Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

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

Band: 3 (1950)

Heft: 5

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

Autor: Pongratz, Edmond

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739464

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: 14.07.2025

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

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

PAR

Edmond PONGRATZ

(Avec 10 fig.)

(suite et fin)

CHAPITRE II

Influence de substances chimiques et biologiques diverses sur la Nadi-réaction catalytique

Nous avons étudié l'influence exercée sur l'activité catalytique des ions cuivre par toute une série de substances tant biologiques que chimiques, susceptibles de réagir avec le catalyseur ou d'influencer les processus d'oxydation d'une autre manière. Nous avons utilisé le mélange Nadi comme « révélateur » pour « tester » l'activité du cuivre dans ces nouvelles conditions.

Mode opératoire:

10 cm^3 de solution tampon phosphate (pH = 7,3) contenant 50 γ de Cu^{+2} sont additionnés d'environ 1 à 10 mg de substance à essayer (concentration environ 1 pour mille à 1 pour dix mille). Si le produit est gazeux, on le fait barboter quelques instants dans la solution. Les substances peu ou difficilement solubles dans l'eau sont additionnées sous forme de solution alcoolique concentrée.

On teste l'activité du cuivre dans la solution obtenue au moyen du mélange Nadi qu'on ajoute à raison de 5 gouttes

pour 10 cm³. On agite violemment pour bien oxygéner la solution. Chaque essai est comparé « visuellement » à un témoin préparé de manière identique et au même instant, mais ne contenant pas de substance étrangère. Pour obtenir des valeurs numériques, les solutions sont soumises à un examen photométrique.

Il est important de procéder dans l'ordre indiqué pour préparer les mélanges, sinon les résultats peuvent être variables: nous verrons plus loin les raisons dictant ces conditions.

Résultats :

Nous avons constaté que des substances (A) inhibent plus ou moins fortement la Nadi-réaction, d'autres (B) au contraire l'activent, enfin qu'un grand nombre de substances sont indifférentes c'est-à-dire n'affectent pas d'une manière sensible la catalyse.

Nous distinguerons parmi les premières substances quatre groupes: classification toute arbitraire comme le montrera l'examen de chacun des groupes, mais que nous garderons pour la clarté de l'exposé.

1) Les corps précipitant le cuivre ou formant avec lui des sels peu ionisés.
2) Les substances formant avec le cuivre des complexes.
3) Les corps facilement oxydables.
4) Divers (protéines, antioxygènes, inhibiteurs d'enzymes, etc.).

A. *Substances inhibitrices de la Nadi-réaction catalytique.*

1. *Les corps précipitant le cuivre ou formant avec lui des sels peu ionisés.*

Nous savons que le cuivre doit ses propriétés catalytiques (fongicides, germicides, etc.) à sa forme ionique: la précipitation ayant pour conséquence une diminution des ions en solution, allant souvent jusqu'à leur disparition quasi totale, il est à prévoir donc que toute substance précipitant le cuivre sera un poison de la catalyse due à ce métal.

La précipitation n'est pas la seule possibilité d'inhibition directe: la formation de sels peu ionisés ou comme nous verrons

plus loin la formation de combinaisons complexes, même solubles, peut également faire régresser le nombre des ions Cu^{+2} de la solution.

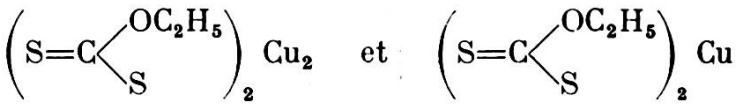
Nous admettons que les substances suivantes, qui toutes exercent un effet inhibiteur puissant sur la Nadi-réaction, forment avec le cuivre des combinaisons données, bien que par suite des faibles concentrations, aucun précipité ou produit de réaction ne soit généralement visible dans la solution.

Le cuivre peut former des combinaisons dans lesquelles il est monovalent; cette réduction est due soit à la substance inhibitrice (qui présente souvent un caractère réducteur), soit à la catalyse elle-même. (On admet généralement qu'un catalyseur d'oxydation vibre entre deux états d'oxydation [47]; Shibata [48] signale que le cobalt dans les complexes qu'il étudia, ne change pas de valence au cours de la catalyse.)

L'*hydrogène sulfuré* et les *sulfures alcalins* précipitent le cuivre comme sulfure noir pratiquement insoluble:

produit ionique à 10° du SCu $= 3{,}2 \,.\, 10^{-42}$
» » à 18° du $SCu_2 = 2{,}0 \,.\, 10^{-47}$.

L'*anion éthylxanthogénique (éthylxanthogénate de potassium)* précipite le Cu^{+2} comme éthylxanthogénate de cuivre (II) brun ou de cuivre (I) de couleur jaune. On donne les deux formules suivantes [49].



Ces combinaisons sont détruites peu à peu, surtout en milieu alcalin et donnent alors des sulfures de cuivre.

L'*anion thiocyanique (rhodanate de potassium)* précipite le cuivre comme thiocyanate de cuivre (II) noir et de cuivre (I) blan rosé (surtout en présence d'un réducteur)

produit ionique à 18° du NCSCu $= 1{,}6 \,.\, 10^{-11}$.

L'*anion oxalique* donne l'oxalate de cuivre CuC_2O_4 (produit ionique à 25° $= 2{,}9 \,.\, 10^{-8}$).

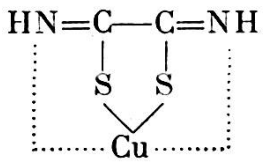
2. *Substances formant avec le cuivre des complexes.*

Les réactifs organiques caractéristiques du cuivre ont une action inhibitrice particulièrement marquée sur la Nadi-

réaction catalytique, mais beaucoup d'autres substances, également capables de former des complexes avec le cuivre, ont révélé (pour la plupart) une très nette action anticatalytique.

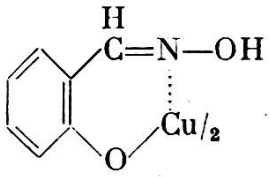
Nous avons vérifié l'inhibition due aux corps suivants:

Acide rubéanique (dithioxamide) forme avec le cation Cu^{+2} un complexe interne vert foncé de formule:

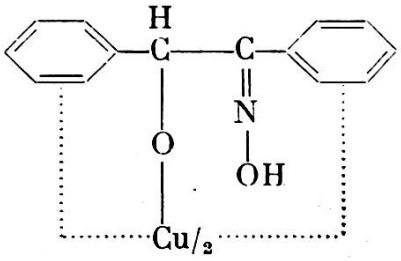


Cette réaction est souvent utilisée en chimie analytique.

La *salicylaldoxime* forme avec le cuivre le complexe:

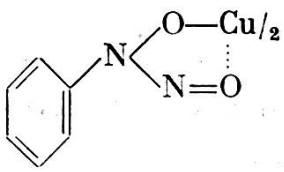


La *benzoïneoxime* donne avec le cuivre un sel complexe vert de structure suivante [50]:

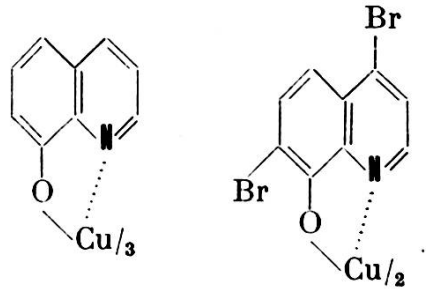


dans ce complexe ce sont les radicaux aromatiques qui paraissent posséder un pouvoir coordinatif.

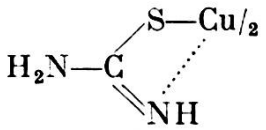
Le « *Kupferon* » (nitrosophénylhydroxylamine) donne avec le cuivre la combinaison [51]:



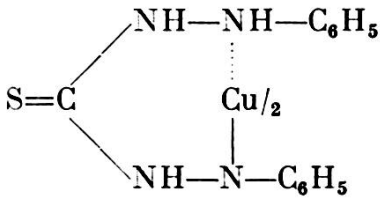
L'*hydroxy 8-quinoléine* (oxine) et la *5,7-dibromohydroxy 8-quinoléine* donnent les combinaisons suivantes avec Cu^{+2} [49].



La *thio-urée* et plusieurs de ses dérivés (méthylthiourée allylthiourée, etc.) donnent avec le cuivre différentes combinaisons [52] entre autres le complexe suivant correspondant à la forme pseudo-thio-urée:

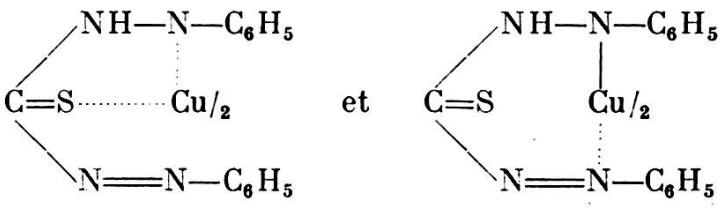


La *diphénylcarbazide* et le *diphénylthiocarbazide* forment avec le cuivre des complexes dans lesquels les liaisons de coordination du métal vont de préférence à l'azote (plutôt qu'au S. ou O.).

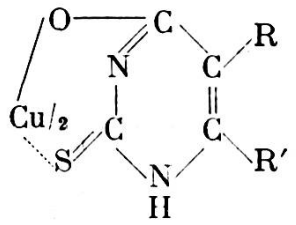


La *diphénylcarbazone* et la *diphénylthiocarbazone* (dithizone) forment facilement des complexes avec les métaux lourds et avec le cuivre.

On ne sait pas d'une façon certaine si dans ces combinaisons le cuivre est coordonné au soufre ou à l'azote; on donne les formules:



Le *thiouracile et ses dérivés* [1] (méthylthiouracile) forme avec le Cu^{+2} le complexe suivant [53]:

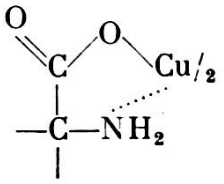


Le *diethyldithiocarbamate de sodium* forme avec le cuivre une combinaison complexe intensément colorée en jaune-brun utilisée pour son dosage colorimétrique.

Beaucoup d'autres substances présentant un groupement thiol (-SH) forment avec le cuivre des combinaisons complexes:

Citons l'acide thioglycolique $HOOC\text{-}CH_2SH$, l'acide thiolactique, la thionalide $CH_2(SH)CONHC_{10}H_7$, ... le thiosulfate.

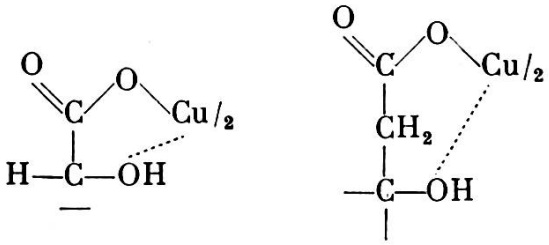
Les *acides α-aminés* d'une manière générale sont susceptibles de former avec le Cu^{+2} des complexes du type:



certains cependant — le glycocolle, l'α-alanine, la δ-sérine, l'acide aspartique, l'asparagine, la méthionine, l'*l*-cystine, l'acide *l* (+) glutamique exercent une action inhibitrice particulièrement forte sur la Nadi-réaction catalytique.

Les peptides — produit de l'hydrolyse chimique ou enzymatique de substances protéiques — « complexent » aussi le cuivre et le rendent inactif.

Les α et β *oxyacides* forment facilement des combinaisons avec le cuivre du type:



exemple: citrate, tartrate (sel de seignette).

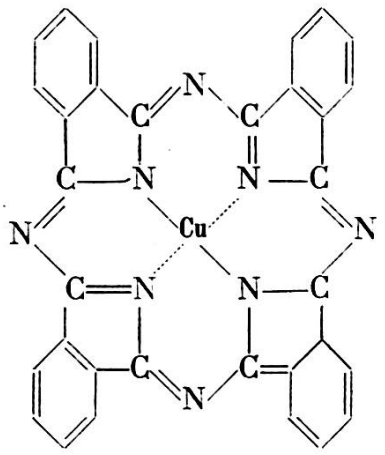
[1] Mis gracieusement à notre disposition par la maison Hoffmann la Roche (Bâle).

L'inhibition de la Nadi-réaction due à ces deux dernières substances est en général plutôt faible.

Les *composés polyphénoliques* tel que les acides galliques, tanniques, protocatéchique, les tannins, etc., peuvent former avec le cuivre des complexes variés, mais ces substances possèdent en plus de ces caractères, des propriétés antioxygènes qui font d'eux d'excellents inhibiteurs des réactions catalytiques d'oxydation (elles sont utilisées comme stabilisants).

Il nous a paru intéressant de tester encore l'activité catalytique du cuivre lorsqu'il est incorporé dans des édifices moléculaires plus compliqués mais où il est lié également de façon complexe.

La *phtalocyanine* [1] (Linstead) est une combinaison complexe du cuivre, extrêmement stable, de couleur bleu foncé, qui dérive de la tétraazoporphine. Ce corps présente une curieuse analogie structurale avec les pigments du sang et de la chlorophylle. Le cuivre dans cette combinaison ne présente pas la moindre propriété catalytique sur l'oxydation du Nadi.

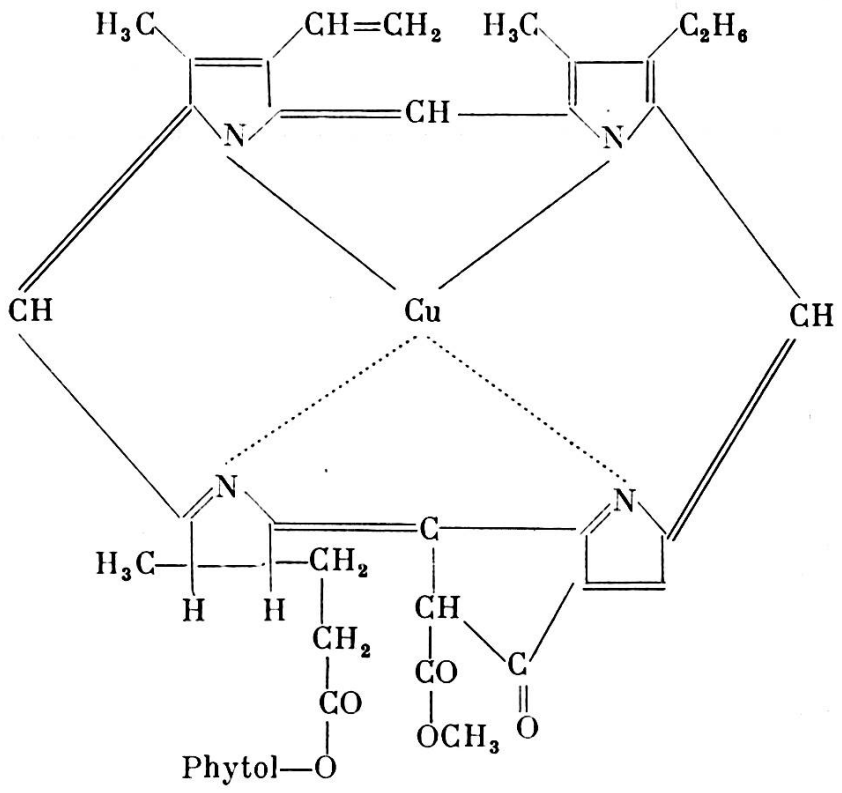


Cu-phtalocyanine

De même que dans la combinaison précédente, le cuivre lié de façon complexe à la molécule de *phéophytine* est inactif en tant que catalyseur d'oxydation.

[1] Nous avons préparé ce corps selon les indicatios données dans L. GATTERMANN, *Manuel pratique de chim. org.*, 1946, p. 327.

Formule selon H. Fischer:



Cette substance est préparée en chauffant une solution alcoolique de phéophytine [1] (= chlorophylle *a* privée de son atome de magnésium) avec de l'acétate de cuivre. La solution devient vert brillant sans fluorescence, coloration due à la formation du complexe cuprique très stable.

Conclusion:

Toutes ces observations nous conduisent à penser que le cuivre lorsqu'il entre dans la constitution d'un complexe interne, ne peut plus manifester son activité catalytique.

Fort de ces constatations nous pouvons généraliser et admettre que tout corps organique susceptible de former avec le cuivre un complexe interne stable, peut être considéré comme un poison de la catalyse due à ce métal et dans la mesure où ces corps organiques ont la même réactivité *in vivo*, on peut les assimiler à des inhibiteurs des enzymes cupriques.

[1] Nous avons préparé la phéophytine selon R. WILLSTAETER et A. STOLL, *Chlorophyll*, p. 251, 1918.

Il faut ajouter aux substances inhibitrices déjà mentionnées encore l'oxyde de carbone et l'acide cyanhydrique (cyanures) qui, dans les recherches enzymologiques jouent un rôle prépondérant. Ces deux poisons respiratoires annihilent presque complétement le pouvoir catalytique du cuivre. Pour l'*oxyde de carbone*, il faut incriminer la formation de divers complexes d'addition du cuivre dont nous avons vérifié la photostabilité.

Le chlorure de cuivre (I) fixe en solution chlorhydrique ou ammoniacale l'oxyde de carbone et forme des complexes tel que $[CuCl(CO)(H_2O)_2]$. Les solutions de cuivre (II) peuvent aussi additionner dans certaines conditions de l'oxyde de carbone: il se forme alors du CO_2 et des sels de cuivre I (Möller und Leschewski, 1935) [54].

En ce qui concerne le *cyanure de potassium*, il doit son pouvoir inhibiteur puissant à sa propriété de former avec le cation cuivre diverses combinaisons, plus particulièrement le cyanure de cuivre (II) et cuivre (I) et l'anion complexe tétracyanocuivrique (I) extrêmement stable, selon le schéma de réaction suivant:

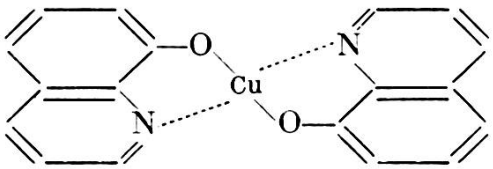
$$2CN^- + Cu^{+2} \rightleftharpoons (CN)_2Cu$$
$$2(CN)_2Cu \longrightarrow 2CNCu + (CN)_2$$
$$CNCu + 3CN^- \rightleftharpoons [Cu(CN)_4]^{-3}$$

L'action des cyanures alcalins qui permet de « masquer » les réactions du cuivre est bien connue en chimie analytique. Par ce procédé (formation de complexe), on diminue la concentration du Cu^{+2} dans la solution à tel point qu'il ne réagit plus avec les réactifs courants. Mieux encore, la stabilité de ce complexe est telle, qu'elle permet au KCN de redissoudre divers précipités du cuivre ou de décolorer les solutions bleues de cuivre-tétramine par exemple. Les applications de ces phénomènes sont constantes en chimie analytique et surtout en microchimie.

Nous désirons attirer une attention particulière sur l'affinité du cyanure pour le cuivre, car dans les phénomènes biologiques l'on envisageait jusqu'à présent surtout une action de bloquage du cyanure s'exerçant sur le fer cellulaire (hématine, enzymes ferrugineux, etc.).

2. *Généralités sur les substances capables de former avec le cuivre des complexes internes et mécanisme de leur action inhibitrice.*

Lorsqu'on considère les édifices moléculaires dans lesquels le cuivre voit son activité catalytique bloquée, on s'aperçoit que le métal y est « doublement » lié. Ainsi, par exemple, dans l'hydroxy-8-quinolinolate de cuivre (Cu-8-quinoléate), le cation est fixé par électrovalence sur l'oxygène (ayant remplacé l'hydrogène du groupe hydroxyle) et par valence de coordination sur l'azote:



Nous voyons que la molécule organique, pour pouvoir former un complexe interne doit posséder à la fois un groupement (salifiable) à fonction acide (dont l'hydrogène est remplaçable par le métal comme le groupe carboxyle –COOH, le groupe hydroxyle –OH, le groupe sulfhydrile -SH, etc.) et un atome négatif capable de coordination (azote dans les groupes $-NH_2$; =NH; $-C_6H_5N$; –N=N–; oxygène dans les groupes –OH; C=O; le soufre dans C=S; C–S–C, –S–S–, etc.). Les positions relatives de ces groupements dans la molécule et leur situation stérique ont une importance déterminante sur la possibilité de formation de complexes. Il se forme des cycles en général de 5 à 6 atomes (noyaux chélatés) [55] qui seuls sont stables où l'atome de cuivre constitue l'un des maillons (voir formule ci-dessus).

Les phénomènes d'inhibition décrits précédemment suggèrent l'interprétation suivante: des liaisons simultanées par électrovalence et valence de coordination entre l'ion Cu^{+2} et différents atomes d'une seule et même molécule organique, déterminent un abaissement du pouvoir catalytique du métal par suite de sa forte liaison; en effet des mesures de conductibilité électrique montrent que ces complexes sont extrêmement peu dissociés. Théoriquement, lorsqu'un ion lie d'autres molécules pour former un complexe, la concentration de l'ion primitif (Cu^{+2}) diminue

plus ou moins fortement mais ne disparaît jamais totalement; il se forme un équilibre par exemple:

$$Cu^{+2} + 2(\text{hydroxy 8-quinoléine}) \rightleftharpoons \text{Cu-8 quinoléate} + 2H^{+}$$

La stabilité de ces complexes est cependant généralement telle, que pratiquement il ne subsiste plus guère d'ions Cu^{+2} libres. L'équilibre des réactions étant fonction de la loi d'action des masses, la « complexion » du cuivre sera donc encore favorisée par un excès de substance « complexante ».

Dans les expériences d'empoisonnement du catalyseur Cu^{+2}, le pouvoir inhibiteur des substances est encore fonction de leur affinité pour le cuivre (en solution diluée) et de la vitesse de formation des complexes cupriques.

3. *Corps facilement oxydables.*

A part les substances que nous venons de voir qui se combinent à l'élément catalyseur et qui de ce fait l'inactivent (on pourra grouper ces substances sous la dénomination générale d'anticatalyseurs ou d'inhibiteurs directs), il existe toute une série de corps plus ou moins facilement oxydables qui exercent durant un certain temps un effet protecteur sur l'oxydation du Nadi. Parmi ces inhibiteurs indirects, citons les substances, l'intérêt biologique: l'acide ascorbique, la cystéine, le glutathion..., les polyphénols... et les substances inorganiques comme l'hydrogène arsénié, le sulfite, bisulfite, les sels ferreux, etc.

Selon nous, il est probable que le cytochrome réduit entre de la même manière en compétition avec les constituants du réactif Nadi et inhibe leur oxydation. Pour plusieurs de ces substances inhibitrices, il s'agit plus que d'une simple compétition: elles peuvent même réduire à l'état de leucodérivé le bleu d'indophénol déjà formé. Nous pouvons prévoir l'influence perturbatrice qu'auront ces substances sur les résultats de la Nadi-réaction utilisée comme test cytologique pour la localisation des oxydases. Plusieurs auteurs, Wyss Chodat et F. Chodat [56], L. Kaufmann [57] et R. Stadelmann [58] en particulier ont déjà attiré l'attention sur l'influence inhibitrice

qu'exerce l'acide ascorbique sur la plupart des réactions d'identité des oxydases.

L'hydroxylamine, réactif très utilisé en enzymologie, n'a pas d'action sur la Nadi-réaction catalytique malgré son caractère réducteur. Dans certains cas cependant, s'il y a présence simultanée d'une substance réductible par l'hydroxylamine (Fe^{+3} par ex.) le corps réduit formé peut entrer en concurrence avec le mélange Nadi.

Les substances à groupement sulfhydrile (-SH) comme la cystéine doivent leur effet inhibiteur probablement encore à leur propriété de pouvoir fixer le cuivre sous forme complexe [59]. Les produits d'oxydation de ces substances — les formes disulfure (R-S-S-R) — n'exercent pratiquement plus d'inhibition sur la Nadi-réaction.

4. *Substances diverses.*

Nous avons encore examiné l'influence sur la Nadi-réaction catalytique de substances réputées inhibitrices de certaines réactions enzymatiques: azide de sodium (NaN_3), fluorure de sodium, pyrophosphate: leur effet est négligeable (noter que ces substances réagissent facilement avec le fer); l'azide de sodium active même légèrement le cuivre. Les inhibiteurs des déhydrases, acide monoïodacétique, uréthanes, narcotiques... sont également sans action appréciable.

Contrairement à l'affirmation de R. Meier [60] qui considère les sulfanilamines comme des anticatalyseurs d'oxydation, nous avons trouvés que l'acide sulfanilique, la sulfanilamide étaient sans effet notoire sur l'oxydation catalytique du Nadi.

Autres substances plus ou moins indifférentes: pénicilline, streptomycine, ac. anthranilique, quinique, amygdalique, salicylique.

Les albumines d'œufs, de sang, etc., la gélatine ont des effets très variables suivant leur provenance, le traitement subi, le pH, etc. En présence de ces substances, on observe souvent des effets inhibiteurs ou indifférents, parfois aussi stimulants. Nous ne nous sommes pas occupés d'une manière plus approfondie de ces substances car les combinaisons qu'elles donnent avec le cuivre sont difficiles à connaître: d'autres auteurs

d'ailleurs étudient la question, citons P. Bouvet [61], E. Barbu, J. Lesciau et M. Machebœuf [62].

Les sels de mercure ($Hg\text{-}Cl_2$) inhibent fortement la Nadi-réaction catalytique. En présence de ces substances, on observe souvent une déviation des processus d'oxydation. L'action inhibitrice du mercure s'exerçant probablement sur le cuivre est intéressante à relever.

On cite [63] la pyridine comme inhibiteur possible de la catalyse par le cuivre. Nous avons trouvé au contraire que ce corps active fortement le cuivre en tant que catalyseur (voir plus loin).

Il est vrai que lorsqu'il y a présence simultanée de pyridine et de thiocyanate par exemple, il y a formation en milieu neutre ou alcalin d'un précipité floconneux vert dû au complexe $[Cu \ldots (Py)_2](CNS)_2$ très peu soluble, et par suite inhibition. Cette méthode de précipitation du cuivre est utilisée pour son dosage gravimétrique ou colorimétrique (méthode de Spacu).

Connaissant le mécanisme de l'inhibition de l'activité catalytique du cuivre, il apparaît évident maintenant que l'on puisse lever dans une certaine mesure l'inhibition primitive par une adjonction d'une nouvelle quantité de cuivre (dans le cas des inhibiteurs directs) ou par une addition d'un oxydant (dans le cas des inhibiteurs indirects réducteurs) et cela suivant l'excès de substance inhibitrice présente.

Comme parallèle biologique de ces phénomènes, la littérature scientifique nous donne plus d'un exemple d'enzymes [64] ou de cellules (bactéries, etc.) empoisonnées qui purent être désintoxiquées par un traitement cuprique ou oxydant approprié.

Conclusions :

Il ressort des observations faites ci-dessus qu'un rapprochement doit être fait entre notre réaction catalytique et certaines réactions enzymatiques de caractère oxydatif.

Voici quelques arguments justifiant ce rapprochement:

a) Les inhibiteurs mentionnés ci-dessus sous 1, 2 et 3 sont en général ceux des oxydases.

b) Les inhibiteurs directs (mentionnés sous 1 et 2) sont souvent des substances très toxiques déjà à faible dose, ce qui indique que ces substances agissent *in vivo* sur des mécanismes délicats et importants, réglant les processus vitaux.

c) Les inhibiteurs des déshydrases et d'autres ferments (uréthanes, narcotiques, acide monoïodacétique, acide trichloracétique, azide de sodium, florure et pyrophosphate de sodium, etc.) sont sans action sur l'oxydation catalytique du Nadi.

De ces constations et d'autres observations faites *in vivo* nous tirons les conclusions suivantes:

1. La Nadi-réaction ne constitue pas un test spécifique des oxydases (cytochrome-oxydase, phénolases); cette réaction est catalysée de façon quasi spécifique par les ions Cu^{+2}. L'effet « indophénol-oxydasique » du cuivre se distingue de celui de l'enzyme de Warburg et Keilin (« Atmungsferment » de Warburg ou cytochrome-oxydase) par le fait qu'il n'exige pas pour parachever l'oxydation du Nadi, le concours du cytochrome.

2. Lorsque *in vivo* la Nadi-réaction est positive, il y a présence d'une oxydase (ou d'un catalyseur d'oxydation) mais cela implique l'absence de systèmes oxydo-réducteurs sous forme réduite. D'une façon générale, on peut dire que s'il y a présence sous forme réduite et en quantité importante d'un système à potentiel redox inférieur à celui du mélange Nadi, il n'y aura pas réaction colorée. Il faut encore tenir compte des conditions du milieu (pH), car les potentiels redox du substrat oxydable et du Nadi peuvent s'inverser.

D'une Nadi-réaction négative *in vivo* on ne peut donc pas tirer de conclusion quant à la présence ou absence d'oxydase.

Il est d'observation courante que l'on peut souvent mettre en évidence *in vivo* un effet peroxydasique mais pas d'oxyda-

ses [58]. Nous pensons par déduction de ce que nous avons dit plus haut, que, dans certains cas du moins, le traitement à l'eau oxygénée active l'oxydation des substances inhibitrices présentes (acide ascorbique, etc.) et permet la détection par la suite des simples oxydases (pas peroxydases) au moyen des réactifs usuels.

3. Etant donné la grande similitude de comportement (vis-à-vis des inhibiteurs) de la Nadi-réaction catalytique spécifique à base de cuivre avec certaines réactions enzymatiques oxydatives, ne doit-on pas incriminer plus souvent le cuivre d'être l'élément actif de ces systèmes ? Nous pensons en particulier à la cytochrome-oxydase. (On admet depuis les travaux de Warburg [43] que le ferment spécifique catalysant l'oxydation du cytochrome (*a*) réduit, est de nature hémique.) Cette hypothèse élargit singulièrement la conception de Keilin, à savoir assimilation de l'indophénoloxydase à la cytochrome-oxydase.

4. Vu la grande sensibilité et spécificité du réactif Nadi aux ions Cu^{+2}, nous préconisons son utilisation à des fins analytiques (dans certaines conditions on pourra même faire appel à des activateurs ou à H_2O_2 (voir plus loin) pour augmenter encore la sensibilité du Nadi vis-à-vis du Cu^{+2}.

Par ce procédé, il est possible de mettre en évidence 10^{-2} à 10^{-4} γ de Cu^{+2} dans l'eau de conduite; pour cela il est nécessaire de travailler en milieu tamponné et de comparer à un témoin préparé avec de l'eau bidistillée absolument exempte de Cu^{+2}.

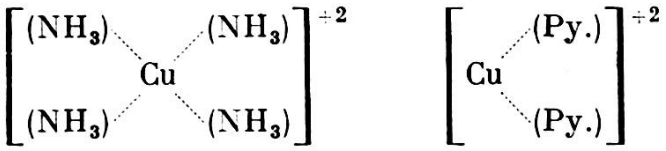
B. — 1. *Substances activatrices de la Nadi-réaction catalytique.*

Au cours de nos investigations portant sur les substances inhibitrices de la Nadi-réaction catalytique, nous avons observé que de nombreux composés organiques azotés (contenant un atome d'azote tertiaire ou quaternaire principalement) avaient la propriété d'exalter le pouvoir oxydant du cuivre. Parmi les corps actifs, il se trouve des composés aliphatiques, mais surtout des composés hétérocycliques.

Nos recherches primitivement basées sur ces quelques observations empiriques nous ont permis de trouver un certain nombre d'adjuvants du cuivre, dont les plus actifs sont: l'ammoniaque, la pyridine, l'iminazole, le thiazole, la pyrimidine, la quinoléine et nombre de leurs dérivés; nous citerons comme exemple: la chloramine, la triméthylamine, la choline... l'acide nicotinique, la nicotylamide, la nicotyldiéthylamide (coramine), la piperidine, la pipérazine, l'aneurine (vitamine B_1), l'uracile, des barbituriques (luminal), des bases puriques: *xanthine*, *guanine*, des *alcaloïdes* (*nicotine*, *quinine*, *etc.*), la guanidine, des sulfamides, des bactéricides, des fongicides, etc.

Le catalyseur ionique Cu^{+2} forme avec ces substances des systèmes organo-métalliques qui sont principalement du type complexe d'addition (syn. complexe de superposition) ou du type complexe d'interposition (Werner [65]: An- und Einlagerungsverbindungen).

Plusieurs de ces complexes sont bien connus en chimie analytique et nous les choisirons comme type, car ils sont en même temps le plus représentatif de nos systèmes actifs: ce sont les complexes cuivre-tétramine et cuivre-dipyridine (Y. et K. Shibata [48] ont déjà signalé en 1928 la forte action oxydante de ces deux corps sur la myricétine).

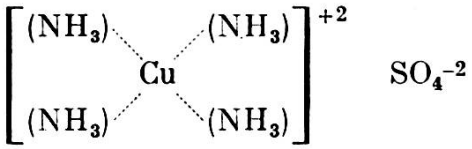


L'addition des substances azotées susmentionnées à une solution cuivrique en modifie visiblement la teinte: de bleu clair, elle devient verte, bleu azur plus ou moins foncé, bleu indigo, violet. Ces virages font immédiatement présumer la formation d'ions complexes et l'apparition d'importantes modifications corrélatives: état ionique particulier du cuivre et ses répercussions sur le spectre d'absorption.

2. *Généralités sur les complexes actifs.*

Dans la catégorie des complexes cuivriques qui montre une activité catalytique supérieure à celle des ions simple Cu^{+2},

nous avons cité le complexe cuivre-tétramine bien connu en chimie analytique. Nous savons que l'ammoniac, à cause du caractère dipolaire de sa molécule, montre une forte tendance à la formation de complexes relativement stables, appelés ammoniacates ou combinaisons amminées. Dans ce type d'édifice moléculaire l'atome de cuivre devient « atome central » (centre de coordination). Le nombre des espèces d'ions ou de molécules indépendantes qui peuvent être liés par lui au moyen de ces valences secondaires (valences de champs) est exprimé par le nombre de coordinations (n). Celui-ci peut prendre différentes valeurs pour le cuivre, mais généralement les valeurs 2, 4 et 6 pour Cu^{+2} et les valeurs 1, 2 et 3 pour Cu^{+1}. Dans les complexes cupro-aminés, c'est l'atome d'azote qui fixe les valences de coordination. La constitution du sulfate de cuprotétramine peut être représentée par la formule:



Les groupements coordonnés (ici les molécules d'ammoniac) s'intercalent en quelque sorte entre le cation cuivrique et l'anion du sel primitif d'où le nom de complexe d'interposition donné à ce type de combinaison.

Cette formule montre d'autre part que la molécule est dissociable (elle se dissocie en solution aqueuse) et par suite se comporte en électrolyte (différence avec les complexes internes qui ne conduisent pas le courant). Notons encore que dans ce type de combinaison complexe, le cuivre est encore après dissociation cation divalent $[(Cu)]^{+2}$.

En solution (neutre ou alcaline) les molécules coordonnées (ici NH_3) restent attachées au cuivre et confèrent la coloration bleu azur bien connue des cupramines (eau céleste). En solution acide par contre, il y a décoloration par suite de la décomposition du complexe.

Le caractère basique de l'ammoniac est très marqué et bien connu; nous le signalons car le caractère de basicité se retrouve

chez la plupart des substances activatrices du cuivre sous forme plus ou moins atténuée (alcaloïdes, bases puriques, etc.).

On connaît toute une série de sels du cation complexe Cu-tétramine. On les obtient par simple addition d'ammoniaque en excès aux sels ordinaires du cuivre bivalent; il précipite d'abord l'hydroxyde cuivrique $Cu(OH)_2$ qui se redissout dans l'excès d'ammoniaque pour former une liqueur bleu intense, appelée « eau céleste ». On connaît entre autres:

$$[Cu(NH_3)_4]Cl_2 \; ; \; [Cu(NH_3)_4](NO_3)_2 \; ; \; [Cu(NH_3)_4]SO_4$$

l'hydroxyde correspondant à ces complexes est la base $[Cu\,(NH_3)_4]\,(OH)_2$ qui en solution est également bleu foncé, (liqueur de Schweizer). On prépare ce corps par dissolution dans l'ammoniaque d'hydroxyde cuivrique précipité par un alcali caustique. Remarquer que sous cette forme complexe, le cuivre est soluble en milieu alcalin. Par dissolution dans l'ammoniaque de chromate de cuivre, on obtient une solution d'un beau vert répondant probablement à la formule:

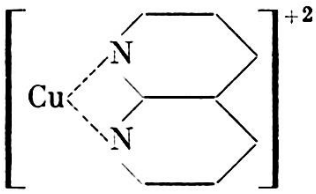
$$[Cu(NH_3)_4]\,CrO_4$$

De même que l'ammoniac, certains de ses dérivés organiques et inorganiques ($ClNH_2$) montrent également le pouvoir de coordination de leur azote, mais ce sont surtout les dérivés hétérocycliques qui montrent les propriétés semblables les plus intéressantes pour nous. Ainsi les complexes $[Cu\,(Py)_2]^{+2}$, $[Cu\,(Iminazole)_2]^{+2}$ $[Cu\,(Nicotine)_2]^{+2}$, etc. se forment facilement par simple mélange d'une solution d'acétate de cuivre neutre et de la base correspondante.

Notons en passant que l'eau qui est une molécule dipolaire (Debye) comme l'ammoniac peut également être coordonné aux ions cuivre. Dans ces cas, c'est sur l'atome d'oxygène que se fixent les valences secondaires. Dans nos expériences de catalyse par les « ions » cuivre, nous avions déjà affaire en réalité à des ions cuivre complexes tétrahydratés [54] $[Cu\,(H_2O)_4]^{+2}$ (les sels de cuivre (II) perdent par déshydratation leur coloration bleue, ce qui montre que cette teinte est

due à l'ion hydraté). Les analogues organiques de l'eau (substances de la série grasse possédant un groupe hydroxyle ou leur dérivés, alcool, cétones, éther, etc.) montrent parfois des propriétés semblables.

Les observations que nous avons faites concernant l'accroissement du pouvoir oxydant du cuivre dû aux activateurs mentionnés nous suggèrent le mécanisme suivant: il y a augmentation du potentiel redox lorsque l'ion métallique (Cu^{+2}) lie par valence secondaire des molécules organiques ou inorganiques (H_2O, NH_3). *Il y a cependant des exceptions à cette* « règle »: l'α, α'-dipyridyle et l'o-phénanthroline par exemple, qui forment des complexes de ce type, exemple:



ne confèrent pas au cuivre une activité catalytique supérieure. Au contraire même, ces substances sont inhibitrices de la Nadi-réaction catalytique. Les complexes cupriques de ces deux substances présentent certains caractères des complexes internes; leur stabilité aux divers pH par exemple les distingue essentiellement des complexes actifs. Les expériences suivantes nous permettront peut être de tirer des conclusions d'ordre plus général sur le mécanisme de l'activation du cuivre.

3. *Activation du cuivre par de faibles quantités de substances réputées inhibitrices.*

Au cours de notre étude sur les actions inhibitrices du processus catalytique d'oxydation du Nadi, nous avons attiré l'attention sur l'importance de l'ordre dans lequel on prépare les mélanges:

1° solution tampon + catalyseur (50 γ Cu^{+2});

2° substance à essayer;

3° mélange Nadi.

Inversons cet ordre et ajoutons la substance à essayer à la fin, après avoir mélangé la solution tampon + catalyseur et le réactif Nadi.

On observe une stimulation initiale de l'oxydation du Nadi au moment même de l'adjonction de la substance inhibitrice. Nous avons observé ce phénomène avec le cyanure, le sulfocyanure, l'hyposulfite de soude, l'iodure de potassium, la thio-urée, le thiouracile, le méthyl-thiouracile, l'acide thioglycolique, le diphénylthiocarbazide, le ferrocyanure de potassium, l'azide de sodium, etc. L'importance de l'oxydation est fonction de la quantité de cuivre présente. Lorsque le mélange de la substance inhibitrice est opéré, l'oxydation du Nadi s'arrête: le catalyseur Cu^{+2} étant bloqué. Ce phénomène est assez général et s'observe souvent lorsque réagissent ensemble le cuivre [1] et la substance inhibitrice au contact même du substrat oxydable.

Nous formulons l'hypothèse suivante à ce propos:

Le cuivre ionique (Cu^{+2}) avant de s'incorporer dans un édifice moléculaire stable (par ex. complexe interne) où il est inactif, passe par des états de réactivité accrue (complexes d'addition ?).

Ces états transitoires ne peuvent pas être isolés, mais peuvent persister (existence statistique due à des équilibres) plus ou moins en solution diluée.

A l'appui de cette thèse nous signalons les faits suivants: Lorsqu'on mélange deux solutions (relativement concentrées) de cuivre (Cu^{+2}) et de KCN, $Na_2S_2O_3$, etc., on observe la formation de composés labiles signalés par une coloration très fugace, violette, bleue, verte suivant le cas. Nous avons vu précédemment que la coloration était un critère de l'activité des combinaisons cupriques actives.

D'autre part, la labilité des combinaisons transitoires du cuivre, qui caractérise ici ses états « activés » en tant que catalyseur, est un autre indice que nous avions déjà relevé précédemment comme étant essentiel à l'activité catalytique (au contraire la stabilité caractérise les états inactifs du cuivre).

[1] Avec d'autres métaux, en particulier le fer on observe un phénomène semblable comme déjà signalé.

A la suite de ces observations de stimulation initiale, nous avons étudié l'influence de quantités croissantes de quelques poisons de la catalyse sur la réaction de Nadi.

a) *Action de faibles quantités de cyanure sur la Nadi-réaction catalytique.*

Nous avons étudié l'influence de faibles concentrations de KCN sur l'activité catalytique du cuivre en faisant encore

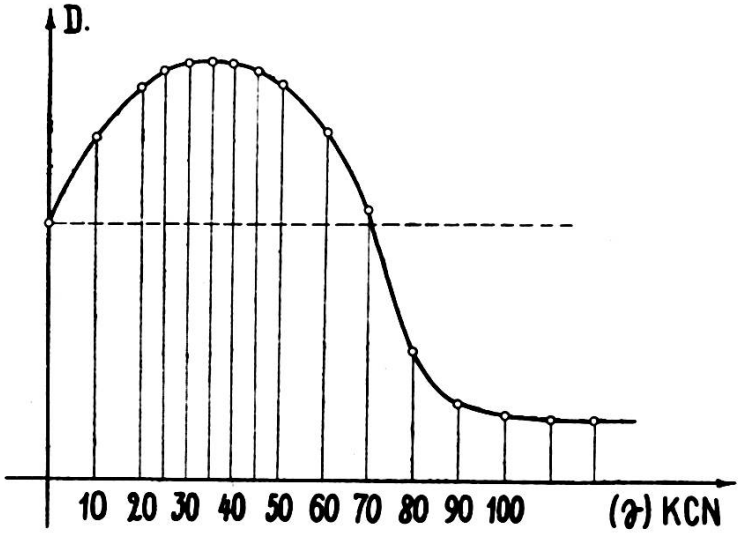


Fig. 7.

Variation de la vitesse d'oxydation du Nadi catalysée par 50 γ de Cu^{+2} ionique en fonction de quantités croissantes de KCN. En ordonnée, nous avons porté directement la densité optique (D) lue au photomètre). (Observation après 5 minutes, pH-7,3, température constante = 18°, filtre jaune S 50, cuves de 1 cm.)

appel au réactif Nadi. Nous avons utilisé des mélanges préformés de cuivre et de cyanure.

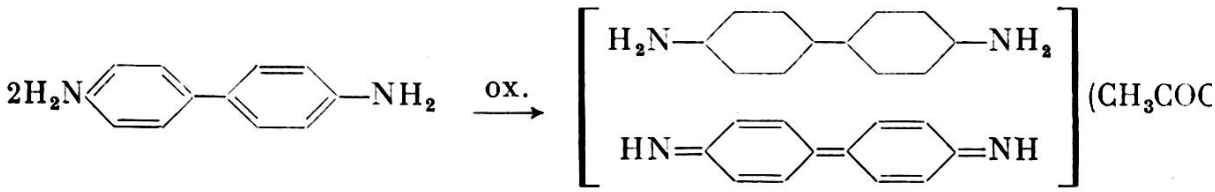
Interprétation du graphique (fig. 7): le cyanure, précédemment signalé comme inhibiteur, fonctionne comme activateur lorsque sa concentration est inférieure à 1,4 molécules environ par atome de cuivre présent.

L'exaltation plus ou moins durable en solution très diluée des propriétés catalytiques du cuivre, par des quantités définies de cyanure nous a fait considérer le système formé par le mélange de ces deux corps comme un « modèle d'oxydase » [66].

Le pouvoir activateur du cyanure en faible concentration sur l'effet catalytique d'oxydation du cuivre est dû à une augmentation du potentiel redox [1] du système cuivre-cyanure par rapport à celui du couple Cu^{+2}/Cu^{+1}.

Cet artifice est exploité en microchimie analytique [67] pour détecter la présence de traces d'ions CN^{-1}: un papier à filtrer, imbibé d'une solution d'acétate de cuivre à 1 % et d'une solution d'acétate de benzidine, bleuit au contact de vapeurs d'acide cyanhydrique.

La benzidine est oxydée en un colorant mériquinoïdique bleu (bleu de benzidine). Le cuivre à lui seul étant incapable de déclencher l'oxydation de la benzidine.



En présence d'un excès d'ions CN^{-1} la coloration bleue ne se forme pas ou si elle s'est formée se dissout et disparaît (probablement par réduction).

Cette réaction analytique n'est spécifique que lorsqu'on opère dans certaines conditions (mais d'autres corps donnent la même réaction).

Nous pouvons utiliser ce procédé à la benzidine pour rechercher les substances conférant au cuivre un pouvoir oxydant élevé.

Des essais nous ont montré que certaines substances (KCN, KSCN, Tu) trouvées activatrices de la Nadi-réaction catalytique à l'instant de leur adjonction, déclenchent également l'oxydation de la benzidine par le Cu^{+2}.

Les phénomènes d'activation du cuivre par de faibles quantités de CNK et d'inhibition des propriétés catalytiques du métal par de plus fortes doses de cyanure, prennent toute leur

[1] Les systèmes $Cu^{+2} + ClO^{-1}$; $Cu^{+2} + BrO^{-1}$ ont des potentiels redox extrêmement élevés permettant à ces mélanges d'oxyder par exemple le Mn^{+2} en Mn^{+7} en milieu alcalin !67!.

signification lorsqu'on les rapproche des phénomènes biologiques de l'asphyxie cyanhydrique. En effet, l'inhibition des processus vitaux par intoxication par CNK des catalyseurs biologiques est bien connue, mais la littérature scientifique nous donne encore plus d'un exemple de stimulation par des doses homéopathiques de ce poison.

Ainsi Lindahl et Örström [68] ont constaté une augmentation de la respiration des levures fermentatives, en présence de CNK M.0,0015 alors qu'elle est inhibée par des concentrations plus fortes de cyanure (0,005 M.).

Une légère stimulation de la respiration a été également constatée par Emerson [69] lorsqu'il cultive l'algue Chlorella sur milieu synthétique, en présence de CNK $M.10^{-4}$; O. Warburg [70] fit la même constatation et montra que cette stimulation était de 57%.

En 1931, Hanes et Baker [71] constatent, en présence de doses modérées de cyanure, une augmentation initiale de la respiration des cellules de la pomme de terre. Cette augmentation était suivie aussitôt d'une diminution parallèle de la respiration et de la quantité de sucre.

En présence de faibles quantités de cyanure (2.10^{-4} M), la photosynthèse de Hormidium est stimulée (van de Paauw) [72].

E. Rabinowitch [73] rapporte plusieurs observations de stimulation de la respiration et de la photosynthèse chez des algues vertes, due à de faibles doses de CNK.

Shoup et Boykin [74] ont constaté une légère augmentation du taux respiratoire de la paramécie, sous l'influence de CNH à des concentrations variant entre $M.2.10^{-2}$ à $M.10^{-4}$.

Récemment P. Wolf [75] étudiant les répercussions de l'asphyxie cyanhydrique chez *Pseudomonas fluorescens*, a observé un phénomène d'hyperchromie sous l'influence de faibles quantités de CNK.

H. von Euler [59] a relevé que parfois le cyanure activait l'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre; il l'attribuait cependant à la formation d'une combinaison (cyanhydrine) du cyanure et des groupements carbonyles de la vitamine C.

Chez l'homme, l'asphyxie cyanhydrique se traduit au début de l'empoisonnement par une respiration rapide, accélérée, par

une élévation de la pression sanguine, par des tremblements symptomatiques des muscles, etc. [76]; toutes ces manifestations sont la conséquence d'un effet stimulateur du CNK avant son effet inhibiteur. Nous pensons que cette inversion d'action correspond aux concentrations croissantes qui atteignent progressivement les cellules nerveuses principalement.

b) *Action de faibles concentrations de thio-urée sur l'activité catalytique du cuivre.*

Le graphique n° 8 montre qu'à l'instar du cyanure, la thio-urée en très faible concentration active le cuivre et lui confère

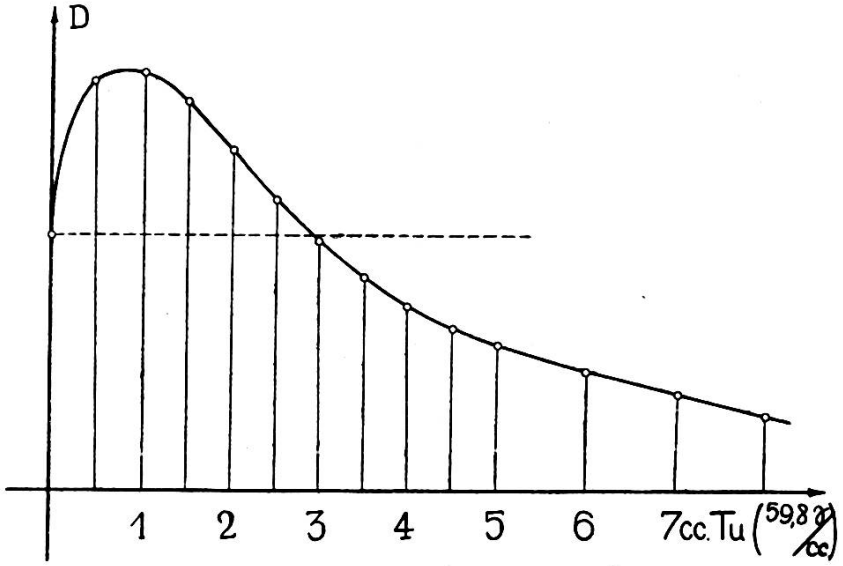


Fig. 8.

Variation de la vitesse d'oxydation du Nadi catalysée par 50 γ de Cu^{+2} ionique en fonction de quantités croissantes de thio-urée. (En ordonnée: densité optique (D) mesurée au photomètre après 5 minutes; pH-7,3; température-18°, filtre S 50; cuves de 1 cm.)

des propriétés catalytiques d'oxydation particulières. La plupart des dérivés de la Tu se comportent de façon semblable.

Ce phénomène d'exaltation des propriétés catalytiques du cuivre est peut être responsable de la légère stimulation de croissance d'A. n. cultivé en présence de faibles quantités de Tu que nous avons observée (en première partie) et du pouvoir de la Tu de rompre le sommeil des graines et tubercules.

L'action inhibitrice de la Nadi-réaction par de plus fortes concentrations de Tu s'exerce selon toute vraisemblance directement sur le catalyseur. Nous montrons sur un système simple *in vitro* le bloquage de l'activité catalytique du cuivre par la Tu. L'action inhibitrice de la Tu s'exerçant sur le Cu^{+2} constituait notre hypothèse de travail en première partie: nous en prouvons ici le bien-fondé.

Nous aurions pu multiplier les exemples de ces phénomènes d'exaltation des propriétés catalytiques du cuivre par de faibles quantités d'« inhibiteur », mais nous pensons que les deux cas signalés suffisent à attirer l'attention sur cette possibilité de mécanisme d'inversion d'action de certaines drogues dans des conditions homéopathiques.

4. *Influences divers sur l'activité catalytique des complexes cuivriques* [1].

L'activité des complexes cuivriques (comme d'ailleurs celle des enzymes oxydants) est influencée par différents facteurs externes; les principaux sont l'acidité (pH), la température et certaines substances chimiques.

a) *Influence du pH sur l'activité des complexes cuivriques.*

La vitesse d'oxydation du Nadi et des autres substrats par les complexes cuivriques décroît très rapidement lorsque le pH diminue. Ce phénomène très général (également vrai pour les réactions enzymatiques) peut être facilement interprété par la dissociation du complexe en milieu acide: le cuivre ainsi plus ou moins libéré de son « support » organique (de caractère faiblement basique) perd en même temps son état d'exaltation, soit des propriétés catalytiques particulières que lui avait conférées la molécule organique.

Au-dessus du pH 7,2 environ, on remarque une certaine constance de vitesse d'oxydation du Nadi (II) lors de la catalyse par les ions Cu^{+2} seuls (courbe I). La réaction d'oxydation catalysée par le complexe Cu-pyridine (courbe II) ne présente pas cette constance dans cet intervalle de pH. Cette parti-

[1] On sous-entend les complexes *actifs*.

cularité est due à la dissociation plus ou moins forte du complexe.

b) *Influence de la température.*

Nous avons étudié l'influence de la température sur la Nadi-réaction et sur diverses réactions d'oxydation catalysées par des complexes cupriques (dans des conditions standards de pH, durée, etc.). On observe une accélération notable de la vitesse

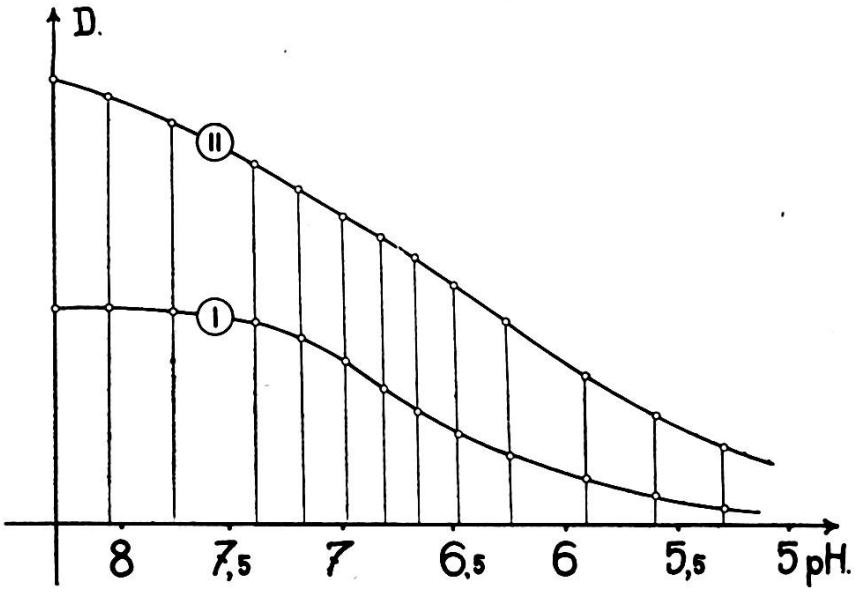


Fig. 9.

Variation de l'intensité d'oxydation du Nadi (II), en fonction du pH (température constante 18°).
Courbe I: catalyse par 50 γ de Cu^{+2} ionique (obs. après 5 minutes).
Courbe II; catalyse par le complexe Cu-dipyridique (20 γ Cu^{+2}) (obs. après 2 minutes).
En ordonnée, nous avons porté la densité optique lue au photomètre (cuves de 1 cm; filtre jaune S 50).

d'oxydation, atteignant son maximum à une température de 80-90°. Au-dessus, la très légère diminution de vitesse de réaction doit être attribuée à une moindre solubilité de l'oxygène nécessaire plutôt qu'à une dissociation ou précipitation du complexe.

c) *Influence de substances chimiques.*

Les substances inhibitrices de la catalyse par les ions Cu^{+2} précédemment signalées, inhibent également l'activité catalytique des complexes cuivrique.

TROISIÈME PARTIE

Modèles non protidiques d'oxydases, de catalase et d'hydrokynases.

1. *Activité catalytique des complexes cuivriques.*

Poussant nos investigations plus loin, nous avons cherché jusqu'à quel point il est permis d'assimiler l'activité de nos complexes cuivriques à celles des oxydases et peroxydases, ainsi que de la catalyse.

Nous avons fait agir des complexes contenant 20 γ de Cu^{+2} sur des substrats variés, à pH = 7,3, tantôt en l'absence, tantôt en présence de peroxyde d'hydrogène; nous avons observé les effets suivants:

A. *Effets oxydasiques.*

Les effets oxydasiques dus au cuivre ionique sont amplifiés par l'emploi des complexes organo-cupriques.

Le graphique n° 10 montre que la vitesse d'oxydation du Nadi croît très rapidement lorsqu'on utilise des complexes cuivriques comme catalyseurs de la réaction.

L'importance de l'activation du cuivre par les différentes substances (nicotine, pyridine, etc.) est fonction de la concentration de ces dernières dans la solution. L'augmentation de vitesse d'oxydation par l'emploi des complexes cuivriques n'est pas le seul effet que l'on observe: les combinaisons complexes, du fait de leur potentiel redox élevé, sont capables de catalyser des oxydations de substrats qui, en présence de cuivre ionique, ne réagiraient pas. Parmi les complexes étudiés, le Cu-iminazole s'est révélé comme étant l'un des plus actifs (l'activité varie parfois légèrement avec le substrat et avec la concentration de ce dernier: en présence de forte concentration de substrat, le catalyseur est plus ou moins paralysé. Fleury a désigné ce

type d'inactivation d'enzyme par un excédent de substrat comme « inhibition paradoxale »). Il catalyse à l'air l'oxydation des polyphénols et amines aromatiques principalement.

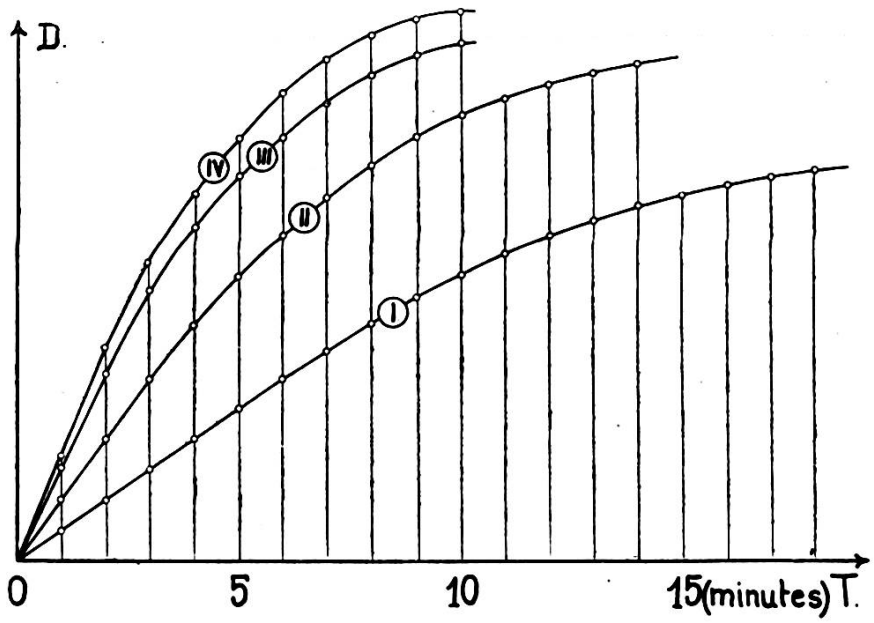


Fig. 10.

Variation de la vitesse d'oxydation du Nadi II catalysée par des complexes cupriques en fonction du temps (pH = 7,3; température constante = 18°).

Courbe I : catalyse par 20 γ de Cu^{+2} ionique.
Courbe II : catalyse par le complexe Cu-nicotine (20 γ Cu^2).
Courbe III : catalyse par le complexe Cu-pyridine (20 γ Cu^2).
Courbe IV : catalyse par le complexe Cu-iminazole (20 γ Cu^2).
En ordonnée, nous avons porté la densité optique (D) lue au photomètre (filtre jaune S 50), cuves de 1 cm).

Substrats	*Produits d'oxydation*
Pyrogallol	Color. brun-orange → précipité brun
Phloroglucine	» jaune → jaune-orange
Hydroquinone	» jaune → jaune-orange
Catéchol	» jaune → gris-jaune
Résorcinol	» jaunâtre → jaune
Orcinol	» rose
Gaïacol	» rose-mauve
Résine de gaïac	» bleu-vert
p-amino-phénol	» brun-jaune → précipité brun
Métol	brun-rose → précipité brun
Adrénaline	» rose → brun-rouge → brun-jaune
Dihydroxyphénylalanine (Dopa)	rosé → gris → brun-noir (mélanines)

Substrats		*Produits d'oxydation*
α-naphtol	»	violet → précipité violet
α-naphtylamine	»	rose → précipité mauve
Diméthyl *p*-phénylènediamine . .	rose →	violet
p-phénylènediamine . . .	»	violet-gris → brun-violet vineux
m- » . . .	»	violet-mauve → précipité brun
Réactif de Schiff (Fuchsine sulfureuse)	»	rose → rouge

Les monophénols (tyrosine, *m*-, *o*-, *p*-crésol) et le réactif de Chodat (*mélange de p-crésol et de glycocolle*) ne sont pas oxydés dans les conditions que nous nous sommes fixées.

Dans le tableau précédent, nous avons signalé quelques substrats pouvant être facilement oxydés catalytiquement par le cuivre et (ou) ses complexes. Ces substrats ont été choisis car ils donnent des produits d'oxydation immédiatement visibles par leur coloration propre. Le cuivre et ses formes complexes ont une action catalytique beaucoup plus générale. Voegtlin [76] a montré que le cuivre catalyse l'oxydation du glutathion dans des solutions de pH = 7,27. Le fer et le manganèse par contre n'ont pas d'effet. Sieffert [63], Bovay [78], Reisner, [79], von Euler [80], Stadelmann [58] ont étudié l'action destructrice sur la vitamine C de traces de cuivre. Cette action semble être spécifiquement due au cuivre; le manganèse et le fer rigoureusement pur seraient inactifs (Barron [81], Sieffert [63]. L'oxydation de la Cystéine par le cuivre est également bien connue [82], [83].

Des expériences dans lesquelles nous avons dosé ces substrats ont montré que l'activité catalytique d'oxydation des complexes cupriques est supérieure à celle du Cu^{+2} ionique.

L'action catalytique des sels de cuivre sur l'oxydation du fer divalent est aussi bien connue. J. Knop [84] la signale comme pouvant fausser des dosages du fer; nous la mettons facilement en évidence par une expérience simple: on verse dans une éprouvette une solution diluée fraîchement préparée d'un mélange de sulfate ferreux et d'acide salicylique (ou d'acide sulfosalicylique); à l'une des éprouvettes, on ajoute une goutte d'une solution de cuivre, l'autre éprouvette servant de témoin. Après quelques minutes déjà ou après quelques

secondes en chauffant, il apparaît la coloration violette, caractéristique due à Fe^{+3} dans l'éprouvette ayant été additionnée de catalyseur.

F. Chodat et H. Cano [85] (1939) ont montré que le complexe ferrisalycilique violet constitue un système oxydant ou en d'autres termes un accepteur d'hydrogène très sensible qui, comme le bleu de méthylène par exemple, passe par hydrogénation à l'état incolore. Ainsi le complexe ferrique est réduit spontanément par l'acide ascorbique, la cystéine, le ferment jaune, le catéchol, l'hydroquinone, etc.: on peut le considérer comme un modèle de transporteur d'hydrogène (modèle de cytochrome). Nous avons montré que le cuivre catalyse la réoxydation par l'oxygène atmosphérique du complexe ferro-acide salycilique. Le système « bimétallique » catalyseur cuprique — complexe ferri-salycilique — substrat oxydable, constitue selon nous un modèle des métaux protides cellulaires du Warburg Keilin système (W. K. S.).

Une expérience semblable à la précédente peut être faite avec une solution diluée d'un mélange de sel ferreux et de rhodanate de potassium. Si l'on fait tomber dans cette solution une goutte de cuivre (Cu^{+2}), il se forme immédiatement la coloration rouge caractéristique du Fe^{+3} (sulfocyanure ferrique). Dans cette expérience, l'oxydation du fer est plus rapide car la présence de sulfocyanure exalte initialement le pouvoir oxydant du cuivre. Ce phénomène de stimulation par le KSCN est semblable à celui que nous avons observé précédemment avec le cyanure en faible concentration entre autres. Ces deux dernières expériences nous paraissent intéressantes car elles sont peut-être en rapport avec les corrélations biologiques fer-cuivre très intimes que nous avons constatées ailleurs (voir première partie) et qui ont été signalées par plusieurs auteurs: L. Maquenne et E. Demoussy [86], à la suite de leurs recherches dans un autre domaine (étude de la toxicité du fer) ont été conduit à considérer le cuivre comme une véritable diastase minérale, ne différant des diastases naturelles qu'en ce qu'elle agit en l'absence de toute matière organique et n'est pas détruite à l'ébullition. Ces chercheurs ont observé que le cuivre, à des doses infinitésimales, accélère l'oxydation du fer au

minimum dans les solutions nutritives. Hart, Waddell, Steenbock, et Elvehjem [87] ont constaté que chez les animaux anémiés et recevant du fer, l'addition de cuivre augmente la teneur en hémoglobine du sang. Cette action favorable du cuivre a encore été constatée sur la formation d'autres ferroporphyrines: sur le cytochrome *a* et la cytochrome-oxydase (Elvehjem 1931-35) [88, 89], sur l'hémoglobine, sur le cytochrome (Schultze 1939-1941) [90], et sur la formation de la protohemine par l'organisme (McHargue [91]).

Autre phénomène semblable: on a signalé un effet activateur du cuivre sur un système ferreux-ferrique utilisé comme modèle de catalase [77 *a*].

Tous ces faits et d'autres encore nous font penser qu'il doit exister dans les phénomènes biologiques des relations très étroites entre le fer et le cuivre, une espèce de synergie des deux éléments où le rôle du cuivre n'est pas moindre.

Des observations *in vitro* que nous avons faites, nous déduisons que le cuivre (ou ses complexes actifs), grâce à sa propriété de vibrer rapidement entre sa forme réduite et oxydée, catalyse les oxydo-réductions du fer, beaucoup plus inerte qu'on ne le pense souvent.

Le cuivre catalyse encore et d'une façon générale la réoxydation des leucodérivés de substances colorantes. Ces derniers sont préparés en réduisant les colorants correspondants par l'hydrosulfite qu'on ajoute en léger excès, ou encore suivant les cas, en milieu acide ou alcalin, par le zinc. Il suffit pour la plupart des leucobases de les soumettre à l'action de l'oxygène atmosphérique, par agitation, pour les transformer à nouveau en colorant. Lorsqu'on ajoute une goutte de cuivre à la solution contenant le leucodérivé, son oxydation est fortement accélérée par rapport à un témoin ne renfermant pas de catalyseur. Nous avons vérifié ces faits sur des colorants histologiques appartenant à différents groupes suivant la nature de leur chromophore:

Colorants du groupe des

a) Thiazines: thionine, bleu de toluidine, bleu de méthylène.
b) Oxazines: bleu de Nil, bleu de crésyl brillant, violet de crésyl.

c) Azines: rouge neutre, violet neutre, safranine T, phénosafranine, vert Janus B.

d) Colorants dérivés du triphénylméthane: rubine S, fuchsine basique, fuchsine S, violet de méthyle, vert malachite, vert lumière, etc.

e) Colorants indophénoliques: phénol-indophénol.

f) Colorants naturels: tournesol, carmin d'indigo.

Le cuivre catalyse encore la réoxydation des différents produits de réduction de la riboflavine (verdo-, chloro-, rhodo-, leuco-flavine).

On sait que la riboflavine entre dans la constitution du groupement prosthétique de plusieurs ferments jaunes respiratoires (Warburg, Christian, Ellinger, Karrer, Kuhn) et que ces derniers sont spontanément oxydables par l'oxygène tout comme la riboflavine elle-même.

Nous pensons que ces faits n'excluent pas qu'*in vivo* et lors d'une respiration normale, un catalyseur cuprique accompagne ces ferments et accélère leur réoxydation (un argument en faveur de cette thèse nous est donné par l'expérience de culture d'*Aspergillus niger* sur milieu carencé en cuivre: voir première partie). On sait d'ailleurs que pour le ferment respiratoire jaune (ancien) de Warburg pour le moins, la fréquence d'oxydo-réduction (sans catalyseur) est trop faible pour lui permettre d'intervenir d'une manière très efficace dans la respiration cellulaire et suffit à peine à expliquer les respirations accessoires et résiduelles [43 *a*].

De même que l'on distingue habituellement deux types de diastases décomposant le peroxyde d'hydrogène — l'un à action peroxydasique vraie, qui effectue cette décomposition avec libération d'oxygène très actif comme oxydant, l'autre décomposant l'H_2O_2 avec libération d'oxygène moléculaire beaucoup moins actif — de même nous distinguons deux effets analogues des complexes cupriques.

B. *Effets peroxydasiques.*

Nos expériences montrent que l'effet peroxydasique des complexes actifs chevauche en réalité à la fois sur l'effet simplement oxydasique et sur l'effet catalasique. La présence d'eau oxygénée ne fait généralement que renforcer le pouvoir

oxydant du cuivre et de ses complexes, mais on observe souvent accessoirement un dégagement d'oxygène moléculaire non consommé dans l'oxydation (effet catalasique). Outre une plus grande vitesse d'oxydation, la présence de H_2O_2 permet de déclencher l'oxydation de substrats qui, en présence d'oxygène moléculaire, resteraient inattaqués.

Le complexe cuivre-iminazole en présence d'eau oxygénée (une goutte de perhydrol par 10 cm^3 de solution tampon) catalyse l'oxydation d'un grand nombre de substrats, particulièrement des phénols et amines aromatiques. Beaucoup de ces substances sont oxydées quasi instantanément:

Substrats		*Produits d'oxydation*
Pyrogallol	Color.	brun-orange → précipité brun-rouge
Phloroglucine	»	brun-jaune
Acide protocatechique . .	»	« thé » → rose-orange
Hydroquinone	»	orange → rouge-orange
Catéchol	»	jaune → brun
Résorcinol	»	jaune-orange
Orcinol	»	rose → orange-rouge
Gaïacol	»	trouble brun-rose
Résine de gaïac	»	Bleu-vert
Adrénaline	»	rose → rouge → orange
Dihydroxiphénylalanine (Dopa)	»	rose → brun rosé → gris-brun (mélanine)
α-naphtol	»	violet → précipité violet
α-naphtylamine	»	violet rose → précipité brun rosé
p-phénylène diamine . . .	»	gris-brun foncé → précipité brun-rouge
m-phénylènediamine . . .	»	trouble brun-violet → gris-brun
Diméthyl *p*-phénylènediamine . .	»	rose, lie de vin → précipité brunâtre
p-crésol.	»	trouble blanc rosé
o- »	»	» vert olive
m- »	»	» beige
Benzidine	»	bleu-vert → olive → précipité brun
Thymol.	»	trouble blanc
Mélange Nadi I	»	rose → violet
» » II	»	bleu à bleu-violet

Dans certains cas, l'action oxydante des complexes du cuivre ne se manifeste qu'en présence d'H_2O_2; le cas suivant en est un

exemple: P. Thomas et G. Carpentier [77 *c*] signalent une action catalytique du cuivre sur l'oxydation par l'eau oxygénée du leucodérivé de la phénolphtaléine (réactif de Kastle-Meyer pour la recherche du sang [77 *b*]). Nous avons observé que certains complexes du cuivre, particulièrement le cation Cu-tétramine, catalysent de façon plus intense l'oxydation de ce réactif.

On prépare la phénolphtaléine incolore en faisant bouillir jusqu'à décoloration complète 1 gr de phénolphtaléine, 10 gr de KOH pur, 50 cm^3 eau bidistillée, 5 gr zinc en poudre. On acidifie par HCl, on filtre le précipité qu'on lave à l'eau acidulée. Le précipité est ensuite mis en suspension dans de l'eau bidistillée, on ajoute une solution de KOH à 10% jusqu'à dissolution du précipité et encore un excès de quelques gouttes.

Quelques gouttes de ce réactif sont versées dans une éprouvette avec 10 cm^3 d'eau distillée ainsi qu'une goutte d'eau oxygénée diluée (perhydrol dilué au moins dix fois). Si l'on fait tomber dans ce mélange une goutte de catalyseur (complexe cuprique) immédiatement une belle coloration rouge se développe. Cette réaction, où le cuivre tétramine joue le rôle de péroxydase, est encore donnée pour des teneurs en cuivre inférieure à 10^{-8} gr/10 cm^3.

Un autre très bel effet peroxydasique est obtenu avec l'*o*-tolidine comme réactif. On ajoute quelques gouttes d'une solution alcoolique d'*o*-tolidine à 10 cm^3 de solution tampon puis une goutte d'eau oxygénée. Lorsqu'on fait tomber dans cette solution une goutte d'un complexe cuprique (Cu-pyridine ou Cu-iminazole) il se forme une belle coloration bleu-vert qui passe rapidement au vert olive et brun. L'ion cuivre seul ne donne pas cette réaction.

C. *Effets catalasiques.*

La décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire, selon la réaction $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$, est accélérée par un grand nombre de substances, et ce surtout en milieu alcalin.

Les métaux finement divisés, en mousse ou en solution colloïdale (Pt, Ag, Au), le charbon, sont très actifs. Beaucoup

d'oxydes et d'hydroxydes métalliques (Mn, Pb, Co, Ni, Fe) se comportent de même, notamment l'hydroxyde de cuivre [92]. La décomposition de l'eau oxygénée sous l'influence de ces substances est cependant assez lente. Nous avons observé que certains complexes du cuivre, notamment les sels (sulfate, chromate) et l'hydroxyde de cuprotétramine, etc., avaient une activité catalytique particulière sur la décomposition de H_2O_2. Lorsqu'on combine le pouvoir catalytique des complexes susmentionnés avec un effet de surface, on obtient de bons modèles de catalase. Nous avons adsorbé les complexes sur divers supports inertes de réaction neutre ou légèrement basique. A cet effet, la craie s'est révélée très favorable. Ces systèmes sont quasi aussi actifs que les enzymes naturels et très peu altérés pendant la réaction. Le dégagement d'oxygène est encore sensible dans les solutions très diluées d'H_2O_2 (1% — 1‰).

Le cuivre n'est pas le seul élément pouvant donner des complexes ayant une activité catalasique. Le cobalt, le nickel, etc. donnent des combinaisons aminées actives. Avec d'autres activateurs, la nicotine par exemple, plusieurs métaux, le manganèse entre autres, donnent des systèmes complexes qui, adsorbés sur de la craie, décomposent fortement l'eau oxygénée diluée.

2. *Similitude d'action des complexes cupriques avec celle des enzymes oxydants naturels.*

Nous avons cité un certain nombre de substrats qui sont oxydés catalytiquement en présence d'air ou d'eau oxygénée par nos complexes cupriques. La littérature fournit un grand nombre de réactions d'identité de ferments oxydants où il est fait emploi de ces mêmes substrats. Citons: la recherche par de nombreux auteurs de la cytochrome-oxydase et des phénolases au moyen du réactif bien connu de Nadi (mélange de Koechlin et Witt [93]), recherche de l'α-naphtol-oxydase parMolisch [94], détection des peroxydases au moyen de la benzidine (réaction de Madelung) selon les procédés de Graham [95], Prenant [96], Romieu [97], etc., recherche des oxydases et peroxydases au moyen de la résine de gaïac [98] et du gaïacol [99], recherche des peroxydases par Grüss [98] au moyen du tartrate d'ursol

(tartrate de *p*-phénylènediamine), détection des phénolases et peroxydases par Bach [100] au moyen de la purpurogalline, recherche des peroxydases par L. Lison [101] par l'emploi des leucodérivés de rosanilines sulfonées, réaction d'identité du sang par Kastle Meyer [77 *d*] au moyen de la leucophénolphtaléine.

L'identité des substrats oxydables par les complexes cupriques et par les enzymes naturels montre la grande similitude d'activité de nos complexes avec celle des ferments cellulaires. Nous avons montré précédemment leur similitude de comportement vis-à-vis des facteurs externes (pH, inhibiteurs).

Nous pensons que tous ces points communs nous autorisent à considérer les complexes organo-cupriques par nous mis en évidence, comme des modèles d'enzyme.

3. *Conclusions.*

Nous avons réalisé divers modèles de ferments oxydants et de ferments décomposant le peroxyde d'hydrogène, à base de cuivre et dépourvus de protéine. Tous nos modèles sont actifs *in vitro*; ce sont des systèmes complexes organo-cupriques où le métal est la partie active (catalyseur) et où les molécules organiques fonctionnent comme groupes activants (co-catalyseur). On peut considérer cet ensemble comme un groupement prosthétique. Nos modèles d'enzymes se distinguent les uns des autres par leur propriété dominante qui peut servir à les classer en trois catégories:

a) type oxydase (indophénol-oxydase, polyphénolase);
b) type peroxydase;
c) type catalase.

Les expériences montrent cependant que les différences entre ces trois types sont plutôt d'ordre quantitatif. Les frontières, déjà si fragiles établies par l'enzymologie classique, tendent encore à s'effacer ici.

Nous avons encore montré la grande similitude de comportement et d'action des complexes cupriques avec celle des ferments cellulaires.

De toute notre étude, il ressort la non-spécificité d'action des modèles sur le substrat.

Au point de vue biochimique la présence de cuivre dans nos modèles n'a rien d'exceptionnel; on connaît plusieurs ferments cellulaires contenant du cuivre: les polyphénolases sont des ferments très répandus surtout chez les végétaux et qui agissent, sur de nombreux substratums de nature phénolique principalement: ils ont été décrits pour cette raison sous diverses dénominations, laccase, catecholase, dopa-oxydase, etc. On attribuait anciennement leur activité à la présence de manganèse (G. Bertrand) [102] puis au fer [103], mais il a été reconnu depuis que c'est au cuivre qu'est due l'activité de ces ferments. Ainsi Kubowitz [104], isolant la laccase de la pomme de terre a montré que son activité est proportionnelle à la teneur en cuivre et qu'il s'agissait d'un protéide cuprique. Keilin et Mann [105] ont à leur tour retiré et purifié des polyphénolases provenant de champignons (*Psalliota*, *lactarius*) et du latex de l'arbre à laque (*Rhus vernicifera*) et ont montré que ces enzymes étaient également des cuproprotéides. D'autres auteurs [106, 107, 108, 109] on pu démontrer que le cuivre est une partie intégrante du groupe prosthétique de l'ascorbinase et qu'il est responsable de son caractère d'oxydase.

Tous ces faits ne laissent aucun doute sur le rôle important, capital même, que joue le cuivre comme catalyseur biochimique.

La fréquence dans l'organisme de certaines molécules activatrices que nous avons éprouvées nous suggère l'hypothèse suivante: ces molécules ou fragments de macromolécules (bases puriques, pyridiques, pyrimidiques, etc.) ne jouent-ils pas le rôle de lien entre le cuivre et la molécule protéinique des enzymes naturels ?

Nous savons qu'une action médicamenteuse consiste essentiellement en une modification du fonctionnement normal d'un organe, dans le sens soit d'une stimulation, soit d'une inhibition, c'est-à-dire d'une augmentation ou d'une diminution de l'excitabilité et des oxydations. Une importante littérature traite de l'influence des substances médicamenteuses sur la respiration cellulaire [110]. Les activateurs du cuivre éprouvés,

comprenant précisément un nombre élevé de substances réputées pharmacodynamiques, on peut se demander alors si l'activité de ces médicaments n'est pas en partie, due à leur fonction d'auxiliaire des oxydations biologiques. L'hypothèse de l'action physiologique de substances basées sur une activation ou inhibition de l'activité catalytique du cuivre cellulaire, nous paraît très plausible; elle permet d'expliquer d'une façon très élégante l'action stimulante et excitante exercée par de faibles doses de certains poisons comme le cyanure, la thio-urée, et l'action inhibitrice exercée à plus forte dose. On peut encore expliquer de façon simple le mécanisme de l'action cardiotonique de la coramine et l'action plus ou moins toxique de la nicotine, etc., etc.

On n'oubliera pas que beaucoup de substances inactives telles quelles *in vitro* peuvent devenir stimulantes dans l'organisme par suite de leur fixation qui entraîne la disparition de groupements inhibiteurs ou par suite de modifications ou dégradations chimiques souvent légères.

L'hypothèse formulée plus haut gagne encore en importance lorsqu'on connaît la distribution générale du cuivre dans la matière organique. La littérature scientifique nous apprend à ce sujet que le cuivre est un élément qui existe à l'état de traces (oligoélément) dans la matière vivante mais dont la présence est générale dans tous les organes des animaux et chez les plantes. On sait qu'il existe dans l'hémocyanine du sang des mollusques, des crustacés et des arachnides où il joue un rôle de catalyseur d'oxydation, pouvant remplacer le fer ou fonctionner conjointement avec lui. La présence de cuivre a été signalée chez de nombreux animaux depuis les plus simples (Cœlentérés) jusqu'au plus évolués en passant par les Echinodermes, les Annelides, les Mollusques, les Crustacés, les Poissons, les Batraciens, les Oiseaux (D. Bertrand); le cuivre se rencontre dans de nombreuses cellules en même temps que le fer (O. Warburg); on le trouve aussi dans la levure, dans la bile, dans le sérum et les globules sanguins (Flim) dans le lait de femme (G. Krausz), dans le lait de vache.

Le foie contient normalement du cuivre; la dose est plus élevée chez le fœtus et diminue continuellement jusqu'à la

naissance et ensuite jusqu'à l'âge adulte (F. Haurowitz). Chez le rat, le cuivre est surtout localisé dans les organes à métabolisme intense: rein, foie, cœur, cerveau, testicule, etc. (Lindow, Peterson et Steenbock).

Tous ces faits témoignent de l'important rôle oligodynamique du cuivre.

Plusieurs auteurs, dont G. A. Zentmyer [111] (1943-1944) expliquent l'action fongicide et toxique de certaines substances (hydroxy 8-quinoléine, quinone-dioxime, salicylaldoxime, dithiocarbamate, etc.) par le bloquage des métaux nécessaires à la vie (Cu, Zn) que ces dernières opèrent.

Nous pensons que le bloquage du cuivre n'est pas seul à avoir des répercussions biologiques, mais que les phénomènes d'exaltation de l'activité catalytique du cuivre — élément si universellement répandu dans tout organisme — peuvent également avoir des conséquences importantes. Certains de nos modèles d'oxydase fonctionneraient *in vivo* comme de véritables enzymes oxydants.

Notre hypothèse permet d'expliquer un grand nombre de phénomènes biologiques, comme par exemple les phénomènes d'antagonisme (les incompatibilités d'action de la nicotine et de l'hydroxy 8-quinoléine par exemple), les actions synergiques de certaines drogues et leur spécificité; des variations de potentiel redox par suite des actions de stimulation ou d'inhibition des propriétés catalytiques du cuivre seraient à la base de toutes ces manifestations.

Ces conceptions nouvelles, trop succinctement esquissées, font cependant ressortir le rôle capital joué par le cuivre dans les processus vitaux. Les constatations que nous avons faites sur l'activité universelle du cuivre comme catalyseur d'oxydation et le fait que le cuivre a été trouvé par Rivers et Macfarlane [112] à l'exclusion de tout autre métal dans les formes les plus simples de la matière vivante, soit dans des virus (virus vaccinal Jennerien) font que nous nous demandons avec L. Sieffert si le cuivre est un catalyseur d'oxydation parmi d'autres ou s'il ne doit pas plutôt être considéré comme « le » catalyseur des oxydations biologiques.

Addenda :

En relations étroites avec les observations que nous avons faites *in vitro*, nous avons encore constaté que lorsqu'on traite des tissus végétaux (tissus méristématiques, poils absorbants, algues, mycelia) par une solution de $CuSO_4$ à $1^0/_{00}$ durant quelques minutes, on forme des systèmes oxydasiques et peroxydasiques au niveau de certains organites (mitochondries ?) qui peuvent être ensuite mis en évidence par les réactifs usuels des oxydases: mélange Nadi avec ou sans H_2O_2, benzidine + H_2O_2, réactif de Kastle Meyer, etc.

Ces granules d'oxydase sont formés *de novo* par le traitement cuprique et se surajoutent à ceux existants déjà dans les cellules. Ces essais montrent que le cuivre n'est pas fixé de façon uniforme par tout le cytoplasme cellulaire, du moins pas sous une forme active en tant que catalyseur. Le traitement cuprique a encore pour effet de diminuer le pouvoir réducteur de la cellule, probablement par oxydation catalytique de divers substrats qu'elle renferme habituellement (acide ascorbique).

Tous ces faits nous suggèrent une explication du mécanisme de la toxicité différentielle des sels de cuivre utilisés comme fongicides: les cryptogames, les moisissures et certaines algues en particuler, sont précisément les espèces cellulaires les plus sensibles à l'action toxique du cuivre et chez lesquelles on note la plus intense formation de systèmes oxydasiques.

Par les constatations énoncées, nous sommes amené à formuler des critiques et réserves à la méthode de Sato [115] pour la mise en évidence de granules de peroxydase dans les leucocytes. Il est possible que le traitement cuprique préalable préconisé par la méthode crée de toute pièce ces « peroxydases ». La réaction à la benzidine subséquente décèle alors aussi bien ces *arte factes* que les diastases naturelles.

4. *Effets hydrokinasiques du cuivre (Cu^{+2}) et des complexes cupriques.*

Au cours des recherches précédentes, nous avons observé le rôle que joue le cuivre en tant que catalyseur d'oxydation. Sachant que les ferments qui accélèrent les oxydations bio-

logiques ne provoquent pas une fixation d'oxygène, mais favorisent plutôt une déshydrogénation du substratum, en rendant l'hydrogène « actif » (mobile), c'est-à-dire susceptible d'entrer en réaction avec l'oxygène moléculaire (théorie de Wieland), il nous a paru intéressant d'expérimenter si nos complexes cupriques favorisaient également les oxydations par déshydrogénation. Nous avons entrepris quelques expériences dans ce sens en substituant à l'oxygène atmosphérique un accepteur d'hydrogène tel que le bleu de méthylène (rH = 13,5 — 15,5).

Mode opératoire :

On utilise une solution tampon phosphate (PH = 7,3) bouillie pour chasser les gaz dissous et légèrement teintée en bleu ciel par du bleu de méthylène. Les expériences d'oxydation peuvent être faites en tube de Thunberg, mais il nous a paru préférable d'utiliser un cylindre à vide dans lequel on peut mettre un certain nombre d'éprouvettes ordinaires; ainsi lorsqu'on fait le vide dans le cylindre, tous les tubes d'une même série sont soumis à la même tension d'oxygène résiduelle, ce qui exclut des erreurs de résultats dues à ce facteur très important.

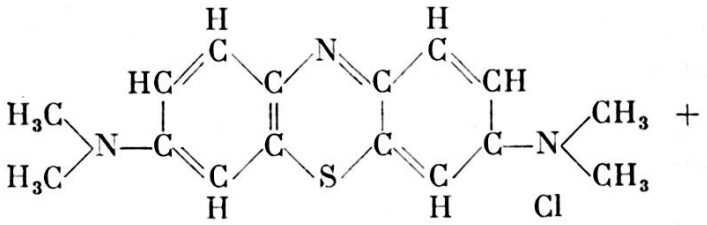
Résultats :

On observe que sous vide, le bleu de méthylène est réduit à l'état de leucodérivé par différentes substances, plus rapidement en présence qu'en l'absence de catalyseur cuprique.

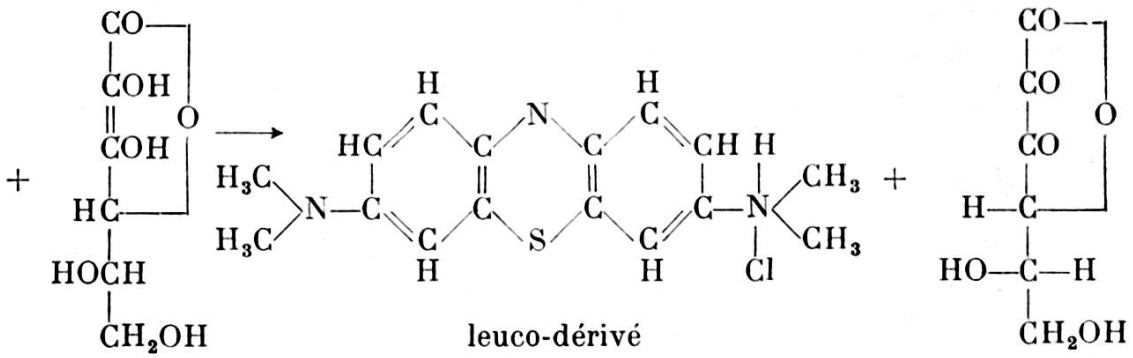
Ce type de réaction est particulièrement net avec l'acide ascorbique, la cystéine et le glutathion. On peut le représenter schématiquement comme suit (page suivante):

On peut considérer cette réaction comme une oxydation (déshydrogénation) du substrat (acide ascorbique) ou comme une réduction (hydrogénation) du bleu de méthylène.

En fait, il s'agit d'une oxydo-réduction où le colorant sert d'accepteur aux deux hydrogènes cédés par l'acide ascorbique, qui, de ce fait, est oxydé en acide déhydroascorbique. Le cuivre et surtout les complexes cupriques, principalement le cuivre-tétramine, qui catalysent ce type de processus, activent donc l'hydrogène du substrat et le rendent apte à entrer en réaction avec l'accepteur. Nos modèles « d'oxydases » doivent donc être



bleu de méthylène



acide *l*-ascorbique — leuco-dérivé — acide déhydro-ascorbique

considérés plutôt comme des modèles de « déshydrases », au sens de Wieland [113].

En général, le bleu de méthylène est réduit spontanément, sous vide, par les différents substrats facilement oxydables, mais avec des vitesses bien moindres. Lorsqu'on rétablit la pression d'oxygène, le bleu de méthylène réduit, se recolore et cela généralement d'autant plus vite s'il y a présence de catalyseur [1]. Ce phénomène dépend de plusieurs facteurs dont, entre autres, la tension d'oxygène (variable par agitation), les vitesses relatives des diverses réactions (fonction du catalyseur), etc. Ainsi l'acide ascorbique, la cystéine, le glutathion, en présence de catalyseur, réduisent le bleu de méthylène à l'air plus rapidement que ne se réoxyde le leucodérivé; mais une légère agitation suffit à déplacer l'équilibre et alors la vitesse de recoloration l'emporte.

D'autres substrats peuvent encore être oxydés en présence de bleu de méthylène, tel que le pyrogallol ou l'hydroquinone,

[1] Nous avons signalé précédemment l'action catalytique du cuivre sur la réoxydation des leuco-dérivés.

mais c'est surtout avec les accepteurs d'hydrogène ayant un potentiel redox plus élevé, qu'il est possible d'oxyder des substrats variés: nous avons fait des essais entre autres avec le dichlorophénol-indophénol (rH = 20-20,5). Cette substance qui est utilisée pour le dosage de la vitamine C est encore spontanément réduite à l'air (en l'absence de tout catalyseur) par différents substrats comme le glutathion, la cystéine, l'hydroquinone, le pyrogallol, la phloroglucine, le métol, etc. Avec d'autres substrats, la décoloration du dichlorophénol-indophénol est plus lente et peut nécessiter plusieurs jours. Cette dernière substance oxyde par déshydrogénation des polyphénols comme le catéchol, le résorcinol, la Dopa, l'adrénaline, etc. mais encore d'importants métabolites comme le pyruvate, le lactate, l'acide glutamic, etc.

Nous avons observé que, d'une façon générale, le cuivre et ses formes complexes actives, catalysent et accélèrent tous ces transferts d'hydrogène.

5. *Conclusions.*

Nous montrons que le cuivre ionique et ses combinaisons complexes, catalysent l'oxydation de divers substrats en présence d'accepteurs d'hydrogène convenables. Dans ces cas d'oxydation avec formation concomittante de leucodérivés, il s'agit de réactions de déshydrogénation du substrat et d'hydrogénation du colorant. Nous voyons que le cuivre catalyse en fait les transferts d'hydrogène. A. Reid [114] signale déjà l'action déshydrasique du cuivre.

Il est probable que dans tous les cas où le cuivre intervient comme catalyseur (cuivre ionique, complexe ou diastases cupriques) il y a « activation » de l'hydrogène.

Dans les expériences précédentes en « aérobiose » l'oxygène élémentaire ou le peroxyde d'hydrogène fonctionnaient donc comme des accepteurs « passifs » de l'hydrogène. On admet (Wieland [113]) que lorsque l'hydrogène est activé et transféré sur l'oxygène élémentaire, la réaction conduit à la formation d'H_2O_2. Nous n'avons cependant jamais pu mettre ce corps en évidence au cours des processus oxybiotiques catalysés par le cuivre. Ce fait ne nous étonne pas car comme nous l'avons

montré, les complexes cuivriques décomposent rapidement l'H_2O_2 en H_2O et oxygène (action catalasique) d'une part et d'autre part nos modèles catalysent d'une manière générale les oxydations par H_2O_2.

Par analogie avec nos modèles d'enzyme qui se comportent en « oxydase » en présence d'oxygène et en « déshydrase » en l'absence d'O_2, nous pensons que les oxydases cupriques naturelles peuvent fonctionner de même comme catalyseurs de déshydrogénation anoxybiotique lorsque la tension d'oxygène est suffisamment faible (voir en première partie les faits biologiques qui nous suggèrent encore cette hypothèse). Cette hypothèse appelle plusieurs corollaires et parmi ceux-ci principalement celui de la sensibilité aux inhibiteurs classiques (KCN, etc.).

Plusieurs auteurs ont déjà attiré l'attention sur le fait que le système déshydrasique (W. W. S.) présente une certaine sensibilité aux inhibiteurs habituels des oxydases (réactifs des métaux lourds), bien que l'on admette encore souvent que le Warburg-Wieland Système (W. W. S.) est cyano-insensible (et par suite régi par des catalyseurs non métalliques).

Cook, Haldane et Mapson [116] entre autres admettent d'ailleurs que certaines déshydrases naturelles renferment du cuivre.

Nos observations infirment encore semble-t-il, l'hypothèse de l'activation de l'oxygène qui, par ailleurs, est déjà sérieusement ébranlée. En effet, nous avons montré d'une part que la Nadi-réaction est catalysée par le cuivre et que celui-ci active l'hydrogène du substrat. On sait que la Nadi-réaction est donnée par le ferment rouge respiratoire de Warburg qui selon son auteur serait un ferment activant l'oxygène. Il suffirait maintenant de montrer que l'« Atmungsferment » ou cytochrome-oxydase est un enzyme cuprique, pour anéantir l'hypothèse de Warburg.

BIBLIOGRAPHIE

[1] FLEURY, C. Thèse nº 1121, Genève, *a*) p. 88, *b*) p. 97, *c*) p. 89.
[2] THOMPSON, R. C. and KOSAR, W. F. *Science*, *87*, 218, 1938.
[3] DENNY, F. E. *Contribution of Boyce Thompson inst.*, *7*, 55 1935; ib. *12*, 309, 1942.
[4] CHODAT, F. et DUPARC, G. *Helv. Chim. acta*, *27*, 1, 334 (1944).
[5] ASTWOOD, E. B. J. *Amer. med. Ass.*, *122*, 78, 81, 1943.
[6] SCHINDLER, O., SCHÄR, M., STACHELIN, D. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, *23*, 117-128, 1948.
[7] BERNHART, G. *Praxis, Revue Suisse de médecine*, nº 48, nov. 1947.
[8] ASTWOOD, E. B. *J. Pharmacol. 78*, 79, 1943, RAWSON, R. W. c.s., *Endocrinology 34*, 245, 1944; CLIN, J. *Endocrinology 4*, 201, 1944; AMER, J. *Med. ass. 127*, 69, 1945. PASCHKIS, K. E. *C.S.*, *Proc. Soc. Exp. Biol.* a. *Med. 60*, 148, 1945.
[9] BERNHEIM, F., et BERNHEIM, M. L. C., BIOL, J. *Chem. 145*, 213 1942. PASCHKIS, C. S. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 57*, 37, (1944). DU CHALIOT, C. *Boll. Soc. ital. Biol. aper. 23*, 945, 1947.
[10] DUBOIS, K. P., et ERWAY, W. F. *J. Biol. Chem.*, *165*, 711, 1946.
[11] RICHTER, C. P., et CLISBY, K. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, *48*, 684, 1941.
[12] DICKE, S. H. *Endocrinology*, *40*, 123, 1947.
[13] JAQUES, R. *Experientia*, *6*, 148, 1950.
[14] GREEN, MCCARTHY and KING. *J. Biol. Chem.*, *128*, 447, 1949.
[15] STADELMANN, R. Thèse, nº 1133, Genève.
[16] CHARLOT, G. et BEZIER, D. Méth. modernes d'analyse quantitative minérale, p. 89 et p. 278.
[17] BERTRAND, G. *Analytica Chimica acta*, *2*, 1948.
[18] BER, A. *Experientia*, vol. 5, 2, 455 (1949).
[19] MORRISON, S. L., et HARRIET. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, *18*, 211-13, 1946.
—— —— *A. 40*, 1, 1946, 2410.
[20] PIPER, C. S. *J. Agric.*, *Sci.*, *32*, 143-78, 1942.
—— *Soil and Plant Analysis Adelaïde.*
[21] MULDER, E. G. Thèse Wageningen, 1938.
—— *Analytica chimica acta*, *2*, 793, 1948.
[22] ROCHAT, J. *Helv. Chim. Acta 4*, 819-30, 1946.
[23] NICLOUX. *Bull. Soc. Chim.*, *35*, 330, 1906.
[24] FLEURY, Cl. *Bull. de la Soc. vaudoise des Sciences Naturelles*, *63*, 1948.
[25] FLEURY, Cl. *Bull. de la Soc. botanique suisse*, *58*, 1948.
[26] HORSFALL, J. G. *Fungicides and their Actions*, 116, 1945.
[27] SHIBATA, K., et TAMIYA, H. *Acta Phytochimica*, *5*, 34, 1928-31.

[28] WALTRE, G., und STORFER, E. *Monathefte fur Chemie*, *65*, 21, 1935.
[29] QUARTERLY, J. *of Pharm. and Pharmacol*, *19*, 64, 1946.
[30] PONGRATZ, E. *Helvetica Chimica Acta*, *33*, 410, 1950.
[31] FEIGL. S., 383.
[32] TAMIYA, H. *Advances in enzymology*, *2*, 218.
[33] LICHTENTHAELER, Ch. *Le cytochrome et la respiration cellulaire* 65, 1944.
[34] BANGA, J., und SZENT-GYORGYI, A., HOPPE-SEYL, Z. *255*, 57-60, 1938.
[35] SZENT-CYORGYI, A. *Acta Univ. Szeged* (*e*), *9*, (1), 98, 1937.
[36] —— *Bull. Soc. Chim. biol.*, Paris, *20*, 846-858, 1938.
[37] WOODS, J. T., MELLON, M. G. Thiocyanate méthode for iron A spectrophotome-tric Study. *Ind. Eng. chem. Anal. Ed.*, *13*, 551, 1941.
[38] FORTUM, W. D. et MELLON, M. G. Determination of iron O-phenanthroline. A spectrophotometric study. *Ind. Eng. Chem.*, *Anal. Ed.*, *10*, 60, 1938.
[39] EHRLICH, P. *Das Sauerstoff bed. organismus Berlin*, 1885.
[40] ROHMANN, P., and SPITZER, W. *Ber. d. deutsch, chem. Ges.*, *28*, 567, 1995, SPITZER, W., PFLUGERS. *Arch. f.d. ges. Physiol.* *60*, 322, 1895.
[41] POHL, J. J. *Archiv. exp. Pathol.*, *Bd.*, 38, cité par Czapek, biochemie, *2*, 469.
[42] CZAPEK. cité dans *H. Molisch Mikrochemie der Pflanze*, 2e éd., 317.
[43] LICHTENTHAELER, Ch. *Le cytochrome et la respiration cellulaire*. Librairie médicale F. Roth & Cie, Lausanne, 1944, p. 202.
[44] BRADFIELD, J. R. G. *Biological Reviews*, *25*, 113, 1950.
[45] OPPENHEIMER, Of. C. *Die Fermente und ihre Wirkungen 2*, 1759, 1926.
[46] FLORKIN, Cf. *introduction à la chimie générale*, 3e éd., 153, 1944.
[47] POLONOVSKI, M. *Eléments de biochimie médicale*, 318, 1942.
[48] SHIBATA, Y. & K. *Acta phylochimica*, *4-5*, 369, 1928-29.
[49] TREADWELL, W. D. *Manuel de Chimie analytique*, p. 227, 1943.
[50] FEIGL, B. *Mikrochemie*, *56*, 2083, 1923.
[51] —— *J. pharm. Chim.*, *2*, 531, 1925.
[52] FLEURY, Cl. *Bull. soc. vaudoise des Sc. nat.*, *53*, 1948, 1942.
[53] LIBERMANN, D. *Bull. Soc. Chim. Biol. 31*, 1325, 1949.
[54] RIESENFELD, E. H. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 612, 1943.
[55] MORGAN, G. *Ch. Soc. 117*, 1457, 1920.
[56] WYSS-CHODAT, F., et CHODAT, F. *Compte rendu des séances de la Sté de physique et d'histoire naturelle de Genève. 56*, 210, 1939.
[57] KAUFMANN, L. *Diss. EPF*, 1943.
[58] STADELMANN, R. Thèse no 1133. Genève.

[59] VON EULER, H. *Ergebnisse der Enzymforschung*, vol. 3, p. 158.
[60] MEIER, R. *Schweiz. Ztsch. für Pathologie und Bakteriologie*, *9*, 341, 1946.
[61] BOUVET, P. *Bull. Soc. Chim. biol. 31*, 1307, 1949.
[62] BARBU, E., LESSIAU, J., et MACHEBŒUF, M. *Bull. Soc. Chim. biol. XXXI*, 1254 (1949).
[63] SIFFERT, L. J. M. Thèse nº 1075, Genève.
[64] TENENBAUM, L. E. and JENSEN, H. *J. Biol. Chem.*, *147*, 27, 1943.
[65] WERNER, A. und PFEIFFER. *Nähere Auschauungen auf. d. Gebiet der anorg. Chemie* (5e éd. 1923) Braunschweig.
WEINLAND, R. *Einführung in die Chemie der Komplex verbindungen* (2e éd. 1924) Stuttgart.
[66] PONGRATZ, E. *Archives des Sciences*, vol. *3*, 84, 1950.
[67] WENGER, P. et DUCKERT, R. *Traité de Chimie analytique qualitative minérale*, 1946.
[68] LINDAHL, E. und ÖRSTRÖM, A. *Naturwissenschaften*, *24*, 142, 1936.
[69] EMERSON, R. *Journ. gen. physiol.*, *10*, 469, 1927.
[70] WARBURG, O. *Biochem. Ztschr. 100*, 230, 1919.
[71] HANES, Ch., BAKER, J. *Proceed Roy. Soc. London* (B), *108*, 95, 1931.
[72] VAN DE PAAUW. *Rec. trav. botan. neerl.*, *29*, 497, 1932.
[73] RABINOWITCH, E. *Photosynthesis*, *1*, 301, 1945.
[74] SHOUP, C. S. et BOYKIN, J. T. *Journ. gen. physiol.*, *15*, 107, 1931.
[75] WOLF, P. Thèse nº 1157, Genève.
[76] REUTER, L. *Traité de Chimie pharmaceutique*, p. 276, 1939.
[77] THOMAS, P. *Manuel de Biochimie*, 1946: pp. *a*) 185, *b*) 557, *c*) 105, *d*) 623.
[78] BOVAY, E. Thèse, Lausanne, 1944.
[79] REISNER, W. Thèse, Munich, 1940.
[80] EULER, MYRBÂCK u. LARSSON, Z. *Physiol. Ch. 1*, 217, 1933.
[81] BARRON and KLEMPERER. *J. Biol. chem. 116*, 563, 1936.
[82] VON EULER, H. *Ergebnise der Gnzymforschnug* Vol. 3, o. 157.
[83] BERSIN, Th. *Advances in Enzymology*, *10*, 276.
[84] KNOP, J., AMER, J. *Chem. Soc. 46*, 265, 1924.
[85] CHODAT, F., CANO, H. *Compte rendu des séances de la Soc. de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève*, *56*, 315, 1939.
[86] MAQUENNE, L. et DEMOUSSY, E. *C.R. Acad. sc. 170*, 1542, 1920,. *151*, 210, 1920.
LERAUX, D. Cf. Thèse: *Contr. à l'étude agronom. de divers oligo-éléments*, p. 52, Paris, 1924.
[87] HART, E. B., STEENBOCK, H., WADDELL, J. and ELVEHJEM, C. A. (1928), *J. Biol. Chem. 77*, 797-812.
[88] ELVEHJEM, C. A. *Journ. Biol. Chem. 90*, 111, 1931.
[89] ELVEHJEM, C. A., *Physiol. Rev. 15*, 471-507, 1935.
[90] SCHULTZE, M. O. *Journ. Biol. Chem. 129*, 729, 1939, *130*, 219, 1941.

[91] McHargue, J. S., Healy, D. J. and Hill, E. S. *J. Biol. Chem. 70*, 637-41, 1928.
[92] Tian, A. und Roche. J. Cf. *Précis de Chimie*, p. 252, 1942.
[93] Langeron, M. *Précis de Microscopie*, p. 1033, 1934.
[94] Molisch, H. *Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen Jena*, 1901.
—— *Mikrochemie der Pflanze*, 2e éd
[95] Graham. *Journ. of med. research 39*, 15-24, 1918. *Journ. of exper. med. 31*, 209, 1920.
[96] Prenant. *Bull. Soc. zool. de France 46*, 140-143, 1922.
[97] Romieu, C. R. *Acad. des Sc., 201.* 455, 1922.
[98] Tunmann-Rosenthaler. *Pflanzenmikrochemie*, 2e éd, 1931.
[99] Bach u. Zubkowa. *Biochem. Ztsch., 125*, 288.
[100] Bach, A. *Ber. deutsch. chem. Ges. 47*, 2125, 1914. *Ber. deutsch. chem. Ges. 47*, 3151, 1913.
[101] Lison, L. *C. R. Soc. de biologie, 106*, 1266-1268, 1931.
[102] Bertrand, G. *C. R. Ac. Sc. 124. Idem, 124*, 1897, 1032. *Bull. Soc. Chim. Biol. 15*, 791, 1896.
[103] Fleury et Campora. *Bull. Soc. Chim. Biol., 16*, 1589, 1934,
[104] Kubowitz. *Biochem. Zeitschr. 292*, 221, 1937.
[105] Keilin and Mann. *Nature, 143*, 25, 1939. *Proced. Roy. Soc. London B, 125*, 187, 1938.
[106] Lampitt, L. H. and Clayson, D. H. F. *Biochem*, J. *15-16*, 39, (1945). Stotz, Harrer and King. *J. biol. Chem. 119*, 611, 1937.
[107] Ramasarma, G. B., Daha, V. R. et Doctor, N. S. *Enzymologia 8*, 108, 1940.
[108] Powers, W. H., Lewis, S. et Dawson, C. R. *J. Gen. Physiol., 27*, 167, 1944.
[109] Loveh, Janison, Nelson. *Cité d'après Powers et Coll* (63).
[110] Levy, J. Cf. *Pull. Soc. Chim, biol. 28*, 1946.
[111] Zentmyer, G. A. *Phytopath. 83*, 1121, 1943, *Science 100*, 294, 1944.
[112] Boivin, A. et Delaunay, A. *L'organisme en lutte contre les microbes.*
[113] Wieland, H. *Handbuch der Biochemie, 2*, 252-272, Jena 1923.
—— u. Franke, W. *Lieb, Ann. 464*, 101, 1928.
[114] Bertho, Alfred. Cf. *Ergebnisse der Enzymforschung B*, 11, p. 212.
[115] « Ciba ». *Les principaux modes d'emploi des colorants pour la microscopie*, p. 39.
[116] Cook, Haldam u. Mapson. *Biochem. J., 25*, 534, 1931.