

Les expériences suivantes ont eu pour objectif :

1^o de rechercher si la vitamine A synthétisée était uniquement la vitamine A₁ (rétinol) ou si la vitamine A₂ (hydrorétinol) était également présente ;

2^o de préciser la cinétique et les étapes de la transformation de l'astaxanthine en vitamine A.

b) ETUDE DE LA NATURE DE LA VITAMINE A NEOFORMEE (92).

Chez les Poissons d'eau douce, il est de règle de rencontrer simultanément les vitamines A₁ (rétinol) et A₂ (hydrorétinol) (235), (139). Morton et Creed (175) administrant à des perches (*Perca fluviatilis*) un régime enrichi en carotène, ont enregistré une augmentation considérable des réserves en vitamines A₁ et A₂ et ont pu conclure que chez les Poissons d'eau douce, le carotène peut jouer à la

fois le rôle de provitamine A₁ et de provitamine A₂. Inhoffen et Pommer (113) estiment — sans d'ailleurs fournir d'argument expérimental à l'appui de leur hypothèse — qu'il doit en être de même pour d'autres provitamines A bien que la conversion de la vitamine A₂ en vitamine A₁ n'ait jusqu'ici jamais été observée in vivo (210).

Matériel et techniques :

Dans les premiers essais, les gambouses utilisés étaient indifféremment des mâles et des femelles, l'évolution de la carence, en particulier les anomalies de la nageoire caudale étant constatées sur les deux sexes ; par ailleurs, la femelle adulte atteint une taille près de deux fois supérieure et la dissection en est beaucoup plus facile. Les femelles gestantes ont été écartées : bien que nous n'ayons fait aucune observation à cet égard, on pouvait redouter que la gestation ne vienne perturber le métabolisme de la vitamine A et des pigments caroténoïdes et que, de ce fait, une cause d'erreur soit introduite.

Régimes :

Le régime synthétique utilisé dans les premières expériences a été légèrement modifié dans sa composition, la dextrine blonde ayant été substituée à la mie de pain blanc. La formule est alors la suivante :

Régime n° 1 : Caséine dévitaminée	20
Dextrine blonde	72
Levure de bière irradiée	4
Huile végétale dévitaminée	4
(à 1 % de tocophérol).	

On mélange la caséine à la dextrine et à la levure de bière. Par addition d'eau et malaxage on obtient un pâton que l'on sèche à l'étuve. La masse desséchée est pulvérisée et additionnée de l'huile tocophérolée.

Régime n° 2 : Ce régime est préparé à partir de la formule de base n° 1 et sa préparation est identique jusqu'à l'addition d'huile. Avant d'incorporer l'huile dévitaminée tocophérolée, on ajoute une quantité calculée d'une solution d'esters de l'astaxanthine, de façon à obtenir une solution huileuse de pigment de titre connu. Pour cela, on mélange les 4 g. d'huile à 1.000 ml. d'une solution éthéro-pétrolique renfermant 5 mg d'esters d'astaxanthine (concentration évaluée par spectrophotométrie à $\lambda = 470 \text{ m}\mu$), obtenue selon le mode opératoire précédemment décrit (cf. p. 39) ; puis on chasse le solvant par évaporation sous pression réduite et en atmosphère inerte.

Recherche et dosage des facteurs vitaminiques A.

Les Gambouses aussitôt pêchés, sont maintenus à 0° C. Les organes immédiatement prélevés sont immergés dans 3 ml. d'alcool absolu, placés dans des ballons tarés et plongés pendant toute la durée de la dissection dans un mélange réfrigérant de glace et de sel. Il a été vérifié qu'en opérant dans ces conditions l'alcool ne s'évapore pas et que la pesée des organes est significative à $\pm 0,01 \text{ g.}$ près. Après pesée, les organes sont saponifiés suivant la méthode de Lewis

et Bodansky (cf. p. 22). Le résidu de saponification est repris par 2,5 ml. de chloroforme rectifié anhydre et on procède, sur des parties aliquotes de solution chloroformique, à la caractérisation et au dosage des vitamines A₁ et A₂, par la réaction de Carr et Price (technique cinétique de Meunier et Raoul).

Les mesures sont effectuées au spectrophotomètre de Beckman à

$$\gamma = 620 \text{ m}\mu \left(E \begin{array}{c} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{array} = 5070 \right) \text{ pour la vitamine A}_1 \text{ et à } \lambda = 693 \text{ m}\mu$$

$$(E \begin{array}{c} 1 \% \\ 1 \text{ cm} \end{array} = 4100) \text{ pour la vitamine A}_2.$$

Protocoles et résultats expérimentaux :

a) Première expérience : il s'agissait de caractériser les vitamines A₁ et A₂ éventuellement néoformées après administration d'astaxanthine.

807 gambouses (♀ et ♂) ont été soumis pendant 12 jours au régime de base carencé en vitamine A (régime n° 1). Au bout de ce temps, 300 sujets (150 ♀ et 150 ♂) pris comme témoins (lot I) ont été sacrifiés et les vitamines A₁ et A₂ ont été recherchées et dosées dans les intestins, les foies et les yeux.

Les 507 gambouses restants (lot II) ont alors reçu pendant les 15 jours suivants, le régime de base additionné d'astaxanthine (régime n° 2). Ils ont été ensuite sacrifiés et les mêmes examens que sur les témoins ont été pratiqués. L'ensemble des résultats de cette première expérience est rapporté au Tableau XXV.

TABLEAU XXV

		Vitamine A ₁ en μg. par g. de tissu frais	Vitamine A ₂ en μg. par g. de tissu frais
Lot I 300 témoins	Intestins	néant	néant
	Foie	4,0	1,8
	Yeux	7,6	2,2
Lot II 507 sujets	Intestins	4,3	2,0
	Foies	8,2	5,6
	Yeux	12,5	traces

Ces résultats montrent que chez les animaux carencés, les vitamines A₁ et A₂ disparaissent rapidement de la muqueuse intestinale et que l'administration d'astaxanthine provoque la néoformation des deux facteurs.

Deuxième expérience : cette seconde expérience avait pour but de préciser la cinétique de la transformation de l'astaxanthine après

administration à des gambouses carencés d'un repas unique du régime additionné d'astaxanthine.

600 gambouses ♂ (*) ont été soumis pendant huit jours au régime carencé. Après cette période, 150 animaux servant de témoins ont été sacrifiés, et il a été constaté que la vitamine A₁ avait totalement disparu de l'intestin ; les traces de vitamine A₂ (non dosables) y subsistaient encore.

Les 450 gambouses restants ont alors été partagés en trois lots égaux et ont reçu un repas abondant unique du régime n° 2. Ils ont ensuite été sacrifiés respectivement 2, 3 et 7 heures plus tard et les vitamines A₁ et A₂ ont été recherchées et dosées dans l'intestin.

Les résultats suivants ont été enregistrés (Tableau XXVI).

TABLEAU XXVI

	Vitamine A ₁ en μg. par g. de tissu frais	Vitamine A ₂ en μg. par g. de tissu frais
Lot I (150 animaux)	néant	néant
Lot II (150 animaux)	6,6	néant
Lot III (150 animaux)	1,65	traces

c) CINÉTIQUE ET ÉTAPE DE LA TRANSFORMATION DE L'ASTAXANTHINE EN VITAMINE A.

Cette expérience montre donc que la vitamine A₁ apparaît en quantité importante dès la 3^e heure qui suit l'administration d'astaxanthine. A la 7^e heure, la concentration du rétinol dans la muqueuse intestinale est encore notable, mais déjà fortement décroissante. Quant à la vitamine A₂ dont de petites quantités ont été décelées dans les intestins des animaux du lot III (sacrifiés 7 heures après le repas unique) il n'est pas possible d'affirmer qu'il s'agit d'une néoformation puisque des traces de cette vitamine étaient également présentes dans la muqueuse intestinale des témoins.

Au cours de cette expérience, 2 ml. de la solution éthéro-pétrolique (représentant 1/5^e de l'extrait des intestins du lot III) ont été chromatographiés sur microcolonne d'alumine de 0,5 cm. de diamètre. Après lavage par l'éther de pétrole (2 ml.), le chromatogramme est développé avec de l'éther de pétrole additionné de 0,5 % de méthanol. Tandis que l'astacine (produite au cours de la saponification par oxydation de l'astaxanthine) restait fortement absorbée à la partie supérieure de la colonne, un anneau orangé s'est détaché puis est descendu lentement. Cette opération a donc permis de révéler dans l'extrait la présence d'un pigment caroténoïde dont le comportement chromatographique indiquait qu'il pouvait s'agir de carotène. Pour tenter son identification, une troisième expérience a été entreprise.

(*) Cette expérience ayant été réalisée en juin au moment où la plupart des femelles se trouvaient en gestation, celles-ci ont été écartées.

Troisième expérience : dans cette expérience, les femelles ont été choisies de préférence aux mâles à cause de leur taille relativement grande, mais les femelles gravides ont été écartées (*) et la durée de la carence a été fixée à 23 jours.

630 sujets ont été utilisés :

150 animaux servent de témoins : l'absence des vitamines A₁ et A₂ est vérifiée après 23 jours.

480 gambouses sont partagés en trois lots égaux. Avec un décalage d'une heure, on administre à chacun des lots un repas unique de régime surchargé en astaxanthine, puis les animaux sont sacrifiés 3 heures plus tard. On procède rapidement à la dissection (sur les animaux refroidis) et les intestins sont immergés au fur et à mesure de la dissection dans l'alcool refroidi pour éviter que ne se prolongent les phénomènes enzymatiques au-delà des trois heures fixées.

Les intestins des trois lots ont été réunis. L'ensemble représentant 5,150 g. de tissu frais a été saponifié (**) et l'insaponifiable mis en solution éthéro-pétrolique. La solution éthéro-pétrolique lavée, puis déshydratée par contact sur du sulfate de sodium anhydre a été chromatographiée. Le développement du chromatogramme par l'éther de pétrole additionné de 0,5 % de méthanol a permis d'isoler un pigment migrant lentement et de la même façon que le β carotène. Il a été élué par agitation de l'alumine colorée avec de l'éther de pétrole additionné de 1 % de méthanol ; l'éluat, lavé, déshydraté est de nouveau chromatographié. Après élution, on procède à une mesure spectrale : on constate que le spectre est comparable à celui du β carotène, avec un léger décalage vers les courtes longueurs d'ondes du maximum principal (448 m μ , au lieu de 452 m μ pour le carotène entièrement trans) pouvant être imputé à la présence de stéréoisomères.

Une expérience complémentaire a complété l'identification : la solution éthéro-pétrolique du pigment a été additionnée d'un égal volume de solution de β carotène dans le même solvant et de même concentration : au développement, une zone unique s'est formée confirmant que le pigment présent dans l'extrait était bien du β carotène.

d) DISCUSSION :

L'ensemble des résultats des expériences sur *Gambusia holbrooki* Grd. fait apparaître que :

1° les gambouses peuvent être rapidement carencés (en moins de 35 jours) lorsqu'ils sont soumis à un régime privé de vitamine A ;

2° les symptômes de carence n'apparaissent pas et la survie est normale si on administre à l'animal des fragments de conjonctif péris-tomacal ou d'hypoderme d'*Aristeus antennatus* ou si on incorpore au

(*) Les femelles gravides présentent une tache noire abdominale caractéristique qui permet de les distinguer des autres femelles.

(**) La saponification a eu pour but de permettre l'élimination de la majeure partie de l'astaxanthine non transformée.

régime carencé un extrait huileux d'astaxanthine ;

3° chez les animaux ainsi traités pendant 25 jours des quantités notables de vitamine A peuvent être décelées, la vitamine s'accumulant principalement dans les yeux ;

4° l'astaxanthine se comporte à la fois comme une provitamine A₁ et comme une provitamine A₂ ;

5° la vitamine A₁ est décelée dans la muqueuse intestinale peu de temps après l'ingestion du pigment, la concentration étant maximum à la 3^e heure. La vitamine A₂ apparaît après ce qui conduit à envisager sa formation par déshydrogénation en C₃ de la vitamine A₁ ;

6° on constate la présence de β carotène, ce qui semble indiquer qu'il représente l'étape intermédiaire de la transformation de l'astaxanthine en vitamine A, la réduction des fonctions oxygénées précédant la coupure oxydante de la molécule ; mais il n'est pas établi que cette voie soit la principale et des expériences complémentaires devront être tentées dans ce domaine.

RESUME GENERAL ET CONCLUSIONS

Au cours de ce travail consacré aux propriétés vitaminiques de l'astaxanthine, nous avons en premier lieu porté notre attention sur le matériel d'étude.

Nous avons donné une description détaillée des Crustacés qui nous ont fourni les extraits ; nous avons surtout étudié avec le plus grand soin leurs pigments caroténoïdes et recherché la présence de vitamine A et de carotènes. Nous avons pu ainsi montrer que chez *Aristeomorpha foliacea*, comme chez *Aristeus antennatus*, la vitamine A ne peut être décelée ni dans l'hépto-pancréas, ni dans l'hypoderme, ni dans le conjonctif péristomacal. Elle se localise en quasi-totalité au niveau des yeux où sa concentration est de l'ordre de 3 à 11 μg . par gramme d'organe frais. L'intervention de ce facteur ne saurait donc être invoquée pour rendre compte partiellement ou en totalité des effets obtenus, chez le Rat blanc carencé en vitamine A, par l'administration d'huile d'hépto-pancréas, d'extraits d'hypoderme ou de conjonctif péristomacal.

De plus dans la partie technique consacrée à la séparation des esters d'astaxanthine nous avons pu montrer que la méthode de préparation éliminerait complètement les carotènes et la vitamine A si ces facteurs avaient été présents.

Une autre fraction de notre matériel d'étude a fait aussi l'objet d'une étude minutieuse : il s'agit de chromoprotéides de colorations variées provenant d'œufs, de tissus et de membranes de six espèces de Crustacés. En faisant agir un agent de dénaturation des protéides, libérant le groupement prosthétique par floculation de la protéine, nous avons pu montrer qu'il s'agit, dans tous les cas, de l'astaxanthine entièrement trans (γ maximum = 492 $m\mu$). La vitamine A a été recherchée dans ce matériel et les résultats indiquent que, par gramme de substance fraîche, la teneur en vitamine A n'excède pas 1,2 μg . pour les ovaires mûrs d'*Aristeomorpha foliacea* et ceux d'*Aristeus antennatus* ; dans le cas des œufs de *Plesionika edwardsii* et de *Scyllarus latus*, des traces seulement sont décelées.

Ces chromoprotéides ont pu être obtenus en solution aqueuse et nous avons pu établir que là aussi, la technique de préparation des solutions hydro-solubles injectées implique l'élimination de la vitamine et des carotènes.

Ce sont donc essentiellement :

- des esters d'astaxanthine, isolés par chromatographie et redissous dans de l'huile végétale dévitaminée ;
- des astaxanthino-protéides sous leur forme hydrosoluble, qui ont servi à nos essais biologiques.

Nous avons au préalable étudié avec soin l'évolution de la carence chez le Rat Wistar, précisé en particulier l'importance des réserves hépatiques et suivi dans le temps la disparition de ces réserves. Deux types d'essais nous ont permis d'étudier et de comparer les caractères vitaminiques de l'astaxanthine : des essais de type curatif et des essais de type préventif.

Nous avons pu ainsi retrouver et préciser un résultat obtenu antérieurement avec les huiles entières extraites de l'hépatopancréas : l'effet anti-xérophtalmique est déjà notable pour des doses qui entraînent aucune reprise de poids.

Un résultat comparable a été enregistré lorsque le pigment sous forme d'une solution aqueuse d'astaxanthino-protéides est injecté dans le péritoine : les lésions oculaires régressent en quelques jours tandis que le poids de l'animal demeure stationnaire ou décline.

A doses plus élevées se manifeste une action sur l'accroissement pondéral ; des expériences antérieures avaient souligné qu'administrées à titre préventif, les huiles entières d'hépatopancréas (90 mg. par animal et par jour) exerçaient un effet de croissance. Nous avons systématiquement étudié dans quelle mesure l'action des lipides de l'hépatopancréas pouvait être concomitante de celle de l'astaxanthine. En administrant des extraits de titre variable en astaxanthine et des extraits de même titre délivrés dans des véhicules huileux différents (huile extraite de l'hépatopancréas ou huile végétale dévitaminée) nous avons pu montrer :

— que les esters d'astaxanthine, administrés à fortes doses (50 µg. **pro die**) sont seuls responsables de l'accroissement pondéral normal du jeune Rat traité dès le sevrage et soumis, par ailleurs, à un régime carencé en facteurs A ;

— que même à la dose de 200 mg. par animal et par jour les lipides extraits de l'hépatopancréas n'exerçaient aucune action sur la croissance.

Les animaux ainsi conduits à l'âge adulte par la seule administration d'astaxanthine ont un poids de sujets normaux et un état de santé apparemment excellent. L'exploration des fonctions de reproduction chez ces sujets n'ayant pas reçu la moindre trace de vitamine A ou de carotène depuis leur sevrage a été entreprise. Des expériences poursuivies pendant plusieurs mois sur des animaux traités avec des huiles d'hépatopancréas ou avec des esters d'astaxanthine ont conduit aux observations suivantes :

— les femelles présentent un œstrus permanent signé par la présence de cellules cornées dans les frottis vaginaux ; elles sont cependant susceptibles, par accouplement avec des mâles normaux d'être fécondées mais l'avortement avant terme ou la mise-bas de portées mort-nées témoigne d'une évolution pathologique de la gestation ;

— les mâles sont frappés de stérilité ;

— ces perturbations fonctionnelles chez les mâles et chez les femelles s'observent quelle que soit la dose d'astaxanthine administrée.

En résumé, l'ensemble des résultats des essais biologiques apporte la confirmation de l'activité vitaminique de l'astaxanthine antérieurement établie et précise les points suivants :

1° l'action antixérophtalmique se retrouve quel que soit le mode d'introduction du pigment : voie buccale ou voie intrapéritonéale ;

2° l'effet de croissance n'est obtenu qu'en mettant en jeu des doses environ dix fois supérieures à celles qui préviennent la xérophtalmie ;

3° un excès d'astaxanthine administré à partir du sevrage ne prévient ni la colpokératose, ni les troubles des fonctions de reproduction.

Ces résultats ont été complétés par l'examen anatomo-pathologique des rats traités. Les résultats d'autopsie des animaux morts spontanément ou sacrifiés ont révélé, dans tous les cas, des troubles et des lésions caractéristiques de l'avitaminose A. Cependant l'administration de pigment dès le sevrage s'oppose dans une certaine mesure aux accidents provoqués par la carence en facteurs A qui apparaissent alors beaucoup plus tardivement et sont moins sévères. Par ailleurs, le temps de survie des mâles traités à l'astaxanthine à partir du sevrage est sensiblement normal : il n'en est pas de même des femelles qui ne survivent pas au-delà de six mois en présentant, dans la majorité des cas, des infections vaginales.

L'étude de la localisation du pigment dans l'organisme du Rat traité a également retenu notre attention. Nous avons effectué la recherche systématique de l'astaxanthine dans les organes et dans les tissus des animaux traités.

— En ce qui concerne la rétine nous avons retrouvé les résultats obtenus antérieurement avec des huiles d'hépatopancréas et des extraits d'hypoderme : chez le Rat traité à l'astaxanthine ou l'un de ses produits de transformation se retrouve au niveau de l'œil.

— Dans le foie le pigment est absent ou présent à l'état de traces ce qui confirme l'inaptitude à la mise en réserve dans cet organe.

En ce qui concerne l'hypophyse, la thyroïde, les surrénales, les résultats sont toujours positifs.

— La localisation au niveau des ovaires et des testicules n'est pas observée régulièrement.

— Après administration de zéaxanthine ce caroténoïde n'est jamais retrouvé au niveau de la rétine ; cependant des traces sont décelées dans d'autres organes ce qui démontre qu'on ne peut attribuer l'absence de pigment au niveau de l'œil à son inaptitude à franchir la barrière intestinale.

En fait, la localisation prépondérante de l'astaxanthine dans la rétine permet de comprendre l'action élective de l'astaxanthine au niveau de l'œil et de ses annexes. Les premiers résultats avaient suggéré que, en nature ou sous forme d'un dérivé proche, l'astaxanthine est susceptible d'entrer dans la constitution de pigments rétiens en tenant la place normalement dévolue à l'axérophtol.

Cependant les résultats obtenus dans la deuxième partie de ce travail permettent d'envisager une autre hypothèse. En effet en expéri-

mentant sur *Gambusia holbrooki* nous avons pu établir la transformation de l'astaxanthine en vitamine A. L'astaxanthine apparaît donc pour les Poissons comme une provitamine A.

En présence de ces résultats nous avons cherché à préciser si la vitamine A néoformée était uniquement de la vitamine A₁ ou si la vitamine A₂ était également présente ; nous avons tenté aussi de préciser la cinétique et les étapes de la transformation de l'astaxanthine en vitamine A. Nous avons ainsi constaté :

1° que (pour *Gambusia holbrooki* Grd.) l'astaxanthine se comporte à la fois comme une provitamine A₁ et comme une provitamine A₂ ; la vitamine A₂ apparaît dans l'intestin après la vitamine A₁ ce qui plaide en faveur de sa formation à partir de celle-ci :

— astaxanthine — vitamine A₁ — vitamine A₂ et non par une voie directe.

2° que du β carotène se forme transitoirement ce qui paraît indiquer que la réduction des fonctions oxygénées de l'astaxanthine doit précéder la coupure oxydante de la molécule.

Les résultats qui viennent d'être rapportés soulignent l'importance biochimique générale de l'astaxanthine et mettent en lumière sa place privilégiée dans la série des caroténoïdes à noyaux de β ionone oxygénés. Comme dans toute expérimentation, ils révèlent de nouvelles inconnues et dictent de nouvelles recherches dont le but sera de réunir en un ensemble synthétique les quelques données parcellaires qu'ils ont permis d'établir.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANDERSEN D.H., *Am. J. Pathol.*, 1949 25, 163.
- (2) ARGILAS A., *Diplôme d'études supérieures de zoologie*, Alger 1929.
- (3) BALACHOVSKI S., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 220.
- (4) BALL E.G., *J. Biol. Chem.*, 1944 152, 627.
- (5) BATHAM E., FISHER L.R., HENRY K.M., KON S.K. et THOMSON S.Y., *Biochem. J.* 1951, 48, x.
- (6) BAUMANN C.A., RIISING B.M. et STEENBOCK K.H., *J. Biol. Chem.*, 1943, 107, 705.
- (7) BENTLEY L.S. et MORGAN A.F., *J. Nutrition*, 1945, 30, 159.
- (8) BLAISOT J., *Ann. Nutr. et Alim.*, 1949, 3, 5.
- (9) BOOTH V.H., *Biochem. J.*, 1950, 47, xliii.
- (10) BOUVIER E.L., Résultats des campagnes scientifiques d'Albert 1er, prince de Monaco, Fascicule XXXIII, Monaco 1908, cité par Argilas (2), p. 33.
- (11) BRADFORD W.L., *Journ. Infect. Dis.* 1928, 43, 402.
- (12) BRADFIELD D. et SMITH M.C., *Am. J. Physiol.*, 1938, 124, 168.
- (13) BRAUDE R., FOOT A.S., HENRY K.M., KON S.K., THOMSON S.Y. et MEAD T.H., *Biochem. J.*, 1941, 35, 693.
- (14) BROCKMANN H. et SCHODDER H., *Ber. Chem. Ges.*, 1941, 74, 73.
- (15) BROWN F.A., *Bull. Soc. Biol.*, 1934, 67, 365.
- (16) BUSSON A., *Thèse Médecine*, Paris, 1933.
- (17) CALLISON E.C. et KNOWLES V.H., *Am. J. Physiol.*, 1945, 143, 444.
- (18) CANNON M.D., *Proc. Exp. Biol. Med.*, 1940, 44, 129.
- (19) CARR F.H. et PRICE E.A., *Biochem. J.*, 1926, 20, 297.
- (20) CHAIX-AUDEMARD P., *Thèse Médecine*, Lyon, 1933.
- (21) CHARDENOT P., *Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Alger. 1956.
- (22) CHECHAN C., GRANGAUD R. et MASSONET R., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1025.
- (23) CHEVALLIER A., *Zeitsch. für Vit.*, 1938, 7, 10.
- (24) CHEVALLIER A., La vitamine A, in *Traité de Physiologie normale et pathologique* publié sous la direction de G.H. ROGER et Léon BINET, 12, (supp.), 237.
- (25) CHEVALLIER A., AUGIER P. et CHORON Y., *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 1009.
- (26) CHEVALLIER A. et BAERT H., *C.R. Soc. Biol.*, 1934, 116, 1037.
- (27) CLAUSEN S.W., *J. Am. Med. Ass.*, 1938, 144, 111.
- (28) CORMIER M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 30, 931.
- (29) COURBIERES M., *Thèse Médecine*, Lyon, 1936.
- (30) COWARD K.H., *Biological Standardisation of the vitamins*, Nlle éd., 1941.
- (31) COWARD K.H., *Biochem. J.*, 1932, 12, 691.
- (32) COWARD K.H., CAMBDEN M.R. et LEE E.M., 1935, 29, 2736.
- (33) COWARD K.H., DYER F.J. et MORGAN R.A., *Biochem. J.*, 1930, 24, 1952.
- (34) COWARD K.H. et KEY K.M., *Biochem. J.*, 1934, 28, 870.
- (35) CRIMM P.D. et SHORT J.M., *Am. J. Physiol.*, 1938, 124, 168.
- (36) DANN W.J., *Biochem. J.*, 1932, 26, 1072.
- (37) DANN W.J., *Biochem. J.*, 1933, 27, 1998.
- (38) DANN W.J., *Biochem. J.*, 1934, 28, 634.
- (39) DANN W.J., *Biochem. J.*, 1936, 30, 1644.
- (40) DAVIDSON D.M. et SOBEL A.E., *Journ. of Investigative Dermatology*, Baltimore, 1949, 4, 221.
- (41) DAVIES A.W. et MOORE T., *Nature*, London, 1941, 47, 794.
- (42) DAY P.L., *Vitamins and Hormones*, 1944, 2, 71.
- (43) DIEUZEIDE R., Les Crevettes des Côtes d'Algérie, *Extrait des Débats et Documents techniques du Conseil général des Pêches pour la Méditerranée*, décembre 1951.
- (44) DIEUZEIDE R., *Station d'Aquiculture et de Pêche de Castiglione, Nelle Série*, 1950, 2, 35.

- (45) DUBOULOZ P. et GASQUY L., *C.R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 621.
(46) DUBOULOZ P., PISTONE G. et MARVILLE R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1273.
(47) DRUMMOND J.C., *Biochem. J.*, 1919, 13, 95.
(48) EDISBURY J.R., LOVERN J.A. et MORTON R.A., *Biochem. J.*, 1938, 32, 116.
(49) EMERIQUE L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, 14, 305.
(50) EMERIQUE L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 1221.
(51) ERSHOFF B.H., cité par RUBIN S. et RITTER E., (199), p. 127.
(52) ESH G.C. and SUKHAMOY BHATTACHARYA, *The Indian Journ. of Physiol. and allied Sciences*, 5, n° 1, 1951.
(53) EULER H., HELLSTROM H. et KLUSSMANN E., *Hoppe-Seyl. Z.*, 1934, 228, 77.
(54) EULER H., HELLSTROM H. et KLUSSMANN E., *Z. fur Physiol. Chem.*, 1934, 225, 77.
(55) EVANS H.M., *Proc. Nat. Ac. Sc.*, 1925.
(56) EVANS H.M. et BISHOP K.S., *J. Metab. Research.*, 1922, 1.
(57) EVANS H.M. et BISHOP K.S., *J. Metab. Research.*, 1923, 23.
(58) FISHER L.R., KON S.K. et THOMPSON S.Y., *Biochem.*, 1951, 49, xv.
(59) FISHER L.R., KON S.K. et THOMPSON S.K., *II^e Congrès International de Biochimie*, Paris, 1952.
(60) FISHER L.R., KON S.K. et THOMSON S.Y., *J. Mar. Biol. Assoc., U.K.*, 1952, 31, 229.
(61) FISHER L.R., KON S.K., PLACK H.A. et THOMPSON S.Y., *III^e Congrès International de Biochimie*, Bruxelles 1955.
(62) FISHER L.R., KON S.K. et THOMSON S.Y., *Bull. Inst. Monaco*, 1953, 50, n° 102.
(63) FRANCK G., *Le Concours médical*, 1951, 40, 3283.
(64) GIROUD A. et DESCLAUX P., *C.R. Ac. Med.*, 1947.
(65) GIROUD A. et MARTINET M., *C.R. Soc. Biol.*, 1955, 149, n° 11-12, 1088.
(66) GIROUD A. et MARTINET M., *Et. neo-nat. Fr.*, 1956, 5, n° 2, 55.
(67) GOODWIN T.W., *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Chapman and Hall, 1952.
(68) GOODWIN T.W., DEWAR A.D. et GREGORY R.A., *Biochem. J.*, 1946, 40, lx.
(69) GOODWIN T.W. et SRISUKH S., *Biochem. J.*, 1949, 45, 268.
(70) GOSS J. et GUILBERT R., *J. Nutrition*, 1939, 18, 169.
(71) GRANGAUD R., *Thèse de Doctorat ès-sciences physiques*, Lyon, 1950.
(72) GRANGAUD R., *L'Astaxanthine, nouveau facteur vitaminique A. Actualités biochimiques*, publiées sous la direction de Marcel FLORKIN et Jean ROCHE, fasc. n° 15, Desoer. ed., Liège, 1951.
(73) GRANGAUD R., *Exposés annuels de Biochimie*, XI série.
(74) GRANGAUD R., *Tunisie médicale*, 1951, juillet-août.
(75) GRANGAUD R. et CHARDENOT P., *C.R. Acad. Sc.*, 1956, 242, 1767.
(76) GRANGAUD R., CHECHAN C. et MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 1179.
(77) GRANGAUD R., CHECHAN C. et MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1022.
(78) GRANGAUD R., CHECHAN C., MASSONET R. et ODIER M., *Bull. Soc. Biol.*, 1950, 32, 245.
(79) GRANGAUD R., DIEUZEIDE R., MASSONET R. et DOUARD T., *C.R. Acad. Sc.*, 1952, 235, 213.
(80) GRANGAUD R. et MASSONET R., *C.R. Acad. Sc.*, 1948, 227, 568.
(81) GRANGAUD R. et MASSONET R., *VIII^e Congrès de Chimie biologique*, Paris, 1948, in *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 231.
(82) GRANGAUD R. et MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1030.
(83) GRANGAUD R. et MASSONET R., *C.R. Acad. Sc.*, 1950, 230, 1319.
(84) GRANGAUD R. et MASSONET R., *Tunisie Médicale*, 1951, juillet-août.
(85) GRANGAUD R. et MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1954, 148, 1392.
(86) GRANGAUD R. et MASSONET R., *C.R. Acad. Sc.*, 1955, 241, 1087.

- (87) GRANGAUD R. et MASSONET R., *Arch. Sc. Physiol.*, 1955, 9, 245.
(88) GRANGAUD R. et MASSONET R., *Bulletin des Travaux publiés par la Station d'Aquiculture et de Pêche de Castiglione*, Nlle série, 1953, n° 4.
(89) GRANGAUD R., MASSONET R. et DOUARD T., *II^e Congrès International de Biologie*, Paris, 1952.
(90) GRANGAUD R., MASSONET R. et LARROQUE H., *C.R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 1181.
(91) GRANGAUD R., MASSONET R. et SANSAC A., *C.R. Soc. Biol.*, 1954, 148, 533.
(92) GRANGAUD R., VIGNAIS P., MASSONET R. et MOATTI J.P., *C.R. Acad. Sc.*, 1956, 243, 1170.
(93) GRANGAUD R., VIGNAIS P., MASSONET R. et MOATTI J.P., *...IV^e Journées Biochimiques franco-helvético-hispano-italiennes*, Montpellier, mai 1957, in *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 1271.
(94) GRAY E., MARGAREIDGE L.B. et CAWLEY J.D., *J. Nutrition*, 1940, 67, 20.
(95) GREEN H.N., *Brit. Med. Journ.*, 1931, 2, 595.
(96) GRUVEL A., *Station d'Aquiculture et de Pêche de Castiglione*, 1926, 2^e fascicule.
(97) GUILBERT H.R. et HART C.H., *J. Nutrition*, 1935, 10, 409.
(98) GUILBERT H.R., MILLER R.F. et HUGUES E.H., *J. Nutrition*, 1937, 13, 143.
(99) HEBERT J.W. et EVANS H.M., *J. Biol. Chem.*, 1928, 77, 651.
(100) HEBERT J.W. et MORGAN A.F., *J. Nutrition*, 1953, 50, 175.
(101) HEDENBERG I., *Aact. Chir. Scand.*, 1954, 191 (suppl.).
(102) HEINSIUS F., cité par CHEVALLIER 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.
(103) HENRY K.N., KON S.K., MAWSON E.H., STANIER J.E. et THOMPSON S.Y., *Brit. J. Nutrit.*, 1949, 3, 301.
(104) HERISSET T.A., *C.R. Acad. Sc.*, 1946, 223, 47.
(105) HICKMANN K., *Annual Review*, 1943, 12, 353.
(106) HICKMANN K., KALEY M.W. et HARRIS P.L., *J. Biol. Chem.*, 1944, 152, 303.
(107) HIGH E.G., SMITH M.C., TAYLOR H.H. et WILSON S.S., *J. Biol. Chem.*, 1954, 210, 681.
(108) HOLWEG W. et DOHRN M., *Biochem. J.*, 1956, 30, 952.
(109) MORTON P.B., MURILL W.A. et CURTIS A., *J. Clin. Invest.*, 1941, 20, 387.
(110) HUME E.M. et CHICK H., *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser.*, 1935, n° 202.
(111) HUME E.M. et CHICK H., *J. Nutrition*, 1944, 27, 477.
(112) HUME E.M. et SMITH M.C., *Biochem. J.*, 1928, 22, 504.
(113) INHOFFEN H.H. et POMMER H., in Sebrell et Harris, *The Vitamins*, 1954, 1, Academic Press Inc. publ., New York.
(114) IRVING J.T. et RICHARDS M.B., *Brit. J. Nutrit.*, 1956, 10, 7.
(115) JAMESON K.A., cité par LEDERER E. (136), p. 586.
(116) JAVILLIER M. et EMERIQUE L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 43, 771.
(117) JOHNSON G. et BAUMANN C.A., *J. Biol. Chem.*, 1947, 171, 513.
(118) JOYET-LAVERGNE P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 18, 1050.
(119) KAGAN B.M., JORDAN D.A. et GERALD P.S., *J. Nutrition*, 1950, 40, 275.
(120) KARRER P. et coll., cités par KARRER P. et JUCKER E., (121), p. 233.
(121) KARRER P. et JUCKER E., *Carotinoïdes*, Verl. Biskhauser, Basel, 1948.
(122) KING H.D., *Journ. Exper. Zool.*, 1918, 26, 1.
(123) KOBOZIEFF N. et POMRIASKINSKI N.A., *C.R. Soc. Biol.*, 1937, 126, 35.
(124) KON S.K., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 209.
(125) KON S.K., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 213.
(126) KON S.K., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 216.
(127) KON S.K. et THOMPSON S.Y., *Biochem. J.*, 1949, 45, xxi.

- (128) KON S.K. et THOMPSON S.Y., *Biochem. J.*, 1949, 45, xxxi.
 (129) KON S.K. et THOMPSON S.Y., *Biochem. J.*, 1951, 48, x.
 (130) KUHN R., LEDERER E. et DEUTSCH A., *Z. Physiol. Chem.*, 1933, 220, 229.
 (131) KUHN R. et LEDERER E., *Ber. Chem. Ges.*, 1933, 66, 488.
 (132) KUHN R. et SORENSEN N.A., *Ber. Chem. Ges.*, 1938, 71, 1879.
 (133) KUHN R., STENE J. et SORENSEN N., *Ber. Chem. Ges.*, 1939, 72, 1688.
 (134) KUHN R. et WINTERSTEIN A., *Ber. Chem. Ges.*, 1935, 66, 209.
 (135) LECLERQ R., *Gaz Med. Fr.*, 1950, 57, 1295.
 (136) LEDERER E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 555.
 (137) LEDERER E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 585.
 (138) LEDERER E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 586.
 (139) LEDERER E., ROSANOVA V.A., GILLAM A. et HEILBRON I.M., *Nature*, 1937, 140, 233.
 (140) LEWIS J.M., BODANSKY O., FALK K.G. et Mc GUIRE G., *J. Nutrition*, 1942, 23, 351.
 (141) LONGS J.A. et EVANS H.N., *Memoire of the University of Californie*, 1922, n° 6.
 (142) LOVERN J.A., EDISBURY J.R. et MORTON R.A., *Nature*, London, 1937, 140, 265.
 (143) LOVERN J.A. et SHARP P., *Biochem. J.*, 1933, 27, 1470.
 (144) LOVERN J.A., *Nature*, London, 1937, 140, 276.
 (145) LOWE J.S. et MORTON R.A., *Vitamins et Hormones*, 1956, 14, 111.
 (146) LWOFF A., *Bull. Biol.*, France et Belgique, 1927, 61, 193.
 (147) Mc CARTHY P.T. et CERECEDO L.R., *J. Nutrition*, 1952, 46, 361.
 (148) Mc MUNN C.A., *Proc. Roy. Soc.*, 1883, 35, 370.
 (149) Mc WALTER R.C. et DRUMMOND J.C., *Biochem. J.*, 1933, 27.
 (150) MALY R., cité par KARRER P. et JUCKER E., (121).
 (151) MANNERING C.J., *Vitamins et Hormones*, 1949, 7, 201.
 (152) MASON K.E., *Am. J. Anat.*, 1935, 57, 303.
 (153) MASON K.E., *Am. J. Physiol.*, 1940, 131, 268.
 (154) MASON K.E., in SEBRELL et HARRIS, *The Vitamins*, 1954, Academic Press Inc. Publ. New York.
 (155) MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 1178.
 (156) MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1950, 144, 1028.
 (157) MASSONET R., *II^e Congrès International de Biochimie*, Paris, 1952.
 (158) MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1955, 149, 197.
 (159) MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 171.
 (160) MASSONET R., *C.R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 529.
 (160 bis) MASSONET R., *4^e Congrès International de Nutrition*, Paris 1957.
 (161) MAST S., *Zeitsch. Exp. Zool.*, 1917, 22, 471.
 (162) MATTSON F.H., MEHL J.W. et DEUEL H.J., *Arch. Biochem.*, 1947, 15, 67.
 (163) MAYER J. et KREHL A.W., *J. Nutrition*, 1948, 35, 523.
 (164) MELLAMBY E. et GREEN H.N., *Brit Med. Journ.*, 1928, octobre.
 (165) MEREJKOWSKI C., *C.R. Acad. Sc.*, 1881, 93, 1029.
 (166) MEUNIER P., FERRANDO R. et CHENAVER P., *C.R. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 142, 525.
 (167) MEUNIER P. et RAOUL Y., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, 20, 861.
 (168) MEUNIER P. et RAOUL Y., *Le diagnostic chimique des Avitaminoses*, Masson et Co édit. Paris, 1942.
 (169) MOORE T., *Biochem. J.*, 1940, 34, 1321.
 (169) bis MOORE T., *Vitamine A*, Elsevier Publishing Company Ed., Lond., 1957.
 (170) MOORE R. et MARK J., *J. Exp. Mod.*, 1936, 64, 1.
 (171) MOORE T., MARTIN A.J.P. et RAJAGOPAL K.R., *Vitamine E symposium Heffer*, Cambridge, 1939.
 (172) MOORE T. et SHARMAN I.M., *Brit. J. Nutrition*, 1951, 5, 119.
 (173) MOORE T., SHARMAN I.M. et WARD R., *Biochem. J.*, 1950, 47, xliii.
 (174) MORGAN A.F., *North. Am. Veterinarian*, 1940, 4, 476.
 (175) MORTON R.A. et CREED R.H., *Biochem. J.*, 1939, 33, 318.

- (176) MORTON R.A., *The Application of Absorption Spectra to the Study of Vitamins Hormones et Coenzymes*, Adam Hilger édit., London, 1942.
 (177) MOSELEY N.N., cité par KUHN R. et LEDERER E., (131).
 (178) MOURIQUAND G. et CHAIX P., *C.R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 538.
 (179) NELSON V.E., *Am. J. Physiol.*, 1922, 59, 335.
 (180) NEWTON W.H., *J. Physiol.*, 1938, 92, 32.
 (181) ORTEN A., BURN A.H. et SMITH M.C., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1937, 36, 82.
 (182) OSBORNE T.H. et MENDEL L.B., *Journ. Am. Ass.*, 1917, 69, 32.
 (183) OSBORNE T.H. et MENDEL L.B., *J. Biol. Chem.*, 1919, 37, 559.
 (184) OSBORNE T.H. et MENDEL L.B., *Journ. Am. Ass.*, 1921, 76, 905.
 (185) PAUL H.E. et PAUL M.F., *J. Nutrition*, 1946, 31, 67.
 (186) PENAU H. et SIMONNET H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, 4, 192.
 (187) PLANEL H., SARDON R. et GUILHEM A., *C.R. Soc. Biol.*, 1955, 149, 199.
 (188) QUACKENBUSH F.W., COX R.P. and STEENBOCK H., *J. Biol. Chem.*, 1941, 145, 169.
 (189) RANDOIN L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, 17, 62.
 (190) RANDOIN L., *Bull. Soc. Hyg. Alim.*, 1948, 36, 95.
 (191) RANDOIN L. et CAUSERET J., *Bull. Soc. Hyg. Alim.*, 1947, 35, 14.
 (192) RANDOIN L., HUGOT D. et CAUSERET J., *J. Acad. Med.*, 1950, Séance du 24 décembre.
 (193) RANDOIN L. et LE GALLIC P., *C.R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 635.
 (194) RANDOIN L. et NETTER, *C.R. Acad. Sc.*, 1934, 198, 395.
 (195) RANDOIN L. et QUEUILLES S., *C.R. Acad. Sc.*, 1934, 198, 1942.
 (196) RANDOIN L. et QUEUILLES S., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 18, 1789.
 (197) REISS F. et CAMPBELL R.H., *La semaine des Hôpitaux*, 1954, 26, 1666.
 (198) RICHARDS M.B. et SIMPSON S.W., *Biochem. J.*, 1934, 28, 1274.
 (199) RUBIN S.H. et de RITTER E., *Vitamins et Hormones*, 1954, 12, 108.
 (200) SCHOUR I, SMITH M.C. et HOFFMANN M.M., *Journ. Dent. Research*, 1939, 18, 163.
 (201) SERFATY A. et OLIVEREAU M., *Journ. Physiol.*, 1955, 47, 5-6.
 (202) SERGENT Ed. et SERGENT E., *Académie des Sciences coloniales*, séance du 20 juin 1934.
 (203) SERGENT Ed. et SERGENT E., *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 1939, 17, n° 1.
 (204) SEXTON E.L., MEHL J.W. et DEUEL H.J., *J. Nutrition*, 1946, 31, 299.
 (205) SHANTZ E.M. et BRINKMANN J.H., *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 467.
 (206) SHERMAN H.C. et BATCHELDER E.L., *J. Biol. Chem.*, 1931, 91, 505.
 (207) SHERMAN H.C. et CAMPBELL H.L., UDILJAK M. et YARMOLINSKY H., *Proc. National Sc. U.S.*, 1945, 31, 107.
 (208) SHERMAN H.C. et MUNSELL H.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1925, 47, 1539.
 (209) SHERMANN H.C. et TRUPP H.Y., *Proc. National Acad. Sc. U.S.*, 1949, 35, 90.
 (210) SHERMAN H.C. et TRUPP H.Y., *J. Nutrition*, 1949, 37, 467.
 (211) SIMONNET H., *Thèse de Doctorat ès-sciences naturelles*, Paris, 1925.
 (212) SIMONNET H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, 5, 739.
 (213) SMITH M.C. et LANTZ E.M., *J. of Home Econ.*, 1933, 25, n° 5.
 (214) SOBEL A.E., BESMAN L. et KRAMER B., *J. Dis. Child.*, 1949, 77, 575.
 (215) SORENSEN N.A., *Kgl. Norsk. Vidensk. Sk.*, 1936, cité par LEDERER (126) p. 584.
 (216) STEENBOCK H. et COWARD K.M., *J. Biol. Chem.*, 1927, 72, 765.
 (217) STERN K.G. et SALOMON K., *J. Biol. Chem.*, 1938, 122, 461.
 (218) STEVEN D.M., *Nature*, London, 1947, 160, 540.
 (219) STRAIN H.H. et MANNING W.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, 66, 1522.
 (220) SURE B., *Endocrinology*, 1938, 23, 575.
 (221) TAPPEL A.L., *Arch. Biochem. and Biophysic.*, 1954, 50, 473.
 (222) TEISSIER G.A., *C.R. Soc. Biol.*, 1932, 109, 813.
 (223) TEULON H., MARNAY C. et GOUNELLE H., *C.R. Soc. Biol.*, 1951, 145, 831.
 (224) THOMPSON S.Y., GANGULY J. et KON S.K., *Brit. J. Nutrit.*, 1947, 1, 5.
 (225) TISHER J., *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1938, 252, 225.
 (226) TRUSCOTT B.L. et VAN WAGENEN G., cités par RUBIN S.H. et de RITTER E. (199), p. 110.
 (227) VAN LEERSUM E.G., *Journ. Biol. Chem.*, 1928, 76, 137.
 (228) VERNE J., *C.R. Soc. Biol.*, 1920, 83, 963.
 (229) VERNE J., *C.R. Soc. Biol.*, 1920, 83, 988.

- (230) VERNE J., Thèse de Doctorat ès-sciences naturelles, Paris, 1921.
 (231) VILLARD D.H. et VIALLEFONT H., Soc. Sc. Med. et Biol., Montpellier, 1935, avril.
 (232) WAGNER K.H., Vitamin A and carotin des Fin-Blau und SpermWals, Verl. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1939.
 (233) WALD G., Nature, London, 1937, 139, 1017.
 (234) WALD G., Amer. J. Physiol., 1914-1942, 133, 235.
 (235) WALD G., Vitamins and Hormones, 1943, 2, 195.
 (236) WALD G. et ZUSSMANN H., Nature, London, 1937, 140, 197.
 (237) WALD G., NATHANSON N., JENCKS W.P. et TARR E., The Biological Bulletin, 1948, 95, 249.
 (238) WARKANY J. et SCHRAFFEMBERGER E., J. Nutrition, 1944, 27, 477.
 (239) WEEK E.F. and SEVIGNE F.J., J. Nutrition, 1949, 39, 251.
 (240) WIESE G.E., MEHL J.W. et DEUEL H.J., Jr., Arch. Biochem., 1947, 15, 65.
 (241) WILSON J.C. et WARKANY J., J. Am. Anat., 1948, 83, 357.
 (242) WITH T.K. et WANSCHER O., Nord. Med., 1939, 4, 341.
 (243) WOLBACH S.B., in SEBRELL et HARRIS, The Vitamins, 1954, I, Academic Press Inc. Publ. New York.
 (244) WOLBACH S.B. et HOWE P.R., Journ. Exper. Med., 1925, 42, 753.
 (245) WOLBACH S.B. et HOWE P.R., Am. Journ. Path., 1933, 9, 275.
 (246) ZECHMEISTER L., LE ROSEN A.L., WENT F.W. et PAULING L., Proc. Nat. Acad. Sc., 1941, 27, 468.
 (247) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER M.A., J. Biol. Chem., 1942, 144, 315.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 8

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

MATERIEL D'ETUDE	14
A - REPARTITION GEOGRAPHIQUE - DONNEES ECOLOGIQUES	14
B - MORPHOLOGIE	16
C - ETUDE BIOLOGIQUE	18
1° VITAMINE A ET CAROTENES CHEZ LES CRUSTACES	18
a) VITAMINE A	18
Historique	18
Partie expérimentale	21
b) CAROTENES	26
Historique	26
Partie expérimentale	26
2° L'ASTAXANTHINE CHEZ LES CRUSTACES	27
a) ASTAXANTHINE LIBRE ET ESTERIFIEE ..	27
b) STERÉOISOMERES	31
c) CHROMOPROTEIDES	32
d) TECHNIQUE DE PREPARATION DES EXTRAITS	37
D - TECHNIQUE DES ESSAIS BIOLOGIQUES	
1° ANIMAL-REACTIF	41
2° CONDITIONS D'ETUDE DE LA CARENCE EN VITAMINE A	43
a) REGIMES SYNTHETIQUES	43
b) AVITAMINOSE EXPERIMENTALE	45
c) REVERSIBILITE DE LA CARENCE	47
d) ETUDE DES VARIATIONS DE LA RESERVE HEPATIQUE EN VITAMINE A	49
3° ETUDE DE L'ACTIVITE VITAMINIQUE A	50
a) METHODE CURATIVE	53
b) METHODE PREVENTIVE	55
c) RELATION ENTRE LA DOSE DE VITAMINE A ADMINISTREE ET LA SURVIE	57
d) DISCUSSION	58

CHAPITRE VI

EXAMENS

ANATOMO-PATHOLOGIQUES

	Pages
A - EXAMENS ANATOMO-PATHOLOGIQUES DE RATS CARENCES EN VITAMINE A	114
B - EXAMENS ANATOMO-PATHOLOGIQUES DE RATS CARENCES TRAITES PAR L'ASTAXANTHINE	116
1° RATS TRAITES PAR DES HUILES ENTIERES D'HEPATO-PANCREAS D'ARISTEUS ANTENNATUS	117
2° RATS TRAITES PAR DES ESTERS D'ASTAXANTHINE	118
3° RATS TRAITES PAR INJECTIONS DE CHROMOPROTEIDES	119
4° DISCUSSION	120

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LA BIOGENESE
DE LA VITAMINE A DES POISSONS

A - DONNEES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DE LA VITAMINE A DES POISSONS	124
B - CONTRIBUTION EXPERIMENTALE	124
1° MATERIEL D'ETUDE	124
2° RESULTATS EXPERIMENTAUX	128
3° DISCUSSION	130
a) DEMONSTRATION DE LA TRANSFORMATION DE L'ASTAXANTHINE EN VITAMINE A	130
b) ETUDE DE LA NATURE DE LA VITAMINE A NEOFORMEE	130
c) CINETIQUE ET ETAPE DE LA TRANSFORMATION DE L'ASTAXANTHINE EN VITAMINE A	133
d) DISCUSSION	134
RESUME GENERAL ET CONCLUSIONS	137
BIBLIOGRAPHIE	141
TABLE DES MATIERES	147

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

CAROTENOIDES ET VITAMINE A
CHEZ LES INVERTEBRES MARINS

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. CORDIER
MENTZER
CHOPIN
DESSAUX

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
R. DOUIN.

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 13 mars 1958.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université
A. ALLIX.

Imprimerie F. F O N T A N A

3, Rue Pélissier — Alger

Dépôt légal 1.563 Octobre 1960
