

ÉTUDE DES PIGMENTS DES GONADES DE PECTENS AUSTRALIENS

par Antonio CRUZADO

Nous nous sommes proposé d'étudier les pigments caroténoïdes qui colorent les gonades de coquilles Saint-Jacques congelées d'origine australienne.

Le premier travail sur ce sujet a été fait par LEDERER qui a trouvé dans les gonades de *Pecten maximus* comme seul pigment important une xanthophylle à trois atomes d'oxygène ($C_{40}H_{54}O_3 \pm H_2$) présentant des maxima d'absorption à 457 et 487 m μ dans l'éther de pétrole et dénommée par lui « pectenoxanthine ». D'autres pigments, dont les quantités relatives varient selon la saison, accompagnent la « pectenoxanthine ». Ils ont le même spectre d'absorption que celle-ci. LEDERER a pu séparer jusqu'à six zones différentes par chromatographie.

Plus récemment, FISHER et coll. ont étudié la teneur en vitamine A et en caroténoïdes du même *Pecten maximus* (LINNAEUS). Ils ont trouvé surtout des xanthophylles et une trace de β -carotène, mais pas d'astaxanthine.

Enfin, GOODWIN remarque que chez les Lamellibranches on trouve des xanthophylles et des caroténoïdes à réaction acide mais pas d'astaxanthine.

Méthodes de travail.

Les pigments ont été extraits de deux manières différentes. Celle décrite par LEDERER à l'acétone donne quelquefois des émulsions très tenaces. Une seconde, utilisant comme solvant le chloroforme sur des gonades broyées avec du sulfate de sodium anhydre, a donné de très bons résultats. Le transfert des pigments du chloroforme à l'éther de pétrole a été fait par simple évaporation sous vide.

FRACTION	ELUANT
I.	E. de P. Acétone (99 : 1)
II.	E. de P. Acétone (97 : 3)
III.	E. de P. Acétone (96 : 4)
IV.	E. de P. Acétone (94 : 6)
V.	E. de P. Acétone (90 : 10)
VI.	E. de P. Acétone Ethanol (88 : 10 : 2)
VII.	E. de P. Acétone Ethanol (50 : 25 : 25)
VIII.	Potasse éthanolique 5 %

Les différents pigments ont été séparés par chromatographie sur colonne et d'après leur solubilité dans le méthanol à 90 %. La chromatographie sur colonne a été faite sur alumine avec l'éther de pétrole comme éluant, d'abord pur, puis additionné d'acétone en proportions croissantes, et enfin d'éthanol. Une fraction a dû être entraînée par la potasse éthanolique à 5 %. La composition des solvants successifs employés pour isoler les différentes fractions figure ci-dessus.

Le pigment élué par la potasse éthanolique a été récupéré en acidifiant légèrement l'éluat par l'acide acétique et en ajoutant un peu d'éther de pétrole; après agitation, il passe quantitativement dans la couche supérieure. Chaque bande a été purifiée par un second fractionnement sur colonne d'alumine. Les fractions éluées ont été évaporées sous vide et redissoutes dans le solvant utilisé pour faire les spectres d'absorption entre 350 et 550 m μ , avec un spectrophotomètre non enregistreur

Jobin-Yvon. Nous avons évité de faire les spectres dans l'éther de pétrole étant donné le manque de constance de sa composition.

Le traitement par le méthanol à 90 % sépare les pigments selon leur solubilité en deux fractions : épiphase (couche supérieure) et hypophase (couche inférieure). On sait que les xanthophylles restent dans la couche hypophase tandis que leurs esters ou les carbures passent dans la couche épiphase.

L'hydrolyse finale des fractions épiphases a été conduite en milieu homogène en y ajoutant quelques millilitres de potasse éthanolique à 5 %. Après douze heures, le milieu est additionné d'eau et d'éther de pétrole. Le pigment hydrolysé passe dans la couche supérieure. Pour récupérer celui qui a un caractère acide, il a fallu acidifier légèrement le milieu par l'acide acétique.

La pureté de toutes les substances isolées par les deux méthodes de fractionnement a été vérifiée par chromatographie sur couche mince. La méthode suivie a été adaptée de celle de BALLESTER pour les pigments du phytoplancton. Nous avons employé comme support le gel de silice H avec une très petite quantité d'acide ascorbique pour retarder l'oxydation des pigments. De cette façon, les plaques développées peuvent être gardées dans un réfrigérateur pendant plusieurs jours. Les plaques n'ont pas été activées, mais seulement séchées à l'air. L'éluant était un mélange d'éther de pétrole (Eb. 40 - 65 °C), d'acétate d'éthyle et de diéthylamine (68 : 23 : 9 v/v).

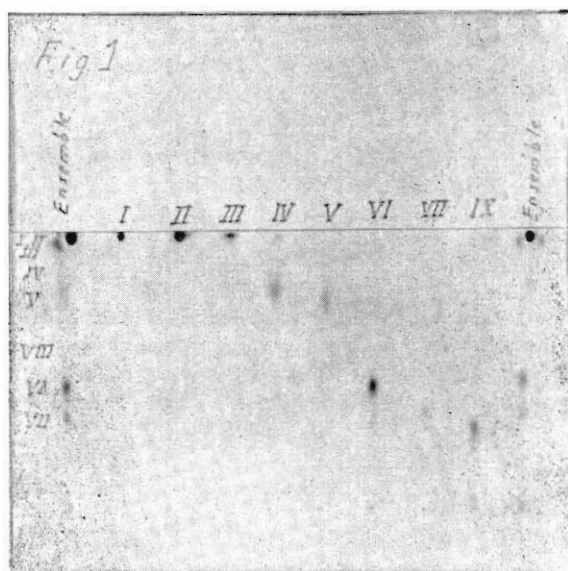


FIG. 1. — Chromatographie sur couche mince des pigments caroténoïdes des pectens australiens utilisant comme adsorbant le gel de silice H et comme éluant le mélange : éther de pétrole, acétate d'éthyle, diéthylamine (68 : 23 : 9 v/v). I à V esters de xanthophylle. VI à IX xanthophylles.

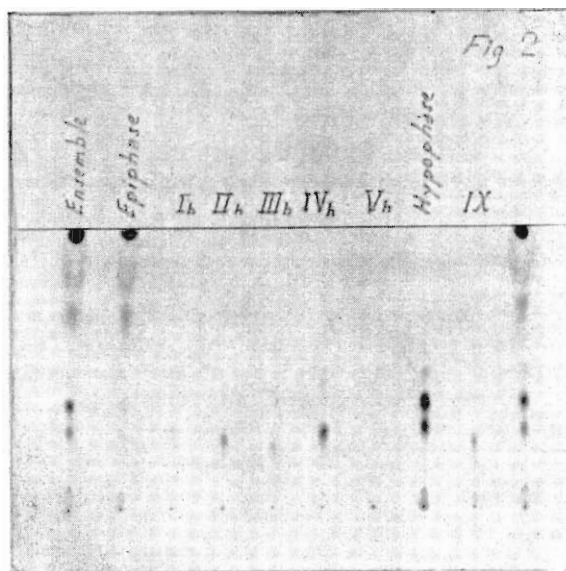


FIG. 2. — Chromatographie sur couche mince des pigments caroténoïdes des pectens australiens hydrolysés. Les colonnes « Ensemble », « Épiphase » et « Hypophase » sont données comme témoins.

Résultats obtenus.

La chromatographie sur colonne de l'extrait total a donné huit bandes, la chromatographie de l'épiphase cinq fractions, celle de l'hypophase trois. Quant au produit de l'hydrolyse, il a donné deux xanthophylles, une à réaction neutre et une à réaction acide.

La chromatographie sur couche mince définit sans ambiguïté huit bandes dans l'extrait originel, exactement comme la chromatographie sur colonne. Ni l'une ni l'autre ne donne donc d'artefact. La figure 1 montre la distribution des différents composants du mélange.

Les bandes I à V, épiphases, éluées de l'alumine sans alcool sont des esters de xanthophylle. Les bandes VI et VII sont des xanthophylles non estérifiées, la bande VIII est un caroténoïde à

réaction acide dont la composition change au cours de l'éluion par la potasse éthanolique; elle migre alors en IX. En fait, cette bande se divise en plusieurs anneaux distincts sur la colonne mais ceux-ci ne peuvent être séparés par l'éluant utilisé, le seul des solvants essayés qui soit capable de les entraîner.

L'hydrolyse des bandes I à V a donné les xanthophylles VII et IX (fig. 2) : les esters I et IV correspondent à la xanthophylle VII, les esters II, III et V à la xanthophylle IX.

La xanthophylle VI n'a pas été retrouvée sous forme d'ester.

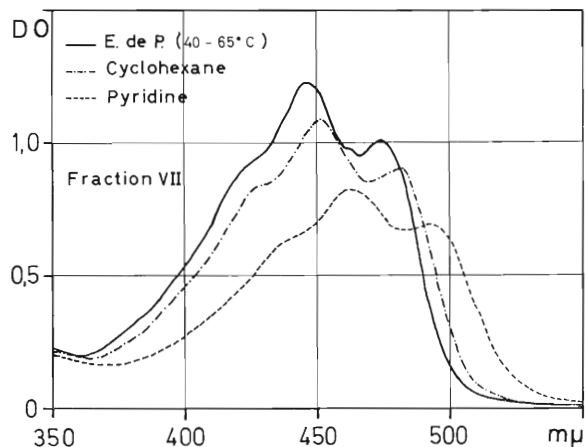


FIG. 3. — Spectres d'absorption de la xanthophylle VII et de deux de ses esters (I et IV). Solvant utilisé cyclohexane.

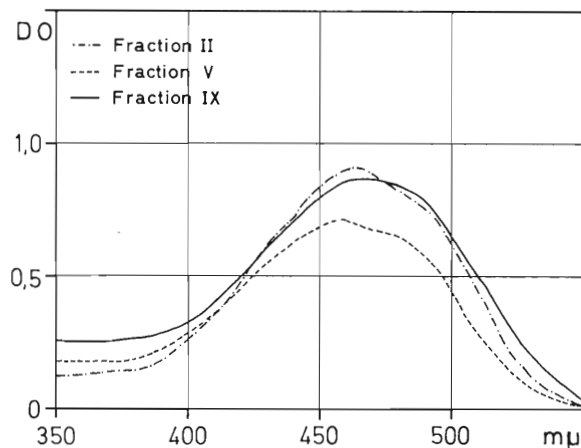


FIG. 4. — Spectres d'absorption de la xanthophylle à réaction acide IX et de ses esters (II et V). Solvant utilisé cyclohexane.

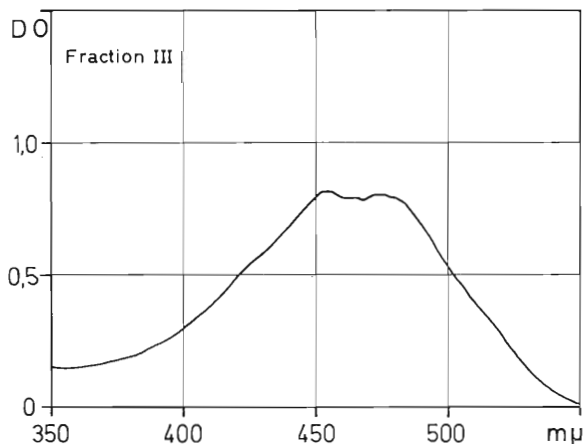


FIG. 5. — Spectre d'absorption de l'ester III. Solvant utilisé cyclohexane.

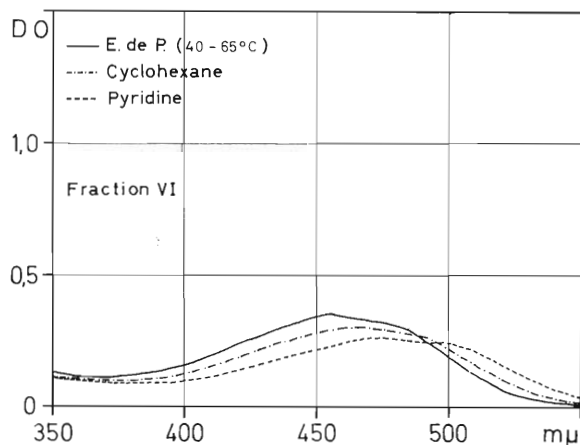


FIG. 6. — Spectre d'absorption de la xanthophylle VI dans plusieurs solvants.

Les spectres d'absorption entre 350 et 550 $m\mu$ des esters I et IV ressemblent bien à celui de la xanthophylle VII; leurs deux principaux pics sont seulement décalés de quelques $m\mu$ vers la droite (fig. 3). De la même façon, les spectres des esters II et V ont des formes qui rappellent celui assez peu caractéristique de la xanthophylle IX (fig. 4). Le spectre de l'ester III est plus différent (fig. 5).

Les spectres d'absorption dans différents solvants des trois xanthophylles sont donnés aux figures 6, 7 et 8. Les maxima des principales bandes des substances isolées sont rappelés dans le tableau 1.

En conclusion, aucun hydrocarbure n'a été trouvé parmi les pigments caroténoïdes des *Pectens* australiens. Par contre, nous avons séparé au moins trois xanthophylles dont une a un caracté-

tère acide. Ce n'est pas l'astaxanthine car elle n'a pas donné la couleur violette, décrite par ESTABLIER, en reprenant le produit de la saponification par l'eau. Les cinq esters qui ont été séparés par chromatographie sur alumine n'appartiennent qu'à deux des trois xanthophylles identifiés.

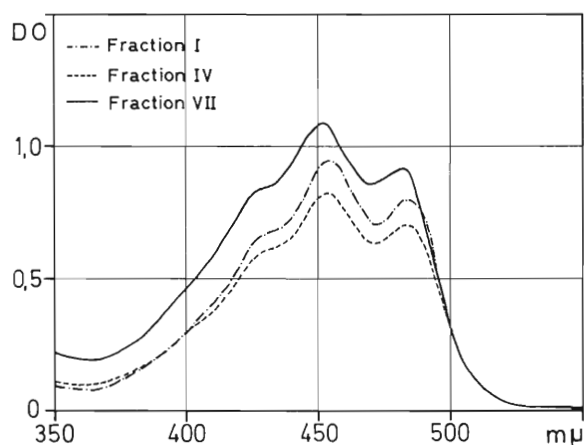


FIG. 7. — Spectre d'absorption de la xanthophylle VII dans plusieurs solvants.

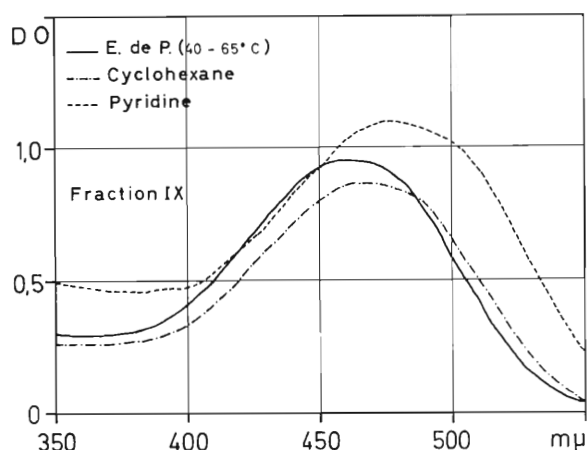


FIG. 8. — Spectre d'absorption de la xanthophylle à réaction acide IX dans plusieurs solvants.

N°	Fonction	Cyclohexane	Pyridine	E. de P.
I	ester	455 - 484		
II	ester	463		
III	ester	454 - 474		
IV	ester	453 - 483		
V	ester	458		
VI	xanth.	465	472	455
VII	xanth.	452 - 482	462 - 493	446 - 474
IX	xanth. ac.	467	477	461

TABLE. 1. — Principaux maxima d'absorption des caroténoïdes dans différents solvants.

Aucun pigment n'a été trouvé ayant les bandes d'absorption annoncées par LEDERER pour la « pectenoxanthine » (457 - 487 mμ ; la valeur 557 portée dans la publication est probablement une erreur typographique). Cela laisse place à deux suppositions. Ou bien la « pectenoxanthine » a été transformée au cours de la congélation et de l'entreposage, ce qui est très invraisemblable vu l'état de fraîcheur des mollusques, contrôlé notamment par dosage des bases azotées volatiles et des protéines dénaturées, les unes et les autres étant à des teneurs très faibles. Ou bien elle n'existait pas dans le mollusque frais ce qui serait plus logique étant donné qu'il s'agit d'espèces différentes.

BIBLIOGRAPHIE

- BALLESTER (A.), 1966. — Critica de los metodos espectrofotométrico y cromatográfico en el estudio de los pigmentos del plancton. — *Invest. Pesq.*, **30**, p. 613.
- ESTABLIER (R.), 1966. — Estudio sobre los carotenoides de plantas y animales marinos. I. Distribución de carotenoides en el crustáceo *Plesiopenaeus edwardsianus* (JOHNSON). — *Ibid.*, **30**, p. 207.
- FISHER (L.R.), KON (S.K.) et THOMPSON (S.Y.), 1956. — Vitamin A and carotenoids in certain invertebrates. — *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **35**, p. 41.
- GOODWIN (T.W.), 1952. — Comparative biochemistry of the carotenoids. — CHAPMANN and HALL.
- LEDERER (E.), 1938. — Recherches sur les caroténoïdes des invertébrés. — *Bull. Soc. Chim. biol. France*, **20**, p. 567.