Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 3 (1950)

Heft: 4

Artikel: Contribution à l'étude du mécanisme de l'action fongistatique et antimélanique de la thio-urée

Autor: Pongratz, Edmond

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739462

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: 08.07.2025

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

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'ACTION FONGISTATIQUE ET ANTIMÉLANIQUE DE LA THIO-URÉE

PAR

Edmond PONGRATZ

(Avec 10 fig.)

PREMIÈRE PARTIE

Mécanisme de l'action fongistatique et antimélanique de la thiourée.

INTRODUCTION

C'est à Reynolds que nous devons la découverte, en 1869, de la thio-urée (Tu) encore appelée thio-carbamide ou improprement « sulfo-urée ». Ce produit octogénaire est resté pendant longtemps dans l'oubli, surtout au point de vue de ses propriétés biologiques. Ce n'est que récemment que la thio-urée et ses dérivés se sont implantés dans les différents domaines de l'activité scientifique, industrielle, agricole et médicale où ils occupent une place importante.

Fleury [1] a donné en 1948 une vue d'ensemble des propriétés chimiques et biologiques de ce corps; nous lui empruntons plusieurs données générales.

La chimie analytique emploie largement la Tu et nombre de ses dérivés, principalement comme réactif des métaux lourds.

Dans le domaine de la biologie végétale et en agriculture spécialement, on reconnaît à la Tu le pouvoir de rompre le sommeil des semences et tubercules, et d'abréger ainsi la durée du repos hivernal [2]. La Tu constitue encore le corps le plus simple de toute une famille de substances qui, depuis la guerre, sont utilisées comme insecticides et fongicides. Parmi ces derniers se trouve le disulfure de tétraméthylthiurame (T. M. T. D.), le diméthyldithiocarbamate de fer ou de zinc, et l'éthylène bis dithiocarbamate de sodium ou de zinc. Toutes ces substances entrent dans la préparation de mélanges anticryptogamiques commercialisés sous les dénominations respectives d'Arasan, Organol, Fermate, Zerlate, Dithane D. 14, Parzate ou Dithane Z 78.

En 1927, Denny [3] fit ses premières expériences d'inhibition avec la Tu; plus tard en 1935 et 1942, il la préconisa comme agent inhibiteur du noircissement de différents tissus végétaux et en particulier des jus de fruits.

En 1944, F. Chodat et Duparc [4] ont examiné l'influence de la Tu sur le noircissement et la respiration de la pomme de terre. Pendant la dernière guerre, la Tu a parfois été utilisée en Suisse pour empêcher le noircissement de la purée de pomme de terre crue, alors employée pour la panification.

La thio-urée et ses dérivés (tétraméthylthiourée, thiouracile, méthyl et propylthiouracile) sont employés depuis peu, mais couramment déjà, pour le traitement des hyperthyréoses. Astwood [5] — à la suite d'observations de Chesney, Clawson et Webster en 1928 et Kennedy en 1942 — préconisa le premier en 1943 l'emploi de certaines de ces substances (Tu et thiouracile) comme agent thérapeutique de la maladie de Basedow. Leur action a été étudiée sous tous ses aspects [6, 7]. Plusieurs auteurs ont montré que le point d'impact des thio-urées, en tant que médicaments antithyroïdiens devait être localisé dans le système enzymatique de la glande thyroïde [8]. On connaît plusieurs enzymes sensibles à la Tu et ses dérivés, mais c'est surtout le groupe des phénolases (tyrosinase, laccase) qui a

retenu l'attention des différents chercheurs. Les mono et polyphénoloxydases sont des ferments hydrosolubles et contenant du cuivre; ils contribuent à l'oxydation de substances de nature principalement phénolique et sont responsables du brunissement postlésionel de beaucoup de plantes et de la formation des pigments noirs ou mélanines. Ces ferments sont particulièrement sensibles à l'effet de la thio-urée et de ses dérivés strumigènes [9].

Un des dérivés de la Tu, l'α-naphtylthiourée, plus connu sous le nom d'Antu est une substance des plus actives vis-à-vis de ce système fermentaire [10]. Fleury [1] a montré dans des expériences *in vitro* l'action inhibitrice de la thio-urée sur la mélanogénèse enzymatique. Ses essais ont porté sur le jus de *Vicia faba*, sur *Psalliota campestris* et sur la réaction quasi synthétique découverte par Chodat. Cette dernière réaction consiste en l'obtention d'un homologue des mélanines sous forme d'un pigment bleu (crésol-azur), grâce à la catalyse de l'oxydation du *p*-crésol par la tyrosinase de pomme de terre en présence d'un acide aminé: le glycocolle.

L'inhibition de la mélanogénèse enzymatique peut aussi se manifester *in vivo*. Fleury [1] a encore amplement montré l'effet inhibiteur de la Tu et de ses dérivés sur le noircissement d'*Aspergillus niger*.

Richter et Clisby [11] ont observé que l'ingestion prolongée de phénylthiourée déterminait chez les rats noirs une dépigmentation du pelage, observation confirmée depuis par Dieke [12].

R. Jacques [13] signale que le thio-uracile possède comme beaucoup de dérivés de la thio-urée, une action antimélanique, qui peut-être mise en évidence *in vivo* chez l'Axolotl, sur la queue en voie de régénération. La pigmentation normale s'installe peu de temps après la cessation du traitement au thio-uracile.

Green, Mc Carthy et King [14] étudient l'effet sur le métabolisme de Chlorella de poisons reconnus comme ayant une action spécifique sur l'activité catalytique d'enzymes contenant du cuivre: la thio-urée, l'allylthiourée, l'hydroxy 8-quinoléine et le diéthyldithiocarbamate de sodium. Ils trouvent que tous

ces corps inhibent la photosynthèse et la respiration de la Chlorelle.

Nous voyons que la thio-urée et ses dérivés exercent une nette action sur des processus fondamentaux de la vie. L'effet sur la mélanogénèse précédemment signalé est le plus immédiatement apparent mais ne constitue en fait qu'une action sur un phénomène accessoire: F. Chodat a toujours considéré la mélanogénèse comme un « satellite » des processus respiratoires.

Nous pûmes avec Fleury nous former l'opinion qu'elle est la manifestation d'un traumatisme, d'une déchéance ou sénilité cellulaire liée elle-même à l'arrêt respiratoire.

Plusieurs auteurs, parmi lesquels R. Stadelmann [15], ont étudié l'effet inhibiteur de la Tu sur des processus d'oxydation catalysés par le cuivre ionique. Ces expériences, parmi d'autres, et le pouvoir depuis longtemps reconnu à la Tu de former facilement des complexes avec différents métaux, suggèrent que la Tu doit ses propriétés biologiques au fait qu'elle bloque l'activité de certains d'entre eux.

Nous avons eu le privilège de pouvoir effectuer quelques recherches au Laboratoire de microbiologie et fermentations de l'Institut de Botanique générale de l'Université de Genève; son directeur, le professeur F. Chodat, nous a conseillé d'approfondir l'étude du mécanisme de l'action biologique de la thio-urée par des analyses chimiques.

Nous présentons ici les résultats de nos recherches.

CHAPITRE PREMIER

Méthodologie

1. *Préparation des milieux de culture et culture d'*Aspergillus niger.

Pour la préparation des milieux de culture et leurs stérilisation par autoclave ou par filtration sur Seitz, pour le flaconnage, la technique d'inoculation, le contrôle de pureté, etc., on consultera la thèse de Cl. Fleury [1].

2. *Destruction des matières organiques en vue du dosage de substances minérales* [16] (cuivre, fer, zinc).

Nous avons renoncé à la minéralisation par voie sèche, comprenant incinération et calcination car cette méthode conduit facilement à des pertes de cuivre principalement et parfois aussi à des gains [17] (cuivre provenant des brûleurs).

Après de nombreux essais d'attaque par voie humide à l'aide des acides sulfurique, nitrique et perchlorique, utilisés de diverses manières, nous nous sommes finalement arrêtés à la méthode suivante:

On pèse 0,5 gr de tissu fungique séché et broyé que l'on introduit dans un matras en pyrex de 100 cm^3, on ajoute 5 cm^3 d'acide nitrique à 40° B et 0,5 cm^3 d'acide sulfurique concentré. On chauffe légèrement sur un bain de sable en maintenant le matras vertical: bientôt la réaction d'oxydation devient vive, il se dégage d'abondantes vapeurs de peroxyde d'azote (travailler sous chapelle à bon tirage). Il est indispensable de surveiller l'opération pour pouvoir retirer à temps les matras et les refroidir si la mousse formée dans ces récipients avait tendance à déborder. Lorsque cette première attaque s'atténue et que la mousse a cessé de se former, on laisse refroidir et on ajoute encore 5 cm^3 d'acide nitrique et 0,5 cm^3 d'acide perchlorique. On chauffe de nouveau en s'arrangeant à maintenir une ébullition régulière: on élimine ainsi l'eau et l'excès d'acide nitrique; vers la fin de l'opération le liquide noircit, on incline alors fortement les matras pour éviter les pertes de substance par projection éventuelle. On chauffe plus énergiquement pour arriver à une décoloration complète de la solution charbonneuse. Si cette opération est insuffisante pour décolorer la solution, on laisse refroidir et on reprend par quelques centimètres cubes d'acide nitrique ou perchlorique. L'évaporation des acides oxydants est poussée jusqu'à l'apparition de fumées blanches d'acide sulfurique. Pour éliminer les acides nitrosylsulfurique éventuellement présents, nous avons traité ensuite le résidu sulfurique par 0,5 cm^3 de perhydrol et évaporé jusqu'à apparition de fumées blanches, cette opération est suivie d'un nouveau traitement par 1 cm^3 d'eau et d'une évaporation consécutive pour détruire l'H_2O_2.

Le produit de la minéralisation obtenu est dissous par quelques centimètres cubes d'eau distillée (chauffer pour bien solubiliser tous les sels qui sont parfois fortement adsorbés sur les parois du matras). On transvase dans un flacon jaugé de 50 cm^3, on ajoute 2,5 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré et on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Il va sans dire que tous les réactifs utilisés pour la minéralisation et pour les dosages sont de pureté chimique rigoureuse; il est cependant toujours indiqué de faire des essais à blanc, qu'on utilise comme témoins.

Cette méthode de minéralisation permet d'obtenir les éléments métalliques sous forme de sulfates. L'opération exécutée convenablement, élimine les substances oxydantes pouvant gêner lors de certains dosages (utilisant la dithizone par exemple).

3. *Dosage du fer total des tissus fungiques.*

De nombreuses méthodes de dosage du fer dans les substances biologiques ont été décrites, la plupart des méthodes colorimétriques font emploi soit d'α, α'-dipyridyl, d'O-phénanthroline ou encore de rhodanate de potassium. Nous avons adapté une méthode utilisant cette dernière substance comme réactif [18, 37]. La méthode a l'avantage d'être très rapide, suffisamment précise et de ne pas nécessiter la réduction préalable du fer.

On procède comme suit:

Dans un entonnoir à robinet, 5 cm^3 de la solution minérale (voir ci-dessus) sont additionnés de 5 cm^3 d'une solution à 40% de KSCN. On extrait le rhodanate de fer (III) rouge par une seule agitation (2 minutes) avec 20 cm^3 d'éther. On laisse décanter, on fait couler la solution aqueuse qu'on jette et on reçoit la liqueur éthérée dans une éprouvette. Cette solution relativement stable est soumise à l'examen photométrique (cuve de 3 cm, filtre bleu-vert S 47 ou bleu S 50). Les résultats sont comparés à une courbe étalon établie dans les mêmes conditions opératoires mais avec des quantités connues de fer.

En prenant quelques précautions (standardisation de l'extraction, acidité et température constante) la méthode fournit des

résultats absolument reproductibles et concordant bien avec ceux obtenus par une autre méthode utilisant l'O-phénanthroline [38].

4. a) *Dosage du cuivre par voie chimique.*

Nous avons utilisé pour le dosage du cuivre dans les tissus fungiques, la méthode colorimétrique à la dithizone décrite par S. L. Morrisson et Harriet [19].

On procède comme suit:

La substance (2 gr) est minéralisée par voie humide; on prend soin d'éliminer tout acide oxydant en évaporant plusieurs fois, après avoir ajouté 5 cm^3 d'eau jusqu'à formation de vapeurs blanches. On dilue à 25 cm^3 dans une ampoule à décantation, neutralise au rouge crésol en ajoutant goutte à goutte de l'ammoniaque concentré. On ajoute ensuite 2 cm^3 de solution tampon de pH-2,3 (8,3 gr de Na_2HPO_4 anhydre + 38 gr d'acide citrique dans 250 cm^3 d'eau) et extrait le cuivre avec 20 cm^3 de solution de dithizone à 7,5 mg/lCCl_4, fraîchement préparée. On secoue 10 minutes, sépare la solution de tétrachlorure de carbone qu'on lave avec 10 cm^3 d'une solution d'iodure de potassium (10 gr KJ + 5 cm^3 HCl N + 450 cm^3 d'eau). On secoue 2 minutes et on sépare. On mesure au spectromètre à 520 mμ la lumière transmise. Après avoir séparé le cuivre comme dithizonate par la méthode décrite, nous avons préféré doser cet élément comme diethyldithiocarbamate de cuivre (méthode de Piper) [20]; pour cela on évapore la solution de tetrachlorure de carbone à siccité en présence d'une goutte d'H_2SO_4 et une goutte d'acide perchlorique (pour détruire le dithizonate de Cu). On dilue avec de l'eau, alcalinise légèrement avec de l'ammoniaque et précipite le cuivre en ajoutant quelques gouttes d'une solution aqueuse à 3% de diethyldithiocarbamate de sodium. Le complexe cuprique brun-jaune est extrait avec de l'alcool amylique ou du CCl_4 et l'intensité de la coloration est mesurée au photomètre.

Tous les produits utilisés doivent être de pureté rigoureuse; la solution tampon et la solution d'iodure de potassium sont débarrassées des traces de cuivre par secouage avec une solution de dithizone puis avec du tetrachlorure de carbone pur.

4. b) *Dosage du cuivre par voie microbiologique.*

Nous avons utilisé la méthode décrite par Mulder [21], basée sur la particularité que très peu de cuivre suffit à la croissance du tissus mycelien d'*Aspergillus niger* tandis qu'une plus grande quantité est nécessaire au développement des conidies et spécialement à leur pigmentation brun-noir. On estime l'intensité de celle-ci par comparaison à des témoins: la pigmentation étant fonction de la teneur en cuivre du milieu sur lequel on a fait croître la moisissure (Gollmick).

Cette méthode de dosage biologique du cuivre présente un grand avantage sur les méthodes chimiques (colorimétrique): elle ne nécessite pas la séparation de l'élément à doser des autres substances; de plus elle est extrêmement sensible puisqu'elle permet la mise en évidence de 10^{-4} à 10^{-3} mg de cuivre. Dans les meilleures conditions il est possible d'estimer des différences de teneur en cuivre de l'ordre de 0,1 γ.

Nous avons modifié la méthode originale de Mulder comme suit: on cultive *Aspergillus niger* sur le milieu suivant:

I		II	
H_2O bidistillée. . .	1000 cm_3	$FeCl_3.6H_2O$	50 mg
Glucose.	50 gr	$ZnSO_4.7H_2O$	20 »
KNO_3	5 »	$MnSO_4.4H_2O$	3 »
K_2HPO_4	2,5 »	$Na_2MoO_4.2H_2O$ . . .	1,5 »
$MgSO_4.7H_2O$ . . .	1 »	Gélose	30 gr

Afin d'éliminer les traces de cuivre qui existent dans les produits commerciaux les plus purs, on fait passer quelques bulles d'hydrogène sulfuré dans la solution I, on ajoute 5-10 gr de charbon végétal « Norit » qui adsorbe le sulfure de cuivre formé et on chauffe à ébullition en agitant souvent. On filtre deux fois sur le même filtre. On peut également extraire les traces de cuivre de la solution I par la dithizone en solution chloroformique ou encore par précipitation du cuivre au moyen de réactifs organiques suivi d'un traitement à la norite. On ajoute ensuite les oligoéléments (II) qui doivent être le plus purs possible.

Mulder utilise ce milieu sous forme liquide; nous avons trouvé qu'il était préférable de l'utiliser solidifié par la gelose lorsqu'on

peut se procurer de l'agar-agar exempt de cuivre (présentation en fibrilles de préférence à la forme en poudre). Dans ces conditions, les conidies se développent plus rapidement et de façon plus homogène.

Le milieu (liquide ou solide) est réparti à raison de 10 cm^3 dans les erlenmeyers de 100 cm^3 de contenance rigoureusement propres.

Pour le dosage du cuivre dans les mycelia, on ajoute à un flacon ainsi préparé une partie aliquote du produit de minéralisation (voir plus haut), préalablement neutralisé. On s'arrange pour que la quantité de cuivre ainsi introduite n'excède pas 1 γ. Après autoclavage (15 minutes à 105°) ces milieux sont inoculés avec 0,5 cm^3 d'une forte suspension de spores d'*Aspergillus niger* provenant de subcultures sur milieu appauvri en cuivre. Après 3-5 jours d'incubation à 35°, on estime l'intensité de la pigmentation des conidies d'Aspergillus en comparant à des cultures témoins auxquelles on a ajouté des quantités connues (O; 0,1; 0,2 ... 1,0 γ Cu^{+2}) de sulfate de cuivre.

En l'absence de cuivre, le mycelium est pauvrement développé de couleur claire et quasi stérile. En présence de quantités croissantes de cuivre, les cultures d'*Aspergillus niger* montrent un meilleur développement des conidies et la teinte de celles-ci varie du jaune, jaune-brun, brun clair, brun foncé au brun-noir.

5. *Dosage de l'éthanol.*

Pour le dosage de l'éthanol dans les milieux de culture, nous avons adapté le procédé décrit par J. Rochat [22], modification de la méthode de Nicloux [23] pour le dosage de l'alcool éthylique sanguin.

La méthode repose sur la transformation intégrale de l'éthanol en acide acétique par oxydation, en milieu sulfurique à l'aide de bichromate de potassium. L'excès de bichromate est réduit au moyen d'une solution de sulfate double de fer et d'ammoniaque, l'excédent de sel de Mohr est titré au moyen d'une solution de permanganate de potassium.

Nous avons procédé comme suit:

20 cm^3 de la liqueur de culture sont additionnés de 10 cm^3 de solution saturée d'acide picrique et soumis à la distillation

en utilisant une petite colonne de fractionnement d'environ 10 cm. On distille directement en réfrigérant dans un petit ballon jaugé de 15 cm^3. L'extrémité effilée du réfrigérant plonge dans environ 3 cm^3 d'eau. On recueille environ 10 cm^3 de distillat et complète au trait de jauge avec de l'eau.

Pour le dosage de l'éthanol, on prélève 5 cm^3 pour un essai préliminaire, puis 5 cm^3 pour l'essai définitif. Suite des opérations selon indications données par J. Rochat.

CHAPITRE II

Influence de la thio-urée et rôle du cuivre chez « Aspergillus niger »

Fleury [1, 24, 25] a abondamment discuté les différentes possibilités d'interférence de la thio-urée; elles sont nombreuses et plusieurs peuvent se réaliser simultanément et concourir à l'action fongistatique et antimélanique de la Tu.

Comme hypothèse de travail, nous n'avons toutefois retenu qu'une action de bloquage de la Tu s'exerçant uniquement sur le cuivre en « complexant » ce dernier.

Il est nécessaire de préciser ici que les actions fongistatiques et antimélaniques de la Tu sont deux actions inséparables et simultanées *in vivo*.

L'action inhibitrice de la thio-urée sur les enzymes cupriques étant bien établie [1], et connaissant d'autre part la facilité avec laquelle cette substance forme des complexes avec les métaux [1], nous avons entrepris d'étudier par l'analyse chimique l'influence éventuelle exercée par la thio-urée sur la teneur en différents éléments du tissus fungique d'Aspergillus qui a été cultivé sur un milieu privé ou contenant des quantités variables de Tu.

1. *La thio-urée modifie-t-elle la teneur en cuivre du tissu fungique* ?

Sommaire description de l'expérience:

a) Culture d'*Aspergillus niger* sur milieu de Raulin préparé selon la formule classique [1 *a*], tel quel ou additionné de

$1^0/_{00}$ de Tu. (Cette dernière substance est stérilisée séparément par filtration sur filtre Seitz et répartie au moyen d'un distributeur stérile) [1 *b*].

b) Récolte des mycelia après cinq jours de culture à 35°. On lave les tissus fungiques à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée; on les sèche durant 6 heures à 100-105°; pesée.

c) Minéralisation par voie humide d'une prise de 1 gr de substance sèche et dosage du cuivre:

1° par voie chimique (méthode colorimétrique de Morrisson, Harriet-Piper);

2° par voie microbiologique (méthode de Mulder).

Cet ensemble d'opérations s'inspire de principes déjà vus ou signalés dans la littérature et à laquelle nous renvoyons pour de plus amples détails.

Résultats des analyses:

Nous avons observé que le tissu fungique d'*Aspergillus niger* (A. n.) qui a crû en présence de $1^0/_{00}$ de Tu renferme en moyenne de 20 à 30% plus de cuivre que les mycelia cultivés sur Raulin pur. Ces résultats sont à rapporter à une même quantité de substance sèche et à des mycelia provenant d'une même série de culture, c'est-à-dire cultivés sur le même milieu de base. En effet, les résultats sont assez variables d'une série à l'autre, probablement par suite des variations des quantités de cuivre introduit dans le milieu de culture comme « impuretés ».

Lorsqu'on introduit effectivement de petites quantités (100 γ/L.) de cuivre dans le milieu de Raulin, on observe par l'analyse chimique une augmentation de la teneur en cuivre des tissus fungiques. Nos expériences ont montré que le cuivre présent dans le milieu est presque intégralement fixé par la moisissure, aussi bien en l'absence qu'en la présence de Tu (du moins en est-il ainsi lorsque les quantités de cuivre disponibles sont faibles).

Il subsiste l'hypothèse d'une adsorption physique du cuivre sur les mycelia. En vue de nouvelles analyses, nous avons lavé

soigneusement les mycelia au moyen d'une solution de nitrate de calcium. Leur teneur en cuivre s'est révélée semblable après ce traitement. J. Bodnar et A. Terenyi [26] (1930), et Lin (1940) affirment que le cuivre adsorbé extérieurement peut être éliminé par un traitement au nitrate de calcium.) Nous écartons donc l'hypothèse d'une adsorption du cuivre en surface.

Conclusion :

1. La Tu ne retient pas le cuivre dans la solution nutritive sous une forme complexe inassimilable par l'Aspergillus.

2. La plus forte teneur en cuivre du mycelium cultivé en présence de Tu est à attribuer probablement au fait que celui-ci (pour un même poids de tissus fungique) a poussé sur un plus grand volume de milieu nutritif; il lui a été par conséquent possible d'assimiler plus de cuivre.

3. Il faut retenir encore l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité cellulaire par la Tu, qui également peut être la cause d'une teneur accrue en cuivre.

Les résultats acquis sont impropres à expliquer le phénomène de non-pigmentation (absence de mélanogénèse) que l'on observe lorsque A. n. est cultivé en présence de Tu: le cuivre a pénétré dans le champignon, mais il y est inactif (on sait que le cuivre est nécessaire à la mélanogénèse).

2. *La thio-urée modifie-t-elle la teneur en fer du tissu fungique ?*

Les arguments principaux qui motivent cette question sont d'ordre théorique et bibliographique.

1. Plusieurs auteurs, parmi lesquels Green, McCarthy et King, Fleury, ont montré l'influence inhibitrice qu'exerce la Tu et ses dérivés sur les processus respiratoires.

2. K. Shibata et H. Tamiya [27] (1928-1930) ont montré la participation du système cytochrome à la respiration d'Aspergillus.

Dès lors il nous a paru intéressant d'étudier les répercussions que pouvait avoir la Tu sur le système ferrugineux et, partant, sur la teneur en fer du mycélium.

Partie expérimentale:

Culture d'Aspergillus sur milieu de Raulin additionné de quantités croissantes de Tu. Conditions habituelles de culture, récolte, séchage et minéralisation du tissu fungique; dosage du fer par colorimétrie comme sulfocyanure ferrique.

Résultat:

Le résultat des analyses est donné par le graphique suivant (fig. 1):

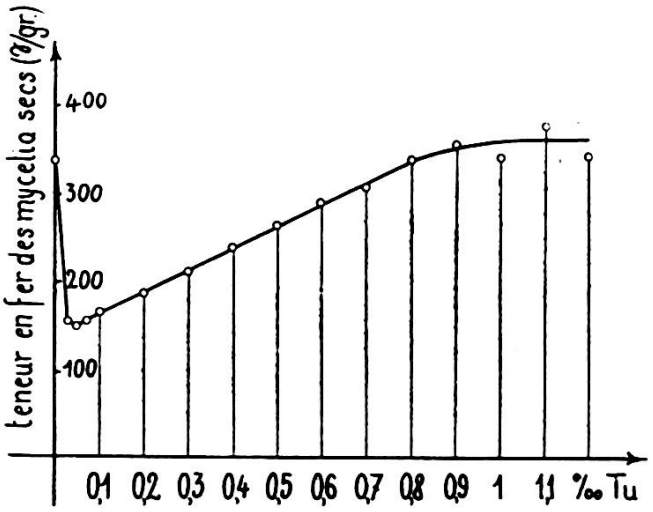


Fig. 1.

Description du phénomène:

On observe d'importantes variations de la teneur en fer des mycelia cultivés en présence de quantités variables de Tu.

Cette teneur en fer passe par un minimum pour une adjonction au milieu de culture de moins de 0,1 ‰ de Tu. Pour des quantités plus fortes de Tu, on observe une augmentation progressive de la teneur en fer.

Interprétation du phénomène différée.

Influence de la Tu sur le poids d'A. n.

Le graphique n° 2 montre les variations de poids que subit le mycélium lorsqu'il est cultivé sur milieu de Raulin en

présence de quantités croissantes de Tu (cultures de 5 jours à 35°).

Remarque:

On observe que contrairement à l'effet considérable sur la teneur en fer, de faibles quantités de Tu n'ont que peu d'influence sur le poids d'A.n. cultivé dans des conditions

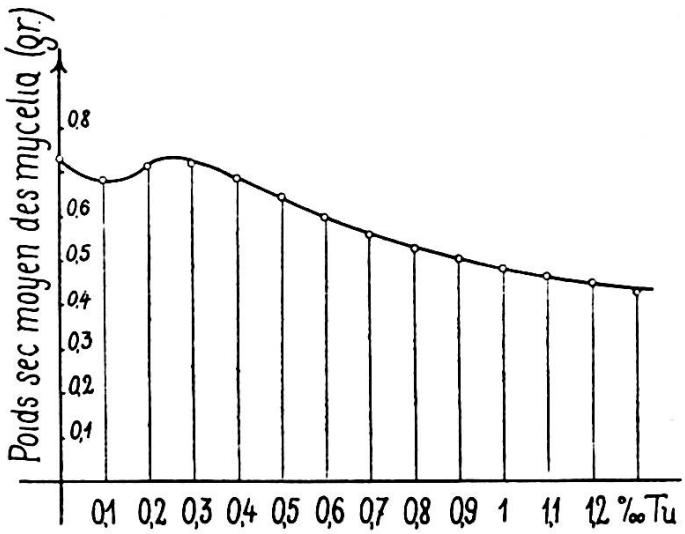


Fig. 2.

normales. On observe même une légère stimulation de la croissance pour les faibles concentrations de Tu.

3. *Sur les relations existant entre la Tu, le cuivre et le fer.*

Des quantités croissantes de Tu exercent un effet antimélanique chez A. n. [1], la pomme de terre [4], l'axolotl [13], les jus de fruits [3], etc. Ce phénomène a été interprété de plusieurs façons dont l'une consiste en un bloquage du cuivre nécessaire aux phénolases (tyrosinase). Plusieurs auteurs Walter G. et Storfer E. [28], Stadelmann R. [15] et une publication anglaise [29] signalent des propriétés anticatalytiques de la Tu sur les ions Cu^{+2}. Nous-mêmes avons relevé la très forte action inhibitrice qu'exerce la Tu sur la Nadi-réaction catalysée par le cuivre [30]. Ce bloquage du cuivre par formation de complexes suspend en conséquence sa participation aux actions catalytiques qui lui sont spécifiques. Nous nous sommes

demandé alors si le fer (dont on connaît le rôle dans les phénomènes respiratoires) était impliqué dans ces inhibitions et plus particulièrement si sa teneur variait en fonction du système Tu-cuivre.

En conséquence, nous avons réalisé l'expérience suivante: Culture d'A.n. sur milieu de Raulin contenant une quantité fixe de Tu soit 0,2$^0/_{00}$ (quantité voisine de celle qui produit la plus forte « anémie » hyposidéremique) et additionné de quantités croissantes de Cu^{+2} (culture de 5 jours à 35°).

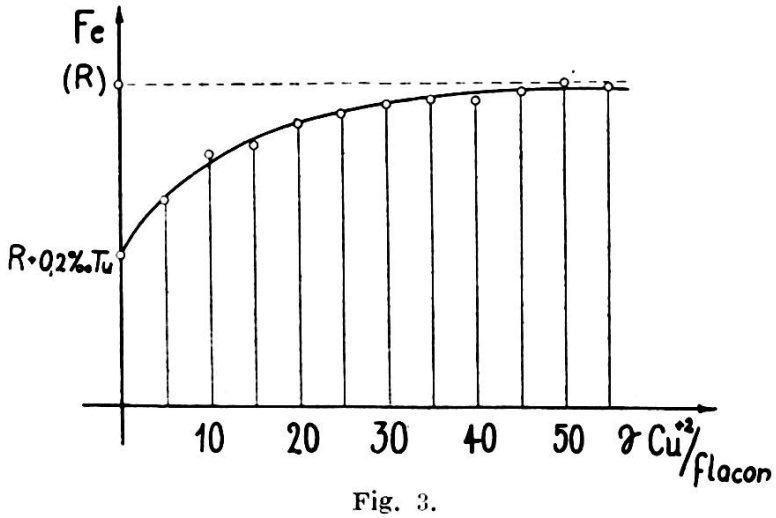


Fig. 3.

Les mycelia obtenus sont destinés à une analyse de leur teneur en fer. Simultanément cette expérience doit nous apprendre si l'adjonction de cuivre supplémentaire lève l'action antimélanique et fongistatique de la Tu relatée ci-dessus.

Résultats :

Le résultat des dosages de fer est donné par la figure n° 3: La teneur en fer des mycelia augmente parallèlement à la quantité de cuivre ajoutée. Des essais préliminaires nous ont permis de fixer les quantités de cuivre à ajouter.

Conclusions :

Nous constatons que le cuivre a la propriété de lever l'action « anémiante » (c'est-à-dire réductrice de la teneur en fer) de la thio-urée.

4. *Hypothèse envisageant l'impossibilité du Fe^{+2} de passer à l'état de Fe^{+3} dans le milieu de culture en présence de Tu et d'être par suite inassimilable.*

Motifs de cette hypothèse:

a) Carence en catalyseur Cu^{+2} par suite de sa complexion avec la Tu (on connaît l'influence catalytique du Cu^{+2} sur l'oxydation du fer; voir deuxième partie).

b) Effet réducteur de la Tu.

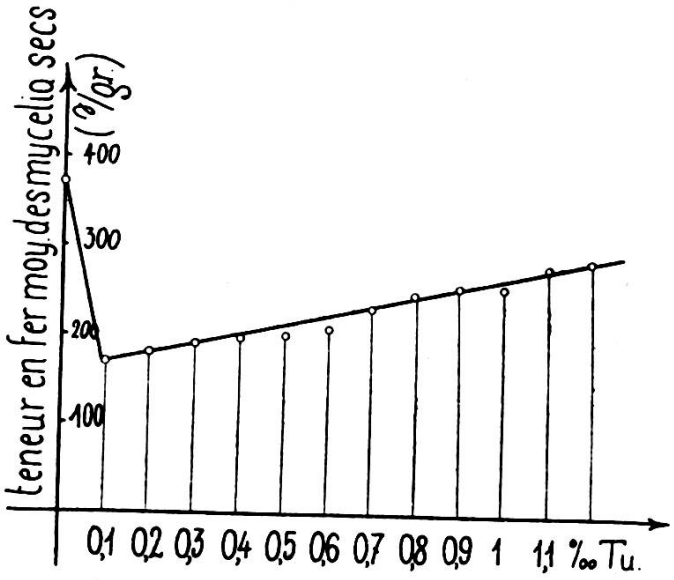


Fig. 4.

Nous avons substitué du sulfate ferrique au sulfate ferreux (précédemment employé) pour la préparation du milieu de Raulin. Culture d'A. n. sur ce milieu en présence de quantités croissantes de Tu (suites des opérations comme plus haut).

Résultat:

Le graphique (fig. 4) montre la teneur en fer des mycelia obtenus, telle que nous l'a révélée l'analyse.

On observe que la Tu exerce à peu de chose près la même influence sur la teneur en fer des mycelia, que le milieu de culture contienne du fer à l'état divalent ou trivalent.

Nous écartons donc l'hypothèse émise: l'action (directe ou indirecte) de la Tu sur le fer — responsable des répercussions

que nous avons observées — a donc lieu essentiellement dans le tissus fungique même, et non dans le milieu de culture.

5. « *Anémie* » *du tissu fungique à la suite d'une carence en cuivre.*

Nous avons constaté précédemment l'importances des ions Cu^{+2} pour l'assimilation du fer par la moisissure cultivée en présence du Tu. Il devenait indispensable de savoir si cet effet du cuivre se retrouvait en l'absence de Tu. (Constitution d'un système simplifié bipartite au lieu de tripartite par élimination de la Tu.) Pour cela, nous avons cultivé A. n. sur milieu de Raulin auquel nous avons ajouté des quantités croissantes de cuivre. Les tissus mycéliens obtenus ont été soumis à l'analyse chimique qui a révélé un accroissement (jusqu'à 30%) de leur teneur en fer parallèlement à l'augmentation du cuivre dans le milieu. Lorsqu'on ajoute de fortes quantités de cuivre au milieu, les répercussions sur la teneur en fer des mycelia sont moins nettes et sujettes à de grandes variations. Une contre-épreuve fut faite en cultivant le champignon sur un milieu carencé chimiquement (voir à ce sujet les méthodes de purifications du milieu de Mulder): le mycélium accusait une teneur en fer de 20 à 30% plus faible que le témoin développé sur le même milieu non carencé en cuivre.

Conclusion :

De toutes ces expériences, il ressort qu'il existe des relations très intimes et synergiques entre les oligoéléments fer et cuivre. Nos expériences montrent que le cuivre est nécessaire à une assimilation normale du fer, il est probable qu'il est même indispensable; en effet les cultures d'A. n. sur milieu rigoureusement (!) exempt de cuivre sont très chétives et stériles.

Nous avons constaté antérieurement que la Tu avait une action anémiante sur la moisissure; nous pensons que c'est par une action indirecte, en bloquant le Cu^{+2}, que cette substance provoque la diminution de la teneur en fer des tissus fungiques.

La littérature scientifique nous donne plus d'un exemple (voir deuxième partie) de phénomènes biologiques dans lesquels on a observé d'étroites relations entre le fer et le cuivre. Plus

loin, nous montrons par des expériences *in vitro* l'influence accélératrice du cuivre sur l'oxydation du Fe^{+2}. Les observations faites nous font penser que la présence de cuivre comme catalyseur est absolument indispensable au fer pour que celui-ci puisse « vibrer » entre ses deux états d'oxydation au rythme que nécessite la vie.

Le cuivre augmente l'oxydo-réductibilité du fer, mais ce n'est qu'un cas particulier de son activité, beaucoup d'autres catalyseurs intermédiaires sont également rapidement oxydés par lui.

6. *Rôle du cuivre dans la respiration d'*Aspergillus niger.

Le cuivre est non seulement nécessaire à l'assimilation du fer, mais joue encore un rôle capital pour l'activité de ce dernier dans le système oxydoréducteur des cytochromes, comme le montre l'expérience suivante:

On cultive A. n. sur le milieu de Mulder, débarassé des traces de cuivre par des traitements chimiques appropriés [21]. On utilisera pour l'inoculation de préférence des spores provenant de cultures sur milieu appauvri en cuivre.

Après 48 à 72 heures de culture à l'obscurité, on observe une intense pigmentation jaune d'or des mycelia. Le pigment qui diffuse dans le milieu présente une forte fluorescence jaune-verte en lumière ultra-violette. Plusieurs facteurs ont une grande importance pour la production de ces pigments, parmi lesquels le pH., la lumière, la richesse en fer, magnésium, etc. L'analyse de la substance colorée nous a révélé l'existence de riboflavine à côté de pigments et prochromogènes de nature phénolique.

L'accumulation de riboflavine que nous avons observée est probablement un symptôme de déficience du système respiratoire. Le manque de cuivre se traduit là encore par le non-fonctionnement (fonctionnement insuffisant) du système cytochrome.

C'est un exemple particulièrement typique et démonstratif de l'entrée en fonctionnement d'un système respiratoire de suppléance par suite du bloquage du système ferrugineux.

Il est nécessaire de préciser que la croissance végétative n'est apparemment que peu entravée par la carence (relative) en

cuivre; les ferments flaviniques suppléent donc effectivement aux catalyseurs métalliques. Fleury [1] signalait un phénomène semblable à celui que nous venons de relater; il remarqua qu'en cas d'inhibition totale de la mélanogénèse par la Tu, le liquide de culture, sur lequel on cultive A. n., se colorait en jaune. La fluorescence de ce pigment lui suggéra qu'il devait être de nature flavinique.

Nous pensons que dans ce cas encore, le bloquage du cuivre par la Tu est responsable des phénomènes signalés.

7. *Influence de la Tu sur des cultures agitées d'*Aspergillus niger.

On prépare des cultures agitées d'A. n. sur Raulin; une série de flacons sans Tu servent de témoins, les autres contiennent 0,5% et 1% de Tu.

L'agitation est obtenue à l'aide d'un chariot mobile agité d'un mouvement de va-et-vient à raison de 45 secousses/minute; l'appareil est réglé de telle façon qu'il imprime aux milieux de culture un mouvement de balancement, mais non d'agitation turbulente.

T° = 35°; âge des cultures au moment de la récolte: 6 jours.

Résultat :

On obtient des « boules » de mycélium entièrement submergées. Le tissus mycelien est plus ou moins flasque et mouillé par le liquide de culture (les gâteaux myceliens obtenus en culture immobile par contre sont fermes et non mouillables en surface). Une odeur de « fermentation » est nettement perceptible.

On remarque à l'œil que la croissance des mycelia est très fortement entravée par la présence de Tu.

Le rapport des poids secs des mycelia ainsi obtenus varie

de 0,6 à 0,3 pour ceux cultivés en présence de 0,5% de Tu
et » 0,3 à 0,05 » » » » » » 1% » »

Le poids sec des mycelia cultivés sur Raulin pur et dans les mêmes conditions étant pris pour unité.

Les mêmes rapports des poids secs des mycelia cultivés sur milieux immobiles sont respectivement de 0,88 et 0,66.

En comparant ces résultats, il ressort que la Tu exerce une action toxique beaucoup plus forte sur les mycelia submergés que sur les mycelia poussant en surface.

Afin de savoir si l'A. n. fermente lorsqu'il est maintenu submergé — comme le faisait prévoir l'odeur caractéristique — nous avons recherché l'éthanol dans le liquide de culture brut ou sur son distillat par formation d'éthylxanthogénate de potassium [31], puis réaction colorée avec le molybdate d'ammonium ou par formation d'iodoforme.

Tous ces essais ont montré la présence d'alcool éthylique dans le milieu de culture. Cette formation d'éthanol par l'A. n. est un critère suffisant indiquant que les conditions réalisées par l'agitation correspondent à une semi-anaérobiose ou plus exactement à une réduction de la tension d'oxygène qui est par suite insuffisante à la respiration normale du champignon.

Les grandes variations de poids des mycelia d'A. n. enregistrées plus haut sont à attribuer à des variations dans les conditions expérimentales: en effet, suivant la section des flacons, suivant leur calage ou encore suivant la viscosité du milieu, une agitation turbulente avec brassage et aération peut prendre place et occasionner les variations indiquées.

Pour nous assurer que c'est bien la déficience d'oxygène qui est responsable de l'augmentation de la toxicité de la Tu vis-à-vis d'A. n., nous avons fait des expériences dans lesquelles l'agitation des cultures a été combinée avec une aération par insufflation d'air. Dans ces cas, on observe une forte levée de l'action inhibitrice de la Tu et les mycelia se développent aussi bien, sinon mieux, que dans les flacons témoins ne renfermant pas de Tu.

En comparant les poids de ces mycelia avec le poids de ceux obtenus sur Raulin pur et également aéré, on obtient des rapports de 0,6 à 0,9, donc de l'ordre de grandeur de ceux observés pour les cultures immobiles.

8. *Etude comparative de l'influence de quantités croissantes de cuivre sur des cultures immobiles ou agitées d'*Aspergillus niger *sur Raulin contenant* $1^0/_{00}$ *de Tu.*

Culture d'A. n. sur milieu de Raulin contenant $1^0/_{00}$ de Tu et additionné de quantités croissantes de Cu^{+2}.

Une série de flacons est agitée comme plus haut, l'autre est maintenue immobile.

Culture de 5 jours à 35°.

Résultats: exprimés par le graphique suivant (fig. 5).

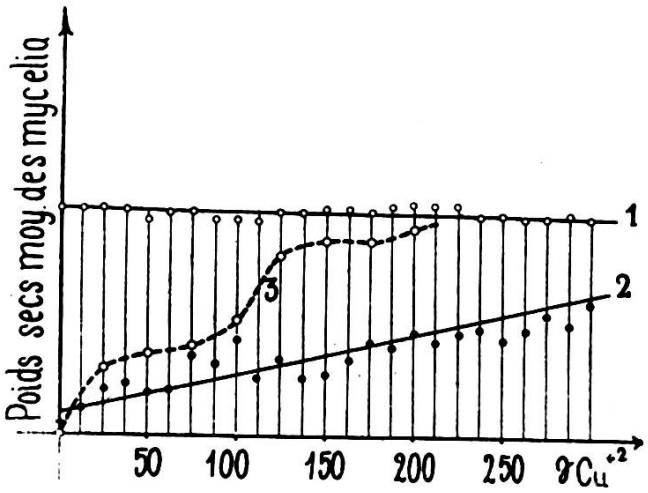


Fig. 5.

Courbe nº 1: variation du poids sec des mycelia en culture immobile.
Courbe nº 2: variation du poids sec des mycelia en culture agitée.
Courbe nº 3: variation de la production d'éthanol par les cultures agitées.

De l'examen de ce graphique, il ressort que:

1º l'influence inhibitrice de la Tu sur la croissance d'A. n. en culture immobile (culture en aérobiose) n'est que peu modifiée par l'adjonction de quantités croissantes de cuivre;

2º l'adjonction de cuivre permet de lever la forte toxicité exercée par la Tu sur des cultures en semi-anaérobiose d'A. n. (cultures agitées).

3º l'adjonction de cuivre favorise la fermentation alcoolique des cultures agitées d'A. n. Cette fermentation est bloquée

presque complètement par la présence de $1^0/_{00}$ de Tu en l'absence de cuivre supplémentaire.

9. *Conclusions.*

Ces dernières expériences montrent que le cuivre est d'autant plus nécessaire à la vie d'A. n. que la tension d'oxygène est faible. L'augmentation de la toxicité de la Tu pour des cultures agitées d'A. n. est à attribuer au bloquage de cuivre car l'inhibition par la Tu peut être levée par une adjonction de cuivre supplémentaire. Les expériences semblent montrer que le cuivre est même nécessaire tout au moins indirectement par le canal des cytochromes au processus purement fermentaire.

O. Warburg montra déjà que la réaction de Pasteur est une « Schwermetallkatalyse », inhibée par l'acide cyanhydrique, et la mit en relation avec le ferment respiratoire.

Nous rappelons ici les résultats semblables aux nôtres signalés par Tamiya, Ogura et Nagahisa [32]. Ces auteurs ont observé que la respiration des mycelia submergés d'Aspergillus était beaucoup plus sensible à l'action toxique du cyanure et de l'oxyde de carbone que celle des mycelia de cultures ordinaires développées en surface. Les auteurs japonais attribuent cette différence de sensibilité aux poisons des deux sortes de mycelia au fait que chez les premiers la respiration serait principalement catalysée par des ferments ferrugineux, tandis que chez les seconds les processus respiratoires seraient régis essentiellement par des catalyseurs insensibles au KCN et CO, et probablement de nature non métallique (Flavoprotéines ?).

D'après nos propres expériences, il ressort que ce n'est pas la participation directe de systèmes ferrugineux dans la respiration des mycelia submergés, mais la participation de catalyseurs cuivriques qui est responsable des phénomènes susmentionnés.

Tamiya a encore montré que le cytochrome et la cytochrome-oxydase (« Nadi » oxydase) n'étaient pas complètement absents, mais en très faible concentration dans les tissus fungiques aériens d'*Aspergillus oryzae*, tandis que dans les hyphes submergés ce système fermentaire peut être mis en évidence en beaucoup plus forte concentration. La participation de systèmes ferrugineux (s. cytochrome) et la nécessité simultanée

de cuivre à la respiration d'A., nous font émettre l'hypothèse que la cytochrome-oxydase est un enzyme à base de cuivre et non de nature hémique comme le pense Warburg. Certains faits signalés dans la littérature semblent confirmer nos vues. Cette hypothèse est encore fortifiée par l'intimité des relations fer-cuivre observée précédemment au cours des analyses chimiques, et par les expériences *in vitro* dans lesquelles nous constatons le rôle du cuivre comme catalyseur d'oxydation du fer (voir 2e partie). Ce dernier à l'état de pureté a une fréquence d'oxydo-réduction extrêmement petite.

En 1929-1930, Shibata et Tamiya [33] ont montré que les cultures d'Aspergillus sujettes à l'autolyse perdent leur cytochrome, mais ne précisent pas le mécanisme de cette disparition. Fleury a observé que le phénomène de la mélanogénèse chez cette moisissure coïncide avec le début de l'autolyse.

Nous pensons que la disparition et l'absence, au moment de l'autolyse du substrat normal de la cytochrome-oxydase, en l'occurence le cytochrome et certains métabolites, élimine la « compétition » de ces derniers et que l'oxydase préside alors à l'oxydation non physiologique de substances de nature phénolique pour former les pigments mélaniques. Ce serait ainsi le même ferment cuprique qui catalyserait les processus respiratoires normaux du champignon et les oxydations de substrats phénoliques à la senilité ou après traumatisme. Les vues de F. Chodat qui considère la mélanogénèse comme un phénomène satellite de la respiration, seraient donc pleinement justifiées.

Notre hypothèse de l'unicité d'action de la « Nadi » oxydase et des phénolases est encore confirmée par les recherches qui vont suivre. Ainsi l'homologie selon Szent Gyorgyi [34, 35, 36] des divers types respiratoires pourrait être d'après nous simplifiée et schématisée comme suit:

Règne	Dernier transporteur d'H. « caractéristique »	Activateur	Groupe prosthétique
Animal (essentiellement)	ac. succinique-cytochromes	Nadi-oxydase	Cuivre
Végétal (sans mélanogénèse)	ac. ascorbique		
» (avec »)	catéchol		

D'autre part, nous montrons par des expériences *in vitro* l'impossibilité qu'il y a de mettre en évidence des actions oxydasiques en présence de substrats réducteurs. Nous fournissons ainsi l'explication de l'absence quasi complète « observée » chez A. n. durant la vie végétative active alors qu'il devient possible de détecter une action oxydasique dans les cellules et dans le liquide de culture au stade de l'autolyse.

SECONDE PARTIE

Le rôle du cuivre dans la réaction de « Nadi » et modèles non protidiques d'oxydases et de catalase [1].

CHAPITRE PREMIER

La Nadi-réaction

Au cours de nos recherches sur le mécanisme de l'action fongistatique et antimélanique de la thio-urée (qui font l'objet de la première partie de cette thèse), nous avons utilisé la réaction colorée dite de « Nadi » pour mettre en évidence des oxydases. A la suite d'observations de phénomènes jusqu'alors inexpliqués, nous avons entrepris une analyse du mécanisme de cette réaction afin d'en élucider certains points.

1. *Historique.*

C'est en 1885 que P. Ehrlich [39] découvrit la formation de bleu d'indophénol dans les tissus lorsqu'on injecte à des animaux un mélange d'α naphtol et de diméthyl *p*-phénylènediamine. Par la suite on étudia également la formation *in vivo* de substances colorées à partir de mélanges variés (*p*-phénylènediamine, di et tétraméthyl *p*-phénylènediamine, α et β naphtol,

[1] Sous ce titre il a paru une note préliminaire dans *Helvetica Chemica Acta*, *33*, 410, 1950.

phénols, polyphénols). On remarqua bientôt le caractère fermentaire de ces réactions. En 1895, Röhman et Spitzer [40], puis Pohl [41] et Czapek [42] montrèrent que la réaction de l'indophénol était également donnée par des tissus végétaux. On appela indophénolase ou indophénoloxydase l'enzyme que l'on croyait responsable de la réaction. C'est à D. Keilin [43] que revient le mérite d'avoir compris le parti que l'on pouvait tirer de cette réaction pour l'étude de la respiration cellulaire. A la suite de ses recherches, il devint de plus en plus évident que l'indophénolase n'oxydait le réactif « Nadi » que par l'intermédiaire du cytochrome. L'enzyme fut débaptisé et prit le nom de cytochrome-oxydase actuellement adopté.

La Nadi-réaction (abréviation de *Na*phtol et *Di*méthyl *p*-phénylènediamine) est universellement connue et a donné lieu à de très importantes recherches dans le domaine de l'enzymologie; nous ne citerons que les travaux de S. Gräff, Warburg, Wieland, Keilin, Batelli, Stern, Vernon et de l'école japonaise de Shibata (Tamiya H, Tanaka, Yamagutchi).

Récemment encore, J. R. G. Bradfield [44] (1950) signalait l'emploi par différents auteurs de la Nadi-réaction pour la localisation *in situ* de la cytochrome-oxydase dans les cellules, ce qui montre que cette réaction est toujours à l'honneur et n'a pas été détrônée par un autre réactif plus approprié.

2. *Recherches personnelles.*

La thermostabilité, très relative il est vrai, des ferments oxydants d'*Aspergillus niger* que nous utilisions, a éveillé notre attention. Des essais nous ont montré que l'auto-oxydation spontanée du « Nadi » que l'on observe en présence du ferment chauffé ou en l'absence de ferment, ne pouvait pas être expliquée par la présence au titre d'inducteur de substances organiques oxydées. Ainsi nous avons remarqué que, l'oxydation du mélange Nadi amorcée, la présence d'indophénol, de diverses quinones, etc., ne suffisait pas à entraîner l'auto-oxydation du réactif. Après avoir écarté l'influence possible de diverses substances, nous avons encore observé que l'auto-oxydation spontanée du Nadi pouvait être fortement inhibée par le cyanure. C'est alors que nous nous sommes aperçu que les

ions Cu^{+2}, existant à l'état de traces, jouaient un rôle spécifique dans ce phénomène (Gräff attribuait ce rôle au fer).

Nous avons entrepris une étude systématique afin d'éclaircir l'influence éventuelle des différents cations métalliques et de quelques anions comme catalyseur de la Nadi-réaction.

a) *Conditions expérimentales.*

Solution tampon:

Nous avons travaillé, sauf indication spéciale, en milieu tamponné de Soerensen de pH = 7,38

solution M/15 de KH_2PO_4 puriss. dans l'eau bidistillée 2 vol
» M/15 de Na_2HPO_4 » » » » 8 »

Réactifs:

1) solution M/20 de *p*-phénylènediamine dans l'éthanol à 95°
2) » M/20 de diméthyl *p*-phénylènediamine. HCl dans l'éthanol à 95°
3) » M/20 d'α-naphtol dans l'éthanol à 95°

Ces solutions sont préparées séparément et mélangées à volume égal (mélange équimoléculaire) au moment de l'emploi.

Solution 1) + 3) = Mélange Nadi (I)
» 2) + 3) = » » (II)

Mode opératoire:

On ajoute à 10 cm³ de solution tampon phosphate (pH = 7,3) 50 γ de Cu^{+2} et environ 0,2 cm³ (5 gouttes) du mélange Nadi. On agite violemment afin de bien aérer la solution et on laisse reposer à la température ordinaire: estimation colorimétrique selon les cas, généralement après quelques minutes, parfois après plusieurs heures, par comparaison à un étalon préparé de la même façon mais sans élément métallique. Pour obtenir des valeurs numériques, les solutions sont soumises à un examen photométrique (Pulfrich).

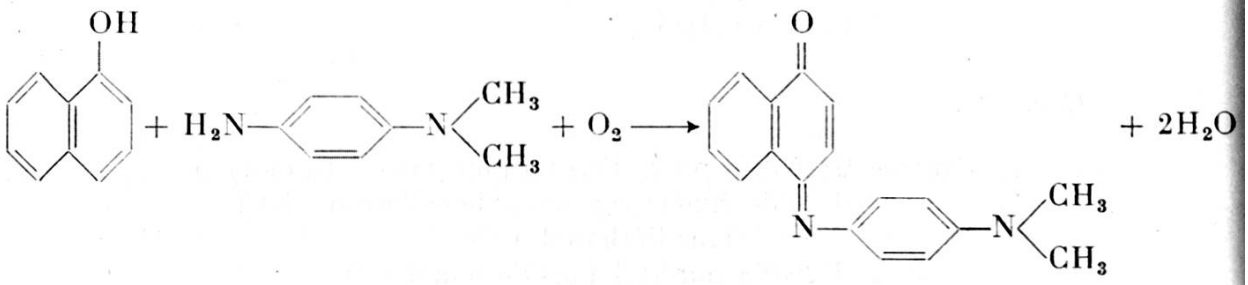
Nous avons fait appel tantôt à la *p*-phénylènediamine (Nadi I), tantôt à la diméthyl *p*-phénylènediamine (Nadi II). La Nadi-réaction positive se manifeste dans le premier cas par

une coloration rose, dans le deuxième cas par une coloration bleue. Les observations qui suivent sont valables pour les deux cas.

b) *Etude de la Nadi-réaction catalytique.*

Des essais avec des sels de cuivre nous ont montré que l'on pouvait substituer les ions de ce métal aux enzymes oxydants (oxydases) et obtenir ainsi le même colorant indophénolique.

En présence de cuivre le mélange du Nadi est plus ou moins rapidement oxydé à l'air en un colorant indophénolique bleu, selon le schéma de réaction suivant:



Nous voyons qu'une molécule d'oxygène est nécessaire pour permettre la synthèse du colorant, mais en réalité on assiste à une oxydation par déshydrogénation.

En présence d'ions Cu^{+2} il apparaît progressivement une coloration rose (Nadi I) ou bleu-violet (Nadi II) qui va en s'approfondissant; finalement, après quelques heures, la solution s'éclaircit légèrement avec séparation d'un précipité bleu-violet, parfois sous forme de fines aiguilles en mouchets.

Le graphique n° 6 montre la progression de l'oxydation du Nadi II en fonction du temps. Nous voyons encore que quelle que soit la quantité de cuivre ajoutée, l'oxydation est totale après un temps donné. Ces deux constatations, ainsi que l'expérience suivante sur la nécessité de l'oxygène pour la réaction, nous montrent bien le caractère catalytique de l'oxydation du Nadi en présence d'ions cuivre.

Pour vérifier la nécessité de l'oxygène, nous avons fait des expériences en tube de Thunberg avec atmosphère inerte ou raréfiée. Dans ces deux cas, on constate que l'oxydation du

Nadi est très fortement entravée par rapport à un témoin maintenu à l'air libre.

Nous avons substitué au cuivre les cations et anions suivants (dans des concentrations ioniques identiques) dont aucune n'a donné dans les conditions décrites une réaction de coloration.

Fe^{+3}, Fe^{+2}, Ni^{+2}, Co^{+2}, Mn^{+2}, Cr^{+3}, MoO_4^{-2}, Zn^{+2}, Pb^{+2}, Bi^{+3}, Hg^{+2}, Sn^{+2}, Cd^{+2}, Ti^{+2}, Al^{+3}, Au^{+3}, Tl^{+1}, WO_4^{-2}, UO_2^{+2}, Sr^{+2}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Na^{+1}, K^{+1}, AsO_3^{-3}, Sb^{+3}, F^{-1}, Cl^{-1}, Br^{-1}, I^{-1}, PO_4^{-3}, SO_4^{-2}, NO_3^{-1}, BO_3^{-3}.

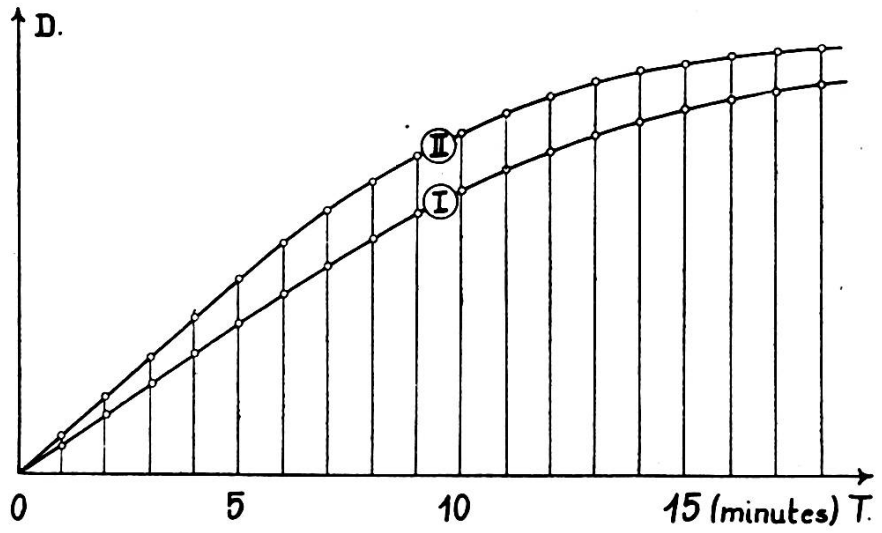


Fig. 6.

Variation de la vitesse d'oxydation du Nadi II catalysée par 20 γ de Cu^{+2} (courbe I) et par 50 γ de Cu^{+2} (courbe II) en fonction du temps. En ordonnée nous avons porté la densité optique lue au photomètre. (Température = 18°; pH = 7,3; filtre jaune S 50, cuves de 1 cm.)

L'argent (NO_3Ag) oxyde le Nadi, cette réaction (coloration instantanée gris-violet) n'a cependant pas le caractère catalytique (coloration progressive) de celle fournie par le cuivre: il s'agit là d'une oxydo-réduction comme avec d'autres oxydants ($K_2Cr_2O_7$, etc.). Cette oxydation du Nadi par l'argent est empêchée par les anions qui le précipitent (halogène, cyanogène).

Dans certaines conditions, le vanadium [1] (vanadate d'ammonium) catalyse faiblement l'oxydation du Nadi.

Le fer (Fe^{+3} et Fe^{+2}) en faible concentration que l'on soupçonne souvent d'intervenir, n'a pas d'action catalytique sur la formation du bleu d'indophénol, contrairement à ce qu'affirme Gräff [45]. Dans certaines conditions (milieu non tamponné) le Fe^{+3} peut oxyder la diamine (un des constituant du Nadi) en des corps quiniminiques de couleurs variables, mais jamais rose ni bleu.

Cependant, lorsque les ions Fe^{+3} réagissent au contact même du mélange Nadi, avec des substances telles que KCN, NaN_3, NaF, AsO_4^{-3}, NO_2^{-1}, PO_4^{-3}, les anions oxalique, citrique, tartrique, etc., des bases comme KOH, NH_4OH, pyridine, etc., on observe la formation concomitante d'une certaine quantité de bleu d'indophénol, proportionnelle à la quantité des ions ferriques qui sont entrés en réaction.

Conclusions :

Les essais que nous avons faits montrent que la Nadi-réaction, telle qu'elle est utilisée, est une réaction purement catalytique. Les différentes observations attestent la spécificité du cation Cu^{+2} comme catalyseur de cette réaction. La sensibilité au cuivre du mélange Nadi est très grande: la présence d'une dose de métal de l'ordre de fractions du γ du métal, suffit à induire en quelques minutes une coloration nettement appréciable et facilement mesurable au photomètre.

Tous ces caractères de spécificité, sensibilité et rapidité, font de la Nadi-réaction un excellent moyen d'investigation pour l'étude des processus catalytiques dus au cuivre.

(à suivre)

[1] Le vanadium existe à l'état de combinaison organique (vanadochromogène) dans le sang des ascidies où il joue un rôle de catalyseur d'oxydation (HENZE); il existe à l'état de traces dans tous les végétaux; c'est un élément oligosynergique pour Aspergillus niger (D. BERTRAND).