Zeitschrift: Archives des sciences physiques et naturelles
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 14 (1932)

Artikel: Contribution à l'étude de la tyrosinase et de la pseudo-peroxydase
Autor: Berenstein, S.
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-740774

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE DE LA TYROSINASE

ET DE

LA PSEUDO-PEROXYDASE

PAR

S. BERENSTEIN

(Avec 1 fig.)

INTRODUCTION

La notion de ferment.

Selon la définition donnée par Oppenheimer [1] et devenue en quelque sorte classique, un ferment est une substance produite par les cellules vivantes et ayant des propriétés de catalyseur, sans que son action elle-même soit liée au processus vital. Le ferment n'est donc pas modifié par le processus chimique dans lequel il intervient et son action est en outre spécifique.

Cette définition du ferment comme substance organique ayant une individualité et une spécificité propres — définition que nous plaçons ainsi en tête du présent travail —, si elle est aujourd'hui assez généralement admise, a été très discutée et l'est même encore, malgré l'appui que lui apportent de nombreux résultats expérimentaux. Les travaux de l'enzymologie moderne, et en particulier les recherches de l'école de Willstätter, la confirment toujours mieux; on arrive à purifier des ferments par des méthodes très fines et très délicates d'adsorption et

[1] Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen.* Vol. 1.

d'élution, jusqu'à obtenir des colloïdes qui, à part les caractères spécifiques des ferments, ne présentent plus de réactions de corps appartenant aux classes chimiques connues. Malheureusement, plus le ferment est purifié, plus il devient fragile, sensible à l'action de réactifs, de la température ou de la lumière, et si l'on essaye de pousser la purification plus loin, on finit par inactiver le ferment, lui faire perdre son pouvoir de catalyseur. Il semble bien que, selon l'hypothèse de Willstätter [1], le ferment soit composé d'un groupe ayant une fonction chimique spécifique, lié à un support colloïdal, et que si on essaye de le détacher de ce support, il perd son activité. Certains ferments, tels la pepsine et l'uréase, auraient été préparés à l'état cristallisé, mais il n'est pas certain si ces cristaux représentent bien le ferment à l'état pur ou si celui-ci ne s'y trouve qu'à l'état de solution solide. En ce qui concerne la structure même des ferments, on n'en connaît pour ainsi dire encore rien. On ne peut donc les caractériser que par les réactions que leur présence accélère ou ralentit d'une façon bien spécifique, par les transformations donc que subissent les substances fermentescibles. Catalyseurs, ils le sont en effet dans le sens donné à ce mot par Ostwald, c'est-à-dire ce sont des substances qui modifient la vitesse des réactions chimiques sans apparaître elles-mêmes dans le produit final de ces réactions. Mais ce qui les distingue des autres catalyseurs, c'est d'une part leur origine — ils sont des produits de la nature vivante, de structure inconnue et, dans l'état actuel de la science, ne peuvent donc être synthétisés — et d'autre part leur spécificité toute particulière (stéréochimique, par exemple) et leur thermolabilité; d'une façon générale, les ferments sont détruits ou inhibés à une température ne dépassant pas 100°.

Aperçu historique.

Si les phénomènes les plus apparents de l'action des ferments, la fermentation alcoolique, la putréfaction, etc., sont connus depuis la plus haute antiquité, ce n'est guère qu'au milieu du

[1] R. Willstätter, *Ber.* 55, 3601 (1922).

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE UNIVERSITÉ NEUCHATEL

siècle dernier que des théories générales ont été proposées pour expliquer ces phénomènes. Rappelons que c'est à Berzelius et à Mitscherlich que l'on doit l'introduction de la notion de catalyse dans le processus fermentatif, et notamment dans celui de la fermentation alcoolique, déjà quelque peu éclairci au point de vue chimique par les recherches de Lavoisier. Mais le premier essai d'une synthèse théorique des connaissances sur les ferments est dû à Liebig, qui n'a voulu voir dans la fermentation qu'une rupture d'équilibre moléculaire résultant de la décomposition chimique de la substance agissant comme ferment. Cette décomposition, considérée comme un ébranlement de la molécule, serait transmise du ferment à la substance fermentescible. Ces vues ont été définitivement reconnues comme inexactes à la suite des nombreux travaux de Pasteur, qui a démontré que la fermentation ne peut pas avoir lieu sans la présence d'un agent particulier, le ferment. Pasteur faisait cependant une distinction entre les ferments organisés, inséparables de la matière vivante, qui ne seraient en somme que des propriétés de celles-ci, et les ferments solubles (nommés plus tard enzymes), capables d'exercer leur action *in vitro*, en dehors des cellules vivantes; au premier groupe appartenaient par exemple les ferments de la fermentation alcoolique, au deuxième, les sucs digestifs. Cette distinction a fait l'objet de nombreuses controverses jusqu'à la publication des travaux de Miquel (1890) qui réussit à extraire des ferments solubles de microorganismes, puis surtout de ceux de E. Buchner (1897), qui est parvenu le premier à isoler de la levure l'enzyme de la fermentation alcoolique et à réaliser cette fermentation en l'absence de levure, confirmant ainsi les idées de Berthelot, Hoppe-Seyler, Traube, etc., qui croyaient à une origine commune chimique de tous les phénomènes de fermentation. Depuis, un grand nombre d'enzymes ont pu être détachées des cellules par lesquelles elles sont formées; et si dans nombre de cas on admet la présence d'enzymes non encore isolées pour expliquer des phénomènes de catalyse produits par la matière vivante, on peut considérer que ces hypothèses sont faites à bon droit; elles sont justifiées par les grandes difficultés qu'on rencontre à isoler certaines enzymes par suite de leur extrême

sensibilité et de la manière dont elles sont ancrées dans les cellules vivantes.

Nous nous limiterons dans le présent travail à l'étude des ferments oxydants, c'est-à-dire des ferments intervenant dans les phénomènes d'oxydation et d'oxydo-réduction.

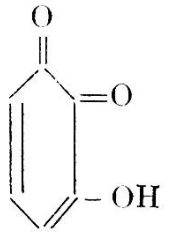
L'histoire des ferments oxydants proprement dits commence avec l'observation faite par Thénard (1818) que, dans l'organisme, certains corps sont susceptibles de décomposer l'eau oxygénée en eau et oxygène moléculaire. Mais il faut attendre jusqu'en 1863 pour trouver les premiers travaux fondamentaux de ce domaine, ceux de Schönbein [1], qui a découvert que certaines substances vivantes sont capables d'activer, « d'ozoniser » l'oxygène de l'air et de provoquer l'oxydation de divers substrats fermentescibles, oxydation caractérisée par un changement de couleur (bleuissement de la teinture de gaïac ou noircissement de jus de champignons). Tout d'abord, on a attribué à un seul et même ferment le pouvoir de décomposer l'eau oxygénée et celui de bleuir la teinture de gaïac. Schönbein voyait dans ces actions des propriétés communes à tous les ferments. Jacobson [2] a séparé l'action sur l'eau oxygénée, dite « catalytique », d'autres actions fermentatives (celles de l'émulsine et de l'extrait de pancréas). C'est O. Loew [3] qui a reconnu l'individualité du ferment dont la fonction spécifique est de catalyser la décomposition de l'eau oxygénée, et qui lui a donné son nom de *catalase*. La catalase, qui n'est pas un ferment oxydant proprement dit puisque l'oxygène dégagé est moléculaire, joue un rôle très important, mais encore assez obscur, dans les phénomènes de la respiration; il n'existe pas de cellule en respiration qui ne soit capable de décomposer l'eau oxygénée.

La *peroxydase*, le ferment susceptible de bleuir la teinture de gaïac en présence d'eau oxygénée ou d'un peroxyde, qui a été ainsi séparée de la catalase, a été particulièrement étudiée par R. Chodat, soit en collaboration avec A. Bach soit avec ses

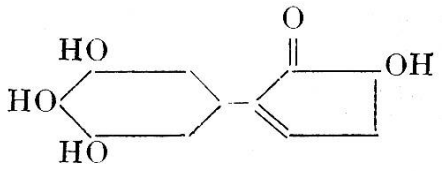
[1] C. F. Schönbein, *J. prakt. Chemie*, *89*, 334 (1863).
[2] W. Jacobson, *Zeitschr. physik. Chemie*, *16*, 340 (1892).
[3] O. Loew, *Ber.*, *35*, 2487 (1902).

élèves [1]; Chodat a préparé à partir des racines de raifort par précipitation à l'alcool fort et extraction à l'alcool à 40%, une peroxydase physiologiquement pure, dépourvue de fer et de manganèse. Par des méthodes d'adsorption et d'élution assez compliquées, et en partant de grandes quantités de raifort, Willstätter et Stoll [2] ont obtenu une peroxydase encore plus active, mais moins stable.

Le caractère essentiel de la peroxydase est de catalyser les réactions d'oxydation par l'eau oxygénée ou les peroxydes. En l'absence de peroxydes, il n'y a pas d'action de peroxydase. Les réactions les plus caractéristiques sont le bleuissement de la teinture de gaïac (très sensible, mais pas toujours très sûre), l'oxydation de la benzidine en bleu de benzidine, celle du pyrogallol en purpurogalline (l'action du ferment est limitée à la formation de l'orthoquinone, à partir de laquelle la purpurogalline est produite par une série de condensations), corps brun et insoluble, qu'on peut doser gravimétriquement ou colori-



Ortho-quinone du pyrogallol



Purpurogalline [3]

métriquement, enfin la transformation du *p*-crésol en solution en un corps laiteux dont le trouble est encore visible à une concentration de 1/10.000e.

La *laccase* a été tout d'abord décrite par Yoshida et isolée

[1] Voir R. Chodat, Darstellung und Nachweis von Oxydasen und Katalasen, etc., dans Abderhalden, *Hdbch. biolog. Arbeitsmethoden*, *4*, 1, p. 319 (1925).

[2] R. Willstätter, A. Stoll, *Liebigs Ann.*, *416*, 20 (1918); *422*, 47 (1921).

[3] R. Willstätter, H. Heiss, *Liebigs Ann.*, *433*, 17 (1923).

pour la première fois par Bertrand [1] à partir du latex de l'arbre à laque *Rhus vernicifera;* c'est à ce ferment qu'on doit la transformation du suc jaune de l'écorce en laque noire. La laccase catalyse les mêmes oxydations que le système peroxyde-peroxydase, mais la source d'oxygène est ici l'oxygène de l'air. On prépare la laccase d'après Chodat à partir de jus de champignons qu'on précipite à l'alcool fort. L'extrait aqueux de ce précipité contient, à côté de la laccase, de la tyrosinase qu'on peut détruire en chauffant la solution pendant une heure au bain-marie à 65°. D'un autre côté, on obtient à partir de ce même précipité une tyrosinase libre de peroxydase et de laccase en le conservant plusieurs années, la laccase s'inactivant avec le temps et ces champignons *(Russula fœtens*, *Lactarius vellereus*, etc.) ne contenant pas de peroxydase.

Nous ne dirons ici que deux mots de la *tyrosinase*, puisqu'elle fait l'objet d'une étude plus détaillée dans les pages qui suivent. Découverte par Bourquelot et Bertrand dans les champignons [2], puis dans les céréales, elle a été reconnue ensuite entre autres dans les carottes et les pommes de terre (à partir desquelles elle est préparée d'après Chodat par précipitation du jus à l'alcool fort). Sa réaction spécifique est l'oxydation de la tyrosine et de ses dérivés en pigments noirs, les mélanines, et l'oxydation du *p*-crésol en présence d'acides aminés ou d'indol, qui donne des pigments, le crésol-azur ou l'indo-crésol. La tyrosinase intervient dans la formation des pigments animaux et végétaux dans lesquels la tyrosine joue le rôle de chromogène. Le noircissement des gousses de légumineuses, du son du froment, celui des pommes de terre exposées à l'air, etc., est dû à la tyrosinase. Mais il ne faut pas conclure du noircissement d'un végétal à l'air à la présence de tyrosinase. Ainsi le noircissement de l'écorce de la banane est dû à l'action de la peroxydase sur le tanin [3]; dans d'autres plantes, les Cornacées, les Plantagmacées,

[1] G. Bertrand, *C. R.*, *118*, 1215 (1894).

[2] E. Bourquelot, G. Bertrand, *C. R. Soc. Biol.*, *1895*, p. 582.

[3] J. Zender, *Archives* [5], 12, *suppl.*, p. 56 (1925); le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. de Genève*, *42*, 56 (1925).

les Scrofulariacées, les Orobanchacées, le noircissement qui survient au cours de la dessication est dû à l'hydrolyse diastasique d'un glucoside, l'aucuboside, et à la polymérisation du produit d'hydrolyse non glucidique [1].

Chez les animaux, la tyrosinase joue également un rôle important dans la formation de pigments normaux ou pathologiques (tumeurs mélanotiques). Ce dernier point est cependant très controversé. Bloch [2] attribue cette fonction à la *dopa-oxydase*, un ferment qui exercerait une action spécifique sur la 3, 4-dioxyphénylalanine (dopa) et la transformerait en mélanine. Pour cela, Bloch se base sur le fait qu'en imbibant de dopa des préparations congelées de la peau, il voit une mélanogénèse dans les parties qui produisent des pigments *in vivo* (mélanoblastes); aucun autre chromogène, et en particulier la tyrosine, n'agit de la même façon. A cet argument on a répondu que la présence de dopa dans l'organisme animal n'est pas démontrée [3], que la dopa s'oxyde spontanément à l'air et surtout en présence d'alcalis, et enfin que cette oxydation est accélérée par la tyrosinase [4] et même par la peroxydase. L'existence d'une dopa-oxydase spécifique semble donc bien douteuse.

Signalons encore que la tyrosinase a été découverte dans la choroïde de l'œil de bœuf normal par Lo Cascio [5], qui l'a mise en évidence par le noircissement de la tyrosine et par la formation du crésol-azur.

En ce qui concerne la *pseudo-peroxydase*, découverte en 1928 par Chodat et Bustinza, nous lui consacrons plus loin un chapitre spécial.

[1] M. Bridel, *Bull. Soc. chim. biol.*, *11*, 620 (1929).

[2] B. Bloch, *Z. physiol. Chemie*, *98*, 226 (1917); B. Bloch, F. Schaef, *Biochem. Z.*, *162*, 181 (1925); B. Bloch, Das Pigment, *Hdb. d. Haut u. Geschlechtskrankheiten*, I, *1*, 434 (1927).

[3] Oppenheimer, *op. cit.*, *2*, 1792.

[4] R. Chodat dans Abderhalden, *Hdb. biolog. Arbeitsmethoden*, *4*, 1, p. 396 (1925).

[5] G. Lo Cascio, *La Clinica oculistica* (1915); *Arch. Farmacologia sperim. e scienze affini*, *47* (1929).

CHAPITRE PREMIER

Les systèmes de ferments oxydants.

Les ferments oxydants sont des ferments capables d'accélérer des réactions d'oxydation ou d'oxydo-réduction. On leur donne également le nom de ferments de respiration. Oppenheimer a proposé de les nommer ferments de dégradation ou desmolases, c'est-à-dire ferments supprimant les liaisons entre atomes de carbone, pour les opposer à la grande majorité des ferments qui ne catalysent que des processus hydrolytiques. Ce terme est heureux en ce sens qu'il permet de réunir en une classe les zymases ou agents de la fermentation alcoolique et les ferments de respiration; il ne peut cependant englober que par extension certains ferments oxydants tels que la catalase.

Le domaine des ferments oxydants est l'un des moins bien connus de l'enzymologie; la spécificité et le mécanisme même de l'action de ces ferments ne sont pas encore parfaitement établis, et, partant, la classification n'est pas définitive et varie d'un auteur à l'autre. La plus commode à notre sens, du moins pour les besoins de la chimie végétale, est encore celle qu'emploie R. Chodat [1], qui ne considère que les conditions extérieures de la réaction. Faisant donc des zymases un groupe à part, il distingue parmi les ferments de respiration trois sous-groupes différents, selon la provenance de l'oxygène intervenant dans le phénomène d'oxydation; ce sont:

1. *Oxydases*, ferments catalysant l'action oxydante de l'oxygène de l'air sur des substrats oxydables.

2. *Peroxydases*, ferments catalysant l'action oxydante des peroxydes sur des substrats oxydables.

3. *Oxydo-réductases* ou hydro-oxydases, ferments catalysant les oxydo-réductions hydroclastiques, c'est-à-dire phénomènes d'oxydation et de réduction simultanée de certains substrats

[1] Dans F. Ullmann, *Enzyklopädie der technischen Chemie*, 2me édition, 1930, vol. V, p. 152.

où l'oxygène et l'hydrogène nécessaires sont fournis par la décomposition de l'eau.

Nous ne nous occuperons dans ce travail que des deux premiers groupes, qu'Oppenheimer a réunis sous le terme général de chromo-oxydases et de chromo-déhydrases, parce que leur fonction essentielle, sinon spécifique, paraît être la coloration de chromogènes cycliques, par oxydation de systèmes benzoïdes ou de leucodérivés.

Chacun de ces deux groupes comprend deux ferments principaux: les deux oxydases sont la *laccase* et la *tyrosinase*, et les deux déhydrases sont la *peroxydase* proprement dite et la *pseudo-peroxydase* (découverte en 1928 par R. Chodat et F. Bustinza).

Il est nécessaire de caractériser ici ces ferments en quelques mots. Du point de vue de la spécificité et des produits de réaction, ils devraient être regroupés. Les catalyses effectuées par la laccase sont homologues à celles du système peroxyde-peroxydase, celles effectuées par la tyrosinase sont, d'après les recherches qui vont suivre, homologues aux catalyses dépendant du système peroxyde-pseudo-peroxydase. Les deux premiers catalysent l'oxydation de composés aromatiques tels que les polyphénols. Mais — et nous y reviendrons plus loin — la formation de quinones à partir de polyphénols, l'action donc de « polyphénolase » n'est pas la seule qu'exercent ces ferments. Ils sont aussi susceptibles d'attaquer des monophénols, bien que de façon différente. La tyrosinase, de son côté, a une spécificité plus marquée; elle oxyde les monophénols, par l'intermédiaire probablement d'un stade ortho-di-phénol, en ortho-quinones; cette action est particulièrement connue pour le para-crésol et la tyrosine; la même réaction, du moins en ce qui concerne le para-crésol — le cas de la tyrosine est douteux —, est catalysée par le système peroxyde-pseudo-peroxydase.

Il y a déjà plus de 25 ans, R. Chodat, dans une conférence résumant des travaux antérieurs [1], distinguait nettement les quatre ferments que nous venons d'énumérer. Il nous semble utile de citer ici la conclusion de ce mémoire qui trace les grandes

[1] *Journ. suisse Chimie et Pharm.*, 1905, nº 46.

lignes du système des ferments oxydants, tel que les recherches récentes viennent de le confirmer dans l'essentiel.

« En résumé: il y a plusieurs catégories de ferments oxydants:

A. *Oxydases.*

1. Les laccases, considérées par nous comme des systèmes peroxydes-peroxydases, analogues au système hydroperoxyde-peroxydase.

Parfois le peroxyde ferment est inconnu; c'est une substance organique particulière, participant de la nature des ferments. Nous l'avons nommée oxygénase.

2. Les tyrosinases, qui sont sans doute des systèmes analogues aux lacases, mais à propriétés spéciales.

3. D'autres ferments oxydants spécifiques.

B. *Peroxydases.*

1. Superoxydase, répandue dans les végétaux, activant l'H_2O_2 et les autres peroxydes dans le phénomène d'oxydation des polyphénols (à deux substitutions hydroxylées ou amidées dans leur noyau en position para ortho) et celui de KI acidulé.

2. Peroxydases spécifiques liées aux oxygénases et constituant les oxydases diverses.

3. Peroxydases à rechercher, qui avec H_2O_2 produiraient l'oxydation de la tyrosine et de corps analogues.

C. *Catalases.* »

Cette citation appelle quelques commentaires et nous permet de toucher ici à la théorie générale des oxydases et peroxydases.

1° On se trouve en présence de quatre ferments spécifiques: la peroxydase (appelée dans cette citation « superoxydase »), la laccase, la pseudo-peroxydase (le ferment à découvrir) et la tyrosinase sont des ferments bien distincts.

2° Les relations entre les peroxydases et les oxydases sont déjà exprimées dans le même mémoire, à une autre place, par la formule: « le système hydroperoxyde-peroxydase constitue une image de la laccase », formule que nous pouvons étendre

maintenant au cas de la tyrosinase et énoncer de façon générale que « les systèmes peroxydase-peroxyde sont des images des oxydases directes » [1].

3° En ce qui concerne l'unicité des oxydases, les opinions varient. R. Chodat et A. Bach ont tout d'abord admis que les oxydases sont formées d'une peroxydase spécifique et d'une oxygénase liée à celle-ci, l'oxygénase étant un peroxyde « susceptible de présenter les caractères d'un ferment (destruction par la chaleur, inhibition par les poisons, précipitation par l'alcool) [2]. Ces auteurs avaient cru avoir séparé une peroxydase et une oxygénase par la précipitation fractionnée d'extraits de *Lactarius vellereus* à l'aide de l'alcool [3]. Ce résultat est souvent cité dans les travaux postérieurs, et ce n'est que récemment que C. Pugh [4] a étudié à nouveau le phénomène plus particulièrement. Elle a confirmé qu'en fractionnant par l'alcool à 40 % les extraits de divers *Lactarius*, on obtient une fraction oxydasique insoluble, qui est fortement activée par les peroxydes, et notamment par la fraction soluble dans l'alcool à 40%. Il résulte cependant de ses recherches que l'activation apparente par la peroxydase doit probablement être attribuée surtout à des substances autoxydables contenues dans ces extraits de champignons, et qui, se transformant en peroxydes, forment avec la peroxydase un système analogue dans son action à l'oxydase.

Le fait, par exemple, que tous les essais de séparation de la tyrosinase en ferment et co-ferment ont échoué et que les communications positives à ce sujet se sont révélées erronées [5] parle également en faveur d'une explication de ce genre. En tout cas, tant que la séparation de la laccase en une peroxydase et une oxygénase n'aura pas été confirmée de façon convaincante, il convient d'être très prudent à ce sujet, et pour notre part, nous penchons à admettre l'unicité de la laccase, dans le même sens que l'unicité de la tyrosinase.

[1] R. Chodat, *Archives* [5], 10, *suppl.*, p. 106 (1928); le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. de Genève*, *45*, 106 (1928).

[2] R. Chodat, A. Bach, *Archives* [4], *17*, 31 (1904).

[3] Id., *Ber*, *36*, 606 (1903).

[4] C. Pugh, *Biochem. Journ.*, *23*, 456 (1929).

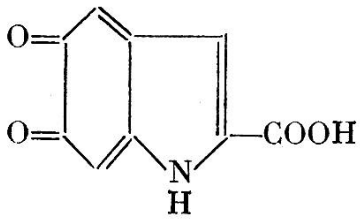
[5] R. Chodat, F. Wyss, *Archives* [5], 4, *suppl.*, p. 22 (1922); le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. de Genève*, *39*, 22 (1922).

En résumé, l'état actuel des recherches sur les ferments oxydants proprement dits permet de reconnaître l'unicité et l'individualité propre d'au moins trois ferments: laccase, tyrosinase, peroxydase. A ceux-ci vient s'ajouter un quatrième, la pseudo-peroxydase, qui fait l'objet du présent travail. D'après l'expression déjà citée de R. Chodat, le système peroxyde-peroxydase est une image de la laccase; de même, le système peroxyde-pseudo-peroxydase est — en ce qui concerne son action sur le para-crésol du moins — une image de la tyrosinase. Aussi, pour comprendre le mode d'action de la pseudo-peroxydase, est-il nécessaire de développer celui de la tyrosinase.

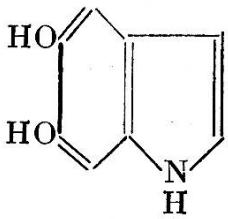
CHAPITRE II

Mode d'action de la tyrosinase.

Comme critère de la présence de tyrosinase, on admet en général son action sur la tyrosinase ou les dérivés voisins, action découverte par Bertrand [1]. La tyrosinase oxyde ces corps en solution aqueuse. Le liquide se colore d'abord en rouge, puis passe au noir par suite de la formation de pigments insolubles



Quinone-5-6 de l'acide indol-2-carbonique



5-6-dioxy-indol

de constitution encore inconnue, les mélanines. Seule la phase rouge est due au ferment. Elle correspond à la formation d'une quinone et à la cyclisation de la chaîne latérale en un noyau indol [2]. Ce corps rouge se décolore tout d'abord avant de se

[1] Bertrand, *Bull. Soc. chim.* [3], *15*, 793 (1896).
[2] H. S. Raper, *Biochem. Journ.*, *21*, 89 (1927).

transformer en mélanine; selon l'hypothèse de Raper, la quinone subit une auto-réduction et partiellement une perte de CO_2; le produit serait le 5-6-dioxy-indol, qui s'oxyderait spontanément à l'air en donnant des mélanines. La transformation de la phase rouge en phase noire se produit à l'air sans que la présence de ferment soit nécessaire (celui-ci ayant été par exemple détruit par ébullition) et est favorisée par les sels neutres et par une réaction alcaline.

L'action de la tyrosinase sur le para-crésol, découverte par R. Chodat, est bien moins utilisée et ceci bien à tort; elle est tout aussi spécifique et beaucoup plus commode à déceler que la réaction de la tyrosine. Oppenheimer même, en général si bien informé, n'a pas compris le sens de ces travaux, lorsqu'il écrit [1] que, dans la réaction tyrosinase-para-crésol-acide aminé, le para-crésol a été ajouté comme antiseptique, tandis que, dès le début, ce para-crésol a été pour Chodat le réactif le plus important de la tyrosinase.

Purifiée, libre d'acides aminés, la tyrosinase agit sur le para-crésol pur en donnant une coloration jaune d'or [2]. La présence de traces d'acides aminés donne lieu à une coloration rouge. Si les acides aminés sont en quantité suffisante, la couleur rouge passe au violet, puis au bleu foncé, avec dichroïsme intense rouge fuchsine. On obtient ainsi un pigment auquel Chodat a donné le nom de *crésol-azur*.

Un produit tout différent est celui qui résulte de l'action de la tyrosinase sur un mélange de para-crésol et d'indol; on obtient de fines aiguilles bleues, insolubles dans l'eau et se dissolvant avec une belle couleur rouge cerise dans le chloroforme. Chodat a donné à ce corps le nom d'*indo-crésol*.

Enfin, un troisième corps est produit par l'action de la tyrosinase sur un mélange de para-crésol et de phloroglucine, cette dernière pouvant être remplacée par la résorcine ou l'orcine: c'est la *crésol-rubine*, matière colorante jaune, à reflets rouge rubis et susceptible de teindre la soie [3].

Nous nous sommes attachés à élucider la nature de ces

[1] Oppenheimer, *Die Fermente u. ihre Wirkungen*, *2*, 1811 (1926).
[2] R. Chodat, *Archives* [4], *33*, 70 (1912).
[3] R. Chodat, F. Wyss, *loc. cit.*

réactions. Les premières observations à ce sujet ont été faites par Chodat et Schweizer [1] qui ont mis en évidence l'action désaminante qu'exerce la tyrosinase lorsqu'elle agit sur un mélange de para-crésol et de glycocolle. Chodat et Wyss [2] ont montré que dans cette réaction la seconde phase, le bleuissement, peut être obtenue chimiquement à partir de la phase rouge. Quant à l'action désaminante, Raper et ses collaborateurs ont montré qu'elle non plus n'est pas due au ferment lui-même, mais résulte du même processus chimique secondaire; ils ont posé comme hypothèse que c'est une ortho-quinone qui est responsable de la désamination [3]. Le fait a été confirmé par Chodat [4] qui a fait agir sur du para-crésol pur de la tyrosinase de pommes de terre libre d'acides aminés. Après 24 heures, le liquide était devenu brun. Il a alors chauffé à 100° pour détruire le ferment, puis ajouté un acide aminé; dans ces conditions, la formation de crésol-azur a lieu avec rapidité et netteté. Le corps qui donne cette réaction, étant un produit d'oxydation du para-crésol, devrait être une tolu-quinone. La tolu-para-quinone donne bien, avec le glycocolle, une belle couleur rouge, mais elle ne produit ni désamination, ni crésol-azur. Il était donc vraisemblable que la quinone résultant de l'action de la tyrosinase sur le para-crésol est l'ortho-tolu-quinone. C. Pugh et H. Raper [5] ont montré que la tyrosinase agissant sur des phénols en présence d'aniline donne lieu à la formation de corps dont les propriétés sont identiques à celles des anilino-ortho-quinones obtenues à partir de quinones correspondantes. Dans un essai de désamination du glycocolle par l'ortho-tolu-quinone, ces auteurs ont obtenu un liquide semblable à celui résultant de l'action de la tyrosinase sur le para-crésol en présence de glycocolle.

Nous avons repris ces essais et nous avons successivement pu obtenir le crésol-azur, l'indo-crésol et la crésol-rubine en faisant

[1] R. Chodat, K. Schweizer, *Archives* [4], *35*, 140 (1913).

[2] R. Chodat, F. Wyss, *Archives* [5], 4, *suppl.*, p. 24 (1922); le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. Genève*, *39*, 24 (1922).

[3] F. Happold, H. Raper, *Biochem. Journ.*, *19*, 92 (1925).

[4] R. Chodat, *Archives* [5], 10, *suppl.*, p. 99; le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. Genève*, *45*, 99 (1928).

[5] C. Pugh, H. Raper, *Biochem. Journ.*, *21*, 1370 (1927).

agir l'ortho-tolu-quinone sur des solutions de glycocolle, d'indol et de phloroglucine. De même que dans la réaction para-crésol-glycocolle catalysée par la tyrosinase, la formation de crésol-azur est précédée de diverses phases, de même, lors de la synthèse du crésol-azur, l'action de l'ortho-tolu-quinone sur le glycocolle se traduit par une coloration rouge carmin du liquide, qui fonce ensuite peu à peu et finit par exhiber le dichroïsme caractéristique.

La réaction la plus rapide, la plus nette, est celle de l'indo-crésol. Si à une solution d'indol on ajoute quelques cm^3 d'une solution éthérée d'ortho-tolu-quinone, le liquide se trouble presque immédiatement, devient opaque, et de petits cristaux d'indol-crésol, solubles en rouge framboise dans le chloroforme, précipitent. La réaction de la crésol-rubine est tout aussi rapide, mais la couleur jaune d'or qui la caractérise est moins facile à identifier.

Toutes les réactions colorées du para-crésol avec les acides aminés, l'indol, les polyphénols, etc., produites sous l'effet de la tyrosinase se ramènent donc en dernière analyse à des condensations de l'ortho-tolu-quinone avec ces corps. L'action de la tyrosinase sur le para-crésol est limitée à l'oxydation du para-crésol en ortho-quinone, oxydation qui vraisemblablement comporte le stade intermédiaire d'un ortho-diphénol. Ce que Raper et Pugh ont mis en évidence en remplaçant le complément de la réaction — l'acide aminé — par l'aniline, nous avons pu le montrer de façon certaine en synthétisant les produits mêmes de la réaction.

On retombe donc dans le cas du para-crésol sur un mécanisme analogue à celui de la tyrosine, pour laquelle on a démontré que l'action du ferment ne dépasse pas le stade quinone et que les phases subséquentes correspondent à des condensations qui se produisent sans intervention de ferment.

Sur la base des travaux que nous avons résumés, Oppenheimer a émis une hypothèse qui de prime abord paraît très séduisante. On peut, dit-il, avancer l'hypothèse de travail suivante [1]: le système tyrosinase comprendrait deux facteurs:

[1] *Loc. cit.*, p. 1808.

un facteur spécifique propre, facteur primaire, catalysant l'oxydation des monophénols en ortho-diphénols,

et un facteur secondaire, le système d'oxydation des diphénols, qui n'a plus un caractère spécifique de tyrosinase, mais un caractère d'oxydase.

D'autre part, la laccase aurait comme propriété spécifique l'oxydation en quinones des polyphénols (pyrogallol, laccol), de la para-phénylène-diamine, etc.

Cette théorie est bien séduisante, mais elle appelle plusieurs objections. En particulier, l'action de la peroxydase sur le para-crésol ne trouve pas de place dans ce cadre. Il faudrait élucider la nature chimique de la réaction qui, à partir d'une solution de para-crésol, produit un trouble ou un précipité blanc, réaction spécifique et extrêmement sensible de la peroxydase sur un monophénol. Il faut en outre signaler que cette théorie, prise comme hypothèse de travail, laisse trop dans l'ombre les relations entre laccase et peroxydase, tyrosinase et pseudo-peroxydase, ferments qui peuvent s'ordonner en deux séries de deux groupements différents, suivant que nous avons plus spécialement en vue la spécificité du substrat ou celle du mode d'oxydation.

CHAPITRE III

Pseudo-peroxydase.

Les premiers essais que nous avons effectués l'ont été sur la base des recherches de Chodat et Bustinza [1], que nous rappellerons tout d'abord brièvement. Ces auteurs ont découvert que l'émulsion du rhizome de *Cyperus esculentus* L. colore une solution de para-crésol en rouge carmin en présence d'eau oxygénée. Ils ont attribué cette coloration à l'effet d'un ferment nouveau, la pseudo-peroxydase. La réaction a également lieu lorsque la peroxydase est extraite de l'émulsion par dissolution dans

[1] R. Chodat, F. Bustinza, *Archives* [5], 10, *suppl.*, p. 103 (1928); le même dans *C. R. Soc. phys. et hist. nat. de Genève*, *45*, 103 (1928).

l'alcool à 40% ou inactivée par l'alcool bouillant. L'ébullition avec de l'alcool ne détruirait donc pas le pouvoir que possède l'émulsion de former un pigment rouge à partir du para-crésol et en présence d'eau oxygénée [1]; l'ébullition avec de l'eau, par contre, inactive complètement l'émulsion; celle-ci, ainsi inactivée et ajoutée soit à la peroxydase, soit à la tyrosinase, ne leur confère pas de fonction de pseudo-peroxydase. Il ne s'agit donc pas d'un co-ferment thermostable. Enfin, l'addition d'un acide aminé au pigment rouge formé par la pseudo-peroxydase donne lieu à la formation de crésol-azur. Relevons encore que les auteurs ne sont pas parvenus à mettre la pseudo-peroxydase en solution, ni à constater d'action de ce ferment sur la tyrosine.

Dans nos essais préliminaires, nous avons cherché à préciser les propriétés de la pseudo-peroxydase, ou plutôt — puisque celle-ci ne se trouvait pas en solution — de l'émulsion de pseudo-peroxydase de *Cyperus esculentus*, et nous avons en même temps essayé de mettre le ferment en solution. Disons tout de suite que nous ne sommes pas parvenu à obtenir une solution de pseudo-peroxydase claire et plus ou moins physiologiquement pure, analogue aux solutions de tyrosinase ou de peroxydase que nous avons employées.

Pour essayer d'éluer la pseudo-peroxydase, qui semble adsorbée au tissu végétal, nous avons extrait les lipoïdes des rhizomes en traitant ceux-ci à l'acétone, au chloroforme, à l'éther de pétrole. La poudre de rhizome ainsi dégraissée, ainsi que des rhizomes non dégraissés, secs, ou gonflés par immersion dans l'eau pendant 24 heures, puis broyés, ont été laissés macérer avec de l'eau de robinet, de l'eau distillée, des solutions de bicarbonate de soude (saturée), de chlorure d'ammonium (1, 2, 5, 10%), de chlorure de sodium *(id.)*, de carbonate d'ammonium *(id.)*, de carbonate de soude (½, 1 et 2%), d'ammoniaque (traces, 0,1%, 1 et 2,5%), d'acide acétique $\left(\frac{n}{50}\right)$, de phosphate secondaire de sodium $\left(\frac{m}{15}\right)$; ainsi que des solutions-tampon d'acétate (pH = 4) et de phosphates (pH = 6,9).

Dans certains essais, les tubercules de *Cyperus* ont été coupés

[1] Voir à ce sujet plus loin, p. 45.

au microtome (15 μ) et broyés au mortier d'agate, ou bien ils ont été broyés avec de la silice et du kieselguhr, et la masse exprimée à la presse (environ 50 atm.). Nous avons également essayé l'autolyse aseptique en présence de toluol, de chloroforme, ou de vapeurs de chloroforme, suivie d'extraction à l'eau distillée. Dans tous ces essais, nous n'avons pas obtenu de résultat positif.

Nous avons alors fait germer des tubercules sur du coton humide. Après quatre jours, les plantules étaient apparus et se développaient. Nous avons alors broyé les tubercules avec de l'eau, et en filtrant sur du papier l'émulsion ainsi obtenue, nous avons eu un liquide un peu trouble et donnant faiblement la réaction de la pseudo-peroxydase. Le trouble n'était dû ni aux graisses ni à l'amidon. En effet, si l'on secouait le filtrat avec de l'éther de pétrole, le trouble persistait; d'autre part, l'addition d'iode ne le colorait pas en bleu.

Nous avons également obtenu un filtrat actif à partir de rhizomes gonflés 24 heures dans de l'eau, coupés en tranches fines au scalpel, traités quelques jours par la vapeur de chloroforme, puis dégraissés par l'acétone et l'éther de pétrole et enfin broyés avec de l'eau.

Mais, dans les deux cas, le filtrat n'était que très faiblement actif (coloration rose fugace du para-crésol, alors que, dans les mêmes conditions, la masse restée sur le filtre et délayée dans la même quantité d'eau donne une coloration rouge carmin intense et persistante). En outre, la précipitation par l'alcool dans le but de purifier le ferment a eu pour effet d'en inactiver les faibles quantités présentes. Ces filtrats étaient donc inutilisables pour l'étude des propriétés de la pseudo-peroxydase.

Ce n'est que sur le point d'arrêter nos recherches que nous avons découvert la présence de la pseudo-peroxydase dans un grand nombre de végétaux et en particulier dans les amandes douces. La manière la plus commode d'obtenir une préparation de pseudo-peroxydase est la suivante: des amandes douces décortiquées sont ébouillantées, puis, après une minute, refroidies rapidement. La pellicule s'enlève alors facilement. On broie les amandes dans un mortier avec de l'eau distillée, de façon à obtenir un lait homogène. Ajouter un peu de chloroforme et

laisser 24 heures. Filtrer. Le lait d'amandes ainsi obtenu a une forte réaction de pseudo-peroxydase. Par contre, le sérum préparé à partir de ce lait en précipitant les protides par l'acide acétique, sérum qui contient l'émulsine, ne donne pas, même après neutralisation, de réaction de pseudo-peroxydase. Pour avoir une préparation homogène et pouvant se conserver, nous avons précipité le lait d'amandes par l'alcool. Ce précipité donne, après dessication, une poudre blanche qu'il suffit ensuite de délayer dans de l'eau pour obtenir une émulsion assez active de pseudo-peroxydase, mais dans laquelle ce ferment n'est pas dans un état de dispersion suffisante pour pouvoir passer à travers un papier filtre. Le temps limité dont nous disposions ne nous a pas permis de faire de nouvelles recherches pour la mise en solution de la pseudo-peroxydase du lait d'amandes. Signalons seulement qu'un essai de protéolyse à chaud avec de la papaïne n'a pas eu pour résultat de permettre l'émulsion de la pseudo-peroxydase, pas plus qu'un essai de macération avec une solution de para-crésol $\frac{1}{250^e}$.

Les expériences que nous avons faites ont toutes été effectuées avec l'émulsion de *Cyperus* ou le lait d'amandes, donc avec un ferment brut, non purifié. Nous ne nous dissimulons pas ce que les conclusions de telles expériences peuvent comporter d'incertitude, puisque le ferment n'est pas physiologiquement pur. Mais, dans un ordre d'idées plus modeste, il nous suffisait d'arriver à une préparation homogène nous permettant, quoique impure, de reconnaître l'individualité et la spécificité du ferment étudié. L'émulsion de *Cyperus*, et plus particulièrement le lait d'amandes, nous paraissent répondre à ces conditions.

Réactions de la pseudo-peroxydase.

Nous avons étudié de façon qualitative les réactions caractéristiques de la pseudo-peroxydase. La réaction la plus importante du matériel végétal contenant la pseudo-peroxydase est de catalyser la formation d'un pigment rouge soluble à partir du para-crésol et en présence d'eau oxygénée. Cette réaction est rapide et vive. Elle est déjà visible après une minute avec

une émulsion de 0,1 gr de tubercule de *Cyperus esculentus* dans 5 cm³ d'eau, additionnée de 1 cm³ de solution saturée de bicarbonate de soude, 1 cm³ de solution de para-crésol $\frac{1}{100^e}$, et quelques gouttes d'eau oxygénée à 1 ½%. Elle se développe bien en milieu neutre ou faiblement alcalin (bicarbonaté). En milieu faiblement acide (pH = environ 5), tel qu'on l'obtient en laissant l'émulsion s'autolyser aseptiquement en présence de toluol ou de chloroforme, on constate une teinte jaune qui vire ensuite au rose par addition d'alcali ou même simplement à l'ébullition. Il s'agit là d'une véritable réaction et non d'une propriété d'indicateur, puisque l'acidification ne ramène pas la teinte rose au jaune. Rappelons pour mémoire que la réaction tyrosinase-para-crésol ne donne pas une teinte rouge, mais bien un pigment jaune, et que le pigment rouge n'apparaît, ainsi qu'il résulte des recherches de Chodat, qu'en présence de faibles quantités d'acides aminés. Ce n'est que si les acides aminés se trouvent en quantité suffisante que la réaction continue jusqu'au crésol-azur. Il est tout-à-fait possible que le corps rouge produit par la peroxydase ne se forme lui aussi qu'en présence d'acides aminés. C'est une question qui ne pourra être résolue que lorsqu'on aura séparé la pseudo-peroxydase des acides aminés qui l'accompagnent dans le matériel végétal. En tout cas, les émulsions de pseudo-peroxydase que nous avons utilisées contiennent bien des acides aminés, puisque ces émulsions, inactivées par ébullition et additionnées de tyrosinase de pomme de terre et de para-crésol, ont donné la même réaction rose que celle attribuée à la pseudo-peroxydase.

Signalons que, tandis que dans la réaction de la tyrosinase, la teinte rouge se développe à partir de la surface, avec la pseudo-peroxydase elle se propage de façon homogène dans toute l'émulsion. Lorsque l'eau oxygénée est complètement décomposée par la catalase, la solution se décolore lentement, mais redevient rouge si on l'aère en l'agitant. Par l'addition d'acides aminés à la solution rouge préalablement débarrassée de son excès d'eau oxygénée, on peut obtenir le crésol-azur. D'autre part, la pseudo-peroxydase donne, à partir du para-crésol et de l'indol, et en présence de l'eau oxygénée, rapidement

et nettement, la réaction de l'indo-crésol. Dans des conditions analogues, on obtient, par exemple avec la phloroglucine, la crésol-rubine. Ces deux derniers pigments peuvent également être obtenus si l'on n'ajoute l'indol ou la phloroglucine que lorsque le corps rouge est déjà formé.

Ceci nous mène à la question de la nature chimique de la catalyse par la pseudo-peroxydase. Comme nous l'avons démontré par ailleurs, les réactions du crésol-azur, de l'indo-crésol et de la crésol-rubine ne sont que des réactions de condensation de l'ortho-tolu-quinone avec un acide aminé, l'indol ou la phloroglucine. Comme la tyrosinase, mais seulement en présence d'eau oxygénée, *la pseudo-peroxydase oxyde le para-crésol en ortho-tolu-quinone*, et le système pseudo-peroxydase-eau oxygénée remplit à l'égard du para-crésol la même fonction que la tyrosinase.

Il ne s'ensuit pas nécessairement que le corps rouge soit identique à l'ortho-tolu-quinone; cette dernière est en effet jaune en solution aqueuse; mais le fait essentiel est que la solution rouge donne les réactions spécifiques de cette quinone, réaction que ne donnent entre autres ni l'ortho-quinone, ni la para-quinone, ni la para-tolu-quinone. Il s'agit probablement d'un complexe ou d'une combinaison de l'ortho-tolu-quinone avec un autre corps, un acide aminé par exemple.

Si l'identité des réactions du système étudié avec celles de la tyrosinase est parfaitement établie à l'égard du para-crésol, il n'en est pas de même à l'égard de la tyrosine. Chodat et Bustinza n'ont pas pu mettre en évidence l'action de la pseudo-peroxydase sur la tyrosine. Nous avons repris cette question et ne sommes pas parvenu à une conclusion bien nette. Nous avons bien obtenu dans certains de nos essais une coloration gris foncé de la solution après 24 ou 48 heures, mais nous n'avons jamais pu observer la première phase rouge de cette réaction, ce qui permet de douter de la nature du phénomène. La question reste donc encore ouverte.

Thermolabilité de la pseudo-peroxydase.

Nous avons contrôlé que les réactions de la pseudo-peroxydase possèdent bien le caractère de thermolabilité propre aux

ferments. L'ébullition de l'émulsion de *Cyperus* détruit le pouvoir de fermentation de celle-ci; le traitement à l'alcool bouillant a une action moins violente; des tubercules broyés avec de l'alcool et portés 2 à 3 minutes à l'ébullition colorent encore fortement le para-crésol en présence d'eau oxygénée; si l'ébullition a duré plus longtemps, par exemple 10 minutes, la coloration qu'on obtient est beaucoup plus faible. Enfin, des coupes très fines au microtome (10 à 15 μ) traitées 1 minute par l'alcool bouillant ne donnent ensuite plus aucune réaction.

Localisation de la pseudo-peroxydase dans le rhizome de *Cyperus esculentus* L.

Nous avons cherché à localiser le ferment dans le tissu du rhizome de *Cyperus esculentus* sur des coupes au microtome de 10 à 15 μ d'épaisseur. Les coupes traitées à la glycérine, à l'eau ou à l'eau oxygénée ne présentaient sous le microscope aucune coloration particulière. Dans les coupes traitées au para-crésol seul, on constate qu'après quelques heures, certaines cellules sont colorées en brun orangé, et toute la coupe prend lentement une teinte rose pâle, qui plus tard vire au bleu sur les bords au contact de l'air. Il s'agit ici très probablement d'une action de la pseudo-peroxydase en présence des peroxydes et des acides aminés de la plante même, plutôt que d'une action de tyrosinase. Nous avons pu observer macroscopiquement la même réaction en éprouvette sur une émulsion de *Cyperus*, mais jamais sur la pseudo-peroxydase purifiée, préparée à partir du lait d'amandes.

Les coupes traitées au para-crésol $\left(\frac{1}{250^e}\right)$ et à l'eau oxygénée très diluée réagissent très rapidement. Les cellules colorées en rouge brunâtre apparaissent en moins de 1 minute, et, après 2 à 4 minutes, toute la coupe est colorée en rose à partir de ces centres, qui restent beaucoup plus foncés. On a donc bien affaire à un pigment soluble, produit par un ferment fixé ou adsorbé dans le tissu. Ces cellules particulières sont, pour autant que nous avons pu le constater, plus petites que les cellules voisines, et présentent, ainsi préparées, une granulation très fine avec grains d'amidon généralement absents. Elles

sont dispersées sans ordre apparent. Si l'on traite par le chlorure de zinc iodé des coupes ainsi colorées en rose, les huiles apparaissent en jaune et l'amidon en violet, mais les cellules déjà colorées en rouge brunâtre gardent leur teinte et ne montrent aucun grain d'amidon. En présence d'acide acétique dilué (à 2%), les centres de coloration apparaissent en jaune et toute la coupe prend une teinte jaunâtre; l'addition de bicarbonate fait virer la coloration au rose.

Le traitement préalable des coupes par l'alcool ou le chloroforme pendant 24 heures n'inhibe pas la réaction. Par contre, ainsi que nous l'avons déjà relevé, il suffit de les maintenir une minute dans de l'alcool à l'ébullition pour que la coloration n'apparaisse plus.

Recherche de la pseudo-peroxydase dans divers végétaux.

Chodat et Bustinza ont trouvé la pseudo-peroxydase, outre dans *Cyperus esculentus*, dans *Cyperus alternifolius*, *Carex pilosa*, *Carex glauca* et *Carex sylvatica*. Nous avons recherché ce ferment dans d'autres végétaux, et nous avons pu le mettre en évidence dans de nombreux cas. A cet effet, nous avons broyé dans de l'eau quelques fragments des parties du végétal étudiées pour en obtenir une émulsion; celle-ci a été divisée entre trois éprouvettes; la première a été portée quelques minutes à l'ébullition, puis a reçu un volume égal de para-crésol à $\frac{1}{250^e}$, et quelques gouttes d'eau oxygénée à 0,5%. Les autres éprouvettes n'ont pas été chauffées et ont été additionnées, la deuxième de para-crésol et la troisième de para-crésol et d'eau oxygénée. Nous avons admis la présence de pseudo-peroxydase dans les végétaux qui ont donné après addition d'eau oxygénée dans le troisième tube une coloration franchement rose ou rouge, et pour lesquelles les deux tubes témoins n'ont pas présenté de coloration après au moins douze heures:

Pistaches *(Rhus lentiscus)*,

Amandes douces, décortiquées *(Amygdalus communis*, var. *dulcis)*,

Noix du Brésil *(Bertholletia excelsea)*,
Noisettes, décortiquées *(Corylus Avellana)*,
Amandes des noyaux de cerise *(Prunus avium)*,
Graines de courge *(Cucurbita Pepo)*,
Graines de moutarde *(Sinapis alba)*,
Graines de lin *(Linum usitatissimum)*,
Graines de chou-navet *(Brassica Napus)*,
Graines de coton égyptien, en germination *(Gossipium sp.)*.

Le riz entier du commerce a donné une réaction très faible. Les amandes des noyaux de pêche, les latex d'une asclépiade et d'une euphorbiacée n'ont pas donné de réaction. Le seigle, le blé, le chanvre contiennent de la tyrosinase, mais paraissent aussi contenir de la pseudo-peroxydase, la réaction étant plus intense et plus rapide en présence d'eau oxygénée.

Il est très intéressant de constater que la pseudo-peroxydase semble être assez répandue dans les phanérogames, en particulier dans les graines oléagineuses [1]. Il est certain qu'on pourra mettre ce ferment en évidence dans de nombreux végétaux encore, car nous n'avons fait des essais qu'avec ceux que nous avions justement sous la main.

CHAPITRE IV

Action de l'eau oxygénée sur la tyrosinase.

Pour nous convaincre de l'individualité réelle de la pseudo-peroxydase et pour délimiter sa spécificité envers celle de la tyrosinase, nous avons effectué quelques essais au sujet de l'action de l'eau oxygénée sur la tyrosinase. C'est l'un des problèmes concernant la tyrosinase qui a fait l'objet de beaucoup de controverses et sur lequel des opinions contradictoires s'affrontent.

[1] Rappelons que, d'après Freedericksz, thèse, Genève, 1911, *Publications de l'Institut de botanique*, VIII, les graines oléagineuses sont plus riches en catalase que les semences qui contiennent principalement des hydrates de carbone, ce qui est à mettre en rapport avec un pouvoir respiratoire plus élevé des graines oléagineuses.

Gessard [1] a le premier signalé une accélération de la mélanogénèse en présence d'eau oxygénée:

« Cette période latente ou temps mort qui précède le rosissement et durant laquelle aucun phénomène apparent ne s'observe, est notablement réduite. Soit par exemple une solution de tyrosinase telle qu'elle n'amène la coloration de la tyrosine qu'au bout de plusieurs heures. Ce délai est réduit à quelques minutes par l'addition d'eau oxygénée dont on aura seulement pris soin de saturer préalablement l'acidité. »

Il suffit même, d'après lui, d'exposer au soleil la solution de tyrosine pour réduire considérablement le temps mort par suite de la formation de peroxyde.

A. Bach a, dans plusieurs publications [2], soutenu que l'eau oxygénée active la tyrosinase dans le phénomène de la mélanogénèse. De même, O. v. Fürth et E. Jerusalem [3]. Par contre, R. Chodat [4] n'a pas pu constater d'activation par l'eau oxygénée, mais seulement une inhibition. Staub [5] a trouvé que l'addition de 0,5 cm³ d'eau oxygénée à 1% à 8 cm³ d'une solution contenant 2 cm³ de tyrosinase de pomme de terre à $\frac{1}{500^e}$, 2 cm³ de para-crésol $\frac{1}{60^e}$, et 2 cm³ de glycocolle à $\frac{1}{125^e}$, suffit pour diminuer la coloration rouge. Plus récemment, C. Pugh [6] a trouvé que si l'eau oxygénée est en faible quantité par rapport à la tyrosinase elle active la réaction, tandis qu'une plus forte quantité d'eau oxygénée la retarde. Cet auteur constate une accélération de la réaction sur la tyrosine en ajoutant 1 cm³ de H_2O_2 1% à 25 cm³ une solution de tyrosine contenant 1 cm³ de solution diluée de tyrosinase de vers de farine.

Nous n'avons pas été en mesure de confirmer ce résultat. En ajoutant à 1 cm³ de tyrosine à 0,1% en solution tampon de

[1] Gessard, *C. R. Soc. Biol.*, *55*, 637 (1903).
[2] A. Bach, *Ber.*, *39*, 2126 (1906); *41*, 216, 221 (1908).
[3] O. v. Fürth, E. Jerusalem, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, *10*, 131 (1907).
[4] R. Chodat, *Archives* [4], *34*, 173 (1907).
[5] Staub, *Nouvelles recherches sur la tyrosinase*, thèse, Inst. de Bot., Genève, 1908.
[6] C. Pugh, *Biochem. Journ.*, *24*, 1442 (1930).

phosphates (pH = 6,9) et 1 cm³ de tyrosinase de *Russula foetens* une goutte d'eau oxygénée à 0,005%, on inhibe déjà nettement la réaction. Dans la réaction para-crésol-tyrosinase, nous avons observé une très légère accélération en ajoutant à 5 cm³ de liquide une goutte d'eau oxygénée à 0,5%; mais l'intensité finale de la coloration après 24 heures était beaucoup plus faible dans le tube auquel nous avions ajouté l'eau oxygénée.

Il en est tout autrement avec la pseudo-peroxydase; ici, on constate que, dans la réaction du para-crésol, le tube n'ayant pas reçu d'eau oxygénée ne présente pas de coloration même après quelques jours, tandis que quelques gouttes d'eau oxygénée à 1½% ont pour effet de développer en peu de minutes une belle couleur rouge.

La tyrosinase n'est donc pas activée par l'eau oxygénée, tandis que la pseudo-peroxydase n'agit qu'en présence d'eau oxygénée (ou d'un peroxyde).

CHAPITRE V

Le crésol-azur.

Préparation et propriétés.

Nous avons préparé le crésol-azur en laissant réagir dans de grands cylindres le jus de 5 à 6 kg de pelure de pommes de terre sur un mélange de 6 litres de solution de glycocolle à 0,3% et de 2 litres de solution de para-crésol à 0,4%, le tout préservé de l'infection par une mince couche de toluol. Dans ces conditions, le liquide devient tout d'abord rouge clair, puis passe au brun rouge. Si, à ce moment, on l'acidifie, il devient plus foncé, mais garde sa teinte brune; avec de l'ammoniaque, il passe au brun verdâtre. Pour obtenir du crésol-azur, il suffit de porter à l'ébullition le liquide, qui prend alors une teinte verte; par addition d'ammoniaque, il vire au vert émeraude, tandis qu'après acidification, il présente le superbe dichroïsme bleu-rouge, caractéristique du crésol-azur. Aussi, après 48 heures, avons-

nous porté notre liquide brun-rouge à l'ébullition, puis acidifié par l'acide chlorhydrique. Autant pour faciliter l'extraction que pour précipiter les matières protéiques qui forment une mousse gênante, nous avons saturé le liquide avec du sel marin. Nous avons extrait le crésol-azur par l'alcool amylique et procédé pour la purification d'après la méthode donnée par R. Chodat: l'alcool amylique a été distillé dans le vide, et le résidu repris par l'alcool éthylique à 96%. De cette solution, le crésol-azur précipite par addition d'éther en flocons bleus amorphes qui, en séchant, donnent une masse brillante. Nous en avons repris une partie dans l'alcool absolu et précipité par l'éther absolu. L'analyse élémentaire de ce produit, préalablement séché dans le vide à 110° pendant six heures, a donné: résidu minéral, 30,7%; C, 40,61%; H, 4,32%; N, 5,53%. Le résidu minéral consiste principalement en chlorure de sodium retenu par le colorant qui se trouve en solution colloïdale. En effet, le crésol-azur ne passe pas à travers les ultra-filtres « Seitz Entkeimungsschichten »; il ne dialyse pas à travers une vessie de porc et ses solutions présentent un cône de Tyndall caractéristique. On voit que le crésol-azur contient une proportion relativement élevée d'azote, ce qui est une preuve de plus en faveur de la condensation du noyau crésol avec l'acide aminé.

Le crésol-azur se dissout dans l'eau, l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, les acides étendus, avec une couleur bleue ou violette en solution concentrée; si on dilue la solution, elle devient dichroïque, bleue par transparence, et rouge par réflexion ou sous une forte épaisseur. Dans l'acide chlorhydrique concentré, le crésol-azur se dissout en donnant une teinte bleu verdâtre qui devient dichroïque si l'on dilue; la solution dans l'acide sulfurique concentré froid est verte, mais passe lentemen au noir par carbonisation du colorant; à chaud, la carbonisation a lieu instantanément. L'acide nitrique concentré attaque le crésol-azur et le transforme en un pigment rouge. Dans les alcalis, le crésol-azur se dissout en jaune ou brun verdâtre; il est peu à peu transformé et ne présente bientôt plus de dichroïsme quand on l'acidifie. Il est insoluble dans le chloroforme et dans l'éther absolu. Il n'a pas de point de fusion, mais se décompose et se carbonise quand on le chauffe.

Synthèse du crésol-azur [1].

Pour synthétiser le crésol-azur, nous avons préparé l'ortho-tolu-quinone à partir du créosol (1-méthyl-4-oxy-3-méthoxy-benzène). Le créosol, de la maison Schuchardt, a été redistillé puis déméthylé par la méthode de de Vries [2], qui consiste à cuire le créosol à reflux en solution acétique avec de l'acide bromhydrique à 48% pendant plusieurs heures. Après refroidissement et neutralisation, on extrait par l'éther le produit de la réaction, c'est-à-dire l'homo-pyrocatéchine. Sécher au sulfate de sodium, chasser l'éther et fractionner dans le vide. L'homo-pyrocatéchine produite se solidifie dans le récipient. Elle se laisse recristalliser dans un mélange de benzène et de ligroïne et se présente sous l'aspect de paillettes blanches.

L'oxydation de l'homo-pyrocatéchine en ortho-tolu-quinone se fait d'après la méthode de Willstätter et Müller [3]; 0,2 gr d'homo-pyrocatéchine ont été dissous dans 5 cm^3 d'éther absolu, et à cette solution nous avons ajouté environ 7 cm^3 d'éther contenant 1 gr de sulfate de sodium et 1 gr d'oxyde d'argent. Après avoir secoué quelques minutes, nous avons filtré sur un petit filtre recouvert d'une couche de sulfate de sodium. La solution éthérée filtrée était rouge, à reflets verts. Nous l'avons employée telle quelle, après nous être assuré qu'aucune des réactions que nous étudions ne pouvait être attribuée à l'homo-pyrocatéchine.

Nous avons ajouté la solution éthérée à une solution de glycocolle à 0,2%, dans l'eau distillée ou tamponnée par des phosphates (pH = environ 7). Les proportions que nous avons employées étaient de 0,5 gr de glycocolle pour la solution de quinone préparée à partir de 0,2 gr d'homo-pyrocatéchine. On constate que la solution se colore tout d'abord en rouge

[1] Les préparations chimiques ont été effectuées au Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève. Je remercie M. le professeur A. Pictet, qui a bien voulu m'autoriser à y travailler; de même, je remercie vivement M. le professeur E. Cherbuliez pour l'accueil aimable qu'il m'a réservé et pour ses précieux conseils.

[2] De Vries, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas*, *28*, 278 (1909).

[3] R. Willstätter, F. Müller, *Ber.*, *44*, 2171 (1911).

carmin, puis devient plus foncée et présente au bout d'un certain temps une teinte rouge foncé à reflets bleu-roi; en acidifiant le liquide, on obtient le dichroïsme caractéristique du crésol-azur. Mais la réaction s'est produite dans l'eau distillée d'une façon différente que dans la solution tampon; tandis que dans cette dernière elle était terminée en 24 heures, il a fallu attendre environ six jours pour constater la présence de crésol-azur dans la solution préparée avec l'eau distillée. L'accélération due aux phosphates n'est pas, comme on pourrait le croire, un effet de leur pouvoir tampon; le même résultat s'obtient en les remplaçant par du chlorure de sodium (concentration 0,4%).

On peut de cette solution extraire le crésol-azur par l'alcool amylique et le purifier ensuite par la méthode habituelle. Le crésol-azur ainsi obtenu et ses solutions ne se distinguent en rien du crésol-azur préparé à l'aide de la tyrosinase.

Spectre d'absorption [1].

Nous avons étudié le spectre d'absorption du crésol-azur par la méthode de Hartley-Baly à l'aide du spectroscope Zeiss à réseau. Le crésol-azur présente une forte absorption entre 6100 et 5300 Å, avec un maximum vers 5880 Å et un second maximum plus faible vers 5550 Å. La figure ci-dessous représente l'allure de la courbe; la concentration correspond à environ 0,004 gr de crésol-azur (produit préparé par l'action de la tyrosinase et contenant environ 30% de matières minérales; voir p. 50).

APPENDICE

L'indo-crésol et la crésol-rubine.

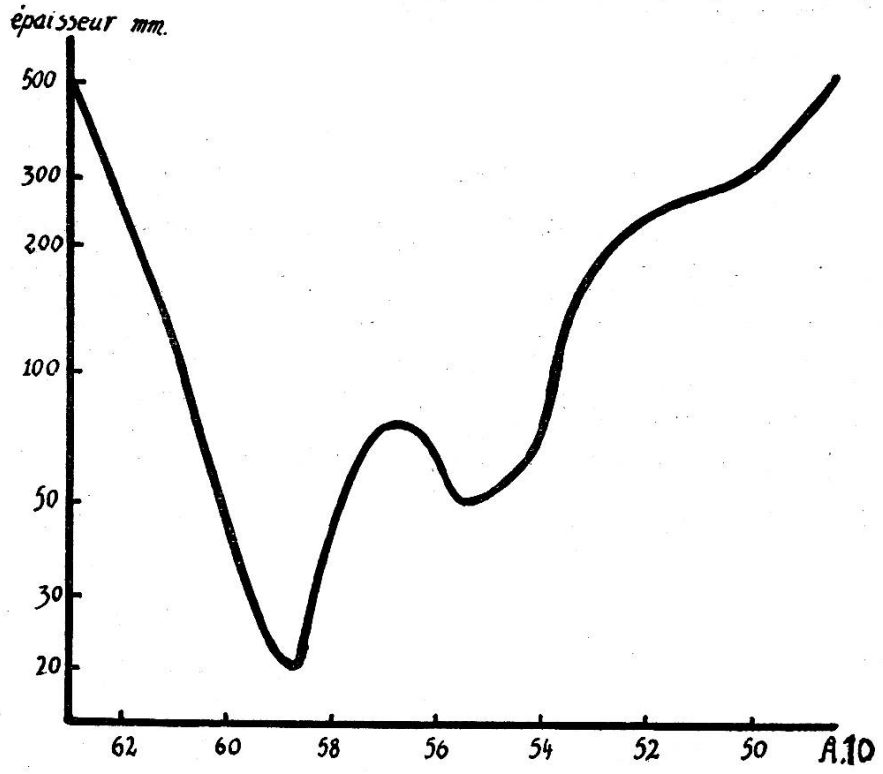
La synthèse de ces corps a été effectuée à partir de l'ortho-tolu-quinone de la même manière que celle du crésol-azur.

A 25 cm³ d'une solution de phloroglucine à 0,2%, nous avons

[1] Spectre mesuré au Laboratoire de chimie théorique. J'exprime ma vive gratitude à M. le professeur E. Briner, qui a très aimablement mis les instruments nécessaires à ma disposition. Je remercie aussi sincèrement M. le Dr B. Susz de l'aide qu'il a bien voulu m'accorder.

ajouté 2 cm³ d'une solution éthérée de la quinone (à environ 1 %). La solution prend bientôt la belle couleur jaune orange de la crésol-rubine, aussi bien en présence qu'en l'absence de sels minéraux.

Pour l'indo-crésol, nous avons employé 25 cm³ d'une solution saturée d'indol (environ 0,1 %). Le liquide se trouble très rapidement après l'addition de la solution d'ortho-tolu-quinone (2 cm³) et devient opaque, presque noir. Puis peu à peu les cristaux d'indocrésol formé se déposent au fond du récipient et le



Spectre d'absorption du crésol-azur.

liquide s'éclaircit. Ces cristaux sont solubles en rouge dans le chloroforme et l'éther et sont précipités de leur solution chloroformique par l'éther de pétrole. Sous le microscope, les cristaux d'indo-crésol présentent des formes caractéristiques; ce sont de fines aiguilles arrangées en rosettes, en étoile ou en barbes de plumes. L'indo-crésol est malheureusement très instable, aussi bien cristallisé qu'en solution, et au bout de quelque temps la couleur de la solution est brunâtre.

Il résulte de ces essais, ainsi que des expériences faites avec la tyrosinase et la pseudo-peroxydase, que la réaction de l'indo-crésol est encore plus commode et plus sûre que celle du crésol-azur. Elle est plus rapide, puisque la condensation se produit presque instantanément; elle est moins délicate aussi: la présence ou l'absence de sels minéraux ou d'eau oxygénée, l'aération de la solution ne paraissent pas l'influencer autant que celle du crésol-azur et, par exemple, à partir de la pseudo-peroxydase, il est beaucoup plus facile d'obtenir de l'indo-crésol que du crésol-azur. Enfin l'indo-crésol se prête bien aussi à l'identification par le microscope.

* * *

Le présent travail a été effectué au Laboratoire de chimie végétale de l'Université de Genève, sur la proposition et sous la haute direction de M. le professeur R. Chodat, à qui j'exprime ici ma profonde reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il m'a accueilli dans son laboratoire et pour l'intérêt qu'il a porté à mes recherches. Mes vifs remerciements vont aussi à M. le professeur F. Chodat et à M. le Dr M. Minod, dont les conseils et les encouragements m'ont été très précieux.