

PHYSIOLOGIE. — *Transformation de l'astaxanthine en vitamine A chez le Rat albinos : néoformation in vivo et in vitro.* Note (\*) de M. RENÉ GRANGAUD, M<sup>lle</sup> RENÉE MASSONET, M<sup>mes</sup> THÉRÈSE CONQUY et JACQUELINE RIDOLFO, présentée par M. Robert Courrier.

Chez le Rat carencé, l'administration *per os* de diacétate d'astaxanthine provoque une néoformation de vitamine A décelable au niveau de l'œil. L'expérimentation *in vitro* permet de préciser que cet organe est bien le siège de la transformation enzymatique qui conduit de l'astaxanthine au rétinol.

Chez le Rat albinos carencé en vitamine A, l'astaxanthine (3.3'-dihydroxy-4.4'-dicéto- $\beta$ -carotène) manifeste une activité électivement anti-xérophthalmique. En effet, l'administration quotidienne de 10 à 15  $\mu$ g de pigment guérit rapidement les lésions oculaires sans provoquer d'accroissement pondéral qui ne s'observe qu'avec des doses nettement supérieures (1) à (4). Pour les Poissons cependant, l'astaxanthine est une provitamine A authentique car chez *Gambusia holbrooki*, elle conduit à une néoformation de rétinol décelable en particulier dans la muqueuse intestinale (5), (6), (7). La confrontation de ces faits suggère que le Rat pourrait avoir conservé au niveau de l'œil la faculté restreinte de convertir l'astaxanthine en vitamine A. Telle est du moins l'hypothèse qui a été soumise à la sanction expérimentale.

Dans une première expérience, du diacétate d'astaxanthine a été administré à des rats carencés qui ont ensuite été sacrifiés en même temps que des témoins et la vitamine A a été dosée parallèlement dans les yeux de chaque catégorie de sujets. Dans la seconde expérience, les yeux d'animaux carencés ont été divisés en deux lots : le premier a été incubé en présence de diacétate d'astaxanthine, le second a été traité de même, mais sans adjonction de pigment; les concentrations respectives en rétinol ont ensuite été déterminées.

PRÉPARATION DU DIACÉTATE D'ASTAXANTHINE. — Les parois des poches stomacales d'*Aristeomorpha foliacea*, Risso, et d'*Aristeus antennatus*, Risso (grosses crevettes rouges de la tribu des Pénéidés) contiennent un chromoprotéide bleu dont le groupement prosthétique est l'astaxanthine (8). Après dissection, les poches sont vidées de leur contenu et agitées avec de l'eau distillée où le chromoprotéide se dissout. La solution est alors additionnée de quatre fois son volume d'acétone : l'astaxanthine se détache de sa copule protéique et la solution se colore en rouge orangé. Par addition d'éther de pétrole et d'eau, le pigment passe dans la phase légère qui est séparée et séchée sur-sulfate de sodium anhydre. La solution est filtrée sur colonne de magnésie qui est ensuite lavée à l'éther de pétrole, puis avec de l'hexane additionné de 2 vol % d'acétone (élimination des carotènes et

des esters de vitamine A) et enfin avec un mélange de 92 ml d'hexane et de 8 ml d'éthanol (élimination du rétinol). La colonne est alors tronçonnée, la zone pigmentée est immergée dans de la pyridine qui par élution se colore en rouge. La solution concentrée sous pression réduite et sous azote est additionnée d'anhydride acétique (XX gouttes/ml). Après 9 h à la température ambiante, le diacétate est repris par l'éther de pétrole. La solution est lavée, séchée et chromatographiée sur alumine. La colonne est traitée comme celle de magnésie. La solution pyridinique finalement obtenue est additionnée d'éther de pétrole et d'eau. La phase légère est séparée, séchée et concentrée. Le résidu est repris par la pyridine chaude, additionné d'un tiers de volume d'eau et abandonné 24 h à 0° C. Le précipité cristallin est purifié par deux recristallisations.

**PROTOCOLES ET RÉSULTATS.** — *a. Expérience in vivo.* — 18 rats Wistar, pesant 32 g sont sevrés et soumis au régime de base exempt de facteurs vitaminiques A. Après 40 jours, les signes de carence étant manifestes, les animaux sont partagés en trois lots recevant quotidiennement :

Lot A : régime de base seul; lot B : régime de base + 3  $\mu$ g de vitamine A<sup>(8)</sup>; lot C : régime de base + 15  $\mu$ g de diacétate d'astaxanthine<sup>(9)</sup>. Après 20 jours, les animaux sont décapités et les rétines sont prélevées selon<sup>(9)</sup>. Les résultats des dosages de vitamine A effectués selon<sup>(4)</sup> sur l'insaponifiable de l'ensemble des rétines de chaque lot sont :

Lot A : traces; lot B : 1  $\mu$ g; lot C : 2,1  $\mu$ g.

*b. Expérience in vitro.* — 12 rats carencés dans les mêmes conditions que les précédents sont décapités au 40<sup>e</sup> jour. Dans deux petits sacs de collodion, on introduit 1 ml de sérum sanguin frais et 1 mmole d' $\alpha$ -tocophérol dispersée dans 1 ml d'eau. Dans l'un des sacs, on place les yeux droits de six des sujets et les yeux gauches des six autres (lot I); dans le deuxième sac, on introduit les 12 yeux restants (lot II) et 1 mg de diacétate d'astaxanthine en dispersion dans 1 ml de Tween 80. Les sacs sont immergés dans une solution tamponnée de Krebs-Ringer et maintenus à l'étuve à 37° C pendant 12 h. Le dosage de la vitamine A effectué sur l'insaponifiable de la totalité des yeux de chaque lot fournit les valeurs suivantes :

Lot I : 0,75  $\mu$ g; lot II : 1,65  $\mu$ g.

*Discussion.* — L'étude spectrophotométrique de la solution de pigment avant chromatographie ne révèle ni vitamine A, ni carotène. Si des traces de ces substances avaient cependant échappé à l'examen, elles seraient éliminées par les lavages des colonnes pratiqués dans ce but selon<sup>(10)</sup>. La recristallisation du diacétate d'astaxanthine constitue enfin une dernière purification. Le contrôle suivant exclut d'ailleurs l'interférence d'une impureté : dans les mêmes conditions que celles de l'expérience *in vitro*, deux lots de fragments d'intestin de rats carencés ont été incubés en présence, l'un de  $\beta$ -carotène, l'autre de diacétate d'astaxanthine. Une néoformation de vitamine A été constatée uniquement dans le premier lot.

Ainsi, dans les conditions expérimentales décrites, *in vivo* comme *in vitro*, la vitamine A néoformée et décelée dans l'œil ne peut être due qu'à la transformation de l'astaxanthine. Des expériences complémentaires tenteront de préciser si, comme cela est vraisemblable, c'est la rétine qui effectue la conversion enzymatique.

*Conclusion.* — Les résultats enregistrés vérifient l'hypothèse de travail qui a dicté ces expériences : chez le Rat albinos carencé en vitamine A, l'administration de diacétate d'astaxanthine provoque une néoformation de rétinol au niveau de l'œil. L'expérimentation *in vitro* aboutit à la même constatation et localise en outre au tissu oculaire le siège de la réaction.

(\*) Séance du 13 mars 1961.

(1) R. GRANGAUD et M<sup>lle</sup> R. MASSONET, *Comptes rendus*, 227, 1948, p. 568.

(2) R. GRANGAUD et M<sup>lle</sup> R. MASSONET, *Comptes rendus*, 230, 1950, p. 1319.

(3) R. GRANGAUD, *Thèse de Doctorat ès sciences physiques*, Lyon, 1950.

(4) M<sup>lle</sup> R. MASSONET, *Thèse de Doctorat ès sciences naturelles*, Lyon, 1958.

(5) R. GRANGAUD et M<sup>lle</sup> R. MASSONET, *Comptes rendus*, 241, 1955, p. 1087.

(6) R. GRANGAUD, P. VIGNAIS, M<sup>lle</sup> R. MASSONET et J. P. MOATTI, *Comptes rendus*, 243, 1956, p. 1170.

(7) J. P. MOATTI, *Thèse de Doctorat d'État (Pharmacie)*, Alger, 1959.

(8) En solution dans de l'huile végétale dévitaminée additionnée de 2 % d' $\alpha$ -tocophérol.

(9) J. M. LEWIS, O. BODANSKY, K. G. FALK et G. Mc GUIRE, *J. Nutrition*, 23, 1941, p. 351.

(10) S. Y. THOMPSON, J. GANGULY et S. K. KON, *Brit. J. Nutr.*, 3, n° 1, 1949, p. 57.

(Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et Pharmacie d'Alger.)