

Zeitschrift: Bulletin de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 20 (1928)
Heft: 1

Artikel: Contribution à l'étude des ferments oxydants
Autor: Evard, Henri
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099571>

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: 17.04.2026

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

Contribution à l'étude des ferments oxydants

par

Henri EVARD¹

INTRODUCTION

L'histoire des ferments et l'exposé de leurs théories ne sont plus à faire. Il y a actuellement de nombreux travaux qui ont été accomplis et publiés dans ce domaine. Citons en particulier les recherches de M. le Professeur R. CHODAT et celles exécutées sous sa direction dans le Laboratoire de l'Institut de Botanique de Genève.

Cependant, nous nous permettons de souligner ce fait que l'activité des ferments constitue une partie importante de la chimie biologique, tant dans le règne animal que végétal. Ils sont étroitement liés aux fonctions vitales. Les modes de leur action sont très variés : hydrolyses, oxydations, etc. ; cette dernière propriété faisant l'objet principal de ce travail. Ils jouissent de quelques propriétés remarquables, telles que leur solubilité dans l'eau et insolubilité dans l'alcool, leur thermolabilité qui sert de contre-épreuve dans les expériences, et pour quelques-uns leurs propriétés à donner des réactions spécifiques colorées, réactions qui ont été employées dans l'exécution d'une grande partie des expériences qui suivent et sur lesquelles nous reviendrons.

Le présent travail est divisé en deux parties : la première, où nous donnons quelques détails sur la manière dont nous fîmes les expériences ; et la seconde, où nous décrivons les expériences et les résultats.

¹ Travail fait sur le conseil et sous la direction de M. R. CHODAT.

PREMIÈRE PARTIE

METHODES DE TRAVAIL

Au cours de ces recherches, nous avons été amenés à faire un usage régulier de certains ferments tirés des végétaux, tels que la peroxydase, la tyrosinase, l'émulsine, lesquels nécessitent dans leur emploi une technique, connue certainement, mais spéciale. Aussi nous avons pensé qu'il serait à propos au début d'exposer brièvement la méthode suivie pour la préparation des ferments et d'indiquer aussi leur mode d'emploi et quelques réactions qui leur sont spécifiques.

DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE.
RÉACTIONS COLORIMÉTRIQUES

Dans nos recherches, nous avons tenu compte et fait usage d'une notion assez nouvelle, quoique déjà connue : la concentration des ions hydrogène, désignée couramment par l'expression pH. Des observations et des expériences très précises ont amené les biochimistes à faire une distinction entre la quantité totale des ions H et OH et celle de ceux qui sont en liberté dans les solutions ; la première nous est donnée par la titration, la seconde par l'ionisation qui peut être mesurée par la conductibilité électrique d'une solution. De plus, pour un rapport titrimétrique égal entre les deux solutions, celui de l'ionisation est différent. Par exemple, entre l'acide acétique (N/10) et l'acide chlorhydrique (N/10), le rapport d'ionisation est de 1/6,2. Ce rapport étant considérable, il est prouvé qu'il joue un rôle important dans certaines réactions de ferments, comme il l'a été démontré pour la première fois par SOERENSEN¹ à propos de la catalase (voir aussi les anciens travaux de SENTER² sur le même sujet) et, plus récemment, pour l'un des

¹ SOERENSEN, S. « Etudes enzymatiques : Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions Hydrogène dans les réactions enzymatiques. » *Comptes rendus des Travaux du Laboratoire de Carlsberg*, 8 (1909), 1.

² SENTER, Georges. Ph.-D. B. Sc. (Lond.). « Studies on the Enzyme Action. The effect of « Poisons » on the rate of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Heamase. » *Proceedings of the Royal Society*, 74 (1904), 201.

ferments dont nous nous sommes occupés, par M. le Dr F. WYSS dans sa thèse de doctorat ¹. Il est donc utile sinon nécessaire de pouvoir déterminer cette concentration rapidement dans des limites précises. A cet effet, il a été préparé une liste d'indicateurs dont le point de virage a été déterminé exactement et qui forment entre eux une échelle assez étendue, qui va de l'acidité à la neutralité et à l'alcalinité. Ceux que nous avons employés le plus souvent sont le Brom-Thymol Blue, Brom-Phénol Blue, Brom-Cresol Purple, Méthyl-orange, Méthyl-red.

Pour augmenter l'exactitude de la méthode, on fait usage de substances acides ou alcalines lesquelles, en proportions définies, donnent une concentration pH déterminée. En ajoutant à une série de ces mélanges une ou deux gouttes d'un indicateur approprié, on obtient une gamme de teintes qui permettent de mieux apprécier la concentration cherchée.

Disons encore qu'à la suite de travaux accomplis dans ce domaine, la neutralité s'indique par 6,9, l'acidité par un nombre plus faible et l'alcalinité par un chiffre supérieur. Dans cet exposé, nous nous sommes reportés aux travaux de SOERENSEN ², F. CHODAT ³, MICHAELIS ⁴, CLARK ⁵.

DE LA PEROXYDASE

Ce ferment oxydant est très répandu dans la nature. Il y a plusieurs méthodes de le préparer. Voici celle de R. CHODAT, modifiée par STOECKLIN ⁶.

On broie la pulpe de raifort dans une machine à hâcher, qu'on laisse séjourner pendant 20 heures pour permettre au myronate de potassium d'être dédoublé par la myrosine. On fait ensuite macérer le tout dans l'alcool à 80° qui extrait les essences et d'autres corps accessoires. Le liquide coloré en rouge est décanté. On recommence une seconde fois la même opération et l'on exprime cette fois l'alcool à la presse. Le résidu est traité dans un percolateur par

¹ WYSS, F., Thèse de doctorat, No 693, Genève (1921).

² SOERENSEN, I. C.

³ CHODAT, F. Thèse de doctorat, Genève (1924).

⁴ MICHAELIS, LEONOR. « Die Wasserstoffionen Konzentration. Ihre Bedeutung für die Biologie und die Methoden ihrer Messung. » Teil I, Berlin, Springer (1922).

⁵ CLARK, W. MANSFIELD. « The determination of Hydrogen Ions. » Baltimore (1920).

⁶ STOECKLIN, E. V. « Contributions à l'étude de la peroxydase. » *Travaux de l'Institut de Botanique de Genève*, 7, série (1907), Voir aussi : R. CHODAT. *Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden*. Abderhalden, E. *Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft* (II édition).

de l'alcool à 40° pendant 40 à 60 heures. Par cette extraction, on enlève une bonne partie de la peroxydase soluble dans l'alcool à 40°. On peut concentrer cette solution à la température dans le vide. On filtre et on précipite par de l'alcool fort (absolu ou 90°) tant qu'il se fait un précipité. Ce dernier est recueilli. Il est dissous dans l'eau et reprécipité par l'alcool. On obtient une poudre blanche très active.

Mode d'emploi du ferment.

On se sert d'ordinaire d'une solution de 1% qu'on obtient en broyant dans un mortier 10 cg. de ferment purifié dans 10 cm³ d'eau naturelle. On ne broie pas le ferment à sec, mais on ajoute quelques gouttes d'eau pour éviter, par le frottement, une élévation de température qui pourrait être nuisible au ferment. On obtient ainsi une pâte qu'on dilue en ajoutant l'eau nécessaire. La solution est mise dans un flacon bouché, additionnée de quelques gouttes de toluol et se conserve quelque temps.

Il est aussi utile de préparer de l'eau oxygénée neutralisée si l'on utilise l'eau oxygénée pharmaceutique à 3% par l'addition de soude caustique, neutralité vérifiée au Brom-Thymol Blue. On amène l'eau oxygénée (Merck's Perhydrol ou eau oxygénée pharmaceutique) à la concentration de 1% en ajoutant de l'eau distillée préalablement bouillie pour éliminer le gaz carbonique qui s'y trouve.

Essai au pyrogallol. — La peroxydase oxyde en purpurogalline rouge brune insoluble dans l'eau le pyrogallol en présence de peroxyde. On prépare une solution de 1 gr. de pyrogallol pour 40 cm³ d'eau et on dispose l'expérience en se servant de 5 tubes dans lesquels on met les quantités de substances comme l'indique le tableau suivant :

<i>Tube</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
Pyrogallol.....	3 cm ³	3 cm ³	3 cm ³	3 cm ³	—
H ² O ²	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	—	1 cm ³
Ferment.	—	1 cm ³	—	1 cm ³	1 cm ³
Ferment bouilli	—	—	1 cm ³	—	—
Eau distillée.....	1 cm ³	—	—	1 cm ³	1 cm ³
Résultats	—	positif	—	—	—

Le second tube seul donne une réaction, puisqu'il est le seul à posséder le système : corps oxydable, ferment, peroxyde. Les autres servent de témoins, en particulier le troisième où le ferment a été bouilli.

En remplaçant le pyrogallol par le paracrésol et en disposant l'expérience de la même manière, on observe une réaction qui se manifeste par un trouble laiteux sensible même à dilution de 1/10.000¹. On peut aussi faire un essai à la résine de Gaïac. On décape cette dernière dans l'alcool pour enlever les portions superficielles qui sont peroxydées. On remplace l'alcool ainsi employé par de l'alcool pur pour obtenir la dissolution de la résine. On recommande aussi de ne pas employer de l'alcool absolu qui est souvent peroxydé. On obtient l'émulsion en ajoutant à 7-9 volumes d'eau, goutte à goutte, un volume de dissolution alcoolique. L'émulsion est de couleur d'un blanc opalescent et ne doit pas bleuir à l'air. L'essai se fait comme précédemment en combinant de plusieurs manières les substances. On obtient le bleuissement caractéristique en présence de ferment actif, d'émulsion, d'eau oxygénée.

Pour la recherche du ferment dans la plante même, nous signalons ici une méthode élégante qui consiste à faire des coupes minces de la plante, à les immerger dans un verre de montre ou sur un porte-objet avec de l'eau oxygénée, puis ajouter une ou deux gouttes d'émulsion. Les parties qui renferment le ferment présentent le bleuissement, tandis que les autres restent intactes. Cette manière de faire nous a donné des résultats intéressants que nous mentionnerons plus loin.

DE LA TYROSINASE

La tyrosinase, ferment oxydant, se prépare de plusieurs manières. Nous avons employé celle de M. R. CHODAT. On broie des pelures de pommes de terre qui sont arrosées immédiatement avec un peu d'alcool. On presse le hâchis et on précipite le jus dans de l'alcool à 90° (environ 3 lit. pour 4 kg. de pelures). On décante l'alcool, on filtre le précipité qui est mis macérer avec de l'eau toluolée avant qu'il soit sec pendant une nuit. On décante sur un filtre, le filtrat est précipité dans de l'alcool à 90°. On recueille le ferment sur un filtre qui est mis sécher sur une plaque de verre. Rendement : 2 à

¹ Voir R. CHODAT. In Abderhalden, l. c.

2,5 gr. pour 4 kg. de pommes de terre. On emploie la tyrosinase en solution de 100 cm³ pour 0,5 gr. On peut aussi faire usage de tyrosinase de champignons exempte de peroxydase. (R. Chodat.).

Comme son nom l'indique, la tyrosinase agit sur la tyrosine en produisant tout d'abord un rougissement, puis un noircissement ; mais aussi sur d'autres corps mélangés ou non dont voici quelques-uns : Un mélange de paracrésol au 1/250 (2 cm³) et de glycocolle au 1/75 (1 cm³) et de quelques gouttes (5) de tyrosinase, donne une réaction rouge qui devient bleue avec dichroïsme rouge. Cette dernière teinte a été appelée par M. R. CHODAT, crésol-azur¹. Récemment M. HAUSMANN a indiqué les proportions moléculaires à observer dans cette réaction qui est spécifique². Elle a servi de base dans les recherches ultérieures pour déceler la présence du ferment dans certaines plantes. Une solution de peptones devient rouge brune ; une solution d'amines devient rouge brune ou rouge violacée, suivant qu'on emploie de la méthylamine ou de la triméthylamine en milieu neutre.

On peut disposer les expériences de la même manière que pour la peroxydase, avec tube témoin bouilli, et un ou deux corps manquants.

DE L'EMULSINE

Ce ferment hydrolyse les glucosides α ; et la formation qui en résulte peut servir à mesurer son activité. On fait une macération d'amandes douces pilées dans un mortier (200 gr. d'eau pour 100 gr. d'amandes) avec un peu de chloroforme pendant 4 heures. On filtre sur une étoffe et on obtient un lait d'amandes ; il a une odeur d'aldéhyde benzoïque, car il y a quelques amandes amères. On précipite la caséine par de l'acide acétique dilué, on filtre et on obtient un liquide opalescent jaune-vert. On précipite le ferment par une égale quantité d'alcool. Il se forme un trouble de couleur crème qu'on recueille et qu'on sèche. C'est encore un mélange³.

On met facilement son activité en évidence par un essai sur l'amygdaline qui est dédoublée, avec formation d'acide cyanhydri-

¹ R. CHODAT et W. STAUB. « La spécificité de la tyrosinase et son action sur la dégradation des corps protéiques. » *Archives des Sciences physiques et naturelles*, 4e période, 24 (1907).

² HAUSMANN, M. « Des proportions à observer dans la réaction crésol-azur (tyrosinase) » *Archives des Sciences phys. et nat.*, 44 (1927), 96.

³ OPPENHEIMER. *Die Fermente* (4e édition).

que et d'aldéhyde benzoïque reconnaissable à son odeur d'amandes amères. A cet effet, on se sert d'une solution de ferment de 1/2 gr. pour 20 cm³. On met dans un tube 2 cm³ de ferment avec 2 cm³ d'une solution d'amygdaline à 5%. On fait deux parts : l'une est bouillie, l'autre reste intacte. Elles sont toutes deux placées dans l'étuve à 40 degrés ou dans un bain-marie pendant une demi-heure ; on constate alors la présence de l'acide cyanhydrique dans le tube non bouilli. Une bande de papier filtre, imbibé d'acide picrique additionné de carbonate de soude, devient rouge sous l'influence de l'HCN (réaction de Guignard).

On peut aussi précipiter le ferment de sa solution aqueuse par l'alcool. Le précipité recueilli sur un filtre et séché sur verre donne une poudre blanchâtre qui se conserve longtemps au sec. Pour l'employer, il suffit de broyer cette poudre dans un mortier et l'on peut avoir le ferment en solution dont la concentration est déterminée.

DEUXIÈME PARTIE

Dans ces travaux, nous nous sommes proposés d'étudier l'action de certains ferments, tels que la peroxydase, la tyrosinase, l'émulsine sur certaines parties de la plante et déterminer les causes qui produisent un changement de couleur, et leurs conditions d'action.

Il s'agissait soit de mettre en évidence la présence du ferment par des réactifs appropriés, soit de déterminer sa localisation, ce qui a été possible dans certains cas, ou encore par des réactions spécifiques de déterminer le ou les corps sensibles à l'action du ferment.

CHAPITRE I

DE LA TYROSINASE DANS QUELQUES PLANTES

PRÉSENCE DU FERMENT

La tyrosinase est un ferment aussi bien d'origine animale que d'origine végétale. Jusqu'à maintenant, parmi les végétaux, c'est chez les champignons qu'on l'a rencontré le plus souvent. La plupart des auteurs qui se sont occupés de ce ferment, le signalent dans les genres *Psalliota*, *Russula*, *Lactarius*, *Boletus*, *Armillaria*, *Amanita* et d'autres. Parmi les autres plantes, il a été trouvé dans la fève, la betterave, le dahlia, la pomme de terre, le son. On l'extrait couramment de la pomme de terre et des champignons.

Bien que l'existence de la tyrosinase soit supposée chez d'autres végétaux, nous n'avons pas connaissance qu'il ait été fait des recherches spéciales pour déterminer parmi les plantes connues celles qui sont susceptibles d'en renfermer et pour essayer de l'extraire le cas échéant. Une telle recherche s'imposait alors et nous indiquons les résultats ci-après.

La mise en évidence de la tyrosinase peut se faire par quelques réactions, spécialement par l'oxydation de la tyrosine en un produit mélanique, c'est d'ailleurs à cette dernière que le ferment doit son nom. La réaction du crésol-azur est aussi spécifique et a l'avantage

d'être sensible, le dichroïsme apparaissant à des concentrations extrêmement faibles. C'est de cette réaction dont nous nous sommes servis pour mettre en évidence la présence du ferment au cours de ces recherches.

La méthode est assez simple. Elle consiste à broyer dans un mortier une certaine quantité de plante fraîchement cueillie, tige, feuille, fruit ou racine, 5 gr. pour 20 cm³ d'eau, par exemple, à filtrer ensuite le jus. On en prélève 1 à 2 cm³ qu'on additionne de 3 cm³ de paracrésol à 1/250 et de 2 cm³ de glyocolle à 1/75 : on divise ce mélange en deux parts, l'une est bouillie et sert de témoin. Pour éviter qu'une infection ne se produise, on ajoute quelques gouttes de toluol. La réaction qui se manifeste, dans le cas où il y a de la tyrosinase, est quelquefois assez rapide : 5 ou 6 heures ; d'autres fois, elle est plus lente : plusieurs jours.

En faisant usage de tyrosinase préparée par extraction alcoolique la teinte passe par plusieurs stades : au début, une couleur rouge cerise qui devient de plus en plus foncée, pour aboutir à la teinte bleue avec dichroïsme. Si, par contre, nous employons du jus fraîchement exprimé d'une plante, il peut arriver que la teinte ne passe pas par le stade rouge, mais que cette solution de couleur verdâtre devienne peu à peu vert foncé, puis vert-bleuâtre avec dichroïsme. Nous n'avons pas fait de recherches spéciales sur cette différence, mais nous pouvons penser que le jus frais contient certaines substances qui empêchent la première phase rouge de se produire.

D'une manière générale, nous avons fait usage du jus obtenu en broyant la plante dans de l'eau ordinaire et sans addition de bicarbonate de soude. Ce dernier corps peut exercer une certaine influence sur quelques essais, à en juger par l'expérience suivante. Nous avons broyé dans de l'eau ordinaire, puis filtré, des feuilles du *Cytisus Laburnum* L. de *Genista sagittalis* L. et *Genista tinctoria* L. et de *Hedera Helix* L. La solution fut mise (2 cm³) en présence de paracrésol (2 cm³), de glyocolle (1 cm³). Nous avons fait deux parts : l'une fut additionnée de quelques gouttes (2-3) d'une solution saturée de bicarbonate de soude, l'autre fut laissée intacte. Dans cette dernière, la réaction se montra positive, se traduisant par une coloration verte qui devint bleuâtre avec dichroïsme rouge, ce qui ne se produisit pas en présence de bicarbonate.

Ces remarques étant faites, nous allons maintenant mentionner

les plantes sur lesquelles nous avons fait des essais, selon la méthode que nous venons de décrire avec les observations faites sur chaque cas, s'il y a lieu.

Famille des Papavéracées :

Papaver Rhoeas L., réaction rouge, puis bleue dichroïque.

Chelidonium majus L., réaction rouge, puis bleue dichroïque.

Famille des Crucifères :

Brassica oleracea L., réaction nulle.

Capsella Bursa pastoris Much., réaction nulle.

Cheiranthus Cheiri L., réaction nulle.

Famille des Tiliacées :

Tilia platyphyllos Scop., réaction nulle.

Famille des Hippocastanées :

Aesculus Hippocastanum L., réaction nulle ou très faible ; les deux tubes deviennent rouge-brique.

Famille des Célastrinées :

Evonymus europaea L., réaction nulle.

Famille des Rhamnées :

Rhamnus alpina L., réaction positive faible ; donne le dichroïsme sans bleuissement net.

Famille des Papilionacées :

Genista sagittalis L., réaction positive ; ne passe pas par le stade rouge ; le ferment a été extrait par l'alcool ; la solution noircit à l'air.

Genista tinctoria L., réaction positive ; mêmes remarques que ci-dessus.

Cytisus Laburnum L., réaction positive, faible, lente.

Lotus corniculatus L., sans réaction.

Robinia Pseudoacacia L., sans réaction.

Orobus vernus L., sans réaction.

Lathyrus niger L., réaction positive.

Vicia Faba L., réaction positive, lente, avec noircissement dans les deux tubes : oxydation du dopa.

Famille des Renonculacées :

Actea spicata L., réaction positive.

Famille des Rosacées :

Pirus communis L., réaction faible dans les feuilles, coloration brun noyer avec dichroïsme rouge.

Famille des Cucurbitacées :

Bryonia dioica L., réaction nulle.

Famille des Araliacées :

Hedera Helix L., réaction positive lente, sans stade rouge, teinte vert-bleuâtre avec dichroïsme rouge ; essais faits sur feuilles et fruits.

Famille des Cornacées :

Cornus sanguinea L., réaction nulle ou très faible.

Famille des Loranthacées :

Viscum album L., réaction positive forte, stade vert foncé, puis bleu et dichroïsme.

Famille des Caprifoliacées :

Sambucus nigra L., réaction douteuse.

Viburnum Lantana L., réaction positive lente et faible ; solution brune avec dichroïsme.

Famille des Rubiacées :

Galium verum L. et *G. Aparine* L., réaction nulle ou très faible.

Famille des Valérianées :

Valeriana officinalis L., réaction nulle.

Famille des Dipsacées :

Dipsacus silvester Hds., réaction nulle.

Famille des Composées :

La plupart des plantes de cette famille donnent une réaction positive passant par le stade rouge.

Cirsium arvense Sc.

Centaurea Jacea L.

Lappa communis L.

Helianthus tuberosus L.

Leucanthemum vulgare Lam.

Tussilago Farfara L.

Doronicum Pardalianches L.

Senecio vulgaris L.

Cichorium Intybus et *C. Endivia* L.

Taraxacum Dens-leonis L., réaction rapide dans la racine, plus faible dans le pédoncule ; localisation du ferment déterminée pour la racine et le pédoncule ; extraction du ferment par l'alcool.

Tragopogon pratense L.

Lactuca sativa L.

Scorzonera humilis L.

Sonchus oleraceus L.

Crepis biennis L.

Leontodon hastile L.

Famille des Campanulacées :

Phyteuma spicatum L., réaction positive rose, puis bleue et dichroïque.

Campanula persicaefolia L., réaction positive forte.

Famille des Monotropées :

Monotropa Hypopitys L., réaction nulle; les deux tubes deviennent noirs sans dichroïsme.

Famille des Oléinées :

Fraxinus excelsior L., réaction positive; stade rouge faible, plutôt brun.

Ligustrum vulgare L., Même réaction que ci-dessus.

Famille des Apocynées :

Vinca minor L., réaction nulle.

Famille des Convolvulacées :

Convolvulus arvensis L., réaction positive; stade rouge, puis bleu dichroïque.

Famille des Borraginées :

Borrago officinalis L., réaction positive forte; localisation du ferment est déterminée.

Sympyhtum officinale L., réaction positive forte, localisation du ferment est déterminée.

Famille des Solanées :

Nicotiana Tabacum L., réaction forte, positive.

Solanum Lycopersicum L., réaction positive, forte.

Famille des Scrofulariacées :

Melampyrum cristatum L., réaction positive, forte.

Rhinanthes hirsutum L., réaction positive, forte.

Famille des Labiées :

Galeopsis Tetrahit L., réaction forte.

Famille des Plantaginées :

Plantago lanceolata L. ; *P. major* L. ; *P. media* L. ; *P. serpentina* Vill. ; réaction positive.

Famille des Euphorbiacées :

Euphorbia Cyparissias L., réaction nulle.

Famille des Buxacées :

Buxus sempervirens L., réaction nulle.

Famille des Juglandées :

Juglans regia L., réaction positive ; extraction du ferment par l'alcool.

Fougères :

Polypodium Dryopteris L., réaction positive.

MÉTHODE D'EXTRACTION DE LA TYROSINASE A PARTIR DE NOUVELLES PLANTES

Les extractions de tyrosinase que nous avons faites en même temps que nous mettions en évidence la présence du ferment, sont basées sur la méthode générale.

Pour extraire le ferment du *Genista tinctoria* L., nous avons pris 100 gr. de racines coupées en petits fragments, puis broyées. Après les avoir laissées macérer pendant quelques heures dans 50 cm³ d'eau légèrement chloroformée, nous avons exprimé le jus qui fut précipité par l'alcool fort et filtré. Le résidu déposé sur le filtre est repris par l'eau et laissé macérer en présence de toluol pendant un jour, puis filtré. La solution est traitée par l'alcool fort jusqu'à formation d'un précipité floconneux de ferment, lequel est recueilli sur un filtre non plissé, puis séché sur une plaque de verre.

La tyrosinase ainsi obtenue est active, elle donne rapidement le bleuissement dans le système paracrésol-glycocolle. Elle renferme, en outre, de la peroxydase mise en évidence par la réaction bleue de la résine de Gaïac et de l'eau oxygénée.

De la même manière nous avons extrait la tyrosinase du *Taraxacum Dens-leonis* L., du *Cichorium Endivia* L., du *Genista sagittalis* L., du *Juglans regia* L. Pour ce dernier, nous donnons ailleurs d'autres détails.

DE LA RÉPARTITION DU FERMENT DANS LE *Taraxacum Dens-leonis* L.

Si une plante comme le *Taraxacum Dens-leonis* L. renferme du ferment, la répartition de celui-ci est-elle égale dans les différences de la plante ? Telle est la question à laquelle les expériences suivantes donneront une réponse.

Après avoir broyé séparément dans un mortier, avec 20 cm³ d'eau, 5 gr. de racines, autant de feuilles et de pédoncules de *Taraxacum Dens-leonis* L., nous avons exprimé et filtré le jus de chacune de

ces parties et en avons ajouté 5 gouttes à un mélange de 2 cm³ de paracrésol et de 1 cm³ de glycocolle. Ces réactions ont été faites avec tube témoin bouilli.

Les résultats furent les suivants :

Les racines présentent un rougissement rapide et intense après quelques minutes déjà.

Les pédoncules ont une réaction légèrement plus faible.

Les feuilles sont légèrement roses après une heure.

Après deux jours, il y a une coloration bleue avec dichroïsme intense pour les racines et les pédoncules, mais non pour les feuilles qui sont verdâtres avec un léger dichroïsme.

Le ferment n'est donc pas réparti d'une manière uniforme dans la plante, les racines en renferment le plus. Nous obtiendrons un résultat semblable avec les *Plantago*, mais avec une autre méthode.

DE LA LOCALISATION DU FERMENT

Quelques observations faites au cours de ces recherches ont montré que la répartition du ferment ne se fait pas également dans les différentes parties de la plante. Ainsi, il y a une différence sensible entre la pulpe du tubercule, la pelure et les germes de pommes de terre, quant à la quantité de tyrosinase. Le fait est le même pour la racine et la tige de *Taraxacum Dens-leonis* L. ; pour les feuilles et le brou de noix, dans le *Juglans regia* L.

Cette distribution inégale n'est pas seulement limitée aux organes mais elle se rencontre aussi dans les tissus. Tous les tissus diffèrent les uns des autres pour la quantité de ferment ; il y a des cellules à ferment qui sont localisables par des réactions appropriées. Cette localisation d'un ferment n'est point chose nouvelle en elle-même. Bien des travaux ont déjà été accomplis dans ce domaine, mais on n'avait pas d'expériences étendues qui concernent les ferments oxydants et la localisation de la tyrosinase restait obscure pour la plupart des cas. On fait une coupe mince de la pelure de pomme de terre qui est placée sur un porte-objet, traitée avec une solution physiologique de Detmer et additionnée de quelques gouttes d'iodure de potassium. Au bout d'un certain temps, on constate que les grains d'amidon à l'intérieur des cellules qui sont alors plasmolysées ont pris la coloration spécifique bleue violette, ce qui détermine ainsi la localisation du ferment ¹.

¹ CHODAT, R. I. c.

La localisation de la catalase a aussi été déterminée sur des feuilles d'*Elodea* placées dans une solution de nitrate de potassium à 5% et additionnée de 1% d'eau oxygénée. On aperçoit alors au microscope la formation de bulles à partir du protoplasme ¹.

La localisation de la tyrosinase après vérification chimique de l'existence de ce ferment, se détermine par une méthode assez semblable, que nous allons indiquer, ainsi que les résultats obtenus sur les germes de pommes de terre, sur les racines et les germes de *Taraxacum Dens-leonis* L., sur le *Borrago officinalis* L. et le *Symphytum officinalis* L., plantes qui toutes renferment une assez grande quantité de tyrosinase.

La méthode est basée sur l'oxydation du paracrésol par la tyrosinase. Après quelques essais, nous sommes parvenus à déterminer la localisation de cellules à ferment, par le procédé suivant qui est assez simple et élégant.

Après avoir fait des coupes pas trop minces de l'organe à étudier, nous les avons lavées dans de l'eau ordinaire et placées sur un porte-objet, puis humectées de quelques gouttes de paracrésol à 1/250 et de saccharose à 10%. Ce sucre a la propriété de conserver les cellules vivantes. En le remplaçant par du nitrate de potassium à 5%, les résultats sont à peu près identiques. On peut aussi alcaliniser la préparation en laissant tomber une goutte d'une solution saturée de bicarbonate de soude, ce qui favorise la réaction dans quelques cas. Ces coupes sont exposées à l'air, sans couvre-objet, pendant un temps variable d'une plante à l'autre. Les cellules se plasmolysent, la réaction d'oxydation s'accomplit et la vacuole de quelques-unes devient d'un brun rougeâtre, à la suite de la pénétration du réactif et de l'oxygène de l'air. La vacuole, ou quelquefois la cellule, se détachent par leur teinte caractéristique des cellules voisines et ne laisse aucun doute sur le lieu de la réaction. Le phénomène n'est que passager, car toute la préparation devient ensuite peu à peu brunâtre, par suite de la diffusion du ferment et de la mort des cellules.

L'oxygène de l'air est indispensable à la réaction, laquelle ne se produit pas si la préparation est recouverte par une lamelle, ou si l'on plonge les coupes dans le réactif. Dans ce cas, le ferment diffuse et provoque peu à peu une coloration de la solution, sans que l'on

¹ MOLLIARD, Nutrition de la plante.

puisse constater nettement de réaction intracellulaire. Cette réaction constitue ainsi un exemple de l'absorption de l'oxygène de l'air par la tyrosinase. Elle montre encore que le paracrésol, dans ces conditions et à cette concentration, n'est pas mortel pour les cellules qui continuent à se plasmolyser comme dans d'autres conditions.

Cette méthode appliquée sur une coupe longitudinale de germes de pommes de terre ayant cru à l'obscurité, a produit une réaction qui s'est manifestée par l'apparition d'une couleur rose dans les cellules corticales sous-épidermiques. Cette coloration augmente progressivement et s'étend dans le parenchyme et dans la moelle ; le tissu conducteur reste tout d'abord incolore, ainsi que les fibres. Les noyaux des cellules par nécrobiose finale ont la propriété de se colorer en rouge-brun et il semblerait que la coloration parte du noyau pour aller à la périphérie.

L'examen au microscope d'une coupe longitudinale de racine de *Taraxacum Dens-leonis* L. montre que les laticifères et les parties conductrices se colorent en rouge-brun. Il se produit aussi la plasmolyse de quelques cellules du parenchyme spécialement de celles qui entourent les laticifères. Une goutte de lait sortant librement des laticifères, déposée sur une lamelle avec une goutte de paracrésol donne une réaction rouge.

Sur une coupe transversale d'un pédoncule floral de la même plante, se colorent premièrement les faisceaux du bois qui deviennent bruns foncés, tandis qu'a lieu la plasmolyse du parenchyme latéral et que se détachent en rose les cellules à ferment qui y sont disséminées. Cette coloration se manifeste aussi dans les cellules de l'épiderme, mais elle ne doit pas être confondue avec celle de l'anthocyane dont la distinction se fait facilement par comparaison avec une coupe non traitée.

En traitant de cette manière un lambeau de l'épiderme de *Symphytum officinale* L., nous avons obtenu une réaction positive. Quelques cellules plasmolysées se détachent en brun d'autres cellules qui n'ont pas réagi, et les méats intercellulaires apparaissent en blanc, comme s'il s'agissait des papilles d'un pétale de fleur. La réaction est particulièrement intense à la base des poils. Le protoplasme de ces derniers présente aussi une forte réaction et la plasmolyse de quelques-uns est obtenue.

Sur une coupe transversale, la réaction s'est manifestée dans le

parenchyme et dans l'épiderme. Le système vasculaire est devenu brun, tandis que les fibres restaient incolores.

Sur une coupe de *Borrago officinalis* L., nous avons observé que les cellules épidermiques spécialement de la base des poils, se colorent en brun. Le tissu collenchymateux sous-épidermique reste sans réaction. Le parenchyme présente quelques cellules plasmolysées vers l'endoderme spécialement. Le système vasculaire se colore en brun ainsi que de nombreuses cellules de la moelle.

Ces exemples nous montrent donc une répartition du ferment dans les cellules parenchymateuses, quelquefois dans l'épiderme et les tissus conducteurs, dans quelques sécrétions, mais absente dans les tissus de soutien.

Des expériences semblables, faites sur *Vicia Faba* L. et sur l'*Aucuba japonica* L., donnent une coloration noirâtre qui est sans rapport avec les précédentes et qui résulte de l'oxydation du dopa ou de l'altération de l'aucubine.

DE LA PRÉSENCE DE LA TYROSINASE DANS LES DIFFÉRENTES PARTIES DE LA POMME DE TERRE

La présence de la tyrosinase dans cette plante étant une chose acquise, nous avons essayé de rechercher sa répartition dans les différentes parties. A cet effet, nous avons broyé séparément 1 gr. de jeunes pousses ayant cru à l'obscurité, autant de pelures et de tubercules, dans 10 cm³ d'eau. Après avoir filtré, nous avons ramené les solutions à la même concentration en ions Hydrogène par la mesure colorimétrique avec le Brom-Thymol Blue, la solution de germes était plus acide, elle a été ramenée à la neutralité par l'addition de bicarbonate de soude. Nous avons réparti ces solutions dans des tubes à raison de 2 cm³, auxquelles nous avons ajouté 2 cm³ de paracrésol à 1/250 et 1 cm³ de glyocolle à 1/75. De chaque solution, nous avons fait deux parts, l'une est bouillie et sert de témoin. Nous avons obtenu les résultats suivants : La solution de tubercules donne une réaction légèrement rose après 5 minutes ; celle des pelures après 2 minutes ; celle des germes est spontanée. Ces solutions deviennent bleues avec le temps et l'intensité de la réaction est de la même gradation.

Cette expérience nous montre donc qu'il y a une variation dans la quantité de ferment suivant que l'on considère les tubercules, la pelure et les jeunes pousses. Ce résultat est certainement en rapport

avec l'activité biologique de ces différentes parties : l'intérieur des tubercules qui sert de réserve, les pelures qui sont le siège de phénomènes respiratoires, et enfin les pousses qui sont en pleine activité.

Mentionnons ici brièvement une expérience pour démontrer l'action de la tyrosinase dans le brunissement de certaines plantes, telles que l'*Actea spicata* L. qui, nous venons de le voir, en renferme beaucoup. Les feuilles et les tiges présentent des taches brunâtres et les fruits mûrs sont noirs. Nous avons fait bouillir dans 20 cm³ d'eau 5 gr. de tiges et autant de fruits encore verts, pendant 5 minutes. L'extrait était légèrement jaunâtre et devenait légèrement verdâtre par addition de quelques gouttes de bicarbonate de soude. Après avoir fait deux parts, nous avons ajouté à l'une quelques gouttes d'une solution de tyrosinase de pommes de terre, ce qui produisit un brunissement rapide, tandis que l'autre restait sans changement. Il y a lieu cependant d'ajouter que des phénomènes d'auto-oxydation se produisent, mais se distinguent facilement de la réaction ci-dessus.

CHAPITRE II

EXPÉRIENCES SUR LE *JUGLANS REGIA* L.

PRÉSENCE ET EXTRACTION DE LA TYROSINASE

Parmi les plantes chez lesquelles nous avons trouvé de la tyrosinase, il en est une, le *Juglans regia* L., qui a retenu notre attention pour deux raisons, l'une à cause du ferment qu'il contient, l'autre du brunissement dont il est le siège ; car c'est un fait d'observation courante que les feuilles et le brou de noix noircissent à l'air.

Comme nous l'avons dit, après avoir broyé et filtré dans de l'eau ordinaire des feuilles de noyer ou des chatons mâles et mis à l'extrait en présence de paracrésol et de glycocolle, nous avons obtenu une réaction positive. Cette réaction n'est pas très nette au début, car il se produit, dans les tubes bouilli et non bouilli, un brunissement qui masque l'action de la tyrosinase sur le système paracrésol-glycocolle et ce n'est qu'un ou deux jours après que l'on distingue en diluant un dichroïsme assez intense qui n'existe pas dans le tube bouilli. Nous avons aussi obtenu une réaction positive avec l'écorce des branches, mais douteuse pour celle des racines.

Nous avons procédé ensuite à un essai d'extraction qui donna un heureux résultat. A cet effet, nous avons broyé dans la machine à hâcher, 200 gr. de jeunes feuilles qui furent mises à macérer avec 100 cm³ d'eau légèrement chloroformée pendant 5 heures. On peut aussi se servir de feuilles adultes ou de chatons mâles. La matière alors avait noirci, à cause de l'oxydation. Après avoir exprimé à la presse, le jus de couleur brune fut précipité par l'alcool fort (deux volumes d'alcool pour un volume de jus). Nous avons recueilli le précipité sur un filtre et mis séché sur une plaque de verre. Il nous a donné une tyrosinase impure, active. Dans un autre essai, nous avons repris par l'eau ce premier précipité alcoolique et laissé macérer pendant un jour avec quelques gouttes de toluol. Nous avons filtré et précipité de nouveau le liquide obtenu par de l'alcool fort. Il s'est produit un précipité floconneux jaune-brun qui, recueilli, donne une tyrosinase purifiée. Cette dernière nous a semblé plus faible que l'autre, mais nous n'avons pas fait de recherches spéciales à ce sujet.

Dans les expériences qui suivent, nous avons fait usage de tyrosinase obtenue par une seule précipitation alcoolique.

Cette tyrosinase a des propriétés chimiques analogues à celle de la pomme de terre, mais elle présente certaines différences dues sans doute à la présence de substances accessoires qui peuvent être utiles pour quelques réactions.

En séchant, elle devient brun clair et a la propriété de ne pas noircir la solution où on la fait agir. Elle renferme de la peroxydase mise en évidence par le bleuissement d'une solution de résine de Gaïac en présence d'eau oxygénée. Dans le système paracrésol-glycocolle, elle donne au début une belle teinte rose qui passe au bleu violet, puis bleu intense avec fort dichroïsme.

ESSAI COMPARATIF AVEC LA TYROSINASE DE NOYER ET CELLE DE POMMES DE TERRE

Pour faire une comparaison entre ces deux tyrosinases, nous avons réalisé des expériences qui ont donné des résultats identiques, sauf quelques légères différences qui peuvent provenir, soit de la concentration du ferment ou d'autres causes inhérentes à l'origine même du ferment. Il s'agit avant tout de réactions qualitatives et non quantitatives. Dès le début, il nous a fallu déterminer la con-

centration des ferments pour obtenir une réaction à peu près égale sur le système paracrésol-glycocolle. Après quelques tâtonnements, nous avons trouvé qu'une concentration double de ferment de noyer produisait la même action qu'une quantité simple de tyrosinase de pommes de terre. C'est de cette manière que nous avons procédé aux réactions suivantes.

Réaction avec le phénol. — Nous avons fait un mélange de 2 cm³ de phénol (1/150) avec 4 cm³ de glycocolle, lequel fut divisé en deux parts, l'une fut additionnée de 10 gouttes de tyrosinase de noyer, l'autre de 5 gouttes de celle de pommes de terre.

Comme résultat, après 12 heures, le tube à tyrosinase de noyer avait une couleur orangé, l'autre une teinte jaune-brune. La réaction s'est accentuée avec le temps.

Réaction avec les amines. — Nous avons préparé un mélange de 2 cm³ de paracrésol, de 4 cm³ d'eau ordinaire et de 10 gouttes de triméthylamine à 0,33%. Nous avons fait deux parts et ajouté à chacune la même quantité de ferment que précédemment.

Après 12 heures, nous avons constaté une réaction jaune-brune plus foncée avec la tyrosinase de pommes de terre qu'avec l'autre. La couleur s'accroît avec le temps.

Réaction avec les peptones. — Après avoir préparé une solution de 1% de peptones par extraction à l'autoclave à 120 degrés pendant un quart d'heure, nous avons fait un mélange de 4 cm³ de paracrésol de 2 cm³ de peptones, puis divisé en deux parts, auxquelles nous avons ajouté les ferments.

La réaction, à peu près identique dans les deux tubes, s'est manifestée par un rougissement qui passe au brun noyer après quelques jours.

INFLUENCE DU MILIEU

Au cours des essais précédents, nous avons remarqué que l'addition de bicarbonate influençait la réaction. Pour préciser l'influence que le milieu pouvait avoir sur l'action de la tyrosinase de pommes de terre, comparée à celle de noyer, nous avons fait l'expérience suivante. Nous avons préparé 2 séries de solutions dont la concentration en ions Hydrogène varie de 4,9 à 8,3 par un mélange convenable de phosphates primaire et secondaire, à raison de 5 cm³ par tube. Elles furent additionnées de 2 cm³ de paracrésol à 1/250 et de 1 cm³ d'asparagine à 1/30. On peut employer le gly-

cocolle à 1/75: A l'une des séries, nous avons ajouté 10 gouttes de tyrosinase de pommes de terre, à l'autre 20 gouttes de tyrosinase de noyer. Les résultats furent les suivants :

Après quelques heures, la réaction s'est manifestée dans les deux séries. Les tubes à tyrosinase de pommes de terre passent du jaune au rose et au rose violacé, au fur et à mesure que l'alcalinité augmente. Ceux de tyrosinase de noyer montrent la même gradation, ayant seulement une teinte un peu plus rouge. Après quelques jours, les teintés sont plus accentués et deviennent verdâtres, se rapprochant du bleu dans les tubes les plus voisins de la neutralité avec un fort dichroïsme rouge. Il y a encore une légère différence en faveur de la tyrosinase de noyer. Les tubes à forte acidité sont plus rougeâtres que les autres, montrant ainsi que l'action du ferment se limite presque à une seule oxydation du paracrésol.

En résumé, toutes ces actions comparatives semblent suffisantes pour établir l'identité d'action entre la tyrosinase de pommes de terre et celle de noyer, pour autant qu'on peut le faire avec des ferments. Ces résultats viennent confirmer ceux d'autres auteurs qui pensent qu'il n'y a qu'une tyrosinase, bien que son origine puisse être différente.

DE L'ÉMULSINE ET DE LA PEROXYDASE DANS LE BROU DE NOIX

Nous avons essayé sans succès de mettre en évidence la présence de la tyrosinase dans les chatons femelles et le brou de noix. En les broyant et additionnant le jus de paracrésol et de glyocolle, nous n'avons pas obtenu de réaction positive. Les deux tubes, bouilli et non bouilli, deviennent bruns sans donner en aucun cas de dichroïsme rouge. La tyrosinase présente dans les feuilles, semble être absente dans ces parties. Par contre, il y a d'autres ferments : de la peroxydase et de l'émulsine.

Une coupe mince de brou de noix, déposée sur un verre de montre, humectée d'eau oxygénée et de quelques gouttes d'une solution de résine de Gaïac décapée au préalable, nous a donné une réaction bleue dans les tissus sous-épidermiques, dénotant ainsi la présence de la peroxydase.

Quant à l'émulsine, nous l'avons mise en évidence par la décomposition de l'amygdaline. Après avoir broyé et filtré 5 gr. de brou

de noix dans 20 cm³ d'eau, nous avons mis le jus (2 cm³) en présence de 2 cm³ d'une solution d'amygdaline à 2%. Il en est résulté la formation d'acide cyanhydrique, que nous avons constaté par son odeur d'amandes amères et avec le réactif de GUIGNARD : une bande de papier filtre, imprégnée d'acide picrique et de carbonate de soude, placée dans le tube devient rose sous l'action de l'HCN. La présence de l'émulsine a aussi été constatée dans la noix par une expérience semblable.

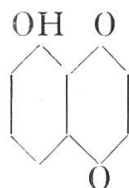
Soulignons ici un fait remarquable dans la distribution des ferments : tyrosinase dans les feuilles, mais non dans le fruit où il y a de l'émulsine. Cette répartition semble être en rapport avec les fonctions des organes : les feuilles, organes d'assimilation, la noix, organe de réserve et de reproduction.

DE LA PRÉSENCE D'UN CORPS OXYDABLE DANS LE NOYER

La présence d'un tel corps se démontre par l'expérience suivante. Nous avons jeté dans 50 cm³ d'eau bouillante, 5 gr. de chatons mâles que nous laissons bouillir pendant 5 minutes. Nous avons ensuite prélevé 2 cm³ d'extrait qui furent additionnés de 5 gouttes de tyrosinase. En comparant un tel tube avec un même tube bouilli ou l'extrait sans tyrosinase, nous avons remarqué un noircissement notable, ce qui montrait une oxydation. Nous avons obtenu des résultats semblables en employant des feuilles de noyer ou de l'écorce, soit des branches ou des racines. Nous avons aussi procédé à une extraction alcoolique et, après avoir évaporé l'alcool, le résidu fut repris par l'eau et donna un résultat semblable aux précédents. Pour bien mettre en évidence l'action de la tyrosinase dans ces essais et pour qu'elle ne soit pas confondue avec celle de la peroxydase, nous avons fait de mêmes expériences en employant de la peroxydase extraite de raifort et vérifiée sans que nous obtenions de résultats positifs.

Parmi les matières contenues dans le noyer et qui peuvent nous intéresser, se trouvent des tanins, du juglon, de la quercitine, de l' α et β juglon, de l'acide gallique. Le juglon aurait la propriété d'être facilement oxydable ; extrait par l'éther des brous mûrs, il se dépose en aiguilles jaunes soluble dans les alcalis ; il donne une

couleur pourpre-violette. On donne au juglon la constitution suivante :



Il y aurait des probabilités que ce corps, le juglon, joue un rôle dans les réactions d'oxydation que nous avons constatées et qui se passent dans les tissus du noyer quand ceux-ci sont endommagés.

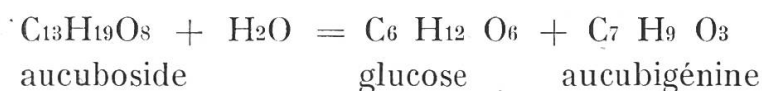
CHAPITRE III

EXPÉRIENCES SUR LES *PLANTAGO*

DE L'AUCUBOSIDE

L'*Aucuba japonica* L. a donné son nom à un glucoside : l'aucuboside qu'il contient et qui a été isolé par BOURQUELOT, E. et HÉRISSEY ¹. Les différentes variétés d'*Aucuba* ne sont pas les seules à élaborer ce corps. Il a aussi été constaté dans les familles des Cornacées, des Plantaginées, des Scrofulariacées ².

Comme tous les glucosides, l'aucuboside possède la propriété d'être dédoublée par les acides minéraux selon l'équation suivante :



L'aucubigénine qui est mise en liberté par l'hydrolyse, est un corps incolore, soluble dans l'eau, mais peu stable, se transformant facilement en un précipité noir floconneux abondant sous l'action de la chaleur. L'aucuboside qui s'appelait primitivement aucubine a été désignée ainsi à la suite des travaux de BOURDIER.

¹ BOURQUELOT, E. et HÉRISSEY. « Sur un glucoside nouveau retiré des graines de *Aucuba japonica*, L. » *Comptes rendus Ac. des Sciences*, 124 (1902), 144.

² HÉRISSEY et LEBAS, C. Présence de l'aucubine dans plusieurs espèces du genre *Carrya*. *Journal de pharmacie et de chimie*, 7, II (1910), 490.

² BOURDIER. « Recherches biochimiques dans le *Plantain* (aucubine) et dans la *Vervaine* (verbenaline). « Etude d'un glucoside nouveau. » *Thèse de doctorat univ. Pharm.* Paris (1908).

² CHARAUX. « Sur la présence de l'aucubine dans les graines de *Veronica hederefolia* L. » *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, Paris, 4 (1922), 568.

Voir aussi : ARMSTRONG, E. F. et H. E. « Enzyme action. » *Proceedings Royal Society*, 73 (1904) et suivants.

DU BRUNISSEMENT DES « PLANTAGO »

Certains auteurs ont pensé que le dédoublement de l'aucuboside sous l'influence de l'émulsine contenue dans la plante, était cause du noircissement du végétal, quand celui-ci est endommagé ou conservé d'une manière quelconque.

En effet, si nous prenons des tubes au fond desquels se trouve un tampon de coton hydrophile imbibé de chloroforme et que nous introduisons une partie de racine, de tige, de feuilles de différents plantains tels que *Plantago-major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L., *P. serpentina* Vill., *P. Cynops* L., nous obtenons après un ou deux jours les résultats suivants :

Les racines sont d'un brun foncé, de jaune-clair qu'elles étaient, en passant par le brun-rouge. Les feuilles sont d'un brun-verdâtre. Nous avons fait plusieurs essais avec des plantes venant d'endroits différents avec les mêmes résultats.

Une plante entière de *Plantago major* L. a été mise dans un tel tube et a présenté une réaction bien nette entre la tige qui était encore grise verdâtre et la racine qui était déjà brune foncée, ce qui donne ainsi un exemple de la répartition inégale ou du ferment ou de la matière oxydable. A notre avis, cette différence est due plus à cette dernière qu'au ferment qui semble assez également réparti dans la plante, comme nous allons le voir.

Tel est le brunissement des Plantaginées qui sont parmi les plantes à aucuboside, celles sur lesquelles nous avons fait des recherches.

RECHERCHE DE L'ÉMULSINE

Pour mettre en évidence ce ferment dans les Plantains, nous avons essayé de décomposer, avec le jus de ces plantes, certains glucosides tels que l'amygdaline et la salicine. Dans ce but, nous avons broyé et exprimé le jus de 5 gr. de tiges et de racines avec 10 cm³ d'eau ordinaire des différentes variétés suivantes : *Plantago major* L., *P. media* L., *P. lanceolata* L. *P. serpentina* Vill.

De ces différents extraits, nous avons prélevé 2 cm³ qui furent chacun additionnés de 2 cm³ d'une solution de 2% d'amygdaline pour une première série et de 2 cm³ de salicine à 5% pour une deuxième série. De chaque solution nous avons fait ensuite deux parts : l'une fut bouillie et servit de témoin. Les solutions à amyg-

daline furent fermées soigneusement pour retenir les traces d'acide cyanhydrique qui auraient pu se dégager. Tous les tubes furent placés dans un bain-marie à 40 degrés pendant une demi-heure. Nous avons essayé de constater l'action de l'émulsine sur l'amygdaline mais sans succès : il n'y avait pas d'HCN reconnaissable à son odeur ou avec le réactif de GUIGNARD. Avec la salicine, il y eut aussi un résultat négatif, bien que dans les deux cas un essai fait à blanc se montra positif avec de l'émulsine d'amandes.

Nous ne tirons de ces expériences aucune conclusion positive, puisqu'il existe plusieurs ferments capables de décomposer les glucosides. Il se peut que dans les Plantains il y ait une diastase qui, ne décomposant pas l'amygdaline, puisse agir sur d'autres glucosides.

ACTION DE LA TYROSINASE DE POMMES DE TERRE SUR UN EXTRAIT DE PLANTAIN

L'existence de ce ferment étant un fait certain, nous avons alors expérimenté son action sur un extrait de Plantain. Dans ce but, nous avons jeté dans l'eau bouillante 5 gr. de racines et autant de feuilles des différentes variétés de Plantains et avons obtenu des extraits aqueux de couleur jaunâtre. De ces extraits, nous en avons prélevé 4 cm³ qui furent additionnés de 10 gouttes de tyrosinase de pommes de terre. Nous en avons fait 3 parts, l'une fut conservée intacte, l'autre fut légèrement alcalinisée avec du bicarbonate de soude et la troisième fut bouillie pour servir de témoin. Les résultats furent les suivants :

Les tubes à tyrosinase présentèrent un brunissement considérable, légèrement verdâtre pour le *Plantago major* L. et rougeâtre pour les *P. media* L., *P. lanceolata* L. et *P. serpentina* Vill. ; les tubes alcalinisés avec du bicarbonate sont tous d'un brun verdâtre plus ou moins accentué ; les tubes témoins sont jaunes.

La tyrosinase a donc agi et rend ainsi compte du brunissement de ces plantes dans une grande mesure. Nous faisons remarquer ici le parallélisme qu'il y a entre l'existence simultanée de l'aucuboside et de la tyrosinase dans les Plantains et chez d'autres plantes, telles que les *Melampyrum cristatum* L. et le *Rhinanthes hirsutum* Lam. de la famille des Scrofulariacées.

INFLUENCE DU MILIEU ET AUTO-OXYDATION

Les teintes provenant de l'action de la tyrosinase présentant des variations suivant le milieu, nous avons cherché à déterminer l'influence que celui-ci peut avoir sur la réaction. Nous avons alors préparé une série de solutions de 5 cm³, dont la concentration en ions Hydrogène varie de 4,9 à 8 et qui furent additionnées de 2 cm³ d'extrait aqueux et de 10 gouttes de tyrosinase de pommes de terre. Comme résultats, tous les tubes présentent une réaction qui va d'une légère teinte brune au jaune-brun pour les concentrations de 4,9 à 6,9 et devient légèrement verdâtre pour 7,1 et nettement pour 7,6 et 8.

Dans une même série de solutions tampons, 2 cm³ d'extrait sans tyrosinase. Une très légère réaction se produisit alors à la concentration 6,6, qui augmente pour 6,9 en devenant jaunâtre, diminue à 7,1 et devient vert-jaune à 7,6, verdâtre à 8. Il y a donc une auto-oxydation et l'alcalinité la favorise et fait apparaître une teinte verdâtre. Dans cette dernière expérience, il s'est produit un phénomène de précipitabilité qui est en rapport avec la diminution de l'auto-oxydation pour le tube 7,1. Un certain trouble est apparu dans les tubes à concentration 6,2 et 7,1 et semble indiquer que l'extrait aqueux contient des substances protéiques qui sont précipitées à ces concentrations.

EXPÉRIENCES SUR L'AUCUBOSIDE LUI-MÊME

Grâce à l'obligeance de M. Marc BRIDEL, professeur au Museum et à qui nous exprimons ici notre reconnaissance, nous avons obtenu de l'aucuboside chimiquement pur et qui nous a servi à quelques expériences qualitatives nous permettant de poursuivre ces recherches.

Action de l'émulsine. — Nous avons préparé 5 cm³ d'une solution d'aucuboside à 1% qui furent additionnés de 5 gouttes d'émulsine d'amandes vérifiées à 1% : Après avoir fait 3 parts, nous avons conservé la première intacte, la deuxième fut additionnée de bicarbonate de soude, et la troisième bouillie pour servir de témoin. Ces trois solutions ont été placées à une température de 40 degrés pendant une demi-heure. Après ce temps, nous avons observé une réaction légèrement noirâtre dans le premier tube, moins forte dans le deuxième, nulle dans le dernier. Les teintes s'accroissent avec le

temps. L'aucuboside a donc été dédoublé, ce qui est conforme aux résultats des auteurs qui ont étudié ce glucoside.

Action de la tyrosinase. — D'autre part, nous avons aussi fait agir sur cette même solution d'aucuboside, de la tyrosinase à raison de 5 gouttes de ferment pour 5 cm³ de solution. Nous avons fait trois parts, comme précédemment : l'une conservée intacte, la deuxième alcalinisée et la troisième bouillie. Il n'y eut aucun résultat : la tyrosinase n'a pas agi sur l'aucuboside.

Action de l'acide chlorhydrique. — Il nous était utile de faire une hydrolyse par un acide minéral. Quelques centimètres cubes de la solution d'aucuboside à 1% furent additionnés de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et chauffés à la température d'ébullition. La solution devient d'un bleu noirâtre, suivie d'une floculation de même teinte qu'on peut séparer par filtration et obtenir un liquide transparent. L'aucuboside a été hydrolysé et a donné un précipité noirâtre.

Action du chlorure ferrique. — La propriété qu'a ce corps de donner des réactions colorées, a été employée dans le cas qui nous occupe. Nous avons additionné une solution d'aucuboside (2 cm³) d'une goutte d'une solution de chlorure de fer sans obtenir à froid de changement appréciable. En chauffant à l'ébullition, nous avons vu la teinte devenir de plus en plus vive jusqu'à obtenir une couleur rouge orangée très nette. Un excès de FeCl₃ produit un trouble dans la solution.

Si, sur le liquide hydrolysé par l'HCl, en présence du précipité ou après avoir filtré, nous ajoutons du FeCl₃ nous n'obtenons plus cette teinte orangée. Nous estimons donc que cette teinte peut servir dans ce cas à déterminer la présence d'aucuboside.

Ces expériences étant faites, nous allons maintenant mentionner celles que nous avons réalisées parallèlement à ces premières sur l'extrait de plantain et qui nous amèneront à supposer qu'il y a dans ces plantes au moins une autre substance, à part l'aucuboside, qui est capable de produire un noircissement.

ESSAI DE L'EXTRAIT DE PLANTAIN AVEC LE CHLORURE FERRIQUE

Nous avons préparé comme précédemment un extrait de *Plantago major* L., en jetant dans 10 cm³ d'eau bouillante 25 gr. de racines. L'extrait filtré est légèrement jaunâtre, additionné de

bicarbonate de soude, il devient légèrement olivâtre. A 2 cm³ de cet extrait nous avons ajouté une goutte de chlorure de fer à 10% ; la teinte est devenue nettement olivâtre. Par ébullition, nous avons obtenu une floculation sans changement de teinte. En ajoutant un excès de chlorure de fer, la teinte à l'ébullition est alors devenue rouge orangée, brunâtre, ce qui prouve la présence de l'aucuboside. De cet essai, il semble que le chlorure de fer se fixe premièrement sur un corps pour donner la teinte olivâtre et réagit ensuite quand il est en excès avec l'aucuboside par l'ébullition.

HYDROLYSE DE L'EXTRAIT

L'extrait additionné d'acide chlorhydrique devient blanchâtre. Bouilli, il devient vert-bleuâtre, puis noir avec formation d'un précipité floconneux noir; c'est l'hydrolyse de l'aucuboside contenu dans l'extrait, réaction qui correspond à l'essai à blanc déjà mentionné. Nous nous sommes assurés que l'aucuboside avait été bien hydrolysé en filtrant la liqueur qui est alors blanchâtre et en la faisant bouillir avec du chlorure de fer : la teinte est devenue jaune olivâtre et se distinguait de la teinte rouge orangée des essais précédents. Ensuite, nous avons neutralisé la liqueur : avec la potasse caustique, elle devient d'un brun rougeâtre ; avec le bicarbonate de soude, brun bistre. Ces teintes rappellent celles obtenues avec l'oxydation du dopa dont nous parlons ailleurs. Cet extrait hydrolysé, filtré, neutralisé, donne encore par une nouvelle ébullition un précipité floconneux. Sur cet extrait neutralisé, nous avons essayé de faire agir la tyrosinase, mais les résultats étaient difficilement appréciables, car les solutions étaient d'une teinte bistre violacée.

Quoiqu'il en soit, ces expériences semblent nous montrer qu'en dehors de l'aucuboside hydrolysée, il existe un corps capable de produire un noircissement. Nous nous bornons à en indiquer la présence, sans vouloir en préciser la nature : d'autres recherches seraient nécessaires.

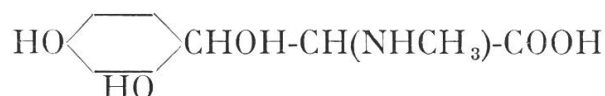
ACTION DE L'ÉMULSINE SUR L'EXTRAIT DE PLANTAIN

L'action de l'émulsine dans le brunissement étant supposée, nous avons essayé son action sur l'extrait aqueux des plantains. Dans ce but, nous avons préparé comme précédemment, un extrait aqueux de 5 cm³ de *Plantago major* L., *P. media* L., *P. lanceolata*

elle est voisine de celle de la tyrosine :



Le dopa a été découvert par TORQUATO¹. Il a été extrait des gousses de *Vicia Faba* L. par GUGGENHEIM². Sa synthèse a été réalisée par FUNCK C.³. Ce même auteur a démontré que ce corps est oxydé par des oxydases végétales. Le dopa est aussi intéressant au point de vue physiologique et pathologique. Sa constitution se rapproche aussi de l'adrénaline :



dont on sait le rôle important qu'elle joue dans l'organisme humain, spécialement dans la coloration de la peau (maladie d'Addison). D'après les recherches de BLOCH⁴, il y a dans la peau normale un ferment spécifique, la dopa-oxydase qui possède, au point de vue chimique, un caractère très spécifique. Parmi les ferments oxydants, elle est la plus spécifique. Pour que ce ferment agisse sur une substance, il faut qu'elle remplisse les conditions suivantes : I^o. La substance doit être un dérivé de la pyrocatechine. II^o. Les deux phénols hydroxylés doivent être intacts. III^o. La chaîne latérale doit se composer d'au moins trois membres. IV^o. Il faut que la chaîne possède un groupe aminé. En résumé, ce ferment n'agit que sur le dopa. Comme il y a parenté chimique entre l'adrénaline et le dopa, il y a possibilité de passage de l'un à l'autre, ce qui permet l'action de la dopaoxydase, action qui se traduit par la formation de mélanines dans les tissus cutanés. Cette oxydation serait le premier pas dans la formation des mélanines. Si la dopa-oxydase n'est capable d'oxyder que le dopa, il ne faudrait pas en conclure que la réciproque soit vraie, c'est-à-dire que le dopa ne peut être oxydé que par la dopa-oxydase. Les recherches que nous avons faites montrent que ce corps peut s'altérer dans des conditions variées.

¹ TORQUATO TORQUATI. « Sur la présence d'une substance azotée dans les gousses vertes de *Vicia faba* L. » *Arch. di farmcol. sperim.*, 15 (1913).

² GUGGENHEIM. « Dioxyphenylalanin, eine neue Aminosäure aus *Vicia faba* L. » *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 88 (1913), 276.

³ FUNCK, C. « Synthèse de la 1-3-4 Dioxyphenylalanine. » *Journ. chem. Soc. Lond.*, 99, 554.

⁴ BLOCH Br. I. c.

DE L'OXYDATION DU DOPA

Auto-oxydation et influence du pH.

Dans le but d'étudier l'oxydation du dopa, nous avons préparé une série de solutions dont la concentration en ions Hydrogène varie de 4,9 à 8, au moyen d'un mélange convenable de solution de phosphate de potassium primaire (KH_2PO_4) et de phosphate secondaire de sodium (Na_2HPO_4) dans les proportions suivantes :

<i>P. sec.</i>	<i>P. prim.</i>	<i>Cn. en pH</i>
0,1 cm ³	9,9 cm ³	4,9
0,5 »	9,5 »	5,6
2 »	8 »	6,2
4 »	6 »	6,6
5 »	5 »	6,8
6 »	4 »	6,9
7 »	3 »	7,1
8 »	2 »	7,3
9 »	1 »	7,6
9,75 »	0,25 »	8

Nous nous sommes servis de solutions étalons préparées d'après la méthode de SOERENSEN.

Dans une première série de solutions ainsi préparées, nous avons ajouté à chaque tube 1 cm³ d'une solution de dopa à 1/1000. La réaction ne commence qu'à partir de la concentration 6,6, elle va en s'accroissant pour atteindre son maximum à la concentration 8. Elle se manifeste par une teinte grise violette, peu apparente après 12 heures, mais nette après 48 heures. Après 4 jours, la réaction apparaît dans la concentration 6,2, mais beaucoup plus faible. Les tubes 4,9 et 5,6 sont intacts. Les tubes de 6,6 à 8 présentent une floculation de mélanines.

La température exerce aussi une influence marquée sur l'auto-oxydation. Faisant deux parts d'une solution de dopa à 1/1000, l'une est placée à la température moyenne de 15 à 18 degrés, l'autre à une température ne dépassant pas 6 degrés. Après quelques jours, nous avons observé une oxydation nettement plus forte dans le tube placé à la température la plus élevée.

Action de la tyrosinase de champignons.

Dans une autre série de tubes ayant les mêmes concentrations, nous avons ajouté 1 cm³ d'une solution de dopa à 1/1000, plus une goutte de tyrosinase de champignons physiologiquement pure, préparée par M. le professeur R. CHODAT, qui a bien voulu nous autoriser à utiliser sa réserve¹. Nous avons obtenu les résultats suivants :

La réaction est apparue déjà dans le tube 5,6 ; elle s'est accentuée avec l'alcalinité. Elle s'est manifestée par une teinte grise violette qui donne un précipité de mélanines après plusieurs jours.

Dans une autre expérience, nous avons fait varier la concentration du dopa et, au lieu de mettre 1 cm³ d'une solution à 1/1000, nous avons mis 2 cm³ et trois gouttes de tyrosinase et nous avons obtenu les résultats suivants :

La réaction est immédiate dans tous les tubes, mais la plus faible à la concentration 4,9. Après 24 heures, les tubes sont devenus gris violets très foncés, le tube 4,9 a une teinte plus brunâtre. Après quatre jours, la réaction est encore accentuée, il y a toujours une différence entre le tube 4,9 et les suivants.

Action de la tyrosinase de pommes de terre.

Dans une même série, nous avons ajouté 1 cm³ d'une solution de dopa à 1/1000, plus une goutte de tyrosinase de pommes de terre. Les résultats étaient les suivants :

L'action est nulle dans les tubes 4,9 et 5,6 ; très légère dans 6,2 ; légère dans 6,6 et s'accroît dans les suivants.

Action de la peroxydase de raifort.

Dans une même série, nous avons ajouté 1 cm³ d'une solution de dopa à 1/1000 et deux gouttes de peroxydase de raifort (0,5%) ; les résultats ont été les suivants :

La réaction ne commence qu'à la réaction 6,6 et s'accroît avec l'alcalinité.

Action de la tyrosinase et de la peroxydase.

Nous avons combiné l'action des deux ferments en ajoutant dans chaque tube 2 gouttes de peroxydase et une goutte de tyrosinase de champignons.

Alors la réaction n'a commencé qu'à la concentration 6,6 et s'est accentuée avec l'alcalinité.

¹ R. CHODAT, l. c.

Graphique résumant ces expériences

(L'épaisseur du trait indique l'intensité de la réaction)

Concentration	4,9	5,6	6,2-6.	6-6,9
Dopa seul 1/1000			██████████	██████████
D. et Tyr. champ.		██████████	██████████	██████████
D. et T. pommes de terre			██████████	██████████
D. et peroxydase				██████████
D., Tyr. et Perox.				██████████

De ces expériences nous pouvons conclure que :

I° il y a auto-oxydation du dopa ; elle varie avec la concentration des ions Hydrogène, elle débute à 6,2 et progresse avec l'alcalinité ; la température exerce une influence.

II° l'addition de tyrosinase de champignons exempte de peroxydase favorise légèrement l'oxydation qui peut se manifester dans le milieu 5,6.

III° le peroxydase a un effet inhibitoire sur la tyrosinase, puisque l'oxydation en présence de peroxydase ne commence qu'à la concentration 6,6 ; concentration qui est la même pour les deux ferments réunis.

Signalons ici une observation de WYSS (1922) et de RAPER et WORMALL¹ qui peut s'appliquer dans le cas où l'oxydation est faible. En étudiant l'action de la tyrosinase sur la tyrosine, ils font remarquer qu'elle s'effectue en trois phases : I° il y a la formation d'une substance rouge avec la présence de l'air et de l'enzyme ; II° la conversion de la substance rouge en substance incolore spontanément ou en chauffant sans la présence de tyrosinase ; III° oxydation de la substance incolore en mélanines.

EXPÉRIENCES SUR LA PARAOXYPHÉNYLETHYLAMINE

Ce corps, dont la constitution est la suivante :



est voisin du dopa. Il était donc utile d'étudier son oxydation et d'établir une comparaison avec le précédent. A cet effet, nous avons préparé une solution de paraoxyphénylamine à 1/1000

¹ RAPER, H. et WORMALL. « The Tyrosinase-tyrosine reaction. » *The Biochemical Journal*, 17 (1923), 454.

que nous avons répartie (1 cm³) dans une série de solutions tampons (10 cm³) de phosphates dont la concentration varie de 4,9 à 7,6. Une première série ne contenait que le corps à étudier ; à une autre nous avons ajouté 2 gouttes de peroxydase ; à la troisième, 2 gouttes de peroxydase et une goutte de tyrosinase. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Les tubes de la première série et de la deuxième ne donnent aucune réaction. Les tubes de la troisième et de la quatrième série donnent une réaction progressive qui passe du gris-rougeâtre pour la concentration 4,9 au gris-noirâtre pour les autres tubes. L'intensité de la réaction est la même dans les deux séries, sauf une petite diminution dans les tubes à concentration 4,9-5,6-6,2 pour la série peroxydase-tyrosinase.

Nous pouvons en conclure que la paraoxyphényléthylamine s'oxyde moins facilement que le dopa, et que l'action de la peroxydase est moindre dans les cas considérés que dans les expériences précédentes.

DE L'OXYDATION DU DOPA EN PRÉSENCE DE GLYCOCOLLE ET DE PARACRÉSOL

Pour faire cette expérience, nous avons disposé de trois tubes renfermant chacun 1 cm³ de paracrésol à 1/250. Dans le premier, nous avons ajouté 2 cm³ d'une solution de dopa à 1/1000 et 2 cm³ d'eau ; au deuxième, 2 cm³ de dopa, 2 cm³ de glycolle à 1/1000 ; au troisième, 2 cm³ de glycolle et 2 cm³ d'eau, puis aux trois tubes 2 gouttes de tyrosinase, selon le plan suivant :

<i>Tube</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Paracrésol.....	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³
Dopa.....	2 cm ³	2 cm ³	—
Glycolle.....	—	2 cm ³	2 cm ³
Eau.....	2 cm ³	—	2 cm ³
Tyrosinase.....	2 gtt.	2 gtt.	2 gtt.

Les résultats étaient les suivants après 24 heures :

Le premier tube devient rouge-brun, teinte qui s'accroît jusqu'à devenir brune-violette. Le deuxième présente une réaction moins forte. Le troisième a une forte réaction rose. Le glycolle a donc une action inhibitrice, puisque le dopa en présence de ce corps donne une réaction moindre.

EXPÉRIENCES SUR LE *Vicia Faba* L.

Après avoir déterminé dans quelles conditions le dopa s'oxyde et se transforme en mélanines, nous avons fait ces recherches sur le *Vicia Faba* L. pour étudier la place qu'occupe ce corps dans l'activité de la plante. A cet effet, nous nous sommes servis de plantules ayant crû dans la sciure humide, stérilisée au préalable et arrosée d'une solution de Detmer, solution qui, nous le savons, renferme tous les sels nécessaires à la nutrition de la plante. Ces plantules étaient âgées d'une semaine ou de quinze jours, suivant les cas. Elles avaient poussé à l'obscurité ou à la lumière selon les expériences que nous nous propositions. En nous efforçant de faire varier les conditions de croissance, nous voulions découvrir, le cas échéant, des variations dans la production du dopa.

RECHERCHE DE LA TYROSINASE ET DE LA PEROXYDASE

Toute plante renferme certains ferments et nos premières recherches étaient de mettre en évidence les ferments qui peuvent par leur action provoquer une action sur le dopa contenu dans la plante, abstraction faite de l'auto-oxydation, qui a aussi son action.

Nous avons pensé à deux ferments qui peuvent agir dans le cas qui nous intéresse : l'un est la tyrosinase, La présence de ce ferment a déjà été constatée par E. BOURQUELOT, sur l'oxydation de la tyrosine ¹.

Nous nous sommes servis de la réaction du crésol-azur, obtenue par l'action de la tyrosinase sur le système paracrésol-glycocolle. A cet effet, nous avons broyé 5 gr. de plante dans 20 cm³ d'eau et exprimé le jus qui fut mis en présence de paracrésol et de glycocolle. Nous avons fait deux parts, l'une fut bouillie pour servir de témoin ; elle devint noire par auto-oxydation, tandis que l'autre prenait une teinte verdâtre, qui s'accroissait davantage en donnant la fluorescence rouge spécifique ; ce tube ne passa pas par le stade rouge.

La peroxydase est l'autre ferment, que nous avons mis en évidence par le procédé suivant : nous avons fait des coupes minces de *Vicia Faba* L. qui furent placées dans un verre de montre ; nous avons ajouté de l'eau oxygénée et quelques gouttes d'une solution alcoolique de résine de Gaïac. La réaction bleue caractéristique se manifesta immédiatement sur toute la section des tiges.

¹ voir : R. CHODAT « Les ferments oxydants » *Journal Suisse de Chimie et de Pharmacie* 45-48 (1905).

DE LA PRÉSENCE DU DOPA DANS LES DIFFÉRENTES PARTIES DE LA
PLANTE

Comme nous l'avons déjà dit, la présence du dopa a été constatée ; il ne s'agissait donc pas de démontrer son existence, mais sa répartition dans la plante. Dans ce but, nous avons fait bouillir 5 gr. de racines, autant de tiges de jeunes feuilles et de cotylédons dans 50 cm³ d'eau, puis nous avons filtré. Ensuite ces extraits ont été mis en présence de tyrosinase et alcalinisés par deux gouttes d'une solution saturée de bicarbonate de soude. Les réactions furent les suivantes, faites avec un tube témoin bouilli.

Les extraits de racines présentent une forte réaction déjà après 5 minutes ; la teinte passe d'un blanc opalescent à l'orangé 127, d'après le code des couleurs de KLINCKSIECK et VALETTE. Celle des feuilles passe du jaune 203 à l'orangé 129 ; celle des tiges, d'un blanc opalescent, au violet 573. L'extrait de cotylédons ne présente aucun changement.

En répétant l'expérience, mais en ajoutant à l'extrait 20% d'alcool, nous avons obtenu des résultats à peu près identiques : les racines deviennent orangé 137 ; les tiges, orangé 117 ; les feuilles, orangé 108 ; les cotylédons, réaction nulle.

Ces expériences nous permettent de conclure que : I^o les feuilles renferment le plus de substances actives ; II^o cette quantité est moindre dans les tiges ; III^o les racines renferment une substance d'un autre ordre, puisque la coloration est différente de celle des tiges ; et IV^o il n'y a point de substance active dans les cotylédons.

EXPÉRIENCES SUR LES COTYLÉDONS

L'absence de réaction que nous venons de constater dans les cotylédons, constitue un point important, car nous pouvons en déduire que le dopa est le produit direct de l'activité biologique de la plante et qu'il ne préexiste pas à l'état de réserve dans la graine. Les cotylédons en fournissent certainement les éléments, mais il s'élabore ailleurs. Le résultat de l'autolyse nous semble assez clair à cet égard. Nous avons préparé de l'eau d'aniline, dans laquelle nous avons laissé séjourner pendant quelques jours des cotylédons broyés qui avaient gonflé dans l'eau au préalable. Nous avons prélevé 10 cm³ de l'extrait ainsi obtenu que nous avons traité avec de la tyrosinase en faisant deux parts, dont l'une bouillie sert de

témoin. Après plusieurs jours, nous avons obtenu une réaction rougeâtre qui ne rappelle en rien celle du dopa. Un même résultat est obtenu en employant de l'eau de levure pour faire l'autolyse.

DE L'INFLUENCE DE LA LUMIÈRE SUR LA PRODUCTION DU DOPA

Comme nous venons de le voir, la production du dopa est due à l'activité de la plante en végétation ; ce corps ne préexiste pas dans la graine. Il nous semblait alors que sa production pouvait varier suivant que la plante est placée dans des conditions qui favorisent son développement ou non. L'une de ces conditions était facile à réaliser. En plaçant ces plantes de *Vicia Faba* L. à la lumière, on activait leur croissance ; à l'obscurité, elles étaient étiolées. Nous avons alors fait deux lots de graines que nous avons mises germer, les unes à la lumière, les autres à l'obscurité pendant une quinzaine de jours, jusqu'à ce qu'elles atteignent une longueur de 15 à 20 cm. Les plantules qui avaient crû à l'obscurité étaient jaunâtres et plus longues que les autres qui s'étaient développées à la lumière. Nous avons broyé dans un mortier avec 40 cm³ d'eau additionnée de calcite pour obtenir un milieu égal dans tous les cas, 3 gr. de tiges partie supérieure, sommet, autant de la partie inférieure de la tige, des racines et des radicelles. Après avoir filtré, nous les avons répartis dans des tubes (2 cm³) et avons ajouté 5 gouttes de tyrosinase vérifiée. Nous avons obtenu les résultats suivants :

	<i>Pl. lumière</i>	<i>Pl. obscurité</i>
Tiges, partie supérieure	Bistre vert	Violet ardoise
Tiges, partie inférieure	Bistre violacé	Rouge sale
Radicelles	Bistre foncé	Rouge sale p. foncé
Racines	Ardoise foncé	Ardoise

La réaction se manifeste déjà après quelques minutes. Par comparaison des teintes lumière et obscurité, on remarque qu'elles sont plus foncées dans le premier cas : la production de dopa est donc favorisée par la lumière. En outre, il y a aussi une différence sensible entre la partie supérieure de la tige et la base, les racines et les radicelles, les racines et les tiges.

Une détermination quantitative du dopa dans les plantes exposées à la lumière ou à l'obscurité était intéressante à faire, malheureusement, elle ne nous a pas donné des résultats satisfaisants. Les

essais avaient pour but de mesurer la quantité de mélanines formées par l'oxydation, par la méthode de R. CHODAT, modifiée par EPSTEIN¹. Cette mesure est basée sur la propriété qu'a le permanganate de potassium d'oxyder les matières organiques. La difficulté que nous avons rencontrée était d'isoler les mélanines formées par l'oxydation.

INFLUENCE DE L'ÉBULLITION SUR L'OXYDATION DU DOPA

Au cours des recherches précédentes, nous avons fait quelques observations que nous mentionnerons ici. L'une concerne l'influence de l'ébullition qui ne semble pas intervenir dans le résultat final de l'expérience, mais qui en modifie légèrement le développement.

Nous avons broyé 3 gr. de tiges de *Vicia Faba* L., qui ont crû dans la sciure humectée de solution nutritive et qui ont atteint une longueur de 25 cm. environ. Nous avons ajouté 40 cm³ d'eau et filtré en présence de calcite pour avoir la même alcalinité. Nous avons fait deux parts, l'une est bouillie, l'autre reste intacte. De ces deux solutions, nous avons prélevé 1 cm³ dilué ensuite avec un égal volume d'eau et additionné de 4 gouttes de tyrosinase vérifiée et nous avons observé les réactions suivantes :

Le tube de tiges non bouillies devient gris-noirâtre, la réaction est assez lente et n'apparaît nette qu'après une heure. Le tube des tiges bouillies donne une teinte plus vive et plus rougeâtre. Après 12 heures, les tubes présentent la même coloration grise noirâtre de même intensité. L'ébullition influence donc la réaction en la facilitant, elle fait apparaître une coloration rougeâtre qui n'existe pas en son absence.

COMPARAISON AVEC LE DOPA ET L'EXTRAIT DE *Vicia Faba* L.

Une deuxième observation concerne la comparaison entre l'oxydation du dopa et celle d'un extrait de *Vicia Faba* L. Nous avons pris 5 gr. de tiges que nous avons fait bouillir dans 50 cm³ d'eau. Nous en avons prélevé 5 cm³, auxquels nous avons ajouté 5 gouttes de tyrosinase. D'autre part, nous avons préparé, avec quelques tâtonnements, une solution de dopa qui donne une même intensité que la réaction précédente. La proportion de dopa est alors d'environ 1/2000. Une telle solution (5 cm³) fut additionnée de 5 gouttes de tyrosinase, et donna une teinte d'une égale intensité, mais plus

rougeâtre. Cette comparaison peut ainsi donner une idée approchée de la quantité de matière active qui se trouve dans les fèves.

INFLUENCE DU PH SUR L'OXYDATION D'UN EXTRAIT DE *Vicia Faba* L.

Pour obtenir un nouveau point de comparaison entre la substance préparée chimiquement et la substance extraite de la plante, nous avons répété les expériences concernant l'oxydation du dopa en milieux dont la concentration en ions Hydrogène varie, mais en employant un extrait de *Vicia Faba* L.

Après avoir préparé une série de solutions dont la concentration varie de 4,9 à 7,6, nous avons ajouté 1 cm³ d'un extrait obtenu en faisant bouillir 2 gr. de tiges dans 20 cm³ d'eau. L'auto-oxydation ne commence que faiblement dans la concentration 6,6, elle s'accroît avec l'alcalinité. Les tubes à concentration 4,9, 5,6, 6,2 n'ont pas réagi.

Dans une autre série, préparée comme ci-dessus, nous avons ajouté 2 gouttes de tyrosinase. La réaction est alors identique à l'auto-oxydation, se manifeste un peu plus visiblement, sans être pour cela plus accentuée. Ces résultats concordent sensiblement avec ceux que nous avons obtenus avec le dopa préparé chimiquement, à cette différence que l'intensité n'est pas la même, plus faible dans ce dernier cas, ce qui ne doit pas nous surprendre car la concentration en substance active est aussi plus faible.

DE LA VARIATION DU DOPA DANS DES PLANTULES DE 8 ET DE 15 JOURS

Les expériences précédentes nous ont montré que la substance active n'est pas répartie uniformément dans la plante, mais que les différentes parties, tiges, feuilles, racines, présentent des variations importantes qui sont observées par les différentes teintes obtenues. Dans les expériences qui vont suivre, nous avons essayé de démontrer la variation du dopa en fonction du temps de germination. A cet effet, nous nous sommes servis de plantules âgées de 8 et 15 jours. De ces deux catégories, nous avons fait bouillir séparément dans la proportion de 9 parties d'eau une partie de plante, des tiges, des racines et des cotylédons. Nous avons ensuite prélevé 2 cm³ de chaque extrait que nous avons mis réagir avec 3 gouttes de tyrosinase de pommes de terre vérifiée en préparant aussi pour chacun un tube témoin bouilli. Nous avons obtenu les résultats suivants après 30 minutes :

	<i>Pl de 8 jours</i>	<i>Pl. de 15 jours</i>
Tiges	gris léger	gris ardoise
Racines.....	gris rougeâtre	violet rouge
Cotylédons	nulle	nulle

Ces réactions s'accroissent avec le temps, deviennent plus foncées mais restent dans les mêmes proportions. Ces résultats confirment ceux que nous avons précédemment obtenus, à savoir la différence qu'il y a entre la tige et la racine, quant à la présence du corps actif. Ils nous montrent, en outre, que la quantité de matière oxydable augmente avec le temps de germination, fait qui est en relation avec l'activité biologique de la plante. Nous pouvons donc penser que les matières oxydables sont élaborées par la plante et s'y accumulent jusqu'à un certain point, car nos expériences portant sur des plantes âgées de 15 jours, nous ne pouvons pas présumer d'expériences faites sur des plantes de 1 ou 2 mois.

DE LA PRÉSENCE D'UN PEPTIDE DANS LES COTYLÉDONS

Jusqu'alors, toutes les expériences que nous avons faites sur les cotylédons, avaient donné des résultats négatifs quant à la présence du dopa dans ceux-ci. Mais comme ces organes sont constitués, en grande partie, par des matières de réserve de diverse nature, nous avons mis en évidence l'une de celles-ci par l'expérience suivante. Nous avons fait bouillir 1 gr. de cotylédon de plante ayant germé depuis 8 jours et de 15 jours, dans 10 cm³ d'eau. Nous avons prélevé 2 cm³ de chaque extrait, auxquels nous avons ajouté 2 cm³ de paracrésol à 1/250 et 3 gouttes de tyrosinase de pommes de terre. Voici les résultats : Les extraits de cotylédons de 8 jours sont devenus rosés, ceux de 15 jours, roses vifs. Cette coloration étant celle des peptides, nous pouvons en conclure qu'il y a un corps de cette nature dans les cotylédons. Il semblerait même que la quantité augmente avec le temps de germination, ce qui est fort probable, puisque la molécule se désagrège au cours de la germination pour donner des corps intermédiaires plus simples, tels que les peptides.

Disons encore que si nous traitons avec du paracrésol et de la tyrosinase un extrait de tiges ou de racines, nous obtenons, dans tous les cas, une teinte grise rosâtre dont l'intensité varie avec la partie de la plante considérée et qui ne se manifeste pas en absence de paracrésol.

CHAPITRE V

EXPÉRIENCES SUR LES POMMES

Dans ces expériences, nous sommes partis de l'observation courante qu'une pomme coupée, laissée à l'air, change de couleur, de blanchâtre elle devient brunâtre. Ce changement est dû comme nous le verrons, à l'action de la peroxydase. Il ne se produit pas seulement quand les tissus ont été blessés, mais au cours de la maturité du fruit, et présente alors certains problèmes qui peuvent tomber dans le domaine économique.

Les travaux accomplis sur la pomme sont peu nombreux, spécialement au point de vue de l'activité des ferments. Quelques auteurs ont cherché à mettre en évidence l'action de la respiration, mais celle-ci est insuffisante pour provoquer les changements observés pendant la maturité et qui doivent être dus en grande partie à l'activité des ferments. LINDET ¹, en étudiant l'oxydation du tanin de la pomme à cidre, a découvert dans le jus un ferment qui oxyde le pyrogallol en purpurogalline. Il en concluait que la coloration était due à l'oxydation des tanins. Nous aurons à revenir, au cours de cet exposé, sur ce ferment et sur l'oxydation des tanins, et montrerons que ce ferment est la peroxydase et que les tanins ne sont pas les seuls à s'oxyder mais que des corps de nature phénolique y jouent un rôle prépondérant.

WARCOLLIER ² fit une étude sur la pomme au point de vue des ferments dédoublant les sucres, étude qui nous intéresse moins quant à notre travail. Disons cependant qu'il a découvert une sucrase et a supposé une invertase dans la pulpe, opinion qui n'a pas été confirmée.

THATCHER ³ a démontré la présence d'oxydases dans la pomme par l'oxydation du pyrogallol et du pyrocatechol ainsi que du gaïacol, mais ce dernier très légèrement. Il en conclut que ce sont les seuls

¹ LINDET, L. « Sur l'oxydation de la pomme à cidre. ». *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, 120 (1895), 370.

² WARCOLLIER, G. « La sucrase dans les moûts de pommes et les cidres. » *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, 144 (1907), 987.

³ TATCHER, R. W. « Enzymes of apples and their relation to the reaping process. » *Journal of Agricultural Researches*, 5 (1905), 103.

ferments qui participent aux changements de coloration pendant la maturité. Il se peut aussi, selon cet auteur, qu'il y ait une légère action de protéase et d'estherase.

DE LA PRÉSENCE DE LA PEROXYDASE

Bien que nos recherches sur les pommes aient eu pour objet principal d'étudier la nature des corps qui s'oxydent sous l'action du ferment, nous avons mis en évidence la présence de la peroxydase par l'expérience suivante bien simple à réaliser et cependant suffisante pour le but que nous nous proposons. Nous avons coupé une pomme et humecté la partie coupée avec de l'eau oxygénée et une solution alcoolique de résine de gaïac fraîchement préparée et décapée au préalable. La réaction bleue s'est alors manifestée autour du noyau et selon les nervures. Il semblait qu'il y avait deux facteurs : le ferment, la peroxydase et un agent décolorant dans le reste du fruit. Avec la solution aqueuse émulsionnée, la réaction était moins nette. Sur le fruit broyé, la réaction apparaissait d'une manière fugace.

DE L'OXYDABILITÉ DES DIFFÉRENTES POMMES

Toutes les pommes ne donnent pas un brunissement égal; pour quelques variétés, la réaction est plus rapide que pour d'autres. Ces différences sont dues sans doute à la constitution intime du fruit. Nous avons donc, au début de nos recherches essayé de déterminer la variété de pommes qui se prêterait le mieux aux travaux que nous avions en vue. Les variétés dont nous disposions provenaient de l'École d'Agriculture de Châtelaine (Genève) et furent les suivantes : Reinette grise de Saintonge, Nouvelle France, Pomme Cusset, Belle de Magny, Calville Gloire de Douai, Calville Madame Lesans. Nous exprimons ici notre reconnaissance à M. le Directeur de cet établissement qui a bien voulu nous fournir ces fruits.

Pour faire un choix entre ces fruits, il nous a semblé que le mieux était de procéder à une extraction alcoolique et d'examiner l'action de la peroxydase sur le résidu qu'on obtiendrait. A cet effet, nous avons pris de chacune de ces pommes 10 gr. exempts de pelures que nous avons fait bouillir dans 30 cm³ d'alcool à 95° pendant 10 minutes. Par filtration sur papier, nous avons séparé

les morceaux de pommes de la liqueur alcoolique. Ceux-ci étaient jaunâtres et la liqueur légèrement verdâtre. Elle fut évaporée sur bain-marie jusqu'à élimination d'alcool et les extraits de Belle de Magny, de Calville Gloire de Douai, de Calville Madame Lesans, brunissent légèrement sans addition de peroxydase ou d'eau oxygénée ; tandis que ceux de Pommes Cusset, de Nouvelle France, de Reinette grise de Saintonge, restent jaunes.

En faisant réagir dans des tubes 1 cm³ de ces extraits avec 5 cm³ d'eau oxygénée et 5 gouttes de peroxydase, préparée comme il a été dit plus haut, nous sommes arrivés aux résultats suivants :

La réaction est générale, mais non immédiate, dans tous les cas. Elle se manifeste par un brunissement. Elle est rapide dans les variétés Nouvelle France, Belle de Magny, Calville Gloire de Douai. Chez cette dernière variété, la différence est la plus forte, toutes choses étant égales d'ailleurs, le tube témoin est jaune, l'essai est orangé. Elle est plus lente chez les autres. Toutes ces réactions ont été faites avec tube témoin, en faisant une solution qu'on répartit dans deux tubes. Dans le premier, on ajoute le ferment et l'eau oxygénée, dans le second, l'eau oxygénée seule et l'on ramène au même volume par de l'eau, ce dernier tube privé de ferment sert de témoin.

DE LA RECHERCHE DES CORPS OXYDABLES

Les essais que nous venons de décrire, nous permettaient de faire un choix entre les différentes variétés de pommes que nous avons. En effet, selon nos prévisions, ils nous indiquaient que tous les fruits n'offraient pas tous la même réaction. Aussi voulant poursuivre la recherche des corps oxydables, nous nous sommes servis de la variété Nouvelle France, dont l'extrait donnait une forte réaction avec l'eau oxygénée et la peroxydase. Alors nous en avons fait bouillir 250 gr. dans 200 cm³ d'alcool à 95 degrés sur bain-marie pendant 15 minutes. Nous avons filtré à chaud et obtenu ainsi une liqueur jaune verdâtre. Elle laissait un dépôt grumeleux en se refroidissant, dont nous ne nous sommes pas occupés. Nous avons ensuite évaporé la liqueur qui a laissé un résidu sirupeux de couleur jaune d'or entièrement soluble dans l'eau. Ayant fait dans la suite plusieurs évaporations et obtenu plusieurs résidus, nous l'appellerons, pour plus de clarté, le résidu A. Nous nous assurâmes qu'il contenait la substance oxydable en le faisant réagir avec la pero-

xydase. Nous l'avons repris par l'eau dans la proportion de 0,5 gr. pour 10 cm³ d'eau et avons ajouté de la peroxydase. Cet essai fait avec un tube témoin se montra positif, il présenta une réaction jaune très rapide.

INFLUENCE DE L'ALCALINITÉ

Nous avons essayé de redissoudre dans l'alcool le résidu A. Une partie resta insoluble et constitua un deuxième résidu qui fut séparé par filtration de la partie soluble, repris par l'eau et mis en présence d'eau oxygénée et de peroxydase ; il donna une réaction moins forte que le résidu A.

Quant à la partie soluble, en solution alcoolique neutralisée au bicarbonate de soude, elle virait au jaune brun, de jaune qu'elle était auparavant, il y avait auto-oxydation. On obtenait la même réaction en ajoutant de l'eau oxygénée et de la peroxydase. Au lieu d'employer la solution alcoolique, nous avons fait usage d'un milieu aqueux en évaporant l'alcool et en reprenant par l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue et neutralisée au bicarbonate de soude, fonçait seulement par addition de peroxydase, il n'y avait pas d'auto-oxydation dans ce cas. Ces expériences nous permettaient donc d'établir une différence importante entre le milieu alcoolique qui, neutralisé, s'auto-oxydait et le milieu aqueux qui, aussi neutralisé, ne s'oxydait que sous l'influence du ferment.

Le rôle du milieu alcalin acide joué dans ces réactions d'oxydation a été mis en évidence par une autre méthode. A cet effet, nous nous sommes servis de l'extrait obtenu par évaporation de l'alcool absolu, dont nous décrirons dans un autre paragraphe la préparation. Cet extrait fut dissous dans l'eau et additionné d'eau oxygénée, il présenta une couleur jaune. Or, en ajoutant du bicarbonate, la teinte devint orangée. La réaction atteignit son maximum au point de neutralité mais n'était pas accélérée par un excès de bicarbonate. Toutefois cette dernière modification, l'accélération, n'est pas très importante et nous n'avons pas tenu compte dans nos recherches sur les corps oxydables.

AUTRE MÉTHODE D'EXTRACTION

Tous les essais que nous avons faits jusqu'alors donnaient des résultats du même ordre de grandeur, soit une oxydation qui se traduisait par un brunissement à peu près égal dans tous les cas.

Aussi se posait désormais la question : comment renforcer la réaction ? Dans ce but, nous avons essayé de dissoudre 1 gr. du résidu A dans 10 cm³ d'alcool absolu. Une partie resta insoluble et fut éliminée. La solution, par contre, fut évaporée et le résidu qu'elle laissa fut repris par l'eau. C'est ce résidu qui servit pour déterminer l'influence de l'alcalinité, expérience que nous venons de décrire.

La solution aqueuse ainsi obtenue donnait une réaction jaune très rapide avec la peroxydase et l'eau oxygénée. En milieu alcoolique, la réaction est moins nette. Si, au contraire, nous neutralisons avec du bicarbonate de soude, la coloration jaune devient rouge en milieu aqueux ou alcoolique. Ces dernières réactions étaient plus fortes que celles faites précédemment sur l'extrait de l'alcool à 95 degrés. Toutes ces réactions étaient assez nettes pour nous permettre de conclure que nous étions en présence d'un ou de plusieurs corps oxydables par les ferments et qu'ils donnent la coloration brunâtre aux pommes coupées laissées à l'air.

DE LA NATURE PHÉNOLIQUE DES CORPS OXYDABLES

Il s'agissait de déterminer la nature du corps oxydable. Parmi toutes les substances qu'on a trouvées dans le pommier, celles qui pouvaient retenir notre attention étaient : la phloroglucine, qui est très répandue ; la phloridzine 3 à 5% dans les racines ; du tanin, 0,1% dans le fruit ; de la quercitine dans l'écorce ; en résumé, des corps phénoliques ou à noyaux phénoliques, et les phénols sont justement des corps qui peuvent s'oxyder sous l'influence des ferments. Ils donnent, en outre, des réactions spécifiques avec le chlorure de fer. Un premier essai avec ce corps s'imposait. Nous avons donc additionné de quelques gouttes de FeCl₃ la solution obtenue par l'alcool absolu. La couleur jaune passa au brun olivâtre. En milieu aqueux, la réaction était moins nette, mais du même type : l'essai se montrait positif, il y avait un corps phénolique.

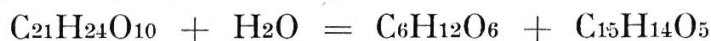
ESSAI AVEC L'HYDROQUINONE

Pour déterminer la nature du corps phénolique, nous avons fait un premier essai comparatif avec l'hydroquinone, car ce corps donne des réactions colorées avec les ferments. Nous avons mis 2 cm³ d'une solution de 1% d'hydroquinone en présence de peroxydase et d'un cm³ d'eau oxygénée. La réaction se manifesta par

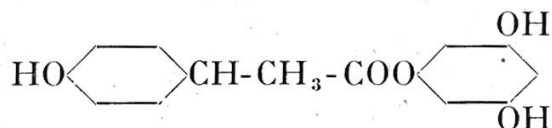
une coloration rose-saumon qui ne pouvait faire illusion avec celle de la tyrosinase. Cette teinte rose se marque dès le début, mais ne saurait être confondue avec aucune des teintes jaunes des essais précédents. Il n'y a donc pas d'hydroquinone dans les extraits de pommes. Ce résultat, quoique négatif, est important ; d'ailleurs, l'hydroquinone n'a pas été rencontrée dans le pommier.

DE LA PHLOROGLUCINE ET DE LA PHLORIDZINE

On sait que ces deux corps se trouvent dans l'écorce et les bourgeons des Rosacées. La phloroglucine est un phénol trivalent qui se place à côté du pyrogallol et de l'oxyhydroquinone. Elle donne certaines réactions colorées en présence de ferment, dont voici un exemple : si dans le système paracrésol-glycocolle-tyrosinase, on introduit la phloroglucine, on obtient une coloration jaune très rapide. La phloridzine (C₂₁H₂₄O₁₀), de son côté, peut se décomposer par hydrolyse en glucose et en phlorétine.



On donne à la phlorétine la constitution suivante :



Nous avons préparé une solution de phloridzine de 2% dont nous nous sommes servis pour réaliser les quelques réactions suivantes :

En présence de peroxydase (5 gouttes), de l'eau oxygénée (1 cm³) et 2 cm³ de cette solution de phloridzine, nous avons obtenu une coloration rose lente. Avec le chlorure ferrique, la solution de phloridzine devient rouge. Hydrolysée par l'acide chlorhydrique en phlorétine puis neutralisée, la solution donne une réaction rose-framboise avec la peroxydase et l'eau oxygénée. Cette dernière donne une forte réaction rouge avec le chlorure ferrique.

Ces réactions étant faites et servant de point de comparaison, nous avons alors cherché de mettre en évidence la phloridzine dans l'extrait de pommes.

A cet effet, nous avons procédé à une autre méthode d'extraction. Nous avons repris par l'alcool à 95 degrés (50 cm³) 5 gr. du résidu A et nous avons ajouté de l'eau et de l'éther. Après avoir agité avec précaution et décanté, la partie alcoolique est mise de côté pour être employée dans la suite, et la solution d'éther est évaporée. Le résidu est repris par l'eau et mis en présence d'eau oxygénée et de

peroxydase. Nous obtenons une réaction rose pâle comparable à celle de la phloridzine en présence de ferment que nous venons d'indiquer. Nous pouvions supposer que l'hydrolyse de la solution donnerait une réaction nouvelle. Effectivement, après avoir hydrolysé à chaud par l'HCl, puis neutralisé au bicarbonate de soude, nous avons mis la solution en présence d'eau oxygénée et de peroxydase et obtenu une réaction rose framboise identique à celle de la phlorétine. Cette même solution hydrolysée additionnée de quelques gouttes de chlorure ferrique, donnait la même réaction rouge que la phlorétine.

En conséquence, nous estimons que ces dernières expériences sont suffisantes pour identifier que la phloridzine se trouve dans l'extrait alcoolique et donc aussi dans les pommes. Cette conclusion, d'ailleurs, est confirmée par les propriétés de phloridzine qui est peu soluble dans l'éther, beaucoup dans l'alcool, colorant sa solution en rouge à l'air par absorption d'oxygène.

DE LA NATURE TANOÏDE DU PIGMENT

Comme nous l'avons vu, LINDET ¹ attribuait la coloration de la pomme à cidre à l'oxydation des tanins. En ceci il n'avait pas tort, car son opinion est confirmée par l'expérience suivante : Nous savons que la poudre de peau a la propriété d'absorber les tanins. Nous servant de cette propriété, nous avons mis digérer, avec de la poudre de peau, l'extrait obtenu par évaporation de l'alcool absolu et repris par l'eau, en ayant une solution témoin sans poudre de peau. Après une demi heure, la solution à poudre de peau est filtrée puis additionnée de peroxydase et d'eau oxygénée et ne semble donner aucune réaction, tandis que l'autre servant de témoin, donne une réaction jaune avec le ferment et l'eau oxygénée. Le pigment qui forme la matière sensible à l'action du ferment est donc de nature tanoïde par sa propriété d'être absorbé par la poudre de peau.

DE LA FORMATION D'UN PEROXYDE

Qu'il y ait dans la maturité des pommes des phénomènes d'oxydation qui conduisent à la formation de gaz carbonique, c'est ce qui a été démontré par THATCHER ². Mais en étudiant la question

¹ LINDET, l. c.

² THATCHER, l. c.

de plus près, surtout au point de vue de la propriété de la phloridzine de se colorer en rouge par absorption d'oxygène, nous sommes amenés à penser qu'il y a d'autres phénomènes qui interviennent, en particulier la formation de peroxyde. C'est ce que les expériences suivantes ont démontré.

A cet effet, nous nous sommes servi de la solution alcoolique séparée de l'éther, que nous avons évaporée et repris le résidu en solution aqueuse. Neutralisée avec du bicarbonate de soude, cette solution a une teinte rougeâtre, tandis qu'acide elle est jaunâtre. Nous avons d'abord oxydé le pigment de cette solution neutralisée en disposant l'expérience de cette manière :

<i>Tube</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Solution	+	+	+
Eau oxygénée ..	+	—	+
Ferment.....	—	+	+

Les réactions furent les suivantes :

Le tube I reste sans changement appréciable ; le tube II présente une lente réaction qui tend à devenir rose-saumon ; le tube III devient rapidement rose-saumon.

Ces résultats ne sont pas pour nous surprendre. Bien que la liqueur ait été modifiée en milieu neutre, elle réagit encore avec la peroxydase et l'eau oxygénée, car la transformation n'est pas complète. Cette transformation accomplie, le pigment pouvait être considéré comme peroxydé, et sa nature de peroxyde a été démontrée par les expériences suivantes :

La première de celle-ci est basée sur la propriété qu'a le paracrésol de s'oxyder en présence de peroxyde et de peroxydase. Or, nous avons mis en présence 2 cm³ d'une solution de paracrésol à 1/250, 2 cm³ de la solution peroxydée et 10 gouttes de peroxydase ; nous avons alors obtenu une opalescence qui n'existait pas dans le tube témoin. Nous nous sommes servi, pour la deuxième expérience, de la résine de gaïac dont l'oxydation se traduit par un bleuissement. En ajoutant à une émulsion de résine fraîchement préparée (2 cm³) de la peroxydase (10 gouttes) et 1 cm³ de la solution peroxydée, nous avons obtenu le bleuissement caractéristique.

DU PH DU JUS DE POMMES

Un point qu'il était intéressant de connaître, c'était le degré d'acidité du jus de pommes dont nous nous servions. Nous fîmes dans ce but plusieurs essais dont les résultats varient dans certaines limites, ce qui est attribuable au fait que nous avons employé plusieurs variétés de pommes. Le premier essai portait sur la Reinette grise de Saintonge. Le fruit broyé et pelé, le jus fut examiné au Brom-Cresol-Purple, et la réaction varie entre 4,5 et 5,3. Dans un deuxième essai, la pomme pelée est immédiatement humectée avec de l'alcool neutralisé, (neutralité obtenue avec le Brom-Thymol-Blue comme réactif), puis broyée dans un mortier. On extrait le jus qui devient peu à peu jaune-paille. On fait deux parts, l'une sert de témoin, à l'autre on ajoute quelques gouttes de Methyl-Red. Par la coloration, la concentration est estimée entre 4 et 4,5. Toutefois, cette mesure n'est qu'approchée, car le réactif est à la limite de son action à cette concentration. Le troisième essai se fit sur les pommes Cusset. Préparées comme précédemment, elles donnent un résultat qui oscille entre 4,1 et 3,9. Tous ces essais ont été faits au moyen d'un compensateur pour déterminer le changement de couleur, le liquide ayant sa couleur propre. De plus, une exposition à l'air ne semble pas modifier la concentration.

CONCLUSION

Arrivés à la fin de cette étude sur les ferments oxydants, nous allons résumer brièvement les résultats obtenus.

De la recherche de la tyrosinase dans quelques plantes, nous pouvons conclure que ce ferment est assez répandu dans le règne végétal, spécialement dans la famille des Composées, et peut s'extraire selon la méthode habituelle. Sa répartition n'est pas égale dans toutes les parties de la plante, sa localisation cellulaire a pu être déterminée dans certains cas. Il existe aussi une relation entre la présence du ferment et le brunissement de certains tissus.

Le *Juglans regia* L. donne une tyrosinase qui a des propriétés identiques à celles de la pomme de terre. Elle est absente des chatons femelles et du brou de noix ; ce dernier corps renferme de la peroxydase et de l'émulsine.

Le noircissement des différentes espèces de Plantains est certainement dû en partie au dédoublement de l'aucuboside qui se résout en un corps noirâtre, mais non totalement, car un extrait de ces plantes, hydrolysé puis filtré pour enlever les produits d'hydrolyse, noircit encore quand il est neutralisé.

Le dopa contenu dans le *Vicia Faba* L. s'oxyde dans des conditions variées. Sa production dans la plante varie suivant la durée de germination et les conditions de développement. Il résulte de l'activité même de la plante et ne préexiste pas dans les cotylédons.

Les pommes sont aussi le siège de l'activité d'un ferment oxydant, la peroxydase, dont l'action se traduit par le brunissement bien connu. La phloridzine, mise en évidence par des réactions qui lui sont propres, ne semble pas jouer un certain rôle dans cette réaction colorée et enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

1. SOERENSEN, S. — Etudes enzymatiques : Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions Hydrogène dans les réactions enzymatiques. *Comptes rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg*, 8 (1909), I.
2. SENTER, Georges, Ph.-D. B. Sc. (Lond.). — « Studies on the Enzyme action. The effect of « Poisons » on the rate of Decomposition of Hydrogen Peroxyde by Heamase. » *Proceedings of the Royal Society*, 74 (1904), 201.
3. WYSS, F. — Thèse de doctorat, N° 693, Genève (1921).
4. MICHAELIS, Leonor. — Die Wasserstoffionen Konzentration. Ihre Bedeutung fur die Biologie und die Methoden ihrer Messung. Berlin (1922).
5. CHODAT, F. — La Concentration en ions Hydrogène du Sol et son importance pour la Constitution des Formations végétales. Thèse de doctorat, Genève.
6. CLARK, W. Mansfield. — The determination of Hydrogen ions. Baltimore (1920).
7. STOECKLIN, E. v. — Contributions à l'étude de la peroxydase. *Travaux de l'Institut de Botanique de Genève*, 7e série (1907).
8. CHODAT, R. — (Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden. Abderhalden, E.) Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft (II edition).
9. CHODAT, R. et W. STAUB. — La spécificité de la tyrosinase et son action sur la dégradation des corps protéiques. *Archives des Sciences phys. et nat.*, 4e période, 24 (1907).
10. HAUSMANN, M. — Les proportions à observer dans la réaction crésol-azur (tyrosinase). *Archives des Sciences phys. et nat.*, 44 (1927), 96.
11. OPPENHEIMER. — Die Fermente (IVe édition).
12. MOLLIARD. — Nutrition de la plante.
13. BOURQUELOT, E. et HERISSEY. — Sur un glucoside nouveau retiré des graines de l'*Aucuba japonica* L. *Comptes rendus Ac. des Sc.*, 124 (1902), 144.

14. HERISSEY et LEBAS, C. — Présence de l'aucubine dans plusieurs espèces du genre *Garrya*. *Journal de pharmacie et de chimie*, 7, 11 (19 10).
 15. BOURDIER. — Recherches biochimiques dans le Plantain (aucubine) et dans la Verveine (verbenaline). Etude d'un glucoside nouveau. Thèse de doctorat univ. Pharm. Paris (1908).
 16. CHARRAUX. — Sur la présence de l'aucubine dans les graines de *Veronica hederefolia* L. *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, 4 (1922).
 17. ARMSTRONG, E. F. et H. E. — Enzyme action. *Proceedings Royal Society*, 73 (1904) et suivants.
 18. BLOCH, Br. et P. PHYRER. — Histochemische Studien in uberlebenden Gewebe uber fermentative Oxydation und Pigmentbildung. *Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Mediz.* 5, 4/6 (1917), 179.
 19. TORQUATO TORQUATI. — Sur la présence d'une substance azotée dans les gousses vertes de *Vicia Faba* L. *Arch. di farmacol. sperim.*, 15 (1913).
 20. GUGGENHEIM. — Dioxyphenylalanin, eine neue Aminosäure aus *Vicia faba* L. *Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 88 (1913).
 21. FUNCK, C. — Synthèse de la 1-3-4 Dioxyphénylalanine. *Journ. chem. Soc. Lond.*, 99, 554.
 22. RAPER, H. et WORMALL. — The Tyrosinase-tyrosine reaction. *The Biochemical Journal*, 17 (1923), 454.
 23. LINDET, L. — Sur l'oxydation de la pomme à cidre. *Comptes rendus Arch. des Sc. Paris*, 120 (1895), 370.
 24. WARCOLLIER, G. — La sucrase dans les moûts de pommes et les cidres. *Comptes rendus Ac. des Sc. Paris*, 144 (1907), 987.
 25. THATCHER, R. W. — Enzym of apples and their relation to the reaping process. *Journal of Agricultural Research*, 5 (1905), 103.
 26. CHODAT. R. — « Les ferments oxydants » *Journal Suisse de chimie et de pharmacie*. 45/48 (1905)
-