

SUR LES PIGMENTS NAPHTOQUINONIQUES DES
ÉPINES ET DU TEST DES OURSINS
PARACENTROTUS LIVIDUS ET ARBACIA PUSTULOSA

par

EDGAR LEDERER

Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France)

Le présent mémoire contient, en partie, les résultats détaillés de recherches effectuées de Mai 1938 à Juillet 1939; par suite de la guerre, deux notes préliminaires seulement ont paru^{1,2}. La publication récente de GOODWIN ET SRISUKH³, mettant en doute quelques-uns de nos résultats, nous a incité à répéter la plupart des essais. Ceux-ci ont confirmé nos résultats antérieurs et nous ont apporté des précisions sur quelques nouveaux pigments. Les différents points litigieux ont pu être éclaircis en étroit contact avec T. W. GOODWIN à Liverpool et L. MUSAJO à Padoue. Nous avons publié ailleurs une mise au point commune⁴ sur la nomenclature des pigments en question (Tableau I).

Spinochrome A

LEDERER ET GLASER¹ ont appelé spinochrome un pigment chromatographiquement pur, isolé des épines et du test de *Paracentrotus lividus* (provenant de ROSCOFF, FINISTÈRE). Ce pigment cristallise en prismes violets, presque noirs, fondant à 185°,

TABLEAU I
NOMENCLATURE DES SPINOCHEMES (D'APRÈS GOODWIN, LEDERER ET MUSAJO⁴)

<i>Suffixe</i>	<i>p.f.</i>	<i>Formule</i>	<i>Ancien nom</i>	<i>Origine</i>	<i>Auteurs</i>
A	185°	C ₁₂ H ₁₀ O ₈	spinochrome	<i>P. lividus</i> , Atlantique Nord	LEDERER ET GLASER ^{1,2}
B	>300°*	C ₁₂ H ₈ O ₇ **	spinochrome P ₁	<i>P. lividus</i> , Méditerranée	GOODWIN ET SRISUKH ³
C	247°	C ₁₂ H ₈ O ₈	iso-échinochrome peut-être identique avec spinone A	<i>A. pustulosa</i> <i>P. lividus</i> , Méditerranée	MUSAJO ET MINCHILLI ⁹ GOODWIN ET SRISUKH ³
D	295°		spinochrome Aka	<i>Pseudocentrotus depressus</i>	GLASER ET LEDERER ²
E	>350°		—	<i>P. lividus</i> , Méditerranée	présent travail
F	229°		—	<i>Heterocentrotus mammilatus</i>	KUHN ET WALLENFELS ⁸
G	>350°		—	<i>P. lividus</i> , Méditerranée	KURODA ET OSHIMA ¹²
M	193°		—	<i>Anthocidaris crassispina</i>	présent travail
P	188°	C ₁₂ H ₁₀ O ₇	—	<i>P. lividus</i> , Méditerranée	KURODA ET OSHIMA ¹²
					MUSAJO ET MINCHILLI ⁷
					présent travail ³

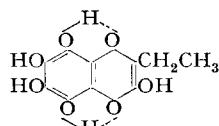
* MUSAJO ET MINCHILLI⁹ avaient trouvé p.f. au-dessus de 350°, GOODWIN ET SRISUKH³ p.f. 283°.
Le p.f. exact est très difficile à déterminer, il est certainement au-dessus de 300°⁴.

** Cette formule résulte de quatre analyses concordantes de MUSAJO ET MINCHILLI⁹.

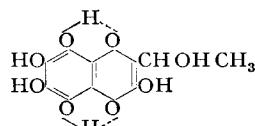
il présente des bandes d'absorption à 581, 538 et 496 m μ (dans CHCl₃)*. Sa formule est C₁₂H₁₀O₈; il contient un hydroxyle de plus que l'échinochrome A (pigment des gonades d'*Arbacia pustulosa* (I) ^{1,8}; KUHN ET WALLENFELS⁵ lui ont attribué la structure II.

MUSAJO ET MINCHILLI⁷ ont pensé trouver le même pigment (p.f. 185°) dans les parties calcaires de *P. lividus* de la baie de Bari et l'ont appelé spinochrome P (isolé de *Paracentrotus*); ils lui attribuent la formule C₁₂H₁₀O₇.

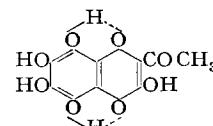
GOODWIN ET SRISUKH³ ont obtenu le spinochrome (p.f. 185°) des épines et du test de *P. lividus* et d'*Echinus esculentus* de Port Erin et l'appellent spinochrome A; ils confirment la formule brute C₁₂H₁₀O₈ établie par LEDERER ET GLASER¹.



I. Echinochrome A



II. Spinochrome A



III. Spinone A

d'après KUHN ET WALLENFELS

Il ne semble donc plus y avoir de doute qu'un spinochrome, C₁₂H₁₀O₈ (p.f. 185°), est le *principal pigment* des parties calcaires de certaines espèces d'oursins. Nous adoptons pour ce pigment, d'accord avec GOODWIN ET SRISUKH, le nom de Spinochrome A (voir GOODWIN, LEDERER ET MUSAJO⁴) et nous montrons plus loin que le spinochrome P de MUSAJO ET MINCHILLI est un pigment différent. TYLER⁶ a isolé un spinochrome, p.f. 187-188° des épines et du test de *Paracentrotus purpuratus* de Californie. Ce pigment n'ayant pas été analysé, il ne semble pas possible de décider s'il s'agissait de spinochrome A ou P.

Autres pigments naphtoquinoniques de *Paracentrotus lividus*

La nature de ces pigments était controversée³. LEDERER ET GLASER¹ ont purifié une solution brute du pigment des parties calcaires de *P. lividus* par épuisement par le bicarbonate et ont ensuite chromatographié sur CaCO₃ les pigments récupérés de leurs sels de Na. Ils ont ainsi obtenu une zone bleu-violet supérieure, contenant le spinochrome A et une zone brune ou rougebrun, inférieure, contenant l'échinochrome A, C₁₂H₁₀O₇, p.f. 220°, (I) pigment déjà isolé des ovaires d'*Arbacia*^{1,8}.

Tyler⁶, utilisant la méthode de purification de LEDERER ET GLASER¹ a isolé des tests de *P. purpuratus* (de Californie), après chromatographie, un spinochrome, p.f. 187-188°, et de l'échinochrome A, p.f. 220°.

MUSAJO ET MINCHILLI⁹ ont trouvé que le spinochrome P de *P. lividus* (de Bari) est accompagné d'un pigment plus clair, p.f. 350-355°, qu'ils appellent spinochrome P₁, et auquel ils attribuent la formule C₁₂H₈O₇; ce pigment forme, avec la chaux, des sels verts. GOODWIN ET SRISUKH³ trouvent un pigment analogue, p.f. 283° (zone verte sur CaCO₃) dans les épines de *P. lividus* et *Echinus esculentus* et pensent qu'il est identique à celui de MUSAJO ET MINCHILLI; ils l'appellent spinochrome B; il est accompagné d'un "pigment naphtoquinonique X".

Quant à la présence d'échinochrome A dans les parties calcaires d'Oursins, ils écrivent

* Positions des bandes mesurées avec un spectroscope visuel; les maxima mesurés au spectro-photomètre de Beckman, sont indiqués dans le Tableau II; la bande à 496 m μ mesurée au spectroscope visuel semble être due à une erreur optique.

Bibliographie p. 101.

(p. 69): "The two group terms echinochrome and spinochrome have been accepted, for there appears to be good reason to believe that echinochromes occur only in the gonads and body fluid, whilst the spinochromes are characteristic of the spines and tests".

Nous montrerons cependant, dans la partie expérimentale, que nous avons identifié avec certitude l'échinochrome A dans les épines de *P. lividus*. GOODWIN⁴ vient, du reste, d'identifier son pigment X avec l'échinochrome A.

Pigments naphtoquinoniques des parties calcaires d'Arbacia pustulosa

GLASER ET LEDERER² ont isolé deux pigments des épines et du test (presque noirs) d'*Arbacia pustulosa* de Monaco : un nouveau pigment qu'ils ont appelé iso-échinochrome, et l'échinochrome A ; nous adoptons pour l'iso-échinochrome le nom de spinochrome C (voir GOODWIN, LEDERER ET MUSAJO⁴).

KUHN ET WALLENFELS⁵ ont isolé des épines d'*Arbacia pustulosa* de Naples un pigment $C_{12}H_8O_8$ ressemblant au spinochrome C et qu'ils appellent spinone A. Ils lui donnent la formule III et pensent que c'est un artefact, formé par oxydation du spinochrome A (II) primitivement présent dans les épines. Nous montrerons ci-dessous que le spinochrome C n'est pas un artefact.

Le présent mémoire contient en outre la description sommaire de deux nouveaux pigments : les spinochromes E et G.

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES*

La préparation d'échinochrome A à partir des ovaires d'*Arbacia aequituberculata* a déjà été décrite en détail (LEDERER ET GLASER¹) ; (voir aussi KUHN ET WALLENFELS⁸ qui ont utilisé la même méthode).

Isollement de spinochrome A et d'échinochrome A des épines violettes de *Paracentrotus lividus* de ROSCOFF (Finistère, France). 200 g d'épines violettes sont traitées par HCl à 12% ; après quelques heures, on décante le liquide et épouse à l'acétone la partie organique qui reste (bases des épines et muscles moteurs). Cet extrait acétonique est généralement plus foncé que l'extrait aqueux acide.

Nous avons traité séparément le pigment de l'extrait chlorhydrique (provenant des parties calcaires) et celui (acétonique) des parties organiques. On fait passer le pigment dans l'éther et lave la solution éthérée à l'eau. En agitant l'éther par une solution aqueuse de $NaHCO_3$, tout le pigment passe dans la phase inférieure. Après acidification par l'acide sulfurique dilué, on fait de nouveau passer le pigment dans l'éther ; on lave ce solvant à l'eau et le séche sur Na_2SO_4 . En filtrant séparément sur $CaCO_3$, les deux solutions éthérées, et en développant à l'éther, on observe la formation de deux zones principales : une première bleu-violet, une deuxième, inférieure, brune. L'extrait (acétonique) des parties organiques semble contenir une plus grande proportion de la deuxième zone ; il ne semble pas y avoir de différence qualitative.

On découpe les deux zones et dissout le $CaCO_3$, recouvert d'éther, dans de l'acide chlorhydrique dilué, puis on reprend les pigments par l'éther. Les bandes d'absorption du pigment de la zone supérieure correspondent à celle du spinochrome A (582, 540 $m\mu$, $CHCl_3$), celles de la deuxième zone à celles de l'échinochrome A (525, 488 $m\mu$, $CHCl_3$).**

Echinochrome A. Après une nouvelle chromatographie du pigment élut de la zone brune, inférieure, on sublime le pigment sous vide et obtient des cristaux fondant à 218-220°. Ces cristaux sont dissous dans l'éther et soumis à l'épreuve de la chromatographie mixte (sur trois tubes). *Il n'y a pas de différence entre l'échinochrome A d'ovaires d'Arbacia et le pigment de la zone brune des épines.*

De plus, la méthylation du pigment des épines, par un excès de diazométhane (en présence de méthanol) donne le triméthyl-échinochrome A, p.f. 133° identique d'après le spectre d'absorption (540, 503 $m\mu$ $CHCl_3$), le p.f. et sa composition élémentaire, avec le triméthyl-échinochrome A préparé à partir de l'échinochrome A d'ovaires d'*Arbacia* (d'après GLASER ET LEDERER² ; voir aussi KUHN ET WALLENFELS⁸).

* Nous remercions Mlle. R. GLASER pour son aide dans quelques expériences de 1939 et M. D. MERCIER pour la mesure des courbes d'absorption, avec le spectrophotomètre de Beckman, modèle DU.

** Positions des bandes mesurées avec un spectroscope visuel ; les maxima mesurés au spectrophotomètre de Beckman, sont indiqués dans le Tableau II.

Un échantillon d'échinochrome A isolé récemment des parties calcaires de *P. lividus* (violets, de ROSCOFF), a été soumis à l'analyse élémentaire:

$C_{12}H_{10}O_7$ Calculé: C 54.14%
Trové*: 53.91

H 3.79%
4.09

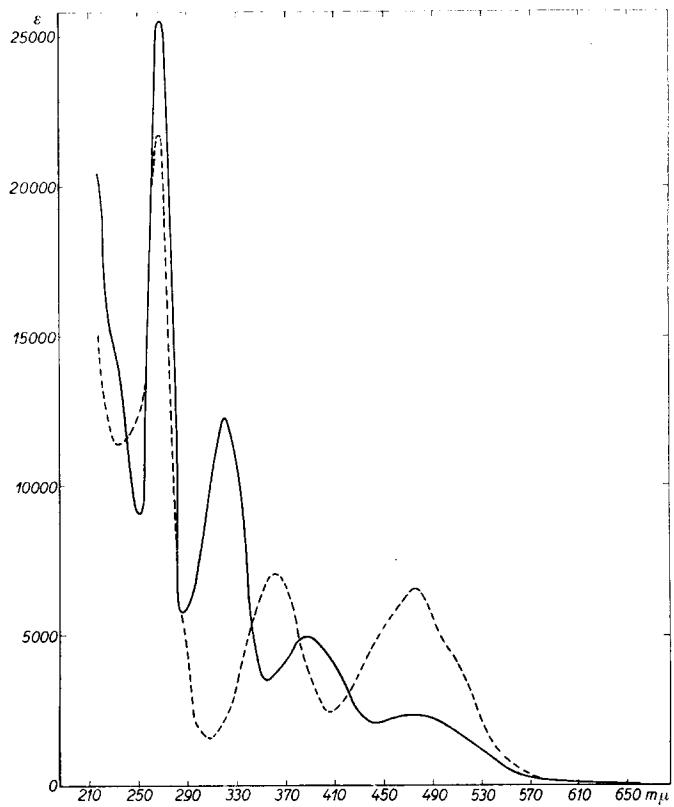


Fig. 1. Courbes d'absorption des spinochrome A — et P — (dans CHCl_3)

une partie du pigment commence à sublimer à partir de 230° ; les cristaux fraîchement sublimés se décolorent à partir de 310° , sans fondre. Adsorbé sur CaCO_3 de TOWERS³ le spinochrome B forme une zone verte, en dessous de la zone violette du spinochrome A.

N'ayant pu obtenir de zone verte avec un extrait d'épines vertes de *P. lividus* de Roscoff, sur notre carbonate de calcium (Prolabo R.P.), nous avons demandé à Mr Goodwin (Liverpool) un échantillon de son ad-

* Les microanalyses de ce travail ont été effectuées par le Dr W. MANSER du laboratoire microanalytique du Prof. L. Ruzicka, Zurich.

Bibliographie p. 101.

Spinochrome A. Le spinochrome A élue du CaCO_3 est rechromatographié sur CaCO_3 , élue de nouveau par dissolution du carbonate dans l'HCl dilué, repris par l'éther, puis sublimé sous 0.01 mm. A une température du bain de 160-180°, il se forme des cristaux violet-noir que l'on recristallise dans l'acétate d'éthyle; on obtient des prismes fondant à 185° (corr.). (Voir photo dans (2) courbe d'absorption, Fig. 1). Dans nos essais récents nous isolons le spinochrome A à l'état pur, sans passage par le bicarbonate, et sans distillation, par recristallisation de l'élut de CaCO_3 dans le dioxane aqueux. Contrairement à l'indication de LEDERER ET GLASER¹ et en accord avec GOODWIN ET SRISUKH², nous trouvons que le spinochrome A n'est pas décoloré par l'hydrosulfite, mais que sa couleur vire au rouge.

La note de LEDERER ET GLASER¹ contient les résultats des dosages de C, H, H mobile, C-CH₃ et Rast. KUHN ET WALLENFELS² se sont basés sur ces chiffres pour proposer la formule II pour le spinochrome A.

Spinochrome B. Nous avons isolé ce pigment de *P. lividus* de Tamaris. Après chromatographie sur CaCO_3 RP, le spinochrome B passe dans le filtrat et cristallise dans le dioxane sous forme de petits prismes rouges ne fondant pas au-dessous de 340°.

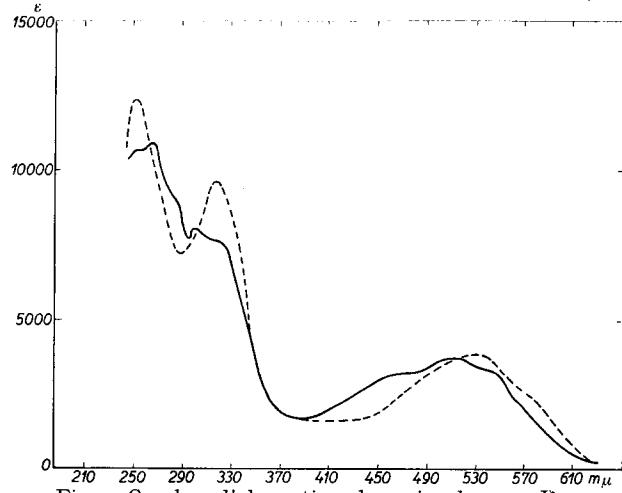


Fig. 2. Courbes d'absorption des spinochro et E ---- (dans CH_3OH)

sorbant (Towers precipitated). Nous avons ainsi facilement confirmé la présence d'un pigment formant une zone verte, et correspondant au spinochrome B. Le point de fusion de notre préparation était toutefois au-dessus de 300° (spectre d'absorption, v. Fig. 2).

La différence entre les propriétés adsorptives des deux carbonates s'explique par leur alcalinité différente: 1 g de CaCO_3 Prolabo R.P., suspendu dans 7 ml d'eau distillée (pH 5.5), donne un pH de 7.5 tandis que le carbonate de Towers donne, sous les mêmes conditions, un pH de 8.9. Tous les spinochromes sont plus fortement adsorbés sur le carbonate Towers que sur celui de Prolabo.

Les difficultés rencontrées dans l'analyse élémentaire des spinochromes sont illustrées par les chiffres suivants:

trouvé:	MUSAJO ET MINCHILLI	C 54.2, 54.12, 54.14, 54.20	H 3.2, 3.36, 3.02, 3.46
	GOODWIN ET SRISUKH	51.3	3.9
	E.L.	53.42	4.58
	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_7$ calculé	54.54	3.03

Etant donné que les auteurs italiens ont obtenu quatre chiffres concordants ainsi qu'un dérivé hepta-acétyle $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{14}$, F. 236°, la formule $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_7$ qu'ils proposent est bien fondée.

Spinochrome C. (*iso-échinochrome de GLASER ET LEDERER*²). Des extraits chlorhydriques de carapaces d'*Arbacia pustulosa* de Monaco donnent deux zones distinctes sur CaCO_3 Prolabo R.P.

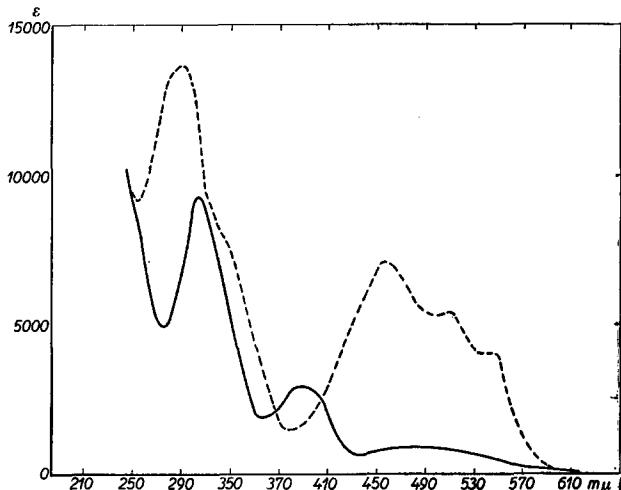


Fig. 3. Courbes d'absorption des spinochromes C ----- et G ——— (dans CHCl_3)



Fig. 4. Cristaux de spinochrome C (aggr. 40° X)

La zone supérieure, brûnâtre, contient le spinochrome C, la zone inférieure, qui passe facilement dans le filtrat, contient l'échinochrome A, p.f. 217-220°, identique d'après sa forme cristalline et la courbe d'absorption, à l'échinochrome A authentique. Il ne semble pas y avoir de spinochrome A.

Le spinochrome C, élué de la colonne par HCl dilué, en présence d'éther, cristallise dans le dioxane aqueux sous forme le longues aiguilles droites brun-rouge, à éclat métallique, fondant vers 247°, avec décomposition (Fig. 4). Bandes d'absorption à 548 et 510 mμ dans CHCl_3 (mesurées au spectroscope visuel). Courbe d'absorption v. Fig. 3.

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8$	Calculé:	C 51.44%	H 2.88%
	Trouvé:	51.38	2.84

Ce pigment est soluble dans le bicarbonate avec une couleur rouge et donne une coloration verte avec FeCl_3 . Il est adsorbé sur le CaCO_3 de Tower sous forme d'une zone brun-rose fortement fixée. Réduit par l'hydrosulfite en milieu bicarbonaté, il ne se décolore pas, mais vire au rouge violet; il ressemble ainsi à la spinone A de KUHN ET WALLENFELS⁶.

P. lividus de Tamaris contient également du spinochrome C; on l'obtient, mélangé avec du spinochrome P, par élution de la zone supérieure rose-violet formée par chromatographie de l'extrait éthétré brut, sur CaCO_3 R.P. Des recristallisations successives dans le dioxane aqueux, puis l'acétate d'éthyle font monter graduellement le F. de la préparation brute jusqu'à environ 245°. Le spinochrome C ainsi obtenu a le même spectre d'absorption caractéristique que le spinochrome C isolé d'*Arbacia pustulosa* de Monaco.

Spinochrome E. Un extrait éthéré de *P. lividus* de Tamaris (près de Toulon) contenant tous les pigments éthersolubles a été conservé pendant une semaine à la glacière (environ 150 ml correspondant à 60 oursins). En décantant l'éther il restait environ 20 mg d'un dépôt cristallin, brun-or, insoluble dans l'éther. Après lavage dans l'éther et recristallisation dans le dioxane-H₂O, nous avons obtenu de longues aiguilles brunes ne fondant pas jusqu'à 350° (Fig. 5). Ce pigment est très peu soluble dans le méthanol. Voir la courbe d'absorption Fig. 2.

Une solution méthanolique brun-rouge additionnée d'une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% donne un précipité d'un sel de sodium vert-foncé, assez peu soluble dans l'eau. La solution méthanolique est décolorée par une solution aqueuse d'hydro sulfit de sodium; la solution incolore se recolore à l'air lentement.

Spinochrome G. Dans une extraction des pigments de *P. lividus* de Mars 1951, nous avons obtenu, après chromatographie sur CaCO₃, une zone supérieure rose-violet donnant à l'élution un mélange de pigments. Par des cristallisations successives dans le dioxane-H₂O, puis dans l'acétate d'éthyle + éther de pétrole, nous en avons finalement isolé des cristaux presque noirs ne fondant pas à 340° (Fig. 6). Ce pigment est peu soluble dans le méthanol. Voir la courbe d'absorption Fig. 3.

Une solution méthanolique additionnée de NaHCO₃ à 5% dans l'eau vire au brun-violet foncé. L'hydro sulfit de soude décolore le spinochrome G; il se recolore à l'air.



Fig. 5. Cristaux de spinochrome E
(aggr. 40 ×)

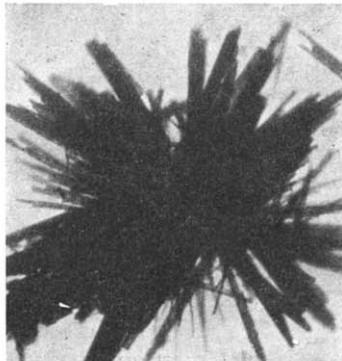


Fig. 6. Cristaux de spinochrome G
(aggr. 100 ×)

Spinochrome P. Les carapaces de 60 exemplaires brun-violet de *P. lividus* de Tamaris (près de Toulon) ont fourni un extrait éthéré rouge que nous avons filtré sur CaCO₃ R.P. Il se forme une zone violette supérieure, dont l'eluat chlorhydrique donne, après recristallisation dans le dioxane aqueux, 20 mg de cristaux violets, foncés, à aspect métallique, fondant vers 188° et ayant le spectre d'absorption et la composition chimique du spinochrome P de MUSAJO ET MINCHILLI⁷.

C ₁₂ H ₁₀ O ₇	Calculé:	C 54.13%	H 3.79%
	Trouvé:	54.22	4.00

Voir la courbe d'absorption Fig. 1.

Nous remercions Madame C. COHN pour les photographies des cristaux (Fig. 4, 5, 6).

DISCUSSION

Le présent mémoire montre l'existence d'au moins sept pigments dans les parties calcaires de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia pustulosa*: les spinochromes A, B, C, E, G, P et l'échinochrome A. Le tableau I indique la nomenclature et la distribution de ces pigments, le tableau II la position des maxima d'absorption. Les Figs. 1, 2 et 3 représentent les courbes d'absorption de ces pigments.

Echinochrome A, p.f. 220°, C₁₂H₁₀O₇. Nous avons identifié l'échinochrome A des épines de *P. lividus* de Roscoff avec l'échinochrome A des ovaires d'*Arbacia*, par chromatographie mixte, par son spectre d'absorption, par son point de fusion et par celui de son dérivé triméthylé, et enfin par analyse élémentaire. TYLER⁶ indique le point de fusion

TABLEAU II
SPECTRES D'ABSORPTION

Pigment	Solvant	Maxima observés au spectrophotomètre de Beckman, en m μ				
Echinochrome A	220°	CHCl ₃	340	463	490	525
Spinochrome A	185°	CHCl ₃	255	320	520	533
Spinochrome B	> 300°	CH ₃ OH	270	320	387	480
Spinochrome C	247°	CHCl ₃	290	~ 330	455	510
Spinochrome C*	247°	benzène		~ 330	465	512
Spinochrome E	> 350°	CH ₃ OH	267	360	475	542
Spinochrome G	> 350°	CHCl ₃	305	390	490	548
Spinochrome P	188°	CHCl ₃	255	300 315	450	510
						~ 545

Le signe ~ indique une inflexion.

* La courbe d'absorption du spinochrome C a été mesurée aussi dans le benzène, pour pouvoir la comparer avec la courbe d'absorption de la spinone A de KUHN ET WALLENFELS⁵. Les deux courbes semblent identiques.

220° de l'échinochrome A isolé des tests de *P. purpuratus* et montre une photographie des cristaux typiques de ce pigment.

L'échinochrome A est donc bien aussi un pigment des épines. Notons toutefois qu'il n'est pas possible d'isoler tout seul le pigment de la partie calcaire des épines; les extraits à l'HCl dilué sont nécessairement souillés par le pigment de la partie organique des épines, qui est encore plus riche en échinochrome A que la partie calcaire. *Le spinochrome A est également présent dans cette partie organique.*

GOODWIN ET SRISUKH viennent de confirmer la présence d'échinochrome A dans les parties calcaires de *P. lividus* en identifiant leur "pigment X" avec l'échinochrome A (voir GOODWIN, LEDERER ET MUSAJO⁴).

Spinochrome A, p.f. 185°, C₁₂H₁₀O₈. GOODWIN ET SRISUKH³ ont confirmé la formule brute de ce pigment, proposée par LEDERER ET GLASER¹. La critique de cette formule par MUSAJO ET MINCHILLI⁷ n'est pas valable, puisque leur spinochrome P n'est pas identique au spinochrome A. Ce dernier a, par rapport au spinochrome P, une teinte nettement plus violette. Les épines de *P. lividus* de Roscoff sont, du reste, franchement violettes, tandis que celles de *P. lividus* provenant de la Méditerranée ont une teinte plus brunâtre. La différence spectrale de ces deux pigments ressort très nettement de la Fig. I.

Spinochrome B, C₁₂H₈O₇, p.f. > 300°. Il ne paraît pas douteux que le spinochrome P₁ de MUSAJO ET MINCHILLI soit identique au spinochrome B de GOODWIN ET SRISUKH comme l'ont pensé ces derniers auteurs. En réexaminant le point de fusion du spinochrome B, GOODWIN le trouve être au-dessus de 300° et difficile à déterminer avec précision⁴; ainsi disparaît la grande différence de p.f. entre les spinochromes P₁ et B constatée par GOODWIN ET SRISUKH. Les écarts des résultats des analyses élémentaires ont été déjà mentionnées ci-dessus; elles sont certainement dues à des difficultés analytiques.

En comparant les quantités relatives de spinochrome A et d'échinochrome A d'individus de *P. lividus* ayant des colorations violettes ou vertes, GLASER ET LEDERER² ont conclu que ces différences sont dues "à des mélanges de spinochrome et d'échinochrome en différentes proportions". D'après ce que nous savons maintenant, leur fraction d'échinochrome contenait aussi du spinochrome B qui donne un sel de Ca vert. Nous sommes d'accord avec GOODWIN ET SRISUKH³ pour attribuer à ce dernier pigment un rôle dans la coloration verte des parties calcaires. Notons toutefois que les sels de fer de tous ces pigments naphtoquinoniques sont verts.

Spinochrome C, p.f. 247° , $C_{12}H_8O_8$. Nous avons isolé ce pigment des parties calcaires d'*Arbacia pustulosa* de Monaco, où il est accompagné d'échinochrome A (2, 10) ainsi que de *P. lividus* de Tamaris. KUHN ET WALLENFELS⁵ ont trouvé un pigment analogue, la spinone A: p.f. 229° , $C_{12}H_8O_8$, dans les épines d'*Arbacia pustulosa* de Naples. D'après ces auteurs, le pigment de ces épines donne avec le bicarbonate un sel violet, tandis que la spinone A ne donnerait qu'une couleur jaune. Ils en concluent que la spinone A s'est formée à partir du spinochrome A, par une déshydrogénération à l'air, en milieu alcalin. Cette explication nous paraît peu probable, car nous avons fréquemment extrait le spinochrome A par le bicarbonate et n'avons jamais observé de formation de spinone A*. Le spinochrome C, d'autre part, n'est certainement pas un artefact, car nous l'isolons sans traitement par le bicarbonate. Ses solutions dans $NaHCO_3$ sont rouges et non jaunes comme celles de la spinone A, elles sont stables pendant quelques heures à 20° .

La courbe d'absorption du spinochrome C (v. Fig. 3) ressemble de très près à celle de la spinone A. Nous avons déjà, en 1940, émis l'opinion que les deux pigments pourraient être identiques¹⁰; n'ayant pas pu nous procurer d'*Arbacia* de Naples, nous devons, laisser la question ouverte.

Spinochrome E, p.f. $> 350^\circ$. Ce nouveau pigment se distingue des autres spinochromes par son insolubilité dans l'éther. Nous n'avons pas pu en préparer de quantités suffisantes pour des analyses élémentaires. La Fig. 2 montre le spectre d'absorption de ce pigment.

Spinochrome G, p.f. $> 350^\circ$. Ce pigment se trouve dans les eaux-mères du spinochrome P de *P. lividus* de Tamaris. La couleur de ses solutions et son comportement chromatographique le rapprochent beaucoup des spinochromes A et P, mais qui fondent beaucoup plus bas. La courbe d'absorption (Fig. 3) semble indiquer que notre préparation n'était pas encore pure.

Spinochrome P, $C_{12}H_{10}O_7$, p.f. 188° . MUSAJO ET MINCHILLI ayant isolé des carapaces de *P. lividus* de Bari un pigment p.f. 185° , ressemblant dans ses propriétés au spinochrome A, ont tout naturellement pensé qu'ils avaient en main le même pigment que LEDERER ET GLASER; leurs analyses ont cependant indiqué la formule $C_{12}H_{10}O_7$ au lieu de $C_{12}H_8O_8$. Nous donnons une explication simple de cette divergence: les deux pigments ne sont pas identiques. On distingue très facilement leurs solutions chloroformiques par leur couleur, qui est violette pour le spinochrome A et rouge pour le spinochrome P. Les deux pigments se distinguent aussi par leur couleur d'adsorption sur $CaCO_3$ RP; violette pour le spinochrome A, elle est rose-mauve pour le spinochrome P. Le spinochrome P isolé de *P. lividus* de Tamaris est identique d'après son p.f., son spectre d'absorption et son adsorbabilité au spinochrome P de MUSAJO ET MINCHILLI**. MUSAJO ET DI FONZO¹³ ont décrit quelques sels du spinochrome P.

QUARTIERI¹⁴ a étudié la localisation des spinochromes B et P dans les épines de divers oursins de Naples.

Conclusions: Nous venons de montrer que les divergences de vue exprimées dans la littérature récente concernant les divers spinochromes sont dues en partie à des difficultés analytiques, mais surtout à la diversité des pigments et à leur variabilité géographique et taxonomique.

* Le Dr T. W. GOODWIN n'a jamais observé non plus la formation de spinone A à partir du spinochrome A (communication personnelle).

** Nous remercions le Prof. L. MUSAJO pour un échantillon de spinochrome P. La courbe d'absorption de Fig. 1 est celle du spinochrome P de L. MUSAJO.

Un grand effort sera encore nécessaire pour déterminer la structure chimique exacte de ces pigments*.

RÉSUMÉ

1. Les parties calcaires de *Paracentrotus lividus* sont colorées par un mélange de pigments naphtoquinoniques. Les exemplaires violettes ou vertes, en provenance de l'Atlantique Nord, contiennent les trois pigments spinochrome A, spinochrome B et échinochrome A, à proportions variables. Les exemplaires bruns en provenance de la Méditerranée contiennent un mélange des spinochromes B, C, E, G et P.

2. Les parties calcaires d'*Arbacia pustulosa* de Monaco contiennent le spinochrome C et l'échinochrome A.

3. Le spinochrome B ne peut être décelé, à côté de l'échinochrome A, que sur un carbonate de calcium légèrement alcalin.

4. Le spinochrome C, p.f. 247°, a la formule brute $C_{12}H_8O_8$; il est peut-être identique à la spinone A de KUHN ET WALLENFELS⁵.

5. Nous décrivons sommairement deux nouveaux pigments: les spinochromes E et G, qui ne fondent pas en dessous de 350°.

6. Le spinochrome P, F. 188°, $C_{12}H_{10}O_7$, découvert par MUSAJO ET MINCHILLI⁷ dans *P. lividus* de Bari est nettement différent du spinochrome A de *P. lividus* de l'Atlantique Nord; nous avons isolé le spinochrome P de *P. lividus* de Tamaris (près de Toulon).

SUMMARY

1. The calcareous parts of *Paracentrotus lividus* are coloured by a mixture of naphthoquinone pigments. The violet or green specimens, obtained from the North Atlantic, contain the three pigments spinochrome A, spinochrome B, and echinochrome A, in variable proportions. The brown specimens from the Mediterranean contain a mixture of spinochrome B, C, E, G, and P.

2. The calcareous parts of *Arbacia pustulosa* from Monaco contain spinochrome C and echinochrome A.

3. Spinochrome B can only be revealed, along with echinochrome A on slightly alkaline calcium carbonate.

4. Spinochrome C, m.p. 247°, has the formula $C_{12}H_8O_8$; it is perhaps identical with the spinone A of KUHN AND WALLENFELS⁵.

5. We describe briefly two new pigments, spinochrome E and G, which do not melt under 350°.

6. Spinochrome P, m.p. 188°, $C_{12}H_{10}O_7$, discovered by MUSAJO AND MINCHILLI in *P. lividus* from Bari is quite different from spinochrome A from *P. lividus* from the North Atlantic; we have isolated spinochrome P from *P. lividus* obtained from Tamaris (near Toulon).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Kalkteile von *Paracentrotus lividus* verdanken ihre Farbe einer Mischung von Naphthoquinon-Farbstoffen. Die violetten oder grünen aus dem nördlichen Atlantischen Ozean stammenden Exemplare enthalten die drei Pigmente Spinochrom A, Spinochrom B und Echinochrom A in verschiedenen Proportionen. Die braunen, aus dem Mittelmeer stammenden Exemplare enthalten eine Mischung der Spinochrome B, C, E, G und P.

2. Die Kalkteile von *Arbacia pustulosa* aus Monaco enthalten Spinochrom C und Echinochrom A.

3. Das Spinochrom B kann neben Echinochrom A nur auf einem leicht alkalischen Calciumcarbonat nachgewiesen werden.

4. Das Spinochrom C, Schm. 247°, hat die Bruttoformel $C_{12}H_8O_8$; es ist vielleicht identisch mit dem Spinon A von KUHN UND WALLENFELS⁵.

5. Zwei neue Pigmente werden kurz beschrieben: es sind die Spinochrome E und G, die unter 350° nicht schmelzen.

6. Das Spinochrom P, Schm. 188°, $C_{12}H_{10}O_7$, welches von MUSAJO UND MINCHILLI⁷ in *P. lividus* aus Bari entdeckt wurde, ist deutlich verschieden vom Spinochrom A des *P. lividus* aus dem nördlichen Atlantischen Ozean; wir haben das Spinochrom P aus *P. lividus* aus Tamaris (bei Toulon) isoliert.

* Il faudra trouver une explication pour la très faible volatilité et les hauts points de fusion des spinochromes B, E et G. On pourrait penser à des molécules contenant deux noyaux naphtoquinoniques 1,4 reliés entre eux par un point aliphatique en 2,2'. De telles substances auraient un point de fusion élevé et des spectres presque identiques à ceux des naphtoquinones 1,4 simples.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. LEDERER ET R. GLASER, *Compt. rend.*, 207 (1938) 454.
- ² R. GLASER ET E. LEDERER, *Compt. rend.*, 208 (1939) 1939.
- ³ T. W. GOODWIN ET S. SRISUKH, *Biochem. J.*, 47 (1950) 69.
- ⁴ T. W. GOODWIN, E. LEDERER, ET L. MUSAJO, *Experientia*, 7 (1951) 375.
- ⁵ R. KUHN ET K. WALLENFELS, *Ber.*, 74 (1941) 1594.
- ⁶ A. TYLER, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 25 (1939) 523.
- ⁷ L. MUSAJO ET M. MINCHILLI, *Gazz. chim. ital.*, 70 (1940) 287.
- ⁸ R. KUHN ET K. WALLENFELS, *Ber.*, 72 (1939) 1407.
- ⁹ L. MUSAJO ET M. MINCHILLI, *Boll. sci. fac. chim. ind. univ. Bologna*, 3 (1942) 1.
- ¹⁰ E. LEDERER, *Biol. Rev.*, 15 (1940) 273.
- ¹¹ H. B. MOORE, *J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom*, 21 (1937) 711.
- ¹² C. KURODA ET H. OSHIMA, *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, 16 (1940) 214.
- ¹³ L. MUSAJO ET M. DI FONZO, *Boll. sci. fac. chim. ind. univ. Bologna*, (1940) 231.
- ¹⁴ C. QUARTIERI, *Atti soc. nat. e mat. Modena*, 78 (1947).

Reçu le 6 Octobre 1951