

Zeitschrift: Bulletin de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 40 (1948)

Artikel: Contribution à l'étude biologique de la thio-urée : effets antimélaniques
Autor: Fleury, Clément
Kapitel: Partie théorique
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099450>

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>

PARTIE THÉORIQUE

CHAPITRE PREMIER

QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR LES PHÉNOMÈNES FONDAMENTAUX PRÉSIDENT A LA MÉLANOGÉNÈSE

A. Définition de la mélanogénèse

La mélanogénèse est le processus biochimique aboutissant à la formation *in vitro* et *in vivo* d'un pigment noir: la mélanine, ou de substances diversement colorées (crésol-azur).

La mélanine est donc le résultat de la transformation d'éléments chimiques plus ou moins passifs (phénols) en présence d'acides aminés, par l'intermédiaire d'un agent actif (phénolase) avec consommation d'oxygène.

Ce pigment noir, contenant de l'azote, diffère des phytomélanes (56, 240, 242) et des substances humiques (240) artificielles qui en sont exempts.

Ainsi délimité, le phénomène se distingue:

1. Des processus purement chimiques de l'autoxydation d'un chromogène phénolique; ne faisant pas intervenir de ferment oxydant.

(Notons qu'un phénol libéré par une glucosidase n'est pas nécessairement destiné aux opérations de la mélanogénèse.)

2. Des processus d'humification naturels, à partir du matériel végétal mort, auxquels participent des microorganismes (240); et des mêmes processus chimiques artificiels (230'), ces derniers aboutissant à la formation d'acides humiques exempts d'azote.

Il est intéressant de remarquer que les plantes comportant le système phénol-phénolase ont habituellement la propriété de noircir à l'air après une lésion. C'est ainsi qu'il suffit de couper une pomme de terre ou un psallote pour que la tranche de section noircisse aussitôt.

Divers traitements peuvent encore provoquer cette pigmentation chez certains végétaux (94). On a trouvé en particulier que c'était le cas pour la dessiccation (41, 155), l'action des anesthésiques (98, 151) et du gel (98), les rayons ultra-violetts (198), etc. (151, 95, 96).

En résumé, ce phénomène de noircissement peut recevoir l'explication suivante:

Chez les végétaux ainsi prédisposés, la blessure ou la mort des tissus (souvent associées au phénomène d'autolyse dont nous parlerons plus loin) mettent en contact le ferment et le substrat localisés précédemment dans des parties distinctes du tissu ou de la cellule. De plus et surtout, le rH se trouve de ce fait perturbé par contact direct du suc cellulaire avec l'oxygène de l'air.

On sait en effet qu'à l'état normal, c'est-à-dire lorsqu'elles sont intactes, les cellules règlent elles-mêmes leur respiration tandis qu'après lésion (87) elles subissent l'influence de la tension d'oxygène du milieu où elles se trouvent.

Il nous paraît donc parfaitement logique que certains auteurs aient admis une relation étroite entre la mélanogénèse et la respiration.

En particulier, SCHÆNBEIN (221) et PALLADIN (184, 185, 186, 187) ont eu les premiers le mérite d'avoir attiré l'attention sur le brunissement des plantes en exprimant l'idée que le « prochromogène » est le plus souvent en relation avec les processus d'oxydation vitale, soit de la respiration.

DUCLAUX (67), puis CHODAT et ses élèves attribuent aux oxydases le rôle de ferment respiratoire.

La mélanogénèse ne serait-elle pas une sorte de « révélateur » de l'activité respiratoire ?

Afin de déterminer cet intéressant point de vue, et de saisir d'une façon plus précise le rapport entre ces deux phénomènes, il nous paraît indispensable d'exposer brièvement en quoi consiste la respiration cellulaire.

B. Respiration cellulaire

Elle se solde par la consommation d'oxygène avec expulsion de CO₂. Les manifestations apparentes de ce processus ont donné lieu à des opinions qui sont restées longtemps divergentes.

La transformation du sucre se fait-elle par une oxydation (248) ou au contraire une déshydrogénation (258) ?

La controverse célèbre WARBURG-WIELAND (cf. bibliogr. in 232) s'est terminée par une réconciliation des deux thèses grâce à SZENT-GYÖRGYI (232, 195).

Ce dernier a montré en effet, en même temps que FLEISCH (77), que, loin de s'affronter, ces deux conceptions se complètent admirablement. Ainsi résume-t-il (234): « they are both equally needed and act together ». Chacune d'elles, en réalité, correspond à un stade différent de la respiration:

1. Phase anoxybiotique ou de fermentation:

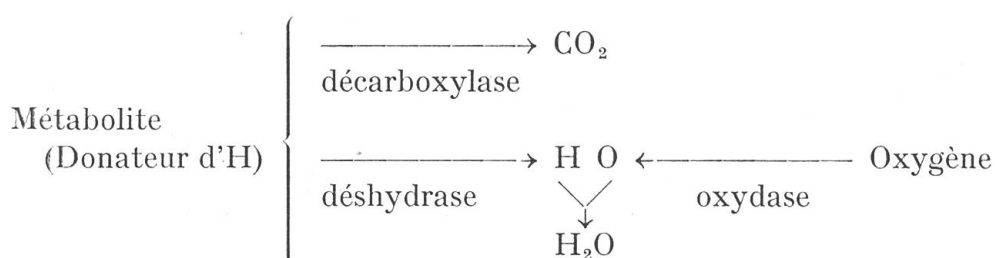
Les sucres, par exemple, sont oxydés sans l'intermédiaire de l'oxygène libre par perte d'H ou d'électron;

2. Phase oxybiotique ou de respiration:

L'oxygène intervient directement.

PASTEUR (190, 191, 192), puis MEYERHOF (156, 157) avaient pensé que ces deux étapes sont étroitement liées et RAULIN, élève du premier, écrivait (207, 208) déjà en 1869: « Il est... probable que la *fermentation proprement dite* et la *combustion complète* par les êtres organisés ne sont que les termes extrêmes d'une même série de phénomènes. »

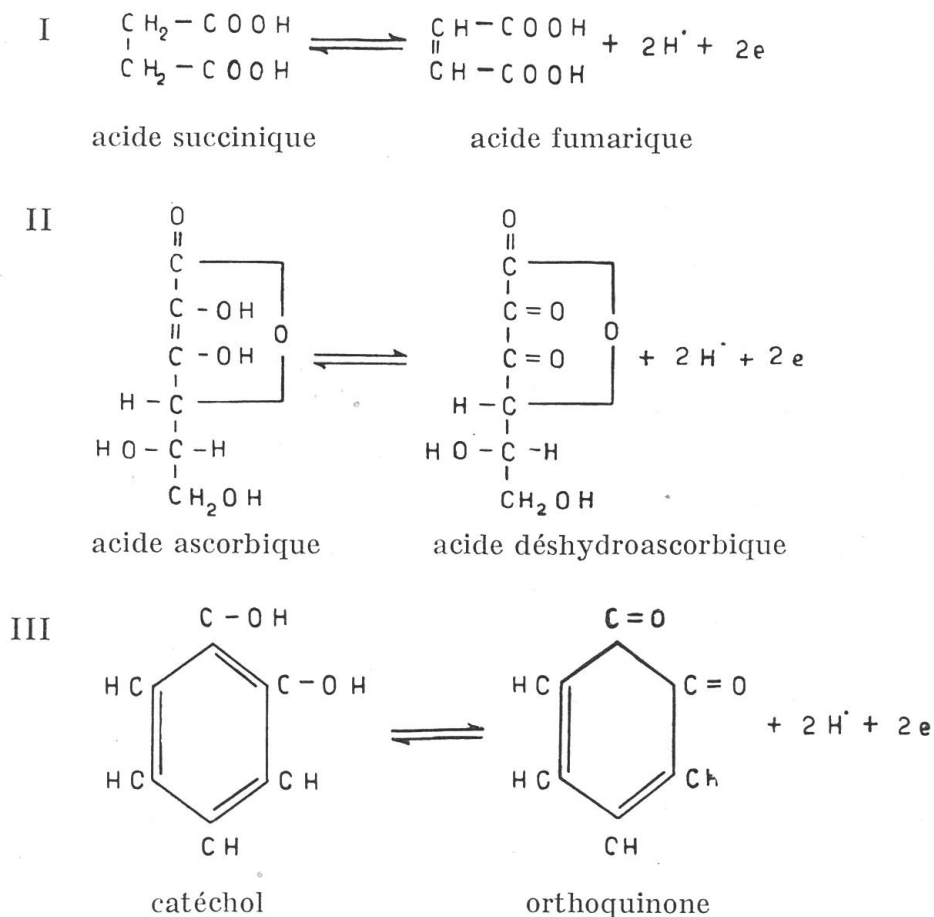
D'une façon très schématique, on peut concevoir la respiration de la manière suivante:



où l'oxygène activé oxyde l'H (l'électron de l'H du métabolite charge l'oxygène qui scinde ses liaisons et s'unit par des valences libérées avec les H⁺ de l'eau en formant H₂O). L'étape *métabolite* $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ H est de beaucoup la plus longue et requiert, outre un grand nombre de ferments, un nombre non moins grand de transporteurs d'H tels que flavines, acide oxalacétique, fumarique, malique, succinique ou quinones. Le dernier transporteur cédera son H, ou l'électron de ce dernier, directement à l'oxygène. Selon SZENT-GYÖRGYI (10, 234, 235) l'homologie des divers types respiratoires est la suivante:

| Type respiratoire | Règne | Dernier transporteur d'H | Activateur d'oxygène | Groupe prosthétique |
|-------------------|---------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|
| I | animal | acide succinique | cytochromoxydase | Fe |
| II | végétal | acide ascorbique | oxydase de l'acide ascorbique | Cu |
| III | » | catéchol (orthodiphénols) | phénoloxydases | Cu |

Les réactions d'oxydation de ces différents transporteurs sont représentées comme suit:



On notera (235) que la faculté de céder l'H directement à l'O est surtout dévolue au groupe *diénol* $\begin{array}{c} - \text{C} = \text{C} - \\ | \quad | \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$ présent dans les types respiratoires II et III.

Lorsque l'oxygène moléculaire sert d'accepteur d'H, il y aurait quelquefois formation d'H₂O₂ (57) décomposée par la catalase en fournissant de l'oxygène.

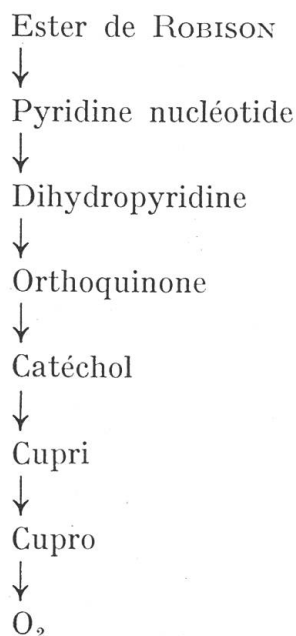
La peroxydase détruit également H₂O₂ mais sans libérer O₂ et il semble que sous son action H₂O₂ fonctionne également comme accepteur d'H (SZENT-GYÖRGYI).

KUBOWITZ (126, 127) estime que les phénolases seraient les ferments transporteurs d'oxygène des cellules dont la respiration est inhibée par CO (inhibition non photosensible) et HCN.

Nous trouvons ici confirmation de l'hypothèse de SCHÖENBEIN et PALLADIN dont KUBOWITZ fournit la démonstration biochimique.

Le métabolite peut être considéré comme le donateur d'H ou mieux d'électron. Ce dernier, transmis par le jeu de divers transporteurs, l'ester de ROBISON par exemple, aboutit en définitive sur l'oxygène.

KUBOWITZ considère la série suivante entre l'ester de ROBISON d'une part et l'oxygène d'autre part:



En somme, chez les végétaux, il y a deux systèmes principaux d'oxydation de l'hydrogène ou de transport terminal de l'électron fourni par le métabolite:

1. Avec l'oxydase de l'acide ascorbique (type II);
2. Avec les phénolases (type III) auxquelles s'adjoignent occasionnellement la catalase et la peroxydase.

Le système phénol - phénolase est donc l'un des trois systèmes connus de la respiration cellulaire, intervenant au moment où l'H du métabolite entre en contact avec l'O₂ de l'air pour former en définitive H₂O avec consommation d'oxygène.

Ce dernier système intervenant parallèlement dans la mélanogénèse et la respiration, l'existence d'un rapport étroit entre ces deux phénomènes est donc évidente.

Ceci établi, il devient indispensable que nous approfondissions le mécanisme de la réaction enzymatique elle-même. Nous allons nous y efforcer dans le paragraphe suivant.

C. Mélanogénèse enzymatique

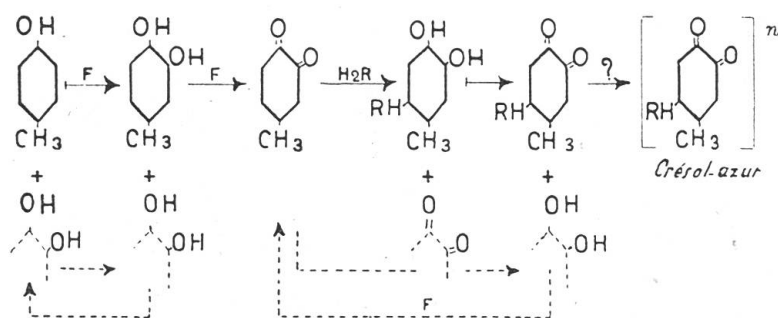
Il est désormais classique d'identifier la mélanogénèse enzymatique au processus décrit par CHODAT (52, 48, 50), consistant en la formation *in vitro* de pigments tels que le crésol-azur.

Or, le crésol-azur prend naissance par oxydation du paracrésol (phénol) en présence de glyocolle (acide aminé) sous l'action de la tyrosinase de pomme de terre (phénolase). Cette réaction très importante est celle que nous avons choisie comme test dans l'étude de l'action de la TU et de ses dérivés.

Voici, synthétisé en quelques mots, son mécanisme tel que nous le concevons au jour des données récentes, en particulier celles de l'école américaine de l'Université de Columbia (176 p. ex.). Nous pouvons distinguer quatre étapes principales, à savoir:

1. Oxydation à la fois enzymatique et autocatalytique du paracrésol en homocatéchol;
2. Oxydation enzymatique de l'homocatéchol en homoquinone (propigment);
3. Condensation non enzymatique entre l'homoquinone et le glyocolle avec réduction de la quinone (au moins une molécule d'acide aminé par molécule de quinone) en donnant lieu à la formation d'un leucodérivé;
4. Réoxydation du composé et polymérisation avec formation de crésol-azur (pigment).

C'est ce que nous avons transcrit par le schéma suivant:



Les réactions en pointillé se rapportent aux éléments catalysant celles indiquées par une flèche de la forme $\text{---}\xrightarrow{\text{---}}$ les autres réactions étant indiquées par une flèche simple $\text{---}\xrightarrow{\text{---}}$ surmontée du symbole de l'agent actif. C'est ainsi que F désigne le ferment. H_2R un acide aminé par exemple.

Le bilan se solde par la consommation d'au moins trois atomes d'oxygène dont chacun représente une étape catalysée par le ferment F.

La première étape d'oxydation, spéciale aux monophénols, est catalysée à la fois par le ferment et les traces de catéchol toujours présentes dans les impuretés.

L'acide aminé H_2R , où R peut aussi être remplacé par O, se combine à raison d'au moins une molécule par molécule de paracrésol.

Les mécanismes assez délicats de cette réaction nous paraissent dès lors suffisamment connus pour justifier l'étude que nous nous proposons quant à l'action frénatrice de certains produits, notamment la TU, sur le cours de l'oxydation enzymatique du paracrésol.

D. Mélanogénèse *in vivo*, en particulier chez l'A. n.

Les expériences *in vitro* fournissent un compte rendu très incomplet de ce qui se passe *in vivo*.

Nous ne pouvons pas, en conséquence, transposer d'emblée aux tissus vivants les observations faites avec la réaction de $CHODAT$, tout au plus facilitent-elles l'interprétation des résultats acquis avec la matière vivante. Notre propos est précisément d'instituer une vérification *in vivo* des indications obtenues *in vitro*. Nous utilisons à cet effet l'A.n., matériel vivant de choix, afin d'établir un parallèle entre l'action inhibitrice de la TU sur la mélanogénèse enzymatique et celle qu'elle exerce sur la pigmentation d'A.n.

Il nous paraît opportun de débiter par quelques mots sur l'importance de la pigmentation chez les champignons et moisissures avant de passer à l'étude plus spéciale des pigments de l'A.n.

a) Pigments des champignons et moisissures en particulier.

On sait (243) que les substances colorées sont largement répandues chez tous les êtres vivants, en particulier les pigments noirs que l'on retrouve à la fois dans le règne végétal et dans le règne animal.

Les champignons manifestent fréquemment un phénomène de pigmentation. C'est ainsi que BERTRAND fit, grâce au bleuissement du bolet (23), ses premières découvertes sur le mécanisme de la mélanogénèse.

Les champignons inférieurs, moisissures plus spécialement, ont offert aux chimistes de nombreux pigments à noyau benzénique, quinonique ou anthraquinonique (29, 202, 203, 204, 189). Par exemple, on a isolé (80) du *Penicillium phoeniceum* la phœnicine; tandis que l'*Aspergillus fumigatus*, autre moisissure, a donné la fumigatine (7) qui se transforme aisément en spinulosine tirée du *P. spinulosum* (7) et retrouvée également chez un *A. fumigatus* (8).

On saisit donc ici la parenté étroite qui relie entre eux la plupart des pigments quinoniques des moisissures. D'autres substances colorées anthraquinoniques se retrouvent également chez plusieurs d'entre elles; tel est le cas de l'auroglaucine, la flavoglaucine et la rubroglaucine que GOULD et RAISTRICK (88) isolèrent des champignons du groupe *Aspergillus glaucus*.

Mais, si l'on a isolé jusqu'à présent six pigments à l'état pur de l'*A. glaucus* (103) par exemple, on sait peu de chose sur ceux de l'*Aspergillus niger*, moisissure noire qui nous intéresse spécialement.

b) *Pigments de l'A.n.*

Bien que leur nature et leur formation doivent être semblables à celles des autres moisissures, il est cependant nécessaire de nous assurer leur connaissance sur la base de données positives.

L'on peut distinguer tout d'abord deux localisations de pigments: les conidies et le liquide de culture.

Malgré diverses données, l'origine exacte et le cheminement du pigment, ou de son précurseur, jusqu'au liquide sont inconnus.

En ce qui concerne celui des conidies, nous avons remarqué qu'il est si étroitement lié à la fructification que certains auteurs ont défini la formation des conidies par celle du pigment. Cette attitude résulte de la difficulté d'apprécier les différences souvent faibles de pigmentation des têtes conidiales sur un mycélium déjà lui-même plus ou moins coloré. Les conidies, pour leur part, apparaissent normalement au 3-4^{me} jour de culture. Les facteurs les plus essentiels de leur formation sont représentés par les proportions relatives des divers cations offerts. Les principaux d'entre eux sont le K (165, 166, 163, 164), le Mn (24, 25, 26, 27), le Fe (207, 208, 140) et le Cu (111, 112).

Considérant plus spécialement leur pigmentation, nous constatons le rôle important du Mn (26') et surtout du Cu (111, 112, 113). Ce dernier métal est en effet nécessaire non seulement pour leur développement, mais aussi pour leur pigmentation. Il participe en effet, de concert avec l'oxygène, au noircissement des conidies. C'est ce que GOLLMICK (86) a démontré au moyen de cultures contenant assez de Zn et de Fe, mais sans Cu; elles présentent en ce cas des conidies jaunes, tandis qu'additionnées d'une goutte de CuSO_4 celles-ci noircissent en 24 heures, s'il y a assez d'oxygène à leur disposition.

Comme le pigment noir, isolé des conidies, comporte dans sa molécule une fonction phénol ou émol (201'), l'on peut penser qu'il s'apparente aux pigments des moisissures du type de ceux signalés plus haut.

En ce qui nous concerne, nous avons réussi à mettre en évidence, dans les conidies, une monophénolase capable d'oxyder lentement le para-crésol en une substance rouge (E.II.4.1, II.4.2 et VII.2.1). Nous sommes donc en droit d'admettre que ce pigment noir des conidies est une mélanine vraie, ce qui n'exclut aucunement la présence d'autres pigments de nature différente, BLOCHWITZ (31) ayant démontré que plusieurs d'entre eux peuvent cohabiter la cellule conidiale.

LINOSSIER (139) isola le premier un pigment noir des conidies d'*Aspergillus niger* et l'appela aspergilline. Cependant, pour éviter toute confusion entre l'aspergilline-pigment et l'aspergilline-antibiotique récemment découverte chez l'*A.n.* (227), nous désignerons désormais le pigment que nous avons obtenu: *mélanaspergilline*, nom qui offre l'avantage de rappeler la genèse et la nature du pigment qui doit être une vraie mélanine.

Si l'on considère à présent le pigment accumulé dans le liquide, on peut remarquer qu'il a été peu étudié (173, 36), contrairement à celui des conidies qui le fut surtout du point de vue chimique.

Nous avons complété personnellement les observations que nous jugions insuffisantes pour se prêter à nos expériences. C'est ainsi que nous avons observé que le mycélium de l'*A.n.*, cultivé sur milieu liquide de RAULIN, montre après 5 à 6 jours de culture une pigmentation qui évolue du brun roux au brun noir. Nous avons encore observé que le liquide de culture, où végète le gâteau mycélien, fournit lui aussi, au bout de 6 à 7 jours, une coloration qui passe du rouge orange au brun foncé. En même temps, le mycélium se dissout et laisse échapper ses constituants qui passent dans le liquide: c'est l'autolyse.

Il aurait été intéressant par la suite de nous rendre compte de la nature des pigments présents dans le liquide, mais l'étude de cette question nous eût par trop éloigné du but de notre travail; aussi nous sommes-nous borné aux observations essentielles. L'extraction par divers solvants a montré que l'alcool amylique peut séparer une substance brune (E.XV.2.1). Le liquide, décoloré facilement par l'Eponit (E.XV.1.2a), contient une monophénolase (E.II.4.8'). On n'en constate pas dans le mycélium (E.II.4.1' et 2'), ni dans le liquide non pigmenté (E.II.4.8). Par contre, on trouve le ferment dans le liquide pigmenté, c'est-à-dire sitôt que s'amorce l'autolyse neutre (E.II.4.8'). L'examen attentif du papier à l'aide duquel nous filtrons le contenu des flacons de culture signale que le pigment se dépose souvent en deux zones concentriques et de couleur différente; la première, orangée mauve, extérieure à la seconde, vert olive, grumeleuse, qui reste au centre.

Le pigment orangé fonctionne comme un indicateur coloré puisqu'il se décolore pour un pH inférieur à 5,5 et se recolore au-dessus. L'ultra-

filtration du liquide pigmenté laisse passer une substance incolore qui se teinte en rose mauve au contact de l'air (E.XV.2.2b). Ces quelques caractéristiques nous autorisent à penser qu'il s'agit très probablement d'un pigment de nature quinonique dont le propigment est rapidement autoxydé. Nous le désignerons par le terme de *nigeraspergilline*.

En fait, les auteurs sont peu prolixes sur ce pigment, mais nous avons la conviction que le chromogène de FREY (79), incolore en milieu acide et jaune en milieu alcalin, est le précurseur du propigment.

Pour résumer, la *nigeraspergilline* comprend au moins trois stades:

1. Le chromogène de FREY;
2. Le propigment oxydable possédant vraisemblablement le groupe quinone ou tout autre homologue (anthraquinone, etc.);
3. Le pigment, plus stable, à grosse molécule et, comme le pense BORTELS, proche des substances humiques dont la formation est facilitée par le Cu (36).

Ainsi donc, comme chez les autres moisissures, nous pouvons déceler chez l'*A.n.* des pigments vraisemblablement benzoquinoniques ou anthraquinoniques, aisément oxydables.

Cette étude biochimique de l'*A.n.* nous autorise à tirer la déduction d'une relation étroite entre la pigmentation et la respiration de la moisissure. C'est pourquoi nous abordons à présent l'étude plus particulière des rapports existant entre la pigmentation d'une part et diverses manifestations d'ordre biochimique ou physiologique d'autre part.

E. Quelques processus liés à la pigmentation chez l'A.n.

a) *Relations pigmentation — respiration.*

Nous avons déjà mentionné comment on peut concevoir, d'une façon générale, l'intervention des pigments dans la respiration cellulaire. Voyons à présent comment nous pouvons adapter ces phénomènes à l'*A.n.*

Nous savons que, selon SZENT-GYÖRGYI, il n'existe que trois systèmes respiratoires terminaux.

Sans doute, nous bornant à notre opinion conçue d'après les précédentes observations, pourrions-nous admettre d'emblée la présence du système respiratoire III chez l'*A.n.* Il nous convient pourtant préalablement de discuter les possibilités d'intervention des autres systèmes.

1. Discussion:

α) Type II (acide ascorbique).

Bien qu'on ait réussi à mettre en évidence un pouvoir réducteur du liquide de culture (19) et la présence de la vitamine C elle-même (84) chez l'*A.n.*, ce système ne peut prédominer que dans les cas où l'on ne constate

pas de pigmentation brune ou jaune, excluant ainsi les cultures faisant l'objet de notre travail.

β) Type I (acide succinique).

Sa participation demeure un point obscur de la physiologie de l'*A.n.* En tous les cas, nous savons que l'on a isolé chez l'*A. oryzae* la cytochromoxydase qui est le ferment participant à ce système spécifiquement animal; mentionnons en outre que la présence d'acide succinique chez l'*A.n.* a été reconnue (18), mais en faible quantité.

Donc, nous pouvons admettre chez cette moisissure la présence éventuelle du système respiratoire I. Toutefois, il est douteux qu'il prédomine.

2. Arguments en faveur de la présence du système phénol-phénolase chez l'*Aspergillus*:

α) Présence chez l'*A.n.* de mélanaspergilline dans les conidies et de nigeraspergilline dans le liquide de culture. Ces deux substances sont les homologues des pigments phénoliques des autres moisissures cités plus haut.

β) Présence de tyrosinase dans les conidies d'*A.n.* prouvant l'existence dans celles-ci d'un pigment mélanique vrai (mélanaspergilline).

γ) Présence de tyrosinase libérée au cours de l'autolyse, dans le liquide de culture d'*A.n.*

δ) Présence de substrats phénoliques, tels que tyrosine (246) isolée du mycélium; et mise en évidence par RAULIN (207, 208) en milieu pauvre en Fe, d'une substance qui serait vraisemblablement un phénol ou un énoI (36).

Ces observations concernant particulièrement l'*A.n.* se complètent par les données biochimiques qui y sont applicables. C'est ainsi que:

ε) Les recherches des Japonais NAGAHISA et OGURA (175) ont montré qu'il existe chez *A. oryzae* un mélange de pigments redox probablement quinoniques.

Or, l'on sait que les quinones et les pigments quinoniques en particulier sont des accepteurs spécifiques de la glucosedéshydrase (172).

ζ) Le mélange de pigments, défini par les auteurs japonais, s'autoxyde très lentement, mais en présence de tyrosinase ou de laccase, ce mélange s'oxyde très rapidement en une substance rouge cerise. Il est ainsi possible d'édifier un système, comprenant le pigment, l'oxydase, et la glucosedéshydrase, qui oxyde rapidement le glucose en consommant de l'oxygène (236).

η) FRIEDHEIM (80) a démontré que l'un de ces pigments fonctionne comme catalyseur de la respiration du bacille pyocyanique dont elle augmente 200 à 300 fois l'intensité respiratoire.

Ces différents faits apportent des arguments de valeur en confirmant notre point de vue, à savoir:

- qu'il existe chez l'*A.n.* un système phénol-phénolase et
- que ce système participe à la respiration de la moisissure.

Toutefois, la respiration n'est qu'un des aspects importants du problème de la pigmentation, et il est certes évident que d'autres processus encore régissent la formation de substances colorées. En particulier la nutrition dont dépend l'économie vitale.

b) *Relations pigmentation — nutrition.*

Parmi les facteurs essentiels, nécessaires au développement de la cellule et à sa pigmentation, les métaux jouent un rôle capital chez les moisissures, l'*A.n.* en particulier. C'est ainsi que le Zn (36, 154), le Cu (36, 216, 171, 113), etc., occupent une place importante parmi les facteurs de la croissance normale. Ces mêmes métaux favorisent encore soit la pigmentation du liquide, soit celle des conidies.

D'autres substances sont cependant essentielles telles l'azote et le carbone.

En 1880 déjà, NÄGELI (173) avait observé chez des moisissures dont il ne donne malheureusement pas le nom, que le liquide de culture se pigmentait, surtout en présence de sels d'ammonium, et seulement en milieu alcalin.

Personnellement, nos expériences (E.II.1.1', 1.2, 6.9 et 6.16) nous ont appris que sur certains milieux (KNOP, CZAPECK-DOX) l'*A.n.* est incapable de pigmenter le liquide sur lequel il s'est développé. Or, ces mêmes milieux privés de sels de NH_4 ne contiennent comme source d'azote que du NO_3 .

Afin de prouver ce rôle du ion ammonium, nous avons substitué, dans un de ces liquides, l'ion Na par l'ion NH_4 tout en maintenant constante la quantité d'azote offerte (E.II.8.2). Le résultat s'est trouvé conforme à nos prévisions et ainsi nous avons pu observer la pigmentation du liquide. Nous avons apporté également la preuve inverse en remplaçant les sels de NH_4 du milieu de RAULIN par des sels de Na (E.II.6.18 et 19); un certain retard de la coloration du liquide s'est alors manifesté.

Une autre observation, que nous avons faite encore, corrobore ces expériences: si on laisse fermenter « spontanément » le liquide de RAULIN brun noir, on peut constater bientôt une forte odeur ammoniacale, résultat probable de la scission par les microorganismes de groupes porteurs de $-\text{NH}_3$ ou tous autres ammonigènes.

Ces données personnelles complètent celles de BORTELS (36) qui admet, en effet, le rôle prépondérant de la nature de la source azotée.

Mais l'influence du sucre ne paraît pas non plus négligeable. Lorsque le milieu n'en contient pas ou plus (36), la pigmentation apparaît. Nous avons également noté cette corrélation dans nos expériences (E.II.2.10'). Tant qu'il reste dans le liquide des sucres réducteurs, ou des produits intermédiaires de leur dégradation (acidité totale élevée) la pigmentation ne peut avoir lieu.

Enfin, l'action favorable d'une part d'une source d'azote adéquate, et celle défavorable du sucre ont été synthétisées par les observations de F. CHOÛAT et NAHAZ (47) sur *Phoma buxi* où l'asparagine exerce une action « contre-balançante » pour le sucre sur la pigmentation du liquide de culture.

En résumé, la présence d'une source convenable d'azote, coïncidant avec une carence de sucre, détermine la pigmentation.

Dès le moment où le sucre est épuisé, le champignon vit aux dépens de sa propre substance. Sur le point de mourir il s'autolyse et se pigmente !

La pigmentation est donc encore liée à ce dernier important phénomène : l'autolyse.

c) Relations pigmentation — autolyse.

Si l'on pèse des récoltes (poids sec) de cultures d'A.n. faites sur milieu liquide de RAULIN, on observe que les valeurs augmentent avec l'âge, jusqu'à un maximum, et décroissent ensuite (graphique fig. 8, p. 105).

Nous avons, quant à nous, constaté de plus que la consommation du glucose atteint 99% à ce stade, c'est-à-dire qu'elle est pratiquement totale (E.II.2.10').

La décroissance commence vers le 5^{me} jour de culture à 35° C, alors que le tissu paraît en pleine vitalité. Notons que KÖHLER (121) pense que le mycélium de l'A.n. ne vit que

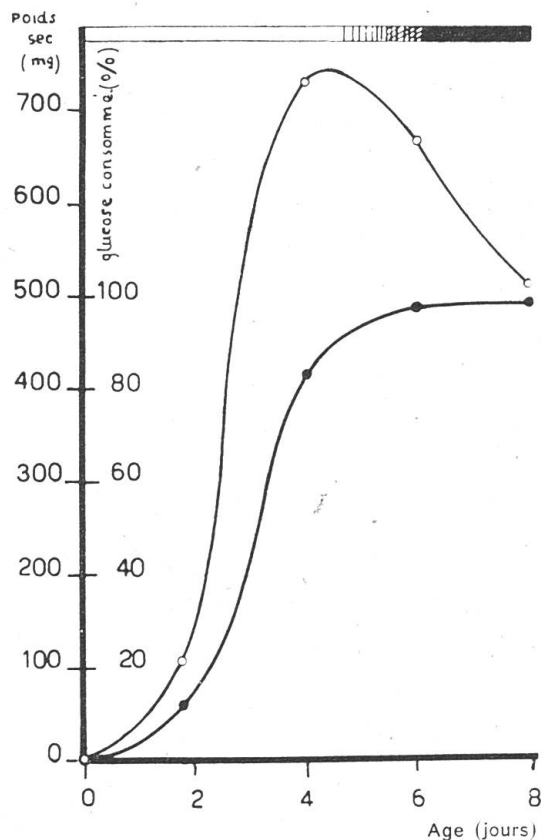


Fig. 1.

□ Pigmentation du liquide
 -o-o- Poids sec
 -●-●- Glucose consommé

4-5 jours dans le milieu, et que de vieilles cultures contiennent une forte proportion de cellules mortes (E.II.8.2'), comme nous l'avons constaté.

Cette phase de décroissance de poids constitue le phénomène de l'autolyse.

BEHR (17) en distingue deux sortes chez *A.n.*:

1. L'autolyse «acide» qui a lieu quand on emploie le sulfate d'ammonium, acidificateur physiologique, comme source d'azote. La lyse se passe alors aux alentours de pH 1 et se caractérise par une diminution de poids minime avec libération de composés organiques azotés (acides aminés, NH_4 , et traces d'acides amidés) ainsi que formation d'un pigment jaune. Nous avons constaté cette autolyse sur milieu de CZAPECK-DOX par exemple (E.II.8.2).

2. L'autolyse «neutre» qui se fait entre pH 6-7 et consiste en une diminution de poids rapide et intense (E.II.1.9a et fig. 8, p. 105) avec libération de produits organiques intermédiaires (17) de la destruction des albumines et d'azote ammoniacal (40, 66, 154). Il y a aussi augmentation de la teneur du liquide en ferments protéolytiques (149, 150) dont l'un d'eux serait semblable à la papaïne (150).

Mais ce qui est le plus caractéristique de l'autolyse neutre est le fait que l'on constate (E.XV.2.2b) au début la présence d'un pigment ultrafiltrable qui devient orangé en milieu alcalin et jaune en milieu acide (c'est notre nigeraspergilline); ensuite le liquide et le mycélium se colorent en brun par des substances humiques (ce sont nos mélanines vraies) non ultrafiltrables.

Plusieurs auteurs ont remarqué une relation entre la pigmentation du liquide et la libération de NH_4 (154), soit la dégradation des albumines (36) c'est-à-dire l'autolyse. Nous avons d'ailleurs contrôlé par nos expériences (E.II.1.9', 1.12', 6.8 et 6.10) la valeur de ces affirmations.

Nous pouvons conclure qu'il existe derechef une relation indiscutable entre l'autolyse et la pigmentation du liquide (fig. 1); la pigmentation n'étant qu'une conséquence de l'autolyse.

Les bases essentielles de la théorie sur la mélanogénèse étant établies par notre enquête bibliographique et nos observations personnelles, nous allons à présent porter notre intérêt sur l'inhibition même de cette pigmentation dont nous avons tenté de saisir l'origine et le processus.

CHAPITRE SECOND

DES EFFETS INHIBITEURS DE LA TU

La mélanogénèse peut-elle être entravée, inhibée ? Cette formation de pigments noirs, parallèle à la destruction des tissus, peut-elle être suspendue ? Quelles méthodes et quelles substances employer à cette fin ?

Nous avons évoqué plus haut les raisons qui motivent notre choix de la TU comme substance inhibitrice.

L'enquête bibliographique faite sur ce sujet ne révèle rien de très intéressant ; il faut citer pourtant les observations de DENNY sur les légumes (39) et les fruits (60, 39, 61, 62) dont le noircissement à l'air est entravé par la TU. Ces constatations se bornent aux faits, mais n'élucident point le mécanisme de la réaction au point de vue biologique. C'est pourquoi nous avons jugé intéressant de faire des recherches dans ce sens destinées à nous renseigner sur le mécanisme d'action de cette substance.

Toutefois, nous ne croyons pas que l'intérêt serait suffisamment soutenu si, dès à présent, nous citions d'emblée les observations faites avec la TU sans avoir préalablement établi son pedigree.

Si l'on considère une substance chimique quant à son comportement biologique, on constate que ce dernier dépend non seulement de propriétés spécifiques ne relevant que de la biologie, mais aussi des propriétés physiques et chimiques du corps.

Dans le dernier cas, les réactions ont lieu comme s'il s'agissait de corps inertes ; dans le premier, on assiste aux réactions plus complexes de cette même substance en présence du matériel vivant.

Cette différence de comportement n'est qu'apparente et ne doit pas laisser supposer une divergence fondamentale dans la nature des phénomènes. N'observe-t-on pas en effet que les processus de la vie se laissent résoudre toujours plus en réactions physico-chimiques ?

Certes oui, aussi sera-t-il plus aisé de saisir le rapport et les influences de la substance même sur les phénomènes de la vie si nous observons quelques-unes de ses propriétés physiques et chimiques fondamentales.

A. Propriétés physiques et chimiques de la TU

a) Propriétés physiques.

La TU cristallise en prismes ortho-rhombiques bi-pyramidés (105, 211, 158) (fig. 2). Ils pourraient, dans certaines conditions, prendre une apparence cubique (245).

La disposition des atomes, constituant la molécule, et la structure moléculaire du cristal, ont été discutées par DEMÉNY et NITTA (59), dont

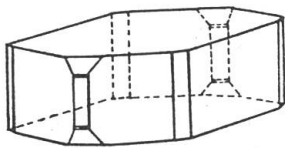


Fig. 2. Cristal de TU.

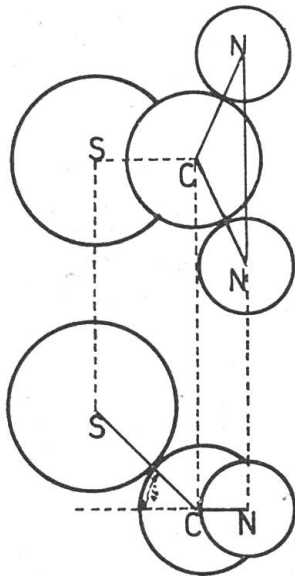


Fig. 3.
Disposition des atomes
dans une molécule.

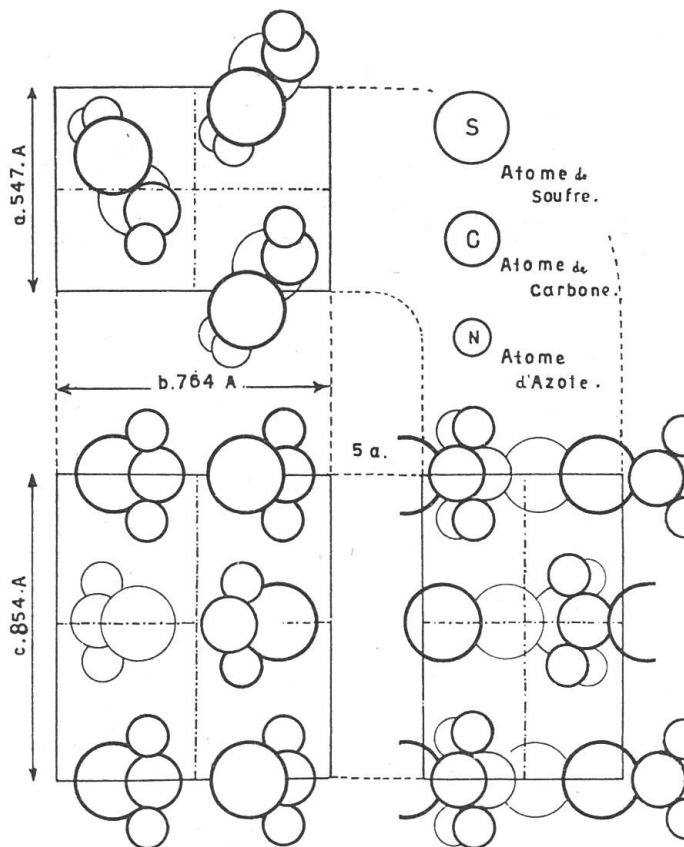
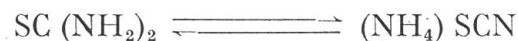


Fig. 4.
Disposition des molécules dans un cristal.

nous présentons (fig. 3 et 4) le schéma de l'orientation des atomes et des molécules dans un cristal. WYCKOFF et COREY (266) n'y apporteront en 1932 que quelques modifications d'ordre secondaire.

Son point de fusion a donné lieu à des avis divergents. Alors que la plupart des anciens auteurs (211, 11, 199, 212, 74) mentionnent des valeurs inférieures, on admet un P.F. de 180° C (100, 118), pour la substance pure.

Cette observation erronée résulte du fait que si l'on porte la TU à cette température, et qu'on la refroidisse aussitôt, elle se liquéfiera désormais à 149° C (199). Que s'est-il passé? La TU, portée à son point de fusion (245, 100), a été transformée partiellement en thiocyanate d'ammonium (211, 212, 72, 81), par une réaction d'ailleurs réversible (212):



C'est le phénomène appelé par LOWRY (144) « Dynamic isomerism ».

Or, la TU, rarement exempte de thiocyanate, livrait naturellement des valeurs trop faibles pour son P.F. (100). C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire de vérifier la pureté de la TU. L'expérience (E.II.2.15) nous a permis de constater l'absence de thiocyanate dans la substance employée pour nos recherches.

Sa solubilité dans l'eau, que VOLHARD (245) estimait avec raison à 1 partie de TU pour environ 11 parties d'eau froide, a été déterminée exactement aux différentes températures (181, 182).

Son addition aux réactions enzymatiques ou aux milieux de culture risque-t-elle d'en modifier le pH? Il ne semble pas, car non seulement sa réaction est neutre (211), mais encore le pH d'une solution aqueuse de quantités croissantes du corps reste pratiquement constant (55):

| | | | | | |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Concentration de TU (gr/l): | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 |
| pH: | 7,0 | 7,1 | 7,0 | 6,9 | 6,8 |

Il en sera de même, comme nous l'avons vérifié, pour la TU introduite en quantités variables dans le liquide de culture (milieu de RAULIN) d'*Aspergillus niger* développé 7 jours à 34,5° C (E.XVI.2.3).

| | | | |
|-----------------------------|------|------|------|
| Concentration de TU (gr/l): | 0,0 | 0,1 | 1,0 |
| pH: | 8,10 | 8,12 | 8,07 |

b) Propriétés physico-chimiques et formule.

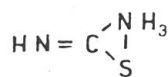
L'étude de sa structure intime, par les raies d'absorption (215) dans les diverses régions du spectre allant de l'infra-rouge (137) à l'ultra-violet (54), a été complétée par la diffraction des rayons X (59, 104, 266). Il en

résulte que, si l'accord est fait sur la constitution du groupement $\text{S}=\text{C} \begin{matrix} \text{N} \\ \text{N} \end{matrix}$

qui admet un plan de symétrie, les opinions sont encore divergentes sur la place à attribuer aux quatre atomes d'H que contient la molécule de TU. Il faut attendre les résultats livrés par les spectres RAMAN (122) pour admettre que ces atomes ne sont pas disposés de façon à former le groupe -SH de la pseudothio-urée.

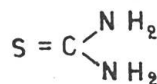
WERNER (255), le premier, avait proposé une formule qui l'apparentait à l'acide isothiocyanique. Actuellement abandonnée, nous ne la citons que pour mémoire. D'ailleurs LECHER et coll. (135, 136) l'ont réfutée.

Résumant leurs importants travaux (134, 135, 136), nous dirons que la TU en solution aqueuse pourrait se trouver sous les formes suivantes:



Formule cyclique de WERNER

1. Thio-urée (thiocarbamide).
C'est la formule classique

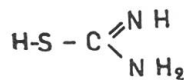


Formule classique

2. Isothio-urée
nommée également pseudo-thio-urée.

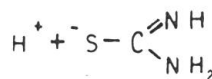
On peut la rencontrer sous 3 formes:

a) acide non dissocié



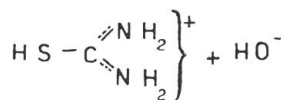
Acide non dissocié

b) acide dissocié



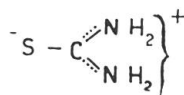
Acide dissocié

c) base du thiuronium



Base du thiuronium

3. « Zwitterion » ou « ion mixte »
de LECHER et coll.



« Zwitterion »

Or, si l'on tient compte des constatations suivantes:

la TU et ses dérivés N-alcoylés sont des bases extraordinairement faibles;

les dérivés S-alcoylés de la TU (pseudothio-urée) sont des bases très fortes, comme toutes les amidines;

au cours de la formation de sels de la TU et de ses dérivés N-alcoylés, l'H de l'acide va sur le S;

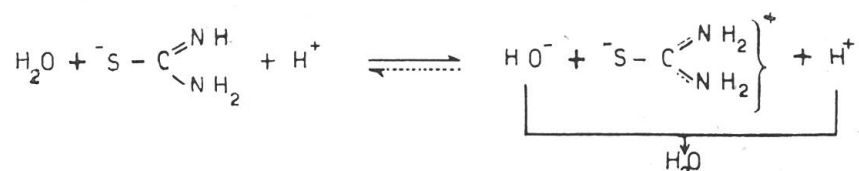
au cours de la formation de sels des dérivés S-alcoylés, comme de la pseudothio-urée, l'H de l'acide va sur l'azote de l'imide;

la formule acide non dissocié, en tant que pseudothio-urée et amidine doit posséder des propriétés de base forte, comme par exemple la S-méthyl-pseudothio-urée. En solution aqueuse, dans l'équilibre qui doit se produire avec la base du thiuronium, cette dernière doit prédominer



cela est peu vraisemblable, car la TU est neutre en solution aqueuse et ses propriétés basiques n'apparaissent que d'une façon extraordinairement faible.

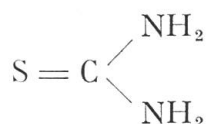
La forme acide dissocié ne pourrait être présente qu'à l'état de traces, parce que l'anion contient le groupement amidine fortement basique. Elle devrait ainsi donner avec l'eau le « Zwitterion » prédominant



D'après cela, on constate que seules les formules du « Zwitterion » ou de la thiocarbamide sont en accord avec les faits connus. Laquelle des deux formules adopterons-nous ?

LECHER et coll. (135) préférant tout d'abord le « Zwitterion » supposent plus tard (136) l'existence d'un équilibre entre les deux.

En ce qui nous concerne, nous admettrons, jusqu'à plus ample information, la formule de la thiocarbamide comme plus représentative de ce corps.



Thio-urée = Thiocarbamide

Ceci pour les raisons suivantes:

La NN' diacétyl-thio-urée devrait donner un acide fort, ce qui n'a pas lieu, puisqu'elle est neutre en solution aqueuse.

Le « dipole moment » montre que ce « Zwitterion » ne doit certes pas prédominer (129).

Les spectres RAMAN (ce qui est déterminant) ne révèlent aucun groupe -SH (122).

Nous devons cependant ajouter qu'il sera quelquefois difficile de rejeter la notion d'existence d'un groupe -SH, *dans certaines conditions*, tant du point de vue chimique pur (231, 255, 239) que du point de vue biologique (194) où l'on peut admettre une « activation » par un enzyme capable de transférer l'atome d'hydrogène, de l'azote au soufre.

Le déplacement de l'atome d'H à l'intérieur de la molécule de TU semble relativement aisé (63). Ce changement de formule résulte en réalité de la migration de l'électron de valence: c'est le phénomène, assez fréquent en chimie, connu sous les noms de tautomérie, mésomérie ou *pseudomérie*. Au sujet de la formule à attribuer à de telles substances, RUMPF (42) écrit récemment: « lorsque l'interprétation des diverses propriétés chimiques et physiques d'un composé . . . exige l'emploi de plusieurs formules de structure qui diffèrent uniquement par l'arrangement des liaisons, c'est-à-dire par la répartition des électrons de valence, l'état normal de l'édifice polyatomique est, *le plus souvent*, intermédiaire entre ceux qui correspondraient aux diverses formules plausibles ». On ne peut énoncer proposition plus souple et plus proche de la réalité !

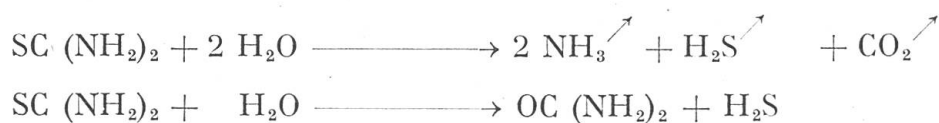
c) *Propriétés chimiques.*

α) *Transformations dues à la chaleur.*

La réaction, déjà signalée plus haut, de transformation de la TU en thiocyanate d'ammonium sous l'action de la chaleur, est conditionnée par la température. C'est ainsi qu'au P.F. de la TU, l'équilibre est atteint avec 1 molécule de TU pour 3 molécules de thiocyanate (212). Une étude plus complète de la vitesse de réaction et des conditions d'équilibre se trouve chez REYNOLDS et WERNER (212) et KAPPANA (115).

Il nous intéresse tout particulièrement de savoir de quel ordre serait une transformation éventuelle qui aurait lieu par chauffage d'une solution aqueuse de TU (stérilisation p. ex.). Selon DUTOIT et GAGNAUX (72) ainsi que GAGNAUX (81) une telle solution environ N/10, séjournant 80,5 min. à 123,4° C, ne subit qu'une diminution de 2% environ en poids, légèrement retardée par NaOH, accélérée légèrement, au contraire, par H₂SO₄. La perte subie est donc minime.

Les auteurs cités rapportent uniquement le déficit à une isomérisation; or il convient de remarquer que POLONOVSKI et LESPAGNOL (197) signalent une destruction de la TU en solution aqueuse sous l'action hydrolysante des acides à l'ébullition. Les formules suivantes semblent devoir rendre compte tout au moins de la formation de H₂S que nous avons constatée (E. XVII. 2.2') au cours de la stérilisation à l'autoclave.



La destruction est néanmoins très faible puisque des contrôles gravimétriques (E.II.2.18 et 19), titrimétriques (E.II.2.18' et 20) et biologiques sur l'*A.n.* (E.II.2.5, 6, et 17) n'ont pu mettre en évidence des différences supérieures aux erreurs expérimentales.

Une autre étude, entreprise sur *Escherichia coli* (E.XVII.1.2), nous a montré qu'aux concentrations étudiées (4 ‰) la TU a une action légèrement accélératrice et que sa stérilisation, de concert avec le bouillon, diminue faiblement cette stimulation par rapport au témoin dont la TU a passé également par l'autoclave mais séparément du milieu de culture.

β) Action de quelques agents oxydants.

Ces agents, tout en mettant en évidence les propriétés réductrices de la TU, agissent généralement comme désulfurants. Le résultat varie selon les quantités relatives et la « force » de l'oxydant. Ici, comme ailleurs, l'atome de S confère à la TU des propriétés caractéristiques qui la différencient nettement de l'urée.

Les produits principaux de l'oxydation de la TU sont la cyanamide, la carbodiimide (diiminométhane), l'urée et le H_2SO_4 . Par contre, sous l'influence d'oxydants plus doux en milieu neutre ou acide, de préférence, il se forme du disulfure de formamidine (instable en milieu alcalin, où il se décompose rapidement en donnant un précipité de soufre), différents acides sulfiniques, ou encore, sous certaines conditions, des produits du type des bases d'HECTOR.

γ) Propriétés oxydo-réductrices.

PIRIE (194) avait déjà remarqué que de nombreuses substances comportant le groupe -SH (telles que l'ergothionéine ou la TU) catalysent l'oxydation par H_2O_2 de la cystéine et du glutathion, d'une façon analogue aux ions Cu^{++} .

Par exemple, le disulfure de formamidine oxyde deux molécules de cystéine pour donner de la cystine et se transformer de nouveau en TU. Ce qui revient à dire que la TU est capable de jouer, selon les cas, le rôle de réducteur ou au contraire de catalyseur d'oxydation (194).

δ) Composés d'addition.

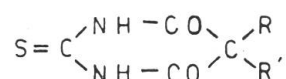
Ils sont passablement nombreux, surtout avec les sels de métaux lourds, mais se combinent néanmoins à nombre d'autres substances.

— Composés d'addition divers.

Comme pour l'urée, la TU se combine avec les aldéhydes (64, 106) et cétones (65) pour produire des résines et matières plastiques. Avec nombre d'acides aldéhydes et d'éthers-cétoniques, on a également des réactions de condensation:

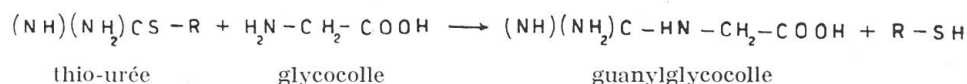
Par ex.: éther γ -chloracétique et l'éther 2-aminothiazol-4-acétique (138).

De même, les éthers maloniques conduisent aux acides thiobarbituriques (159, 76):



C'est par une réaction semblable que l'on obtient (256) un dérivé du thio-uracile, le 2 éthylthiol-6-oxypyrimidine-4-éthylacétate.

Elle se combine (257) aux acides aminés en solution aqueuse selon:



Ces composés peuvent se cycliser par perte d' H_2O .

Le phénylisocyanate (130) produit, avec la TU, un monothiobiuret de formule globale:



— Additions avec les sels métalliques.

Le tableau suivant, où sont réunis quelques composés de la TU avec le Zn et le Cu, donne un aperçu de la merveilleuse facilité de ce corps à former des complexes, comme on peut le constater dans le travail de ROSENHEIM et LÆWENSTAMM (217) entre autres.

| <i>Complexes</i> | <i>Références</i> |
|-------------------------------------------------------|-------------------|
| 3(SCN ₂ H ₄)CuCl | (206, 123) |
| 2(SCN ₂ H ₄)CuCl | (206) |
| 2(SCN ₂ H ₄)CuSO ₄ | (199) |
| [2(SCN ₂ H ₄)Zn] ⁺⁺ | (188) |
| 3(SCN ₂ H ₄)ZnSO ₄ | (218) |

Les complexes, très souvent colorés, formés entre les cations et la TU, de même que ceux de ses dérivés, en feront des réactifs excellents en analyse qualitative et quantitative (dosage par colorimétrie).

L'acide rubéanique, par exemple, donne un complexe interne vert s'il y a du Cu^{+2} (179). L'éthylxanthogénate de K (252, 253) permet de séparer le Cu d'avec le Ni en analyse.

La diphénylthiocarbazono ou dithizone donne des complexes colorés avec de nombreux métaux lourds (75), par exemple, une coloration rouge pourpre avec Zn^{+2} (254).

Les sels du thiocarbamate (58), le diéthylthiocarbamate de Na (193), ou diéthylthion (ce dernier donnant une teinte brune dosable au photomètre de PULFRICH) sont de bons réactifs du Cu.

La TU est employée aussi comme réactif du Ru (229), Bi (73, 161, 4), Pb, Hg, Cu, Cd (73).

ε) *Quelques dérivés de la TU.*

Ils sont nombreux et variés. Nous ne citerons que ceux d'un intérêt biologique évident ou ceux que nous avons pu avoir en main. Nous en donnerons une fois pour toutes la formule à laquelle on voudra bien se reporter ici.

| | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Thio-urée | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H}_2 \\ \searrow \text{N H}_2 \end{array}$ |
| S-méthylpseudothio-urée | $\text{C H}_3 - \text{S} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} \\ \searrow \text{N H}_2 \end{array}$ |
| Allylthio-urée | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H}_2 \\ \searrow \text{N H} - \text{C H}_2 \text{C H} = \text{C H}_2 \end{array}$ |
| « 133 WANDER » (Thiomidil) | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} - \text{C} = \text{O} \\ \searrow \text{N H} - \text{C} = \text{C H}_3 \end{array}$ |
| Thio-uracile | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} - \text{C} = \text{O} \\ \searrow \text{N H} - \text{C} - \text{H} \end{array}$ |
| Diphénylthiocarbazono | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} - \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \searrow \text{N} = \text{N} - \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |
| Phénylthiosemicarbazide | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H}_2 \\ \searrow \text{N H} - \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |
| Diphénylthiocarbazide | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} - \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \searrow \text{N H} - \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |

| | |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phénylthio-urée | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H}_2 \\ \searrow \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |
| Diphénylthio-urée sym. | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \searrow \text{N H} - \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |
| Thiocyanate d'ammonium | $\text{N} \equiv \text{C} - \text{S} - \text{N H}_4$ |
| Allylsénévol = isothiocyanate d'allyle | $\text{S} = \text{C} = \text{N} - \text{C H}_2 \text{C H} = \text{C H}_2$ |
| Ethylxanthogénate de K | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O C}_2\text{H}_5 \\ \searrow \text{S K} \end{array}$ |
| Diéthylthiocarbamate de Na | $\text{S} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_2 \\ \searrow \text{S Na} \end{array}$ |
| TMTD = disulfure de tétraméthylthiurame | $\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{S} - \text{C} - \text{N} (\text{C H}_3)_2 \\ \\ \text{S} - \text{C} - \text{N} (\text{C H}_3)_2 \\ \\ \text{S} \end{array}$ |
| Acide rubéanique = dithioamide | $\begin{array}{c} \text{S} = \text{C} - \text{N H}_2 \\ \\ \text{S} = \text{C} - \text{N H}_2 \end{array}$ |
| Guanidine | $\text{H N} = \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N H}_2 \\ \searrow \text{N H}_2 \end{array}$ |

Après ces considérations sur la physique et la chimie de la TU, nous abordons ici la partie essentielle de notre travail. C'est-à-dire: les diverses étapes de l'action de la TU sur la mélanogénèse.

B. Effets de la TU et dérivés sur différents processus de la mélanogénèse

a) Tissus, sucs végétaux et produits autoxydables.

L'action de la TU sur la mélanogénèse est préventive et non curative. C'est ainsi qu'une purée de pomme de terre crue, brunie par l'effet de l'oxygène de l'air, ne reprend pas sa coloration primitive sous l'influence de la TU (45).

Par contre, on peut empêcher le noircissement des fruits ou légumes par un contact préalable avec une solution de TU (DENNY). Nous avons appliqué cette observation (E.X.5.1) à la préparation d'un liquide conservateur pour collections, à base de TU (E.X.5.2) et destiné aux psallioties

ou champignons de couche ainsi qu'à celle d'une solution pour le traitement avant cueillette des champignons très sensibles aux meurtrissures (Darlington à chair blanche).

L'adrénaline (16) et la phloxine (224) à la lumière, sont également protégées par la TU.

b) *Ferments oxydants.*

Nous avons vu précédemment que la TU possède non seulement des propriétés réductrices, mais encore qu'elle forme facilement des complexes avec les métaux, le Cu en particulier. Or, nombre de ferments oxydants sont des cupro-protéines comme l'oxydase de pomme de terre (126). Aussi n'est-il pas surprenant de constater que la TU entrave l'activité des ferments oxydants responsables en particulier de la mélanogénèse et de l'oxydation de l'acide ascorbique (114, 226). Parmi les multiples observations que nous avons faites personnellement à ce sujet, nous indiquons ci-dessous les plus importantes:

Sont inhibés par la TU:

| Catalyseurs d'oxydation et substrats | Auteurs |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Réaction de CHODAT | (E.VIII.7.2, X.1.9, etc.) |
| couple paracrésol-tyrosinase (sans glyocolle). | (E.X.1.9) |
| ferments oxydants de <i>Vicia faba</i> et autoxydation du chromogène . | (E.IIIa.3.1', 2 et 2') |
| tyrosinase du <i>Psalliota campestris</i> . . | (E.X.5.1) |
| tyrosinase du liquide de culture d' <i>A.n.</i> | (E.X.6.1 et 2) |
| tyrosinase des conidies d' <i>A.n.</i> | (E.VII.2.8) |
| tyrosinase — tyrosine | (E.X.1.9 et 10) |
| » — catéchol | (E.X.1.9) |
| et glyocolle | |
| » — catéchol | (E.X.1.9) |
| » — adrénaline | (E.X.1.10) |
| oxydase de concombre (Cu-protéine) | (147) |
| ion Cu et Cu-protéines synthétiques agissant sur l'acide ascorbique et d-isoascorbique | (147) |
| catalase | (230) [entravée par phénylTU] |
| décomposition de H ₂ O ₂ par Ag fine- ment divisé ou par Pt | (142) |
| peroxydase | (14, 15) |
| cytochromoxydase | (90, 148) |

Il a été observé *in vitro* (E.VIII.7.2, 6, etc.) (45) que la TU a la propriété de protéger le paracrésol contre l'action de l'oxydase de pomme de terre et à partir d'une concentration de TU qui semble équimoléculaire à celle du phénol. Il en est pratiquement de même pour la tyrosine et le catéchol (E.X.1.9 et 10), mais le résultat est moins évident au cours de l'oxydation enzymatique de l'adrénaline (E.X.1.10).

Notons en fait que la protection ainsi obtenue est plus proportionnelle qu'équimoléculaire. En effet, elle est

- 1) temporaire pour un système donné,
- 2) de durée variable suivant la force du ferment,
- 3) varie avec le test choisi,
- 4) d'autant plus efficace que la quantité de TU est plus élevée.

En résumé, nous pouvons dire que plus on ajoute de TU, plus lent sera le rougissement et plus tardive la formation de crésol-azur.

Remarquons que BAUR (13) ne mentionne pas l'action inhibitrice de la TU sur la tyrosinase.

On peut noter que cette action est tout à fait générale sur les oxydases et spécialement sur le couple paracrésol-tyrosinase.

c) *Respiration aérobie.*

Nous confirmons ici que la TU intervient dans les réactions d'oxydo-réduction, le plus souvent comme catalyseur négatif d'oxydation, de réducteur ou d'antioxygène.

Il a été entrepris à l'Institut de Botanique de Genève l'étude de la respiration des tissus de pomme de terre (45). La biochimie de cette plante nous conduit à admettre qu'elle est régentée par le système phénol-phénolase (233, 38, 37, 247) qui lui confère la propriété du noircissement post-lésionnel.

Les tubercules, épluchés et découpés, fournissent des pastilles de tissu frais qui sont mises ensuite en contact avec une solution de TU à 1‰/00 durant 3 heures. Il a été constaté une diminution de 26% de la consommation d'oxygène. Selon les auteurs (45), la TU bloque les substances phénoliques naturelles du tissu frais de pomme de terre. Les pastilles ainsi traitées sont exemptes de noircissement.

Une concentration très forte de TU (env. 6,5‰) est capable d'inhiber la respiration de *Chlorella pyrenoidosa* d'environ 23% en 1 heure (91). Cela peut signifier qu'il y a une grande quantité de corps phénoliques dans les tissus d'où augmentation de la dose nécessaire pour effectuer le blocage de la respiration, soit plus vraisemblablement une intoxication des processus, indépendante du système phénol-phénolase.

Enfin, la TU inhibe considérablement la consommation d'oxygène par *A.n.* (E.VI.1.1).

Ne pourrait-il pas y avoir, par l'étude du comportement de la respiration en présence de TU, une possibilité d'analyse des types respiratoires ?

Certes et cela semble bien le cas pour l'*A.n.* que nous observons à présent. En effet, si l'on admet chez cette moisissure, sur la base des preuves invoquées plus haut, l'existence du système phénol-phénolase, l'action inhibitrice de la TU sur la respiration et la pigmentation s'explique aisément.

Si, au contraire, la controverse n'admet aucun des arguments déjà cités, la seule action de la TU sur la pigmentation suffirait à établir la présomption de la participation du système III.

d) *Pigmentation d'A.n.*

Nos expériences, entreprises en vue de vérifier *in vivo* les constatations faites sur la réaction de CHODAT, ont abouti aux résultats suivants:

La TU

1) inhibe la formation (E.II.1.1 et 2.1) et la pigmentation (E.II.2.2) des conidies, toutefois avec persistance du gâteau mycélien (photos I, II et III);

2) inhibe entièrement, à partir de 400 mgr/l, la pigmentation du liquide de culture et du mycélium (E.II.1.8');

3) en ce cas d'inhibition totale, survient une coloration jaune urine, à fluorescence jaune du liquide, rappelant la lactoflavine et montrant qu'il y a probablement participation du système respiratoire anaérobie de suppléance;

4) de même qu'au cours de la réaction de CHODAT ou sur la purée de pomme de terre, l'addition de TU à la période prémélanique et mélanique de la vie de l'*A.n.* (4-6^{me} jour) (E.II.1.9b, 10 et 11) n'est plus efficace sur la pigmentation si l'on se rapproche du stade où tous les propigments sont oxydés.

e) *Corollaires de la pigmentation d'A.n.*

1. Nutrition.

Nous avons relevé entre autres le rôle des métaux, de la source d'azote et du sucre sur la pigmentogénèse. Il s'agit à présent de savoir quelle influence exerce la TU sur ces éléments importants.

Pour ce qui est des métaux, nous avons en cours une étude de l'action exercée par la TU sur le zinc chez l'*A.n.*

Quant à l'azote, la TU en contenant elle-même sous forme amide très assimilable, nous nous sommes demandé si elle ne pouvait pas fonctionner comme source d'azote; or ce n'est pas le cas (46). L'urée en quantité équi-

moléculaire ne peut contre-balancer l'action fongistatique de la TU (78') (E.II.13.1 et 2). Cependant, il est une constatation que nous développerons ailleurs, c'est l'analogie d'actions physiologiques qui semble exister entre la TU et le NO_3 ; tous deux défavorisent la pigmentation et la consommation du sucre avec, pour conséquence de la dernière action, l'accumulation d'acides organiques.

La consommation du glucose est donc retardée (E.II.1.8 et 2.10) par la TU en même temps que l'autolyse qui en dépend, c'est-à-dire la pigmentation en définitive.

2. Autolyse (46).

Enfin, nous avons vu que le phénomène précurseur le plus important de la pigmentation du liquide se trouve être l'autolyse. C'est pourquoi, nous lui avons consacré une étude plus approfondie; étude dont l'exemple nous permet de saisir la complexité des corrélations de divers processus biochimiques.

En ce qui concerne la TU, considérons tout d'abord, pour simplifier le problème, ce qui se passe durant la phase C-anabolique (carbo-anabolique), c'est-à-dire, suivant notre convention, pendant la période où du sucre reste encore à disposition du champignon (E.II. 2.10).

Les résultats de nos observations sont représentés par la figure 5.

α) Pour la culture témoin, le poids maximum est atteint au 4^{me} jour (cf. graphique, fig. 5); le déclin progressif enregistré depuis le 5-6^{me} jour, signale que l'autolyse a déjà commencé. Dans cette culture, le sucre fait défaut à partir du 6^{me} jour; dans les autres à partir du 7^{me} jour.

β) De faibles concentrations de TU (20 à 200 mgr/l) *stimulent* dès son origine le phénomène d'autolyse. Ce fait est exprimé sur le graphique par la formation d'une vallée à gauche.

γ) Des concentrations moyennes de TU (300 à 400 mgr/l) semblent paralyser l'autolyse; le champignon se trouve comme protégé contre son autocombustion. Ce fait est exprimé sur le graphique par la crête qui se dessine au milieu. Cette inversion d'effets apparente évoque la loi d'ARNDT-SCHULZE. Nous discuterons ailleurs l'analogie entre ces deux phénomènes. Il semble plausible, en outre, d'exprimer que ce renversement d'action résulte de l'interférence d'actions multiples de la TU.

δ) Les fortes concentrations du TU (500 à 1000 mgr/l) diminuent la croissance du champignon et semblent le protéger plus ou moins contre l'autolyse.

Pour l'étude de l'action de la TU au cours de la phase C-catabolique, des expériences analogues sont exécutées (E.II.1.8). Le graphique de la figure 6 résume les résultats acquis.

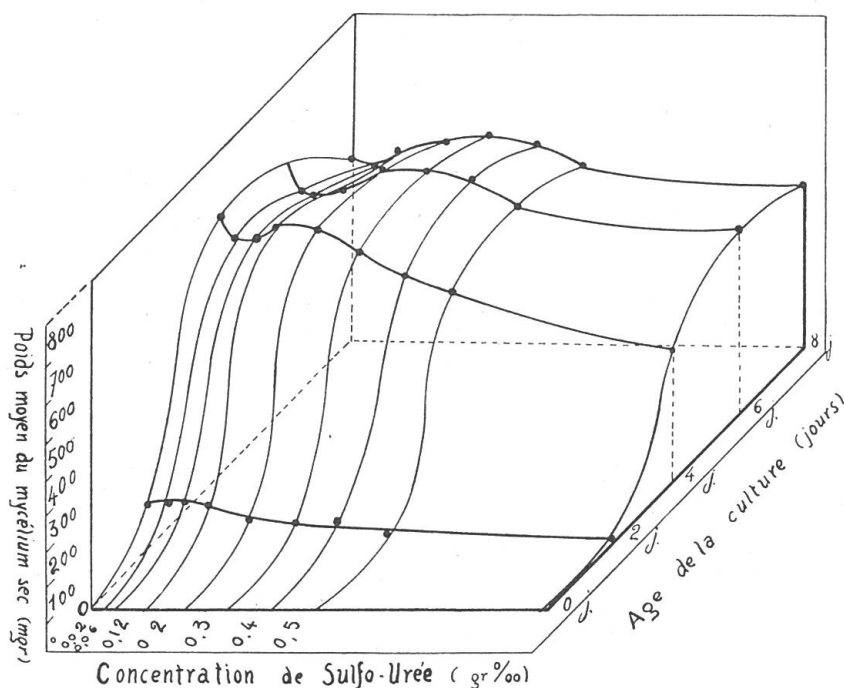


Fig. 5. Croissance durant la phase C-anabolique.

α) La culture témoin s'autolyse rapidement durant la première et la seconde semaine de catabolisme; le poids cesse de diminuer durant la 3^{me} et la 4^{me} semaine. Il est actuellement difficile de préciser les facteurs qui déterminent la durée de ce processus autolytique (ressources endocellulaires, intégrité des ferments, etc.).

β) De faibles concentrations de TU ont la même action stimulante que pendant la première phase.

γ) Les concentrations de TU, voisines de 400 mgr/l, exercent une action inverse: protection du tissu contre l'autolyse. Ces doses fonctionnent en phase C-catabolique, comme des agents d'épargne. Ce fait s'exprime sur la figure 6 par la crête représentée au centre.

δ) Les concentrations supérieures retardent encore, quoique à un moindre degré que les concentrations moyennes, l'autolyse de la moisissure.

La remarque la plus significative est en somme la suivante:

Les concentrations de TU qui protégeraient le champignon contre l'autolyse sont aussi celles qui sont suffisantes pour inhiber le mélanisme (400 mgr/l environ).

Une corrélation évidente, sinon nécessaire, est donc établie entre les phénomènes d'autolyse et ceux de l'oxydation enzymatique des phénols.

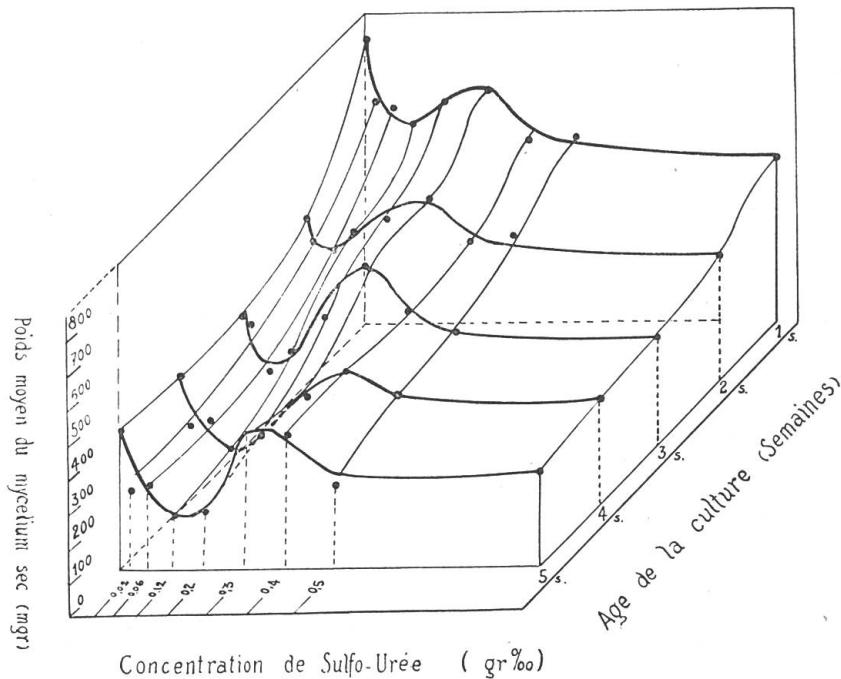


Fig. 6. Autolyse durant la phase C-catabolique.

Cependant, la TU étant ajoutée au début de la croissance du champignon, il est difficile de dissocier l'inhibition de croissance d'une accélération de l'autolyse. L'examen du coefficient d'utilisation du glucose, paraît fournir cependant de bons indices (E.II.1.8 et 2.10); il s'abaisse brusquement au 5-6^{me} jour, au moment où débute vraisemblablement l'autolyse. En présence de TU, il s'élève puis s'abaisse pour de faibles concentrations, alors qu'il ne monte jamais bien haut pour des concentrations plus fortes.

* Nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas de liaison stricte entre le développement et l'intensité de l'autolyse, ni d'ailleurs entre la pigmentation et l'autolyse. La cystine (E.II.10.1 et 2) est intéressante à ce point de vue car elle permet de mettre en évidence la diminution de pigmentation sans action notable sur l'autolyse. Il y a donc dissociation de ces deux phénomènes.

D'autre part, la cystéine (E.II.10.3 et 4), ralentissant le développement et l'autolyse, augmente également le poids maximum atteint par le champignon; ce qui fournit ainsi un argument à l'hypothèse que les phénomènes d'autolyse commençant très tôt pourraient être simultanés aux processus anaboliques.

Il est toutefois préférable d'observer ce qui se passe si l'on introduit la TU dans les cultures en fin de croissance. Les résultats diffèrent quelque

peu selon qu'on l'ajoute pendant ou après la fin de la période C-anabolique (4^{me} jour et suivants). La réponse est d'autant plus irrégulière que nous sommes proche du point critique d'inversion ana-catabolisme. Irrégularité de réponse qui apporte la preuve d'une intervention dans l'autolyse de multiples facteurs différents et de sens contraire.

Après de nombreuses expériences (E.II.1.9b, 10, 11 et 12), nous pouvons dégager les faits suivants:

- α) dès l'addition de TU, il se produit une diminution passagère de l'autolyse (durant 1 jour environ);
- β) la dose de 1000 mgr/l augmente toujours l'autolyse;
- γ) de faibles doses (100 mgr/l), ajoutées avant le brunissement du liquide, accélèrent légèrement l'autolyse tandis que leur addition en cours d'autolyse diminue faiblement celle-ci.

Si nous considérons que la TU exerce les effets suivants:

- α) diminution de l'autolyse du champignon brun, donc plus ou moins mort;
- β) ralentissement transitoire de l'autolyse en cours;
- γ) augmentation habituelle de l'autolyse lorsqu'elle est ajoutée en forte quantité;

nous pouvons penser qu'elle agit directement sur un ferment semblable à la papaïne, provoquant une diminution de son activité, et que l'action de ses produits de dégradation ou son action directe sur le métabolisme (toxicité) provoque au contraire une accélération du phénomène.

C. Interprétations de l'effet inhibiteur de la TU

I. In vitro; sur la mélanogénèse enzymatique.

a) Inhibitions.

Pour la clarté de notre exposé, nous distinguerons, d'une part, l'inhibition survenant en présence des seuls agents et produits de la réaction, c'est-à-dire du ferment, du substrat, de l'acide aminé, de la solution tampon et des produits formés au cours de la réaction (inhibition primaire), d'autre part, l'inhibition consécutive à l'addition d'une substance déterminée (inhibition secondaire). Cette distinction est arbitraire, mais nous permet toutefois d'englober nos connaissances en ce domaine.

α) Inhibition primaire.

Elle est toujours dépendante des variations portant sur les circonstances banales, c'est-à-dire des changements survenant soit dans les conditions physiques de la réaction, soit dans les conditions chimiques quant aux produits nécessaires au phénomène.

Inhibition relative aux conditions physiques.

Hormis les agents connus tels que la température, l'état de dispersion des particules, etc., nous devons tenir compte, en cas d'inhibition, de divers facteurs.

— L'agitation :

MILLER et DAWSON (162) estiment qu'elle accentue l'effet nocif, exercé par la solution tampon d'autre part.

— La tension d'oxygène :

joue également un rôle important comme nous l'avons constaté par ailleurs.

Inhibition relative aux conditions chimiques.

— L'oxygène :

se trouve en tête de liste des inhibiteurs. Ce fait qui peut nous sembler paradoxal a été pourtant prouvé (264, 259). Une diminution d'activité sans formation de substances inhibitrices (259) semble parfaitement en accord avec ce que l'on connaît des phénomènes redox (2) qui sont inhibés par l'O₂ et répond entièrement à la « parenté des catalyses inverses » de MOUREU et DUFRAISSE (169) où l'O₂ peut être antioxygène.

— La solution tampon :

MILLER et DAWSON (162) ont écrit que, si le ferment ne s'inactive que peu ou pas en solution aqueuse, il perd considérablement de sa force en solution tampon (phosphate-citrate); McCANCE (146) fait la même remarque à propos des pyrophosphates qui diminuent la consommation d'oxygène au cours de la réaction.

ROSS, TOTTINGHAM et NAGY (220) ont observé que l'activité de la tyrosinase de pomme de terre est perturbée par le tampon employé. C'est ainsi que le phosphate accélère l'oxydation de la tyrosine, tandis que les phtalates et les borates inhibent cette réaction.

Ce dernier fait s'explique par les observations de LAMBERT (131) qui avait remarqué, il y a bien longtemps, que le catéchol et tous les orthodiphénols se combinent avec l'acide borique. Il est donc indispensable d'écarter le borate comme constituant des solutions tampon (E.VII.2.4 et VII.2.12).

— Le substrat ou son dérivé d'oxydation l'orthoquinone :

le ferment, capable par définition de transformer une quantité illimitée de substrat, est surchargé et intoxiqué par une quantité limitée de ce dernier, le catéchol étant plus nocif que le paracrésol. Cette action pour le moins surprenante est désignée sous le terme d'inactivation; nous préférons la nommer *inhibition paradoxale*.

Notons qu'elle a été aussi constatée avec la catalase qui est « inactivée » par son substrat: l'eau oxygénée (230).

Nous avons tenté (inédit) un essai d'explication de cette diminution d'activité pour le moins singulière.

β) Inhibition secondaire.

— Substances diverses:

les corps qui ralentissent l'action des réactions enzymatiques oxydantes ont été désignés par trois termes principaux (93*b*). Ce sont par ordre de dates: inhibiteurs (267, 268), antioxydants (145) et antioxygènes (167, 168).

Nous retiendrons avec LAVOLLAY (133) le terme d'inhibiteur qui a le bénéfice de la priorité et paraît moins limitatif que celui d'antioxygène ou d'antioxydant.

Parmi les inhibiteurs de la mélanogénèse se trouvent des corps appelés réducteurs, les sulfites par exemple.

On sait que l'acide ascorbique est capable de prévenir le brunissement oxydasique de divers tissus végétaux. La vitamine C, inhibitrice, est à son tour protégée contre l'oxydation par la TU (85, 116, 6).

Outre la vitamine C déjà citée, nous connaissons comme substances capables de prévenir la mélanogénèse, les corps à groupe -SH en général.

— TU:

Enfin, cet aperçu très sommaire doit mentionner que la TU occupe une place de choix dans la liste des inhibiteurs de ces réactions.

Dans le but d'élucider quelque peu le mécanisme inhibiteur nous avons d'abord étudié les faits déjà connus ou trouvés par nous-même pour les intégrer ensuite dans les théories essayant d'expliquer d'une façon générale les phénomènes d'inhibition enzymatique. Nous en consignons les résultats dans le paragraphe ci-dessous:

b) *Inhibiteurs, la TU en particulier.*

Nous devons à DUFRAISSE (93*b*) commenté par LAVOLLAY (133) une revue intéressante des théories expliquant les réactions anticatalytiques, et avons basé sur celles-ci l'exposé de nos recherches concernant l'action antagoniste de la TU.

Les théories sont les suivantes:

1. *Théories dans lesquelles on attribue au corps empêchant un rôle passif.*

α) Le vernis protecteur des surfaces actives (241).

β) L'écran s'interposant entre les voies de propagation de l'énergie (160).

Ces deux explications, purement verbales, ne sont pas des hypothèses fécondes et doivent être rejetées.

2. *Théories par lesquelles on attribue à l'inhibiteur un rôle actif.*

α) L'empoisonnement au cours des oxydations.

La théorie, trop imprécise, ne peut être retenue.

β) Déviation de l'oxydation; de WYSS-CHODAT et F. CHODAT (265).

L'addition d'acide ascorbique au système tyrosinase-paracrésol-glycocolle entrave sa coloration, mais augmente considérablement sa consommation d'oxygène. La vitesse de la disparition de l'oxygène dépend de la quantité de paracrésol présent. La quantité absorbée est d'autant plus considérable qu'il y a plus de vitamine C.

Il s'agirait en ce cas d'une déviation de l'activité du ferment au profit de l'acide ascorbique plus oxydable que le paracrésol. L'oxygène bifurque vers la vitamine oxydable, seulement après avoir été accepté par le phénol; par conséquent ce dernier est réduit par la vitamine C. Aussi longtemps que l'acide ascorbique n'a pas été oxydé, les corps phénoliques du système sont soustraits à une oxydation plus complète et ne forment pas, en conséquence, des pigments prémélaniques.

Cette notion, intéressante à plus d'un titre, nous permet d'interpréter la disparition progressive, apparente, de l'effet protecteur sur la mélanogénèse de maintes substances, dont la TU.

γ) La neutralisation ou immobilisation d'un catalyseur positif.

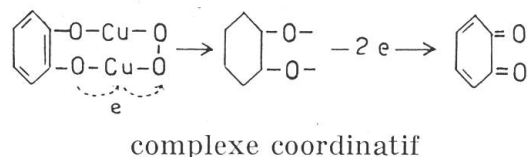
L'inhibiteur se combine ou forme un complexe avec le catalyseur et le mettrait hors d'état d'agir. La théorie a surtout été défendue pour les oxydations catalysées par Cu et Fe. Par exemple, le catalyseur négatif agit sur le Cu, catalyseur positif (238). Si l'on admet que l'agent catalyseur est un peroxyde formé aux dépens du substrat (autocatalyse), ainsi que DUPONT, LÉVY et ALLARD (68, 70, 71) l'ont établi dans le cas de l'acide abiétique, l'inhibiteur se lierait au peroxyde et le « paralyserait » (68) en donnant une combinaison inactive (69).

Le contrôle de la chaîne de réactions résumant l'oxydation du paracrésol (p. 18) nous indique aussitôt que le peroxyde (quinone) catalyse la deuxième partie de la réaction, en réoxydant la quinone réduite par la condensation avec H₂R. La substitution de H₂R par la TU aurait pour résultat de bloquer le peroxyde formé, qui ne peut plus se réoxyder ou se cycliser.

δ) Formation de complexe (théorie de SZENT-GYÖRGYI) (235).

Pour cet auteur, les phénomènes d'oxydation déshydrogénante présentent un intérêt majeur. Or, ceux-ci sont catalysés par des ferments constitués par un métal (Cu, Fe) lié à un support organique. La partie

active de l'enzyme ainsi formé, se lie provisoirement au substrat en une seule molécule. Il se produit alors, à l'intérieur du complexe, un échange d'électrons par l'intermédiaire du cation, aboutissant à un déplacement d'H du substrat sur l'accepteur; la réaction serait la suivante, d'après SZENT-GYÖRGYI, où nous avons remplacé le Fe par le Cu dont on connaît aussi l'affinité pour les phénols (hydroquinone par ex.) (5).



Réaction qui est d'ailleurs en accord avec la théorie proposée par WOOLF (262) que la catalyse des réactions enzymatiques consiste en une série d'échanges tautométriques à l'intérieur d'un complexe formé par le ferment et son substrat.

L'action antagoniste s'explique dès lors par la coordination de la molécule d'inhibiteur (TU). Ce sera soit avec le complexe autoxydable pour aboutir à un complexe mixte moins oxydable que le premier, soit encore avec le Cu, par exemple, pour former des combinaisons moins dissociées.

En somme, l'inhibiteur peut exercer son effet des façons suivantes: soit qu'il entre en concurrence avec le substrat vis-à-vis du métal dont il accapare une partie, ou qu'il prenne la place de l'oxygène à l'intérieur du complexe.

ε) Désactivation ou inactivation du substrat.

Deux théories concourent à l'explication:

1. Théorie de MOUREU et DUFRAISSE (167, 168, 169, 93*b*) ou des antioxygènes.

Chacun est d'accord pour penser que l'accomplissement d'une réaction quelconque implique la nécessité, pour les molécules qui y prennent part, de passer préalablement par un état « activé ».

En l'absence de ferment, le peroxyde primaire formé, substrat-O₂, s'unit à l'antioxygène en fournissant le composé suivant: substrat-O₂-antioxygène où l'inhibiteur disputerait au substrat la possession de O₂, aboutissant au peroxyde O₂-antioxygène lequel se dissocierait à son tour. Il faut pourtant que le corps inhibiteur ait une certaine affinité pour l'oxygène (170) comme c'est le cas de la TU (32, 33, 34).

2. Théorie de BAUR (12) ou de l'anticatalyse.

Cet auteur préfère les termes d'anticatalyseur, d'inhibiteur ou de désensibilisateur qui sont synonymes. Ce qui montre bien que pour lui, le point d'attaque de l'inhibiteur est la molécule « activée » du substrat.

BAUR et Coll., dont OBRECHT (180), ont montré que les désensibilisateurs sont constitués en principe par les substances susceptibles de donner lieu à un équilibre redox, et l'anticatalyse s'expliquerait par une oscillation entre deux degrés de valence.

C'est ce qui a lieu pour les métaux dont l'action catalytique est bien connue. Le Cu, par exemple, peut passer de la forme Cupro à la forme Cupri. La fonction amine $-NH_2$ à la fonction imine $=NH$, etc. Pour la TU, nous admettons que ce pourrait être la transposition amine-imine suivante:



Loin de s'opposer entre elles, les théories que nous avons exposées se complètent mutuellement, car elles ne sont que le résultat d'apparences différentes d'une même réalité. Par exemple, les deux dernières explications présument que la TU se porte sur le substrat activé.

Nous retenons en outre une nouvelle notion intéressante, à savoir que l'équilibre redox a pour base l'instabilité des électrons. La plupart des théories précédentes sont complétées de façon satisfaisante par cette labilité électronique révélée en 1924 par WENDT et GRIMM (251).

En somme, les hypothèses ci-dessus contiennent chacune une part de vérité dont nous réunissons les éléments de la manière qui suit:

ζ) L'inhibiteur exerce une double action.

Sur un dérivé du substrat (quinone), comme nous autorisent à l'admettre:

— l'hypothèse de la neutralisation d'un catalyseur positif de DUPONT, LÉVY et ALLARD,

— les observations de CHODAT (45) et les nôtres (E.VIII.7.2,7.6 et X.1.7),

— les théories de MOUREU et DUFRAISSE puis de BAUR,

— l'affinité du groupe $-SH$ pour les quinones (225, 128, 222),

— les résultats de KAWEREAU et FEARON (116) montrant qu'il y a combinaison entre l'acide déshydroascorbique et la TU protectrice,

— les constatations de DENNY (62) que le peroxyde serait « détruit » par la TU dans le système peroxyde-peroxydase des pommes.

Sur le groupe actif du ferment (Cu), ainsi que nous pouvons l'accepter selon :

— la conception de SZENT-GYÖRGYI et, si l'on veut bien admettre le Cu^{++} comme un peroxyde, selon les trois autres hypothèses déjà envisagées plus haut,

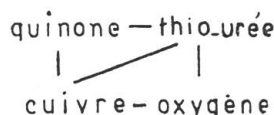
— notre constatation que la TU inhibe le ferment (E.X.1.7),

— l'affinité notoire de la TU pour le Cu.

Il est possible de synthétiser ces deux aspects du problème en un seul, en les confrontant avec la théorie de SZENT-GYÖRGYI.

En effet, cet auteur admet la formation d'une molécule coordonnée du ferment et du substrat à laquelle s'adjoint l'oxygène. Or, il se peut très vraisemblablement que la TU s'incorpore à la molécule coordonnée, soit en prenant la place de l'oxygène, soit d'une autre façon, agissant ainsi à la fois sur la quinone ou le phénol, et sur le Cu du ferment.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons dire que la TU se porte sur les deux éléments actifs du mélange: le phénol ou sa quinone et le Cu, qu'ils soient isolés ou réunis sous forme de complexe



En ce qui concerne plus spécialement cette double action concomitante de la TU, notre interprétation se trouve confirmée :

1. par la confrontation des théories actuellement en cours sur le mécanisme de l'oxydation des corps phénoliques en particulier. Nous venons en effet de relever plusieurs explications principales qui sont « synthétisées » par l'opinion que nous avançons ;

2. par notre observation que la TU agit à la fois sur le ferment et sur le substrat ou ses dérivés (E.X.1.7) ;

3. par la constatation d'une dissociation de l'effet du méthylthio-uracile (E.VIII.7.7) dont l'activité inhibitrice ne se porte que sur le premier stade enzymatique de la réaction, à l'exclusion de la deuxième partie autocatalytique.

La dissociation est la preuve d'un double effet dont l'un est perdu. La molécule est privée alors d'une particularité à laquelle il est permis d'attribuer l'action disparue.

Quelles sont ces particularités et quelle fraction de la molécule de TU peut-on rendre responsable de l'inhibition ?

c) *Action particulière de quelques inhibiteurs voisins de la TU.*

Dans le but d'étayer notre opinion par des données positives, nous effectuons ici une revue préalable des inhibiteurs principaux de l'oxydation des phénols, en ne retenant que ceux dont l'action ne prête pas à contestation et dont le groupe actif présente quelque analogie avec une fraction de la molécule de TU.

Parmi ceux qui sont désormais classiques, il faut mentionner en tête de liste divers groupes chimiques importants.

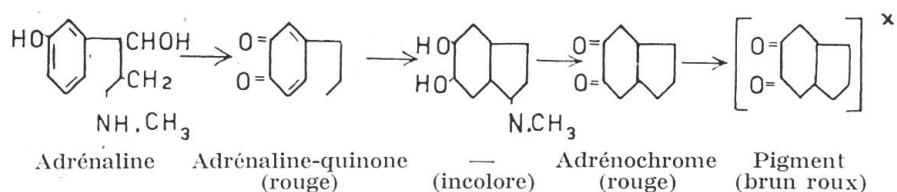
 α) Le H_2S et en général le groupe thiol.

Il y a longtemps que l'on connaît l'action de ce groupe sur la réaction phénol-phénolase. CHODAT (49) en 1912 avait remarqué incidemment que la cystine entravait sa réaction. Puis RICHTER (213) rapporte qu'en outre de l'inhibition due à H_2S et décrite par KEILIN (117), l'oxydase de pomme de terre est inactivée par la cystéine, l'acide thiolacétique, etc.; F. CHODAT (44) a trouvé que c'était le cas également pour le glutathion.

 β) Les acides aminés, et en général le groupe amine.

Ces acides aminés, substances biologiques par excellence, sont aussi des agents inhibiteurs.

Certains d'entre eux paraissent exercer une action favorable sur l'apparition du pigment, parce qu'ils se combinent à la quinone formée; comme c'est le cas pour la tyrosine ou l'adrénaline (92) par exemple.



Nous ne mentionnerons qu'en passant les travaux importants publiés sur ce sujet par RAPER (205), ADAMS et NELSON (3), MILLER et DAWSON (162), etc.

En 1898, BIGELOW avait déjà reconnu le pouvoir protecteur des amines sur l'oxydation du sulfite de Na (28).

En ce qui concerne plus particulièrement l'action de la fonction amine sur les phénols, ABDERHALDEN et GELLHORN (1) ont démontré en 1923 que le plasma ou le sérum sanguin ajouté à la solution d'adrénaline, la protège contre l'oxydation à l'air. Pour LAVOLLAY (133), entre autres (260), les acides aminés se combineraient à l'adrénaline. C'est ce que prouvent en effet les observations de HAUSMANN (101): la réaction de CHODAT est ralentie lorsque le glycolle et le paracrésol sont en quantités

équimoléculaires; il suffit qu'il y ait une disproportion entre les deux corps pour que la formation de crésol-azur soit favorisée.

CHODAT et d'autres auteurs (51, 201) ont établi que les orthodiphénols ont la propriété de réaliser l'oxydation des acides aminés en les désaminant, par la quinone qui reconstitue le phénol lui-même. LAVOLLAY remarque que ce genre d'inhibition « offre un des rares exemples où l'on puisse invoquer une réaction entre l'inhibiteur et le produit d'oxydation du substrat ».

Pour OBRECHT (180), qui s'occupe des substances possédant le groupement aminé susceptible de donner un équilibre redox par le passage de cette fonction à la fonction imine, comme les phénols en quinones, les énols en cétones, les sulfhydryles en disulfures, et comme c'est également le cas pour la guanidine, la phénylurée, etc., il y aurait désactivation des molécules actives du diphénol par oscillation de la fonction entre une forme amine (réduite) et imine (oxydée). Selon nous, l'hypothèse ainsi formulée ne s'oppose pas à la possibilité d'une transposition mésomérique, bien au contraire; ni à la formation d'une combinaison quinone-groupe amine.

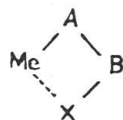
Afin de ne pas omettre une particularité de la formule de TU nous devons aussi envisager l'action du groupe $S=C<$, plus particulièrement caractéristique de la TU.

γ) Groupe $S=C<$

Il est commun à nombre de substances biologiques importantes, et à de multiples réactifs de la chimie analytique.

La dithioamide, l'éthylxanthogénate, la dithizone, etc., contiennent ce groupe et sont des réactifs colorimétriques importants des métaux avec lesquels ils forment des complexes.

Pour LEY [d'après WINKLER (261)] il s'agit d'une combinaison dont la formule générale est la suivante:



X représente le groupe auquel est fixée la valence secondaire $\dots OH$, $\dots OC=$, $\dots NH_2$;

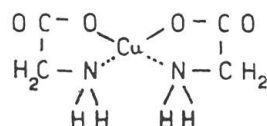
A: le groupe qui cède H et lié au métal (Me) par la valence principale, par ex.: $-O-$, $-S-$, $-N-$, etc.;

B: le reste de la molécule organique.

Les substances mésomères entre autres donnent de tels complexes internes dont la nature peut varier selon le pH du milieu.

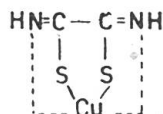
Il est important de constater que nombre de ces produits possèdent le groupe $S=C<$, lequel participe activement à la formation du complexe en même temps que le groupe amine.

Par exemple BRISKAS (196) signale un composé avec le glycolle et le Cu qui, selon LEY, aurait la formule suivante:

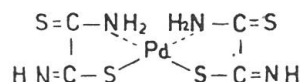


Mentionnons quelques formules de complexes ainsi formés (179).

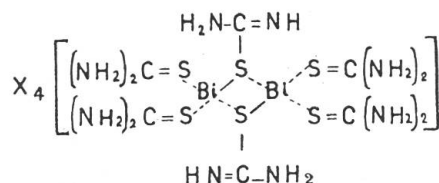
Acide rubéanique avec Cu



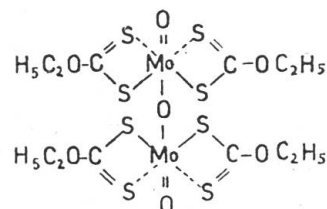
Acide rubéanique avec Pd



Thio-urée avec Bi



Xanthogénate de K avec Mo



d) *Mécanisme de l'effet inhibiteur de la TU.*

Nous sommes obligé de constater une analogie frappante entre la formule des inhibiteurs que nous venons d'envisager et celle de la TU, ceci pour les raisons suivantes:

α) le groupe thiol peut exister dans certaines conditions chez la TU puisque nous connaissons le disulfure de formamidine,

β) le groupe amine est doublement présent dans la molécule de TU,

γ) en outre le groupe $S=C<$, caractéristique de la TU, participe à la formation de complexes métalliques. Il est toujours présent dans la plupart des substances possédant un pouvoir inhibiteur,

δ) enfin, l'oscillation redox d'OBRECHT est tout aussi évidente puisque la TU présente le phénomène de mésomérie, moins prononcé certes que chez certains autres produits, mais suffisant pour qu'il puisse y avoir une oscillation entre $-NH_2$ et $=NH$ avec apparition et disparition du groupe thiol également actif. (En somme, l'H actif (électron), qu'il soit sur le groupe amine ou le groupe thiol, serait toujours apte à former un groupe inhibiteur.)

Il nous a paru intéressant, de prime abord, d'éprouver nous-même les différents dérivés de la TU, sur la réaction de CHODAT, afin de contrôler nos convictions quant à l'efficacité des différents groupes d'atomes constituant la molécule de TU.

Voici un tableau résumant les résultats de nos investigations:

| Substances | Inhibition de la réaction de CHODAT | Expériences |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Thio-urée | + | VIII.7.2, etc. |
| Urée | 0 | VIII.7.8 |
| Phénylthio-urée | ++ | VIII.7.9 |
| Phénylurée | 0 | VIII.7.7 |
| Diphénylthio-urée sym. | 0 | VIII.7.9 |
| Allylthio-urée | ++ | VIII.7.7 |
| Phénylsemicarbazide (cryogénine) | 0 | VIII.7.7 |
| Diphénylthiocarbazide | + | VIII.7.7 |
| Diphénylcarbazide | 0 | VIII.7.7 |
| Diphénylthiocarbazone | ± | VIII.7.7 |
| Diphénylcarbazonne | 0 | VIII.7.7 |
| Semicarbazine HCl | ? | VIII.7.7 |
| Diéthylthiocarbamate de Na | ++++ | VIII.7.7 |
| S-méthylpseudothio-urée | 0 | VIII.7.6 |
| « 133 WANDER » (Thiomidil). | + | VIII.7.7 et 10 |
| Méthylthio-uracile | + | VIII.7.10 |
| Thio-uracile | + | VIII.7.10 |
| Uracile | 0 | VIII.7.7 |
| TMTD | ± | VIII.7.8 |
| Isothiocyanate d'allyle | ± | VIII.7.8 |
| Thiocyanate d'ammonium | 0 | VIII.7.8 |
| Acide p-sulfanilique | ? | VIII.7.8 |
| Carbonate de guanidine | 0 | VIII.7.8 |
| Caféine | 0 | VIII.7.8 |
| 8-oxyquinoléine | ++ | VIII.7.10 |

Afin de déterminer l'action vraisemblable exercée par les diverses particularités de la molécule de TU, nous allons confronter les données du paragraphe précédent avec celles du tableau ci-dessus.

L'action sur le substrat et le ferment sera étudiée séparément pour la clarté de l'exposé, sans que nous préjugions que la TU ait une action distincte et consécutive sur chacun de ces éléments.

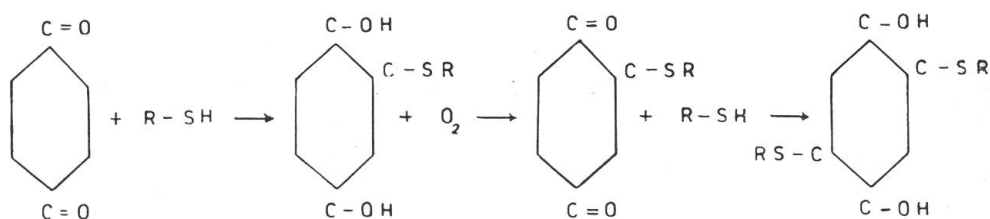
α) TU et groupe -SH

Nous ne reviendrons pas sur la discussion tendant à déterminer si, et dans quelles conditions, apparaît le groupe thiol, mais, lorsqu'il est présent, nous pouvons admettre que son action se porte sur différents points tels que:

1. Le Cu du ferment auquel il se combine d'après la formule classique:



2. La quinone selon SNELL et WEISSBERGER (225) qui ont démontré la réaction suivante:



Réaction dont la confirmation a été faite récemment (128); et plus spécialement sur la TU par SCHUBERT (222).

Enfin, de tout récents travaux, parus après l'achèvement de notre thèse, viennent apporter une confirmation éclatante de l'importance biologique de cette réaction. Des quinones par exemple, comme la fumigatine dont on a reconnu les propriétés antibactériennes, agissent en bloquant les substances à fonction thiol (83), qui sont donc à leur tour capables d'inactiver divers antibiotiques quinoniques.

Ce groupe thiol peut donc se porter à la fois sur le ferment et sur le dérivé du substrat, d'où l'extrême activité de son action inhibitrice reconnue par l'unanimité des auteurs.

β) TU et groupe -NH₂

Il y a deux groupements aminés dans la molécule de TU. Leur action se porte sur divers points à savoir:

1. Sur la quinone selon la réaction classique qui a lieu entre les acides aminés ou protéines (107 p. ex.), et la quinone qui est alors réduite pour être à nouveau réoxydée par le ferment à condition que celui-ci soit encore actif.

Le fait de la participation du groupe amine de la TU à cette réaction est prouvé par l'observation que son action protectrice est rendue moins efficace par le glyocolle (E.X.1.9). Il semble donc qu'il y ait compétition entre la TU et certains acides aminés durant l'oxydation enzymatique du catéchol.

2. Sur le Cu du ferment avec formation d'un complexe du type de ceux signalés par BRISKAS (LEY) (196).

3. Sur le complexe de coordination selon SZENT-GYÖRGYI où la TU ferait un pont entre la quinone et le Cu.

Les substituants qui portent sur cette fonction atteignent difficilement le pouvoir inhibiteur de la substance même, à moins qu'ils n'englobent les deux H du même groupe amine pour aboutir à la formation de $R-N=R'$ comme dans la diphénylthiocarbazonne ou l'isothiocyanate d'allyle.

Si la substitution est du type $R-N \begin{matrix} R' \\ < \\ R'' \end{matrix}$ (diéthylthiocarbamate de Na) et, de plus, voisine avec la substitution du groupe $R-NH_2$ par $-SNa$ ou $-SK$, l'action est au contraire considérablement renforcée.

Par contre, nous ne pouvons nous prononcer définitivement, à cause de sa très faible solubilité, sur le cas de la diphénylTU sym. où la substitution symétrique d'un H par le radical phényle abolit (?) l'effet inhibiteur.

γ) TU et groupe $S=C<$

Celui-ci est tout particulièrement réactif avec le Cu du ferment et d'une façon plus générale avec de nombreux cations.

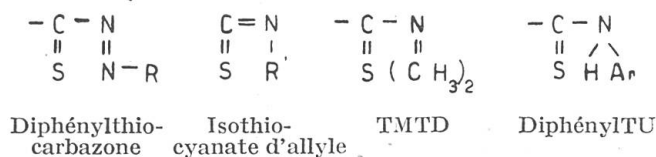
C'est ainsi que l'éthylxantogénate (237) et le diéthylthiocarbamate (E.VIII.7.7) (237) inhibent la réaction alors que le Cu la réactive (237).

Ce groupe $S=C<$ se retrouve dans nombre de substances biologiques importantes; l'isothiocyanate d'allyle, principe de l'essence de moutarde des crucifères, inhibe légèrement la réaction de CHODAT, l'allylTU beaucoup plus.

La substitution de l'oxygène au soufre (urée, uracile, etc.) ou par $=NH$ (guanidine), abolit l'action inhibitrice dans chaque cas examiné

(voir tableau ci-dessus). Réciproquement, chaque fois que l'on rencontre le groupe $S=C<$ on peut admettre qu'il est le plus souvent inhibiteur (huit cas sur douze dans nos expériences). Les exceptions sont: la diphénylthiocarbazone, l'isothiocyanate d'allyle et le TMTD chez lesquels le pouvoir inhibiteur est très faible, ainsi que la diphénylTU sym. où nous n'avons pu le mettre en évidence. Notons que ces deux derniers produits sont extrêmement peu solubles en milieux aqueux, ce qui expliquerait en une certaine mesure l'échec enregistré.

Il n'en reste pas moins que le groupe $S=C<$ est nécessaire au pouvoir inhibiteur, mais qu'il n'est pas toujours suffisant. En effet, l'examen des quatre substances dont l'activité est affaiblie nous montre les formules suivantes:



De plus, si l'on étudie la forme mésomère stable de la TU, c'est-à-dire la S-méthylpseudoTU, $\begin{array}{c} -C=N \\ | \quad | \\ H_3C-S \quad H \end{array}$ on constate que l'effet inhibiteur est inexistant (E.VIII.7.6).

Si l'on excepte la diphénylTU, on constate chez tous les autres produits l'une des deux particularités intéressantes suivantes:

1. l'H du groupe amine est substitué par CH_3 ;
2. il est difficile de faire osciller les formules par transfert d'H avec réarrangement consécutif des doubles liaisons.

En somme il convient de penser que le groupe actif est tricentrique ($S=C-N$) et qu'en son intimité il se produit des transferts d'électrons, formant ainsi le couple mésomère suivant:



Notons que le groupe C_2H_5 est mobile (53) et se trouve dans la formule de corps très actifs (diéthylthiocarbamate de Na par ex.), tandis que le $-CH_3$ ne semble pas jouir de la même labilité.

Presque toutes les combinaisons d'atomes de C, N et O peuvent aussi former des systèmes généralisés du type allylique dans lesquels on rencontre des phénomènes de mésomérie (93a).



C'est en fait la résonance entre ces diverses parties de la molécule qui conditionne la mésomérie, ou encore pseudomérie. Celle-ci résulte d'une particularité dans les couches électroniques entourant chaque groupe d'atomes, couche dénommée π par les spécialistes.

C'est ainsi que nous pouvons écrire pour la TU et la pseudoTU les formules respectives développées de la façon suivante:



équilibre auquel participent les divers groupes d'atomes $\text{S}=\text{C}<$ et $-\text{NH}_2$ déjà envisagés séparément.

Les possibilités offertes par les différentes fonctions chimiques propres à la TU ne nous paraissent pas encore suffisamment éclaircies, si l'on n'envisage pas à présent la nature des corps formés au cours de la réaction inhibitrice.

Nous pouvons dire, à cet effet, que la TU donnerait vraisemblablement lieu à des complexes, portant sur les deux éléments de la réaction, du type

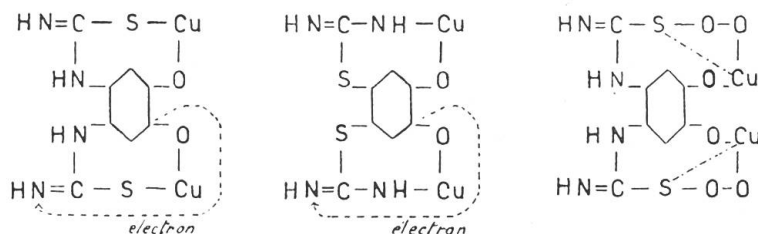
suivant: $\begin{array}{c} \text{quinone} \text{ --- TU} \\ | \\ \text{Cu} \end{array}$ plutôt que d'admettre un effet séparé sur chacun de ces éléments.

Afin d'essayer de nous représenter la nature de ce complexe, on peut résumer de la façon suivante les affinités des divers groupes:

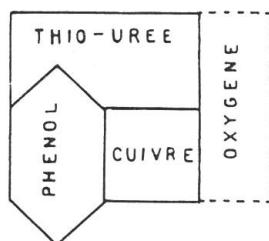
| | | Affinité pour: | |
|--------|----------------------------------|----------------|--------------|
| | | quinone | Cu (ferment) |
| Groupe | { amine | ++ | + |
| | { thiol | + | ++ |
| | { $\text{S}=\text{C}<$ | — | + |

C'est-à-dire que les groupes $\text{S}=\text{C}<$ et $-\text{SH}$ ont un peu plus d'affinités pour le Cu, et le groupe $-\text{NH}_2$ pour la quinone. Il est extrêmement hasardeux de dire qu'un groupe se porte plus particulièrement sur tel catalyseur, mais il nous est toutefois permis de supposer qu'un com-

plexe prend naissance dans lequel le $S=C<$ se lie *plus particulièrement* au Cu et le $-NH_2$ au phényle, selon une des possibilités suivantes :



Molécule coordonnée, dans laquelle le transfert de l'électron a lieu selon des voies différentes de celles habituelles. Cette molécule complexe ainsi formée peut être représentée plus généralement par le schéma suivant :



Ces formules, bien qu'hypothétiques, méritent d'être contrôlées par des expériences physico-chimiques (parachor, spectres RAMAN, etc.), qui en détermineront la valeur.

Certes, nos hypothèses sont basées sur l'observation et la conduite logique des phénomènes naturels provoqués dans cet ordre d'idées. Les tentatives d'explications de l'action inhibitrice ont été revues et étayées par les faits. Notre opinion permet, en confirmant SZENT-GYÖRGYI, de remarquer que les différents auteurs n'ont envisagé qu'un des aspects de la réalité, et que leurs opinions sont généralement justes, sans qu'elles s'excluent l'une l'autre.

Nous avons confiance que les explications proposées ici quant à l'action de la TU soient complétées et vérifiées dans un proche avenir.

II. In vivo ; sur la pigmentogénèse de l'A.n.

Nous pensons avoir élucidé certains points essentiels en ce qui concerne les rapports étroits entre la mélanogénèse enzymatique et l'action inhibitrice (*in vitro*) de substances telles que la TU sur ce phénomène.

Mieux encore, nous avons d'ores et déjà éprouvé l'effet inhibiteur de dérivés de la TU (*in vivo*) sur la pigmentation du liquide de culture de l'A.n.

Les résultats sont mis en comparaison, dans le tableau suivant, avec ceux obtenus sur la réaction de CHODAT.

| Substances | Inhibition de la pigmentation de l'A.n. | Correspondance avec la réaction de CHODAT | Expériences |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|------------------|
| Thio-urée | + | + | II.14.1, 2, etc. |
| Urée | 0 | + | II.14.4 |
| Phénylthio-urée | + | + | II.14.2 |
| Phénylurée | + | 0 | II.14.3 |
| Diphénylthio-urée | 0 | + | II.14.2 |
| Allylthio-urée | + | + | II.14.3 |
| Phénylsemicarbazide (cryogénine) | ± | ± | II.14.3 |
| Diphénylthiocarbazide | (+) ¹ | + | II.14.3 |
| Diphénylcarbazide | ± | ± | II.14.3 |
| Diphénylthiocarbazone | ? | ? | II.14.3 |
| Diphénylcarbazonne | + | 0 | II.14.3 |
| Semicarbazine HCl | + | ? | II.14.4 |
| Diéthylldithiocarbamate de Na | (+) | + | II.14.3 |
| S-méthylpseudothio-urée | 0 | + | II.14.1 |
| « 133 WANDER » (Thiomidil) | 0 | 0 | II.14.3 et 4 |
| Méthylthio-uracile | 0 | 0 | II.14.4 |
| Thio-uracile | 0 | 0 | II.14.4 |
| Uracile | 0 | + | II.14.3 |
| TMTD | (+) | ± | II.14.3 |
| Isothiocyanate d'allyle | — | — | — |
| Thiocyanate d'ammonium | + | 0 | II.14.4 |
| Acide p-sulfanilique | 0 | ? | II.14.4 |
| Carbonate de guanidine | 0 | + | II.14.4 |
| Guanine | 0 | — | II.14.3 |
| Caféine | + | 0 | II.14.3 |
| 8-oxyquinoléine | (+) | + | II.14.4 |
| Cystéine HCl d.l. | + | — | II.10.4 |
| Cystine | + | — | II.10.1 et 2 |

Il en résulte qu'une similitude d'action *in vitro* et *in vivo* se manifeste dans dix cas (à l'exclusion de la 8-oxyquinoléine qui fait partie d'une famille différente); six des produits fournissent des résultats douteux et sept ont un comportement opposé.

Parmi ces derniers on peut distinguer deux groupes:

¹ (+) signifie: pas de croissance.

1. Les substances qui n'inhibent pas ou peu la réaction enzymatique *colorée* mais entravent la pigmentation de l'*A.n.*, probablement par une action toxique de nature différente; tels sont la phénylurée (exception apparente, puisqu'elle inhibe l'oxydation des phénols selon OBRECHT), la diphénylcarbazonne, le thiocyanate d'ammonium et la caféine.

2. Les substances qui inhibent quelque peu la réaction de CHODAT à l'exception de la pigmentation chez l'*A.n.* Ici se trouve le thio-uracile et, bien entendu, le Thiomidil. L'action de ces produits semble être beaucoup plus délicate et ne se manifeste apparemment par aucun effet toxique sur l'*A.n.*

L'étude plus approfondie du mode d'action de divers corps chimiques sur l'*A.n.* nous permet d'ouvrir la discussion ci-dessous, en tenant compte plus spécialement de la TU.

Nous devons d'emblée distinguer deux modalités d'action de la TU, les actions biochimiques et les effets physiologiques.

a) *Action biochimique ou action directe.*

Il nous est désormais permis d'admettre un certain parallélisme entre les actions *in vitro* et *in vivo* quant à la TU et quelques-uns de ses dérivés sur la mélanogénèse; ce qui nous incite, en outre, à supposer que l'action doit se faire *in vivo* directement sur le système phénol-phénolase, d'une façon analogue à la réaction de CHODAT.

Les expériences suivantes viennent confirmer cette opinion:

- la TU inhibe l'oxydation du paracrésol par la monophénolase du liquide de culture (E.X.6.1) et par celle des conidies (E.VII.2.8);
- la TU inhibe *in vivo* la transformation du catéchol par l'*A.n.* (E.XV.1.2').

En ce qui concerne le cuivre, dont on sait qu'il forme aisément des complexes avec la TU, l'examen du tableau ci-dessous groupant les propriétés respectives du Cu et de la TU par rapport à l'*A.n.* nous révèle des qualités diamétralement opposées.

| Cu | TU |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| favorise la formation et la pigmentation des conidies (cf. p. 20); | provoque la diminution de la pigmentation des conidies ou la stérilité (photo III); |
| forme la fraction prosthétique des phénolases (126,127); | inhibe la réaction phénol-phénolase, en se portant sur le ferment (E. X. 1. 7). |

Enfin le Zn, qui fournit également des complexes avec la TU, présente les mêmes oppositions.

| Zn | TU |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| diminue l'acidité du liquide (249); favorise la consommation des sucres (109, 110); favorise la pigmentation (36, 154); | augmente l'acidité du liquide (78'); ralentit et altère la dégradation des sucres (46) (E. II. 1. 8 et 2. 10); inhibe la pigmentation (photos I et II); |
| augmente la respiration d'A. n. (249). | diminue la respiration de l'A. n. (E. VI. 1. 1). |

Considérant par exemple l'action de la TU sur le Zn, nous constatons que ce dernier métal, contrairement au Cu, ne semble pas participer directement à la pigmentation, mais paraît créer les conditions favorables à ce phénomène. Or donc, nous saisissons ici l'*action directe* de la TU sur un facteur de second ordre. Mais les choses sont plus complexes si nous nous demandons quelle peut être l'action de la TU sur un facteur de l'ordre suivant tel que le phénomène de la consommation du glucose, lequel résulte et se décompose lui-même en facteurs multiples de divers ordres. C'est cette tentative d'explication que nous abordons à présent.

b) *Action physiologique ou action indirecte.*

La TU, tout comme chez l'homme, où elle ralentit le métabolisme basal et épargne les combustions, diminue, chez l'A.n., la respiration et retarde la consommation du glucose.

Le résultat se traduit, chez l'A.n., en particulier par une accumulation de produits intermédiaires: les acides organiques (citrique, etc.) acidifiant fortement le liquide dont le pH devient dès lors défavorable aux phénomènes enzymatiques de la mélanogénèse.

Une seconde conséquence, entre autres, est un retard dans la disparition du sucre; à laquelle succède la « respiration des protéines » ou autolyse qui est un des facteurs de la pigmentation.

D'autre part, nous avons montré (78') les propriétés fongistatiques de la TU, autrement dit son action retardatrice sur la croissance d'A.n. dont dépendent l'autolyse et la pigmentation par conséquent.

En effet, les éléments nécessaires à la vie, ou métabolites essentiels peuvent subir une réduction plus ou moins grande de leur activité sous l'influence de la TU laquelle peut se substituer à eux par intrusion, c'est-à-dire les concurrencer. Les ténuités des actions antimétaboliques par concurrence en rendent l'étude difficile. Nous avons en cours l'étude de plusieurs facteurs de ce genre, mais ne pouvons encore nous prononcer définitivement sur l'action de quelques-uns d'entre eux.

c) *Action de la TU sur l'un des facteurs de la pigmentation : l'autolyse.*

Avant de terminer notre travail, nous jugeons intéressant et opportun de nous attarder à discuter l'action de cette substance sur un des phénomènes complexes qui semblent régir directement la pigmentation du liquide: c'est l'autolyse.

Nous avons en effet observé que le changement de teinte ne se produit pas sans que l'on constate l'autolyse du mycélium. D'autre part, l'autolyse elle-même peut se produire sans qu'il y ait consécutivement pigmentation (autolyse acide).

Nous avons tenté de dissocier ce phénomène en un nombre aussi grand que possible de ses éléments, puis avons discuté pour chacun d'entre eux, pris individuellement, l'action probable de la TU. Enfin, ayant admis l'effet inhibiteur de la TU sur l'autolyse comme étant la somme de toutes les actions élémentaires connues ou encore à déterminer, nous nous trouvons une fois de plus devant un exemple de complexité des phénomènes de la vie que nous allons nous efforcer de pénétrer, sans nous dissimuler pourtant la difficulté de cette étude.

α) *Action sur un ferment de l'autolyse (la papaïne).*

L'autolyse est *pro parte* le résultat de l'action de ferments protéolytiques dont l'un d'eux, semblable à la papaïne, joue un rôle prééminent en raison du pH qui règne au moment de ce phénomène (pH=5-6).

Si nous prenons la papaïne comme exemple, nous savons que c'est un ferment qui nécessite des activateurs. La nature de cette activation est de ramener ou de maintenir les groupes actifs (-SH) de ce ferment à l'état réduit. On peut citer entre autres activateurs le H₂S (153) et d'une façon plus générale les substances comportant le groupe thiol, en particulier la cystéine (89). Les métaux lourds, par contre, sont désactivateurs (125).

La TU, en tant que produit susceptible de posséder ce groupe thiol peut jouer à la fois le rôle d'éliminateur de métaux lourds et, dans certaines conditions, celui de réducteur; elle devrait par conséquent activer la papaïne. Or, au contraire, elle inhibe son activité (152).

Cette anomalie apparente résulte du fait que cette substance peut, dans certains cas, jouer le rôle d'oxydant.

C'est ainsi que PIRIE (194) a noté qu'elle catalyse l'oxydation de la cystéine. Nous avons relevé en outre que le potentiel du couple TU-disulfure de formamidine est bien supérieur (200) à celui auquel l'inactivation du ferment est obtenue (209). C'est-à-dire que la TU pourrait agir directement sur les groupes thiols en les rendant inefficaces par oxydation.

Il faut donc remarquer le rôle important des substances redox (22); l'oxydation inhibant la protéolyse (9) dont le rH optimum est situé entre 13-16 (210).

On peut en conséquence tenir compte du rôle non moins capital joué par le pH. Or, la TU en perturbe la régulation biologique, comme nous l'avons montré chez l'*A.n.* (78') (E.XVI.5.1a) et l'avons maintes fois observé. Le résultat est une augmentation notable de l'acidité gênant l'activité de certains ferments protéolytiques (spécialement la papaïne).

β) Action sur les phénomènes respiratoires.

Une autre explication vraisemblable de l'effet inhibiteur de la TU sur la papaïne est que cette substance peut agir sur le système respiratoire succinodéshydrase-acide succinique, régénérateur de la papaïne (22), ou sur d'autres déshydrases qui réactivent le ferment en présence de donateurs d'hydrogène (d'après 20).

Ceci nous confirme en particulier l'existence d'un rapport étroit entre la protéolyse et la respiration, comme nous le laisse supposer l'observation des résultats expérimentaux obtenus par HÉE sur l'*A.n.* (102).

L'effet de la TU sur la respiration d'*A.n.* pourrait ainsi avoir pour conséquence une action sur l'autolyse de cette même moisissure. Nous avons en fait, étayé cette conclusion par une expérience au cours de laquelle il a été constaté que, si le catéchol à lui seul ne change guère l'autolyse, l'association catéchol + TU accélère ce phénomène contrairement à la TU seule (E.XV.1.2).

Or, nous avons précédemment discuté longuement du rôle respiratoire joué par les phénols; le catéchol en particulier. L'effet de la TU sur l'autolyse aurait lieu par l'intermédiaire de son action sur un des régulateurs redox de la respiration tel le catéchol.

γ) Action sur le développement et la vie même de la moisissure.

Enfin, remontant à l'origine, il nous est impossible de nier l'effet que la TU exerce sur la vie même du champignon, sa croissance en particulier (78'), dont dépend l'autolyse (149, 244).

Mais tous ces faits sont régis en somme par la nutrition.

δ) Action sur la nutrition.

On a pu se demander si la TU n'augmente pas l'autolyse, aux faibles concentrations, en fournissant un azote très assimilable comme celui de l'urée (E.II.13.1 et II.13.2).

En fait, nos expériences comparatives effectuées avec des quantités équimoléculaires d'urée et de TU ont appris que l'azote de cette dernière

est non seulement en quantité trop faible à ces concentrations où l'autolyse paraît maximum, mais encore qu'il est inassimilable s'il est fourni comme seul aliment azoté (214, 46).

Le rôle des hydrates de carbone est encore plus important car l'autolyse débute au moment où tout le sucre est consommé. Or, pour NICOLLE (177) il y aurait à ce moment une rupture d'équilibre entre les phénomènes d'assimilation et de désassimilation, rupture qui aboutit à l'autolyse (35).

ε) Action par interférence.

Une autre modalité d'action sur le ferment protéolytique pourrait résulter de son interférence avec le groupe $-NH_2$ actif de la papaine; le rôle de cette fonction amine a été envisagé par BERSIN et KÖSTER (21).

Dans le même ordre d'idées, la TU peut fort bien agir comme anti-métabolite par substitution de son groupe



agissant à la fois sur le cours de la protéolyse et sur la synthèse des acides aminés, et par voie de conséquence sur le métabolisme intime de l'azote.

ζ) Action sur une substance d'autolyse.

La TU peut enfin agir sur un produit, soit favorable à l'autolyse comme le Zn (213', 154) ou autres substances (178, 244), soit défavorable comme la cystéine (E.II.10.4); cette dernière serait oxydée par le champignon (E.II.10.4') en cystine inactive sur l'autolyse (E.II.10.1 et 2).

En somme, nous n'avons envisagé ici que quelques-unes des possibilités d'action de la TU sur l'autolyse, mais afin d'avancer plus sûrement dans la voie de la connaissance, il nous faudrait mieux connaître les facteurs de cette autodigestion, ce qui est loin d'être le cas dans l'état actuel de la science.

Aussi, nous ne pouvons conclure qu'en exprimant la conviction que l'effet apparent n'est que la somme d'actions élémentaires dont un certain nombre seulement peuvent être incriminées avec vraisemblance. Cette intéressante question de l'autolyse appelle un complément d'informations qui ne correspond plus au sens de nos recherches.

CONCLUSIONS

Notre travail comporte, comme toutes les recherches scientifiques, deux ordres de documents:

1. un rappel des expériences faites à ce jour, et de leur interprétation;
2. nos expériences personnelles.

On pourrait s'étonner de l'attention apportée dans cette étude aux notions tirées de la bibliographie.

Bien que chacun sache l'importance d'une documentation de ce genre, l'extension de ces commentaires nous a été littéralement imposée par la nouveauté du sujet.

Pour des raisons d'impression, il nous a même fallu supprimer une partie de cette mise au point pour n'en garder que l'essentiel. Notre but était en effet de réunir et coordonner les données connues se rapportant aux phénomènes relatifs aux actions de la TU sur les organismes vivants, végétaux en particulier.

Néanmoins, le travail que nous présentons ici constitue, à notre connaissance, le premier essai d'une étude d'ensemble relative aux actions biologiques de la TU. Il reste encore d'importants aspects à étudier, tels que son rôle physiologique chez divers champignons et bactéries entre autres. Aussi, connaissons-nous le caractère provisoire du plan adopté pour grouper quelques-uns des problèmes relatifs aux actions antimélaniques de la TU.

Voici le résultat des expériences que nous avons faites à ce propos:

I. Expériences préliminaires sur la mélanogénèse chez l'*A.n.*

a) Pigments de l'*A.n.*

Il existe plusieurs pigments mélaniques vrais:

1. la mélanaspergilline des spores;
2. la nigeraspergilline du mycélium et du liquide, elle-même comprenant au moins trois étapes intermédiaires.

b) Physiologie de la pigmentation du liquide et du mycélium.

La pigmentation:

1. débute quand le sucre est consommé;
2. est favorisée par une source d'azote ammoniacale et entravée par NO_3 ;
3. est intimement liée à l'autolyse neutre dont elle résulte.

II. Expériences sur les effets antimélaniques de la TU

a) Elle empêche le noircissement des champignons de couche.

Aussi avons-nous proposé:

1. une formule de liquide conservateur pour collections;
2. un traitement après cueillette, afin d'assurer une bonne présentation des champignons qui doivent rester blancs.

b) Elle inhibe diverses réactions enzymatiques catalysées par des phénolases, dont la réaction de CHODAT. Il en est de même pour certaines réactions d'autoxydation de corps phénoliques (DOPA).

c) Ayant étudié plus particulièrement la réaction de CHODAT, nous avons observé que l'inhibition est:

1. temporaire pour un système donné;
2. de durée variable suivant la force du ferment;
3. d'autant plus efficace que la quantité de TU est plus élevée.

d) Elle inhibe fortement la respiration aérobie de l'*A.n.*

e) Elle inhibe la formation et la pigmentation des conidies de l'*A.n.*

f) Elle inhibe aussi, entièrement à partir de 400 mgr/l, la pigmentation du liquide de culture et du mycélium, mais cet effet est d'autant moins efficace que le champignon est plus proche du moment où la pigmentation doit se produire (comme dans la réaction de CHODAT d'ailleurs).

g) Elle ne peut fournir son azote, inassimilable et en quantité insuffisante pour favoriser la pigmentation.

h) Elle retarde la consommation du glucose, et favorise l'accumulation d'acides organiques. En conséquence, elle entravera l'autolyse et la pigmentation qui sont étroitement liées à cette consommation.

i) Enfin, l'étude particulière que nous avons faite concernant l'action de la TU sur l'autolyse nous a montré que cette substance

agit différemment selon la dose employée et l'âge de la culture au moment même de l'addition de la substance.

1. Addition avant développement:

- α) de faibles quantités de TU stimulent l'autolyse;
- β) des quantités moyennes la paralysent ;
- γ) de fortes quantités (1⁰/₀₀) ont une action quelque peu protectrice.

On remarque que les concentrations de 400 mgr/l sont à la fois suffisantes pour protéger le champignon contre l'autolyse et inhiber sa pigmentation, confirmant encore la relation existant entre l'autolyse et la pigmentation.

2. Addition en fin de croissance:

Les réponses sont irrégulières, mais on peut toutefois en dégager que:

- α) il y a toujours, dès l'addition de TU, une diminution passagère de l'autolyse;
- β) de fortes concentrations augmentent l'autolyse;
- γ) de faibles concentrations la diminuent, si l'addition a lieu au cours de l'autolyse.

III. Expériences en vue d'interpréter les effets de la TU

- a) Nous avons montré que la TU paraît agir à la fois sur un dérivé du substrat (quinone) et sur le groupe actif du ferment (Cu); avec formation probable d'une molécule coordonnée groupant la quinone, le Cu, la TU et peut-être l'O.
- b) La confrontation des inhibiteurs connus nous apprend que les groupes -SH et -NH₂ sont tous deux susceptibles d'inhiber la réaction. Nous montrons qu'il en est de même pour le groupe S=C<.
- c) Il résulte de l'examen de 25 substances dérivées ou parentes de la TU que le groupe probablement responsable est le groupe tricentrique $\begin{array}{c} -C - N \\ || \quad / \backslash \\ S \end{array}$ dont les doubles liaisons sont mobiles et qui est le siège d'un phénomène important: la mésomérie, autrement dit transport d'électrons manifesté par l'instabilité de la double liaison.

d) La TU agit sur le système phénol-phénolase dont nous avons révélé l'existence chez l'*A.n.*

La preuve de cette action est étayée par les expériences suivantes:

1. la TU inhibe l'oxydation du paracrésol par la monophénolase contenue dans les conidies et le liquide de culture;
2. elle inhibe aussi la transformation du catéchol par l'*A.n.*;
3. enfin, elle entrave fortement sa respiration aérobie;
4. la confrontation de l'action antimélanique *in vivo* des mêmes dérivés montre une certaine analogie avec l'action *in vitro*.

e) Ses autres actions sur l'*A.n.* sont les suivantes:

1. elle ralentit le métabolisme des sucres qu'elle rend plus coûteux;
2. elle inhibe la croissance en général (fongistase);
3. elle agit sur divers facteurs d'autolyse (cystéine, catéchol, acidité, etc.) et par conséquent sur la pigmentation.

Si modestes que soient les résultats obtenus et imparfaites les hypothèses émises, nous espérons que ceux-là et celles-ci pourront servir de départ à des travaux ultérieurs que nous continuerons sur la TU et ses dérivés. Nous considérons le travail actuel comme préliminaire, car seuls des faits constants, vérifiés dans plusieurs circonstances, nous permettront de tirer des conclusions valables et générales sur le mode d'action de ce corps et de ses dérivés, afin d'en pouvoir établir plus sûrement l'intérêt pratique, soit en médecine, soit en agriculture.