Schweizer, K.

Tyrosinase et desamination...

[1916]

QK
896
S413
1916
Bot.

De la part de l'Autour

UNIVERSITÉ DE GENÈVE :: INSTITUT DE BOTANIQUE

Professeur Dr R. CHODAT

TYROSINASE ET DÉSAMINATION

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences

PAR

KARL SCHWEIZER

de Winterthur

Chimiste diplômé et ex-assistant au laboratoire de chimie végétale
de l'Institut de botanique de Genève

THÈSE N° 573

GENÈVE

IMPRIMERIE ATAR, CORRATERIE, 12

8416
5413
1916
BOT

UNIVERSITÉ DE GENÈVE :: INSTITUT DE BOTANIQUE
Professeur Dr R. CHODAT

TYROSINASE ET DÉSAMINATION

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences

PAR

KARL SCHWEIZER

de Winterthur

Chimiste diplômé et ex-assistant au laboratoire de chimie végétale
de l'Institut de botanique de Genève

THÈSE N° 573

GENÈVE

IMPRIMERIE ATAR, CORRATERIE, 12

La Faculté des Sciences, sur le préavis de M. le professeur R. Chodat, autorise l'impression de la thèse présentée par M. Karl Schweizer intitulée : Tyrosinase et désamination, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 6 mars 1916.

Le Doyen,

H. FEHR

541

À mes chers parents

*Ce travail a été effectué au laboratoire de
chimie végétale sous la bienveillante direction
de*

Monsieur le professeur R. Chodat

Dr. h. c.

*Qu'il me soit permis de lui exprimer ici
toute ma reconnaissance ainsi que mes senti-
ments d'admiration.*

I

HISTOIRE DE LA TYROSINASE

Introduction et définition

L'étude des ferments est une des branches les plus récentes des sciences et est encore peu avancée. Nous ne savons pas jusqu'ici ce que c'est qu'un ferment; on ne connaît point sa constitution chimique. Mais par contre, nous pouvons bien observer leur action. Ceci nous rappelle donc l'époque où aussi la chimie ne distinguait que des fonctions, acides et basiques, sans pouvoir distinguer les différents acides et bases dans leur composition. C'est dans ce stade que se trouve à peu près aujourd'hui l'enzymologie: on ne connaît que la fonction ferment.

La tyrosinase est connue depuis une vingtaine d'années. Mais d'autres fonctions ferments ont été observées déjà depuis fort longtemps; la plus vieille est sans doute celle qui transforme le sucre en alcool, connue déjà par les anciens sous le nom de fermentation alcoolique. En 1752, Réaumur¹ a entrevu le premier l'intervention de ferments dans la digestion, essais qui en 1783 avaient été confirmés par Spallanzani². En 1812, Kirchhoff³ a observé le dé-

¹ Réaumur. — *Sur la digestion des oiseaux*. — Mém. de l'Ac. des Sc., 1752, 266 et 461.

² Spallanzani. — *Recherches sur la digestion*. — Genève, 1783.

³ Kirchhoff, C. — *Journal de phys. et chim.* — 1812, 74, 199.

doublément de l'amidon en sucre par l'action de gluten frais, étude qui a été continuée en 1823 par Dubrunfaut⁴. Egalement avant la découverte des ferments oxydants, Liebig et Wöhler⁵ avaient encore trouvé l'émulsine contenue dans les amandes et qui dédouble certains glycosides. En outre, Bussy a démontré l'existence de la myrosine.

La présence de *ferments oxydants* a sans doute été constatée d'abord dans différents organes végétaux bleuisant par la teinture de gaïac⁶.

⁴ Dubrunfaut. — *Mémoire sur la saccharification*. — Soc. d'agriculture, Paris, 1823.

⁵ Liebig et Wöhler. — *Annales de pharm.* 1837, 22, 1.

⁶ Planche. — *Note sur la sophistication de la résine de jalep et sur les moyens de la reconnaître*. — Bull. de pharm., 1810, 1, 518.

Taddei. — *Recherches sur le gluten du froment*. — Journ. de pharm. 1819, 5, 56.

Taddei. — *Sur la coloration de la résine de gaïac par la farine de froment*. — Journ. de pharm., 1820, 6, 14.

Schönbein. — *Notiz über das Guajakharz*. — Poggendorfs Annalen, 1845, 67, 97.

Nachträgliche Notiz über das Guajakharz. — Poggendorfs Ann., 1845, 67, 99.

Ueber die Einwirkung des Ozons und einiger Superoxyde auf das Guajakharz. — Ber. d. Naturf. Ges. Basel, 1845, 7, 13.

Ueber das Bläuen des Guajakharzes. — Ber. d. Naturf. Ges., 1847, 8, 100.

Ueber das Guajakharz. — Poggendorfs Ann., 1878, 73, 489.

Weitere Mittheilungen über das Guajakharz. — Poggendorfs Ann., 1848, 75, 351.

Sauerstofferreger und Sauerstoffträger in der organischen Welt. — Arch. f. physiol. Heilk., 1856, 1.

On constatait ensuite un grand nombre d'oxydations de différents corps produites en présence de ces tissus. En 1871, Jaquet⁷ a enfin réalisé ces actions aussi hors de l'organisme. Il a observé que les mêmes oxydations avaient aussi lieu en présence d'un extrait des dits organes. Mais des preuves exactes de l'existence de ferments qui activent exclusivement les oxydations n'ont été données que par les travaux classiques de Bertrand. Il s'est basé sur les recherches de Yoshida⁸, qui avait observé que le latex de l'arbre à laque (*Rhus vernicifera*) a d'abord une apparence laiteuse, mais qu'il noircit et se durcit bientôt en présence de l'air. Il en retira une substance blanche sans laquelle le suc ne se laquait pas; mais en l'ajoutant au suc d'où on l'avait retirée, on lui restituait ses propriétés. En 1894, Bertrand⁹ a repris ces recherches. C'est lui qui donna le nom de *laccase* à ce ferment. Il a démontré que ce ferment agit en l'absence d'amidon, de saccharose, d'amygdaline, de fibrine, et il établissait la distinction des ferments hydrolysants, d'une part, et de la laccase comme ferment oxydant d'autre part¹⁰. Deux années plus tard, Ber-

⁷ Jaquet, A. — *Ueber die Bedingungen der Oxydationsvorgänge in den Geweben.* — Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., 1871, 29, 386.

⁸ Yoshida, Kikowkuro. — Chemistry of lacques (urushi). I part. - Journ. of the pharm. Soc., 1883, 43, 472.

⁹ Bertrand, G. — *Sur le latex de l'arbre à laque.* — Compt. rend., 1894, 118, 1215.

¹⁰ Bertrand, G. — *Sur le latex de l'arbre à laque et sur une nouvelle diastase contenue dans ce latex.* — Soc. de biol. 1894, 478.

trand¹¹ observa que la laccase n'a point d'action sur la tyrosine, tandis que c'est le cas avec un autre ferment, qui par contre n'attaque pas les polyphénols. Il donna le nom de *tyrosinase* à ce ferment. C'est donc en 1896 que notre ferment a été découvert par Bertrand.

Bertrand, après avoir démontré ainsi qu'il existe deux ferments oxydants différents à fonctions spécifiques, propose de les désigner sous le nom général d'oxydases. Dans la suite, on a encore découvert d'autres ferments oxydants. La base de leur classification, dont on se sert encore aujourd'hui, n'a été donnée qu'au commencement de ce siècle par Chodat et Bach¹². Mais ce n'est qu'en 1905 que Chodat¹³ donne une classification plus détaillée. Il divise les ferments oxydants en :

a) **Oxydases.**

1° Les *laccases* considérées par Chodat et Bach¹⁴ comme des systèmes Peroxydes-peroxydases, analogues au système Hydroperoxyde-peroxydase.

Quelquefois le peroxyde ferment est inconnu; c'est une substance organique particulière partici-

¹¹ Bertrand, G. — *Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxydant d'origine végétale.* — Compt. rend., 1896, 122, 1215, et Bull. de la Soc. chim., 3^{me} série, 1896, 15, 793.

¹² Chodat, R. et Bach, A. — *Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten.* — Bioch. Zentralbl., 1903, 1, 417.

¹³ Chodat, R. — *Les ferments oxydants.* — Journ. suisse de chim. et pharm., 1905, 626, 642 et 569.

¹⁴ Chodat, R. et Bach, A. — (Voir cit. 12).

pant de la nature des ferments. Chodat et Bach l'ont nommé *oxygénase*.

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

3° D'autres ferments oxydants spécifiques.

b) Peroxydases.

1° *Superoxydase*, répandue dans les végétaux, activant l' H^2O^2 et les autres peroxydes dans le phénomène d'oxydation des polyphénols (à deux substitutions hydroxylées ou amidées dans leur noyau en position para-ortho) et celui de K J acidulé.

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

3° Peroxydases à rechercher qui avec H^2O^2 produiraient l'oxydation de la tyrosine et de corps analogues.

La *catalase* n'est pas un ferment oxydant proprement dit, car elle n'entre pas dans ces deux catégories. Sa seule fonction connue est de décomposer l'eau oxygénée.

Le ferment que j'ai étudié au cours de mon travail, la tyrosinase, se range donc dans la catégorie des oxydases; il se distingue de la laccase en ce qu'il possède une action spécifique sur la tyrosine. Nous verrons plus tard que ces deux ferments se distinguent encore par le fait que la tyrosinase n'agit qu'en milieu alcalin, tandis que la laccase nécessite un milieu acide¹⁵.

¹⁵ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son*

Pour l'histoire de ce ferment, il importe encore de mentionner que Gonnermann¹⁶, dans un travail publié en 1900, supposait que la tyrosinase aurait une fonction hydrolytique et pas de fonction oxydante. Elle dégraderait la tyrosine seulement en un corps qui s'oxyderait ensuite tout seul à l'air. Il pensait qu'il y avait formation d'acide homogentisique (= ac. hydroquinone acétique: $(HO)^2 = C^6H^2 - CH^2 - COOH$). Cet acide se transformerait ensuite sous l'action de l'oxygène de l'air et prendrait une couleur bleu-noir (Formation de mélanines, voir sous : propriétés).

Mais, en 1907, Chodat et Staub¹⁷ ont démontré dans leurs travaux classiques que tel n'est pas le cas. La tyrosinase, en absence de l'oxygène, ne forme pas une substance qui ensuite pourrait s'oxyder immédiatement à l'air.

La tyrosinase ne possède donc qu'une fonction oxydante. Mes observations (voir la deuxième partie) semblaient à première vue aussi démontrer une fonction désaminante; mais on verra en étudiant cette action de plus près que, encore dans ce cas, nous avons toujours affaire à une action oxydante.

action sur les produits de la dégradation des corps protéiniques. — Arch. d. sc. phys. et nat., 1907, 24, 172.

¹⁶ Gonnermann. — *Homogentisinsäure, die farbbedingende Substanz dunkler Rübensäfte.* — Pflügers Archiv, 1900, 82, 289.

¹⁷ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. I. Sur le mode d'action de la tyrosinase* — Arch. d. sc. phys. et nat., 1907, 23, 265.

Distribution

Bourquelot et Bertrand¹ avaient trouvé en 1896 que la tyrosinase existe aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. Mais il semble que ces ferments d'origine différente ne sont pourtant pas identiques. Déjà en 1902, Gessard² avait obtenu par injection chez l'animal, de tyrosinase végétale, un sérum qui empêche l'action de ce ferment, mais qui semble être sans influence sur la tyrosinase animale. La tyrosinase végétale aurait donc produit un anticorps qui n'a pas d'action sur la tyrosinase animale ; les deux ferments semblent par conséquent être différents.

Distribution dans le règne végétal

En 1903, Chodat et Bach³ ont constaté que la tyrosinase se trouve seulement dans certaines par-

¹ Bourquelot, E. et Bertrand, G., — *Journ. pharmac. chim.* 1896 (6), 3, 177 ou *Bull. de la Soc. mycol. de France*, 1896, 18, 27.

² Gessard, C. — *Tyrosinase animale*. — *Soc. de biol.* 1902, 54, 1304.

³ Chodat, R. et Bach, A. — *Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. V. Zerlegung der sogenannten Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydassen*. — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1903, 36, 606.

ties de la plante, contrairement à la peroxydase, qui se laisse mettre en évidence dans presque tout le végétal.

La tyrosinase est très répandue dans le règne végétal. Elle produit le noircissement des sucres de plantes, au contact de l'air. Ceci a déjà été observé par Bertrand ⁴, dans ses premières recherches, pour le suc des betteraves, des tubercules de pommes de terre et des dahlias, etc. Doby ⁵, dans une étude publiée en 1911, a démontré que les tubercules de pommes de terre contiennent le maximum de ferments oxydants en état de repos ; ils diminuent lors de la germination. Ceci est surtout le cas pour la tyrosinase. Il prétend que, pendant la germination, la teneur en tyrosinase peut tellement diminuer, que ce ferment disparaît même complètement. Je ne peux pourtant pas confirmer ce dernier résultat. Doby trouva encore que la teneur en tyrosinase est plus forte chez les variétés à écorce foncée que chez les variétés à écorce claire. Mais elle varie suivant le lieu d'origine, probablement sous l'influence du sol, du climat, etc. Le même auteur démontre encore qu'une maladie qui se manifeste par l'enroulement des feuilles provoque une augmentation de tyrosinase dans les tubercules.

⁴ Bertrand, G. — *Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale.* — Compt. rend. 1896, 122, 1215, ou : Bull. de la Soc. chim., 1896 (3) 793.

⁵ Doby, G. — *Contribution à l'étude biochimique des « roulements des feuilles », maladie des pommes de terre. II. Les oxydases des tubercules à l'état de repos et de germination.* — Journ. de pharm. et de chim. 1911, IV, 289.

La tyrosinase se trouve aussi dans le son de froment. Boutroux⁶ avait admis que la laccase causait le brunissement du pain bis. Mais en 1907, Bertrand et Muttermilch⁷ démontrent que, dans la couche d'aleurone des grains de froment, existe de la tyrosinase à côté de la peroxydase, mais pas de laccase comme Boutroux le prétend. D'après ces auteurs, la couleur brune du pain bis serait due à la tyrosinase.

En 1905, R. Chodat⁸ trouve que *Vicia faba* contient de la tyrosinase, mais point de laccase à côté, comme c'est le cas pour les autres plantes citées. La tyrosinase a plus tard encore été trouvée dans d'autres plantes supérieures par v. Fürth et Jerusalem⁹, ainsi que par Lehmann et Sano¹⁰.

La tyrosinase provoque aussi le rougissement, suivi, dans beaucoup de cas, d'un noircissement, chez certains champignons. En 1895, Bertrand et

⁶ Boutroux. — *Sur les causes qui produisent la couleur du pain bis.* — Compt. rend. 1895, 120, 934.

⁷ Bertrand et Muttermilch. — *Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son de froment.* — Compt. rend. 1907, 144, 1285.

⁸ Chodat, R. — *Les ferments oxydants.* — Journ. suisse de chim. et pharm., 1905, 626, 642 et 659.

⁹ v. Fürth et Jerusalem. — *Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung.* — Hofmeisters Beitr. 1907, 10, 131.

¹⁰ Lehmann et Sano. — *Ueber das Vorkommen von Oxydationsfermenten bei Bakterien und höheren Pflanzen.* — Arch. f. Hyg. 1908, 67, 99.

Bourquelot¹² démontraient les premiers ce fait pour plusieurs champignons, par exemple chez *Russula delicata*, *Agaricus Gyromitra*, etc., et surtout pour *Russula nigricans*. Mais la présence de ce ferment n'a pas pu être démontrée chez tous les champignons. En 1896, Bourquelot¹³ publia une étude plus complète sur la distribution des ferments oxydants dans les champignons. Lutz¹⁴ veut encore avoir trouvé la tyrosinase chez *Gyromitra gigas* et *Disciotis perlata*.

Mais elle se trouve aussi chez des champignons dont le suc reste incolore à l'air, comme Bertrand¹⁵ l'avait déjà démontré en 1896. Ces champignons ne contiennent pas de tyrosine, mais en ajoutant au suc cet acide aminé, la coloration se produit par l'action du ferment qui se trouve dans le suc du champignon.

La tyrosinase semble encore avoir été trouvée dans certaines gommes par Tschirch et Stevens¹⁶ en

¹² Bourquelot, E. et Bertrand, G. — *Le bleuissement et le noircissement des champignons*. — Soc. de biol. 1895, 582.

¹³ Bourquelot, E. — *Les ferments oxydants dans les champignons*. — Soc. de biol. 1896, 811.

¹⁴ Lutz, L. — *Sur la présence dans le Gyromitra gigas et Disciotis perlata, de tyrosinase et d'un chromogène*. — Bull. de la Soc. mycol. de France, 1912, 38, 136.

¹⁵ Bertrand, G. — *Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxydant d'origine végétale*. — Compte rend. 1896, 122, 1215 ou Bull. de la Soc. chim. 1896, 15, 793.

¹⁶ Tschirch, A. et Stevens, A. B. — *Ueber die Gummienzyme (Gummasen) speziell den Nachweis des Stickstoffs in ihnen*. — Arch. de pharm. 1905, 243, 504.

1905. Aussi Reinitzer¹⁷, en 1909, observe que certaines gommes peuvent oxyder les polyphénols aussi bien que la tyrosine, tandis que d'autres gommes ne renferment point de tyrosinase, mais par contre de la laccase.

En 1902, Lehmann¹⁸ indique certains microorganismes, comme *Actinomyces chromogenus*, *Bacterium phosphorescens*, etc., donnant une réaction de tyrosinase, tandis que ce ne serait pas le cas chez *Bacterium pneumoniae*, *Bacterium typhi*, *Bacterium coli* et d'autres. Aussi Carbone¹⁹ veut avoir trouvé notre ferment chez certains microorganismes, tels que *Vibrio cholerae* (contrairement à Lehmann), *Bacterium coli* et *Bacterium octeroïdes*.

La tyrosinase ne se trouve pourtant pas dans toutes les plantes. Lehmann et Sano ne l'ont pas constatée dans le chou, la carotte, les lentilles, l'orge, le riz, le tabac, etc.

Sa localisation dans la plante n'est pas encore bien connue, mais il semble pourtant, comme nous avons déjà vu, qu'elle se trouve surtout à la surface, c'est-à-dire dans les parties qui sont le plus facile-

¹⁷ Reinitzer, F. — *Ueber die Enzyme der Akaziengummi und einiger anderer Gummiarten.* — Zeitschr. f. physiol. Chem. 1909, 61, 352.

¹⁸ Lehmann. — *Ueber die Bildung von Oxydationsfermenten (Tyrosinase) durch Bakterien.* — Münch. med. Wochenschr. 1902, 49, 340.

¹⁹ Carbone, D. — *Ricerche sull'origine di alcuni pigmenti microbici con speciale riguardo alla tirosinasi.* — Inst. Lombardo di Sc. et Let. 1906, 39, 327.

ment en contact avec l'oxygène de l'air. Chez les tubercules de pommes de terre, par exemple, c'est la pelure qui renferme le maximum de tyrosinase, et chez le froment elle se trouve surtout dans le son.

Distribution dans le règne animal

Il semble que dans le règne animal aussi, la tyrosinase se rencontre assez souvent. La première tyrosinase animale a été découverte une année après celle du règne végétal, par Abelous et Biarnès²⁰ en 1897, chez *Sepia*. Déjà l'année suivante, Phisalix²¹ démontrait sa présence dans la peau des grenouilles vertes, et en même temps Biedermann²² observa le premier un noircissement de la tyrosine par le suc intestinal de *Tenebrio molitor*.

La tyrosinase est surtout localisée dans les organes qui produisent des pigments. Ainsi, elle se trouve dans la peau, comme Phisalix²¹ a démontré pour les grenouilles. Gessard²³ veut également l'avoir trouvée chez d'autres amphibiens ainsi que chez des poissons. Weindl²⁴ a retiré des céphalopodes et de

²⁰ Abelous et Biarnès. — *Sur l'existence d'une oxydase chez les mammifères*. — Soc. de biol. 1897, 285.

²¹ Phisalix. — *Sur la présence d'une oxydase dans la peau des grenouilles vertes*. — Soc. de biol. 1898, 50, 793.

²² Biedermann, W. — *Die Verdauung der Larve von Tenebrio molitor*. — Pflügers Arch. 1898, 72, 105.

²³ Gessard. — *Sur deux phénomènes de coloration dus à la tyrosinase*. — Soc. de biol. 1904, 56, 285.

²⁴ Weindl. — *Pigmentenstehung auf Grund vorgebildeter Tyrosinase*. — Arch. f. Entwickl. Mechan. 1907, 23, 633.

Proteus un ferment qui transforme la tyrosine en mélanine (pigment). Mais tandis que chez les céphalopodes adultes cette tyrosinase se trouve seulement dans la peau et dans les yeux, c'est-à-dire seulement dans les parties où il y a formation de pigments, on constate, par contre, ce ferment aussi dans des œufs de céphalopodes qui ne contiennent pas du tout des pigments. Déjà en 1904, Durham²⁵ semble avoir obtenu, à partir des peaux de différents animaux supérieurs (lapins, rats, cobayes, poules), en les triturant avec de l'eau distillée, un extrait qui donne avec la tyrosine des pigments. L'action est très lente (jusqu'à 27 heures). Meirowsky²⁶, par contre, n'a pas réussi à trouver une tyrosinase dans la peau animale ou humaine. Il a dans ce cas obtenu seulement une oxydation de l'adrénaline, mais pas de la tyrosine. La question est encore ouverte à savoir si ce ferment a aussi une relation dans la pigmentation des cheveux²⁷.

Il semble que notre ferment se trouve aussi dans les poches d'encre de *Sepia*, ainsi que Prizbram²⁸

²⁵ Durham, M. — *On the presence of the tyrosinase in the skins of some pigmented vertebrates.* — Proceedings of the Royal Society of London 1904-1905, 74, 390.

²⁶ Meirowsky. — *Zur Kenntnis der Fermente der Haut.* — Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1909, 20, 301.

²⁷ Cuénot. — *Hypothèse sur l'hérédité des couleurs dans les croisements des souris noires, grises et blanches.* — Soc. de biol., 1903, 55, 301.

²⁸ Prizbram. — *Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung.* — Hofmeisters Beitr., 1901, 1, 279.

l'a démontré le premier en 1901. On peut en extraire une tyrosinase, qui en présence d'oxygène oxyde la tyrosine avec formation d'un précipité noir. Neuberger²⁹ démontre que ce ferment n'agit que faiblement vis-à-vis de la tyrosine, mais fortement avec l'adrénaline, le tryptophane et la pyrocatéchine. Il semble donc que c'est plutôt une laccase.

D'après Gessard³⁰ et d'autres, la formation des tumeurs mélanotiques chez le cheval serait également due à l'action de la tyrosinase.

Le même ferment semble se trouver également chez les insectes et jouerait un rôle dans la formation de pigments pendant la métamorphose de ces animaux. C'est Dewitz³¹, en 1902, qui s'occupa le premier de cette question. Il avait trouvé chez les larves des insectes un parallélisme entre la formation de pigments et la présence de la tyrosinase³². Gessard³³, en reprenant ces travaux, prétend que dans la larve de la mouche dorée la tyrosinase se forme de très bonne heure, avant même que l'on y

²⁹ Neuberger, Carl. — *Zur Frage der Pigmentbildung*. — Zeitschr. f. Krebsforsch., 1909, VIII, n° 2.

³⁰ Gessard. — *Sur la formation du pigment mélanotique dans les tumeurs du cheval*. — Compt. rend., 1903, 136, 1076.

³¹ Dewitz. — *Recherches expérimentales sur la métamorphose des insectes*. — Soc. de biol., 1902, 54, 44.

³² Dewitz. — *Sur l'action des enzymes (oxydases) dans la métamorphose des insectes*. — Soc. de biol., 1902, 54, 45.

³³ Gessard. — *Sur la tyrosinase de la mouche dorée*. — Compt. rend., 1904, 139, 644.

trouve la tyrosine. En 1905, Phisalix³⁴ faisait des observations analogues sur *Phyllodroma germanica* et quatre ans plus tard, Roques³⁵ aurait observé que la tyrosinase se trouve chez *Limnophilus flavicornis* dans la lymphe, surtout pendant la métamorphose en chrysalide. En 1913, Batelli et Stern³⁶ ont publié un travail qui donne des indications plus détaillées sur ce sujet. Ils démontrent que quelques insectes contiennent dans les différents stades de leur développement des quantités assez importantes de tyrosinase et de phénolase (= laccase). Gortner³⁷, en 1910, fit encore des études sur *Tenebrio molitor* et *Cucujus clavipes*, ainsi que sur quelques myriapodes, tels que *Scalopocryptons serpinosa* et *Julius candensis Newp.* Mais en admettant que cette tyrosinase oxyde la résorcine, l'orcine et le pyrogallol, il confond avec la laccase. D'après le même auteur, la pigmentation de la peau de *Cicada* serait également due à la tyrosinase³⁸.

³⁴ Phisalix. — *Sur le changement de coloration des larves de Phyllodroma germanica.* — Soc. de biol., 1905, 57, 17.

³⁵ Roques. — *Sur la variation d'une enzyme oxydante pendant la métamorphose chez un trichoptère.* — Comp. rend., 1909, 149, 418.

³⁶ Batelli, F. et Stern, L. — *Die Tyrosinoxydase, die Polyphenoloxydase und die Oxydone bei den Insekten.* — Bioch. Zeitschr., 1913, 56, 59.

³⁷ Gortner, R.-A. — *A contribution to the study of the oxydases.* — Journ. of the chem. Soc., London 1910, 98, 110 et Chem. News 1910, 101, 11.

³⁸ Gortner, R.-A. — *Studies on melanin. II. The pigmentation of the adult periodical cicada (Fibicen septemdecim L.)* — Journ. of biolog. Chem. 1911, 10, 89.

Certains auteurs admettent ausssi pour le noircissement de l'hémolymph des invertébrés l'intervention de la tyrosinase. Déjà en 1881, Fredericq³⁹, d'une part, et Krukenberg⁴⁰, d'autre part, ont observé ce phénomène, mais la tyrosinase n'était pas encore connue à cette époque. En 1901, v. Fürth et Schneider⁴¹ ont repris ces travaux et prétendent que le noircissement de l'hémolymph des Lépidoptères à l'air est dû à la présence de ce ferment. Cette hémolymph oxyde la tyrosine en milieu faiblement alcalin, mais elle oxyde d'autre part aussi les polyphénols ainsi que l'oxyphényléthylamine. Il semble donc que l'hémolymph des Lépidoptères contient en même temps la tyrosinase et la laccase.

v. Fürth et Schneider auraient trouvé de petites quantités de tyrosinase dans le sang des écrevisses et Lesser et Taschenberg⁴² la retrouvent aussi chez *Hydrophilus piceus*.

En outre, on trouve ce ferment, d'après Banta et Gortner⁴³, dans les œufs d'amphibies, comme *Hyala*,

³⁹ Fredericq. — *Sur le sang des insectes*. — Bull. de l'Acad. roy. de Belg. 1881, 1, 487.

⁴⁰ Krukenberg. — *Ueber Hydrophiluslymphe*. — Verh. d. naturw. med. Vereins zu Heidelberg. 1881, 3, 79.

⁴¹ v. Fürth et Schneider. — *Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehung zur Pigmentbildung*. — Hofmeister's Beitr. 1901, 1902, 1, 229.

⁴² Lesser, E. et Taschenberg, E.-N. — *Fermente des Regenwurms*. — Zeitschr. f. Biol. 1907, 50, 446.

⁴³ Banta, A.-M. et Gortner, R.-A. — *Certain observations on the occurence of tyrosinase in amphibian egg*. — Proc. Soc. Exp. Biol., New-York 1913, X, 191.

Rana clamitans, *Rana sylvatica*, *Bufo*, mais pas chez *Amblystoma punctatum* et *Spelerpes bilineatus*.

En 1903, Cotte⁴⁴ semble avoir trouvé la tyrosinase chez une éponge, *Suberites domuncula*.

Je me borne à indiquer encore que, d'après Poulsen⁴⁵, l'ochronose chez l'homme serait provoquée par la tyrosinase, et d'après Fiesinger et Roudowska⁴⁶, qu'on trouverait cette oxydase dans les tissus humains.

⁴⁴ Cotte. — *Sur la présence de la tyrosinase chez Suberites domuncula*. — Soc. de biol., 1903, 55, 137.

⁴⁵ Poulsen, V. — *Ueber Ochronose bei Menschen und Tieren*. — Zieglers Beitr. z. path. Anat. 1910, 48, 346.

⁴⁶ Fiesinger, N. et Roudowska, L. — *La réaction microchimique des oxydases dans les tissus humains*. — Arch. de méd. expériment. 1912, 24, 585.

Préparation de la tyrosinase

Nous avons déjà vu que Bertrand a obtenu de la tyrosinase à partir de plusieurs champignons (*Russula delica*, etc.). Il a observé que, dans ces champignons ainsi que dans les plantes supérieures (tubercules de pomme de terre) il se trouve à côté de la tyrosinase aussi de la laccase. Il avait ainsi quelques difficultés à séparer les deux ferments. Mais finalement, il obtint à partir de *Russula* une tyrosinase

exempte de laccase, par précipitation avec l'alcool¹.

En 1901, v. Fürth et Schneider² ont tenté, mais sans succès, d'obtenir une tyrosinase active à partir de l'*hémolymph*e des larves d'insectes par précipitation avec l'alcool ou avec l'acétate d'uranyle. Ils l'ont par contre obtenue par demi-saturation avec du sulfate d'ammonium.

Pour préparer la tyrosinase à partir des *poches d'encre* de seiches, on se sert surtout de la méthode indiquée par Gessard³ en 1902.

L'année suivante, Cotte⁴ obtenait ce ferment à partir de l'éponge *Suberites domuncula*, aussi par précipitation avec l'alcool.

La méthode la plus avantageuse, qui fournit une tyrosinase exempte d'acides aminés, a été donnée en 1908 par Staub⁵. Cet auteur est parti de pelures de *pommes de terre*, produit qu'on peut facilement se procurer. Je me suis servi de cette méthode, à part quelques petites modifications, dans la préparation

¹ Bertrand, G. — *Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons*. — Compt. rend., 1896, 123, 463.

² Von Fürth et Schneider. — *Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehung zur Pigmentbildung*. — Hofmeisters Beitr. 1901, 1902, 1, 229.

³ Gessard. — *Tyrosinase animale*. — Soc. de biol., 1902, 54, 1305, et 1903, 55, 137.

⁴ Cotte. — *Sur la présence de la tyrosinase chez Suberites domuncula*. — Soc. de biol., 1903, 55, 137.

⁵ Staub, W. — *Nouvelles recherches sur la tyrosinase*. — Thèse. Genève, 1908.

de la tyrosinase nécessaire à mes recherches (voir dans la seconde partie de cette thèse).

En même temps que Staub, Chio⁶ a aussi préparé une tyrosinase par la méthode de précipitation par l'alcool à partir de la *peau de grenouilles*.

L'opération avec des sucres et extraits de plantes étant souvent rendue malaisée par la présence de substances colloïdales, Bach⁷ les traite préalablement avec du sulfate de magnésie. Il prétend avoir changé ainsi l'état de ces colloïdes de manière que l'on peut déjà les précipiter par de petites quantités d'alcool.

Si nous partons d'un *organe quelconque*, on le soumet à l'action de la presse de Buchner. La tyrosinase se laisse précipiter par l'alcool fort comme d'ailleurs la plupart des ferments.

En 1910, Chodat⁸ a *résumé* toutes les méthodes usuelles pour l'obtention de ce ferment. Il les classe comme suit :

- A. Méthode de pommes de terre.
- B. Méthode de champignons (*Lactarius vellereus*).
- C. Méthodes d'éponges (*Suberites domuncula*).
- D. Méthodes des céphalopodes à encre (*seiches*).

⁶ Chio. — *Sull' azione dei perossidi sulle ossidasi*. — Lo Sperim., 1908, N. 1/2.

⁷ Bach, A. — *Eine Methode zur schnellen Verarbeitung von Pflanzenextrakten auf Oxydationsfermente*. — Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1910, 43, 362.

⁸ Chodat, R. — *Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft. Methoden ihrer Anwendung*. — Handb. der bioch. Arbeitsmeth., 1910 (3,1) 42.

Pour des recherches critiques, on ne peut se servir que des méthodes A et B, et en outre seulement la méthode B donne une tyrosinase exempte de laccase et de peroxydase. La tyrosinase de pomme de terre avait par contre pour mes recherches l'avantage de ne pas contenir d'acides aminés, comme celle de *Lactarius*, quoique contenant encore de la peroxydase.

Pour avoir une tyrosinase brute, on se sert quelquefois aussi des champignons suivants :

Russula delica ;

» *Queletii* ;

» *aurantiaca* ;

» *lepida* ;

» *integra* ;

que l'on sèche et dont on fait un extrait glycérimé après les avoir broyés.

Propriétés

A) Propriétés physiques.

La tyrosinase est soluble dans l'eau. Gortner¹, en 1910, prétend avoir trouvé chez *Tenebrio molitor* une tyrosinase qui par contre ne donnerait pas une solution aqueuse. Mais nous avons déjà vu qu'il attendait de ce ferment une oxydation de la résorcine,

¹ Gortner, R. A. — *A contribution to the study of the oxydases*. — Jour. of the chem. Soc. London, 1910, 98, 110 et Chem. News, 1910, 101, 11.

l'orcine et le pyrogallol. Mais cette propriété appartenant à la laccase, l'observation de ce ferment insoluble dans l'eau n'entre pas dans la discussion de notre sujet.

Notre ferment en solution aqueuse ne passe pas par des bougies en terre poreuse, c'est ce qui a permis à Lehmann et Sano² de séparer la laccase de la tyrosinase. Un mélange de ferments extrait de pommes de terre qui rougit la résine d'aloès, bleuit le gaïac et brunit la tyrosine, donne après filtration à travers une bougie de terre poreuse bien encore la réaction du gaïac, mais ne noircit plus la tyrosine.

Pour conserver la tyrosinase en solution aqueuse pendant quelque temps, on doit y ajouter des *antiseptiques*. Je me suis servi de préférence du toluène. Déjà Chio³, en 1908, a démontré que les solutions de tyrosinase de la peau de grenouille se conservent en présence de cet antiseptique pendant des mois. On emploie aussi le chloroforme. Bourquelot⁴, en 1896, a démontré que la tyrosinase de champignon (*Russula*) conserve, en solution aqueuse chloroformée et en absence de lumière, son activité assez longtemps, mais elle disparaît quand même plus vite

² Lehmann et Sano. — *Ueber das Vorkommen von Oxydationsfermenten bei Bakterien und höheren Pflanzen*. — Arch. f. Hyg., 1908, 67, 99.

³ Chio. — *Action des peroxydes sur les oxydases*. — Arch. it. de biol., 1908, 50, 230.

⁴ Bourquelot, E. — *Sur quelques propriétés des solutions aqueuses chloroformées de ferment oxydant des champignons et sur la durée de leur activité*. — Soc. de biol., 1896, 893.

que la laccase. Après un séjour prolongé, on ne trouve plus que la laccase, ce qui a été confirmé par Chodat et Staub⁵. En 1902, Dewitz a démontré que l'éther aussi est sans influence nuisible, ainsi qu'une solution de $\frac{1}{1000}$ de sublimé. D'après Gessard⁶, on peut aussi conserver la tyrosinase de champignons dans de la glycérine pendant très longtemps. Le thymol par contre empêche l'action de la tyrosinase, comme Cotte⁷ l'a démontré en 1903.

En ce qui concerne la *lumière*, elle est sans influence sur notre ferment, ainsi que Dewitz⁸ l'a démontré le premier en 1902. D'après Weindl⁹, c'est également le cas pour l'action de la tyrosinase animale *in vitro*, mais chez *Proteus* vivant la lumière semble être indispensable pour la formation des pigments. Même les rayons de radium sont sans influence. En exposant les solutions de ferment aux rayons β et γ dans des tubes de quartz pendant deux à quatre jours, Willcock¹⁰ a observé que l'action de

⁵ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques.* — Arch. des sc. phys. et nat., 1907, 24, 172.

⁶ Gessard. — *Sur la tyrosinase.* — Compt. rend., 1900, 130, 1327.

⁷ Cotte. — *Sur la présence du manganèse et du fer chez les éponges.* — Soc. de biol., 1903, 55, 139.

⁸ Dewitz. — *Recherches expérimentales sur la métamorphose des insectes.* — Soc. de biol., 1902, 54, 44.

⁹ Weindl. — *Pigmententstehung auf Grund vorgebildeter Tyrosinase.* — Arch. f. Entwicklungs-Mechan., 1907, 23, 633.

¹⁰ Willcock, E. G. — *The action of radium rays on tyrosinase.* — Journ. of Physiol., 1906, 34, 207.

la tyrosinase n'est pas affaiblie. Dans quelques cas, il a même observé une augmentation.

La *chaleur* au contraire détruit la tyrosinase, comme c'est d'ailleurs le cas pour tous les ferments. Déjà en 1898, Phisalix¹¹ a indiqué que la tyrosinase de la peau de grenouille est fortement altérée quand on la chauffe à 60° pendant quinze minutes. En 1900, Gessard¹² a trouvé que la tyrosinase végétale est détruite en la chauffant pendant 30 minutes à 68°, et deux ans plus tard, Dewitz¹³ démontra la même chose pour le ferment obtenu à partir des mouches. La tyrosinase du son est par contre assez thermostable, d'après Bertrand et Muttermilch¹⁴. Même à 95°, elle n'est que temporairement inactive, mais reprend son action après quelques jours. En 1907, Chodat et Staub¹⁵ ont trouvé que la tyrosinase de pomme de terre et de *Russula* est affaiblie vers 61° et complètement détruite à 66°. Bertrand et Rosenblatt¹⁶ ont remarqué que la température mortelle

¹¹ Phisalix. — *Sur la présence d'une oxydase dans la peau des grenouilles vertes.* — Soc. de biol., 1898, 50, 793.

¹² Gessard. — *Sur la tyrosinase.* — Compt. rend., 1900, 130, 1327,

¹³ Dewitz. — *Recherches expérimentales sur la métamorphose des insectes.* — Soc. de biol., 1902, 54, 44.

¹⁴ Bertrand et Muttermilch. — *Sur l'existence d'une tyrosinase dans le froment.* — Compt. rend., 1907, 144, 1285.

¹⁵ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. I. Sur le mode d'action de la tyrosinase.* — Arch. de sc. phys. et nat., 1907, 23, 265.

¹⁶ Bertrand, G. et Rosenblatt, M. — *Sur la température mortelle des tyrosinases végétales.* — Compt. rend., 1910, 150, 1142,

pour la tyrosinase végétale est différente suivant l'origine du ferment. Ces ferments sont détruits à des températures qui varient entre 60 et 95°. Les tyrosinases de champignons appartiennent aux ferments thermolabiles, les tyrosinases des plantes supérieures sont au contraire thermostables. La différence de la température mortelle n'est causée que par la différence des tyrosinases et non par les substances (milieu) qui les accompagnent. Il est donc indispensable, si l'on donne la température mortelle, d'indiquer en même temps l'origine du ferment.

Le *milieu* pour la tyrosinase doit être neutre ou faiblement alcalin. En milieu fortement alcalin ainsi qu'en milieu acide, l'action de la tyrosinase est empêchée. La présence de certains corps peut également nuire à l'action de ce ferment, comme Dewitz¹⁷ l'a démontré en 1902 le premier pour l'acide cyanhydrique par exemple. Je traiterai l'influence de certains sels à propos de la cinétique.

Il faut encore remarquer que déjà Bertrand¹⁸, dans ses premiers travaux sur ce sujet, a observé que la tyrosinase est moins résistante au traitement à l'alcool que la laccase. C'est pour cette raison que, précipitant la tyrosinase avec l'alcool, on doit toujours la filtrer immédiatement, si on ne veut pas risquer de la détruire.

¹⁷ Dewitz. — *Recherches expérimentales sur la métamorphose des insectes*. — Soc. de biol., 1902, 54, 44.

¹⁸ Bertrand, G. — *Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale*. — Compt. rend., 1896, 122, 1215, et Bull. de la Soc. chim., 3^{me} série, 1896, 15, 793.

B) *Propriétés chimiques.*

La tyrosinase n'attaque pas les polyphénols, mais elle a d'autres actions communes avec la laccase. Elle seule oxyde la tyrosine¹, c'est-à-dire que la tyrosinase est *spécifique* pour cet acide aminé.

Elle transforme la tyrosine, au contact de l'air, en un produit rouge qui passe finalement au noir. On admet aujourd'hui que la formation des mélanines et pigments aussi bien animaux que végétaux repose sur cette action de la tyrosinase sur la tyrosine ou sur un chromogène analogue. Ainsi d'après v. Fürth et Scheider (1901)², la formation des pigments mélanotiques chez tous les animaux serait due à l'action de ce ferment oxydant. Ils ont observé ce phénomène sur l'hémolymph de lépidoptères en contact avec l'air. D'après ces auteurs, le produit d'oxydation formé, qui se dépose en écailles noires, serait un produit de condensation qui renferme au moins deux molécules de tyrosine. Ils sont conduits à ce raisonnement par l'observation qu'il renferme une quantité double d'azote. En 1902, Bertel³ et

¹ Bertrand, G. — *Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale.* — Compt. rend., 1896, 122, 1215, et Bull. de la Soc. chim., 1896, 15, 793.

² v. Fürth et Schneider. — *Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehung zur Pigmentbildung.* — Hofmeister Beitr., 1901-1902, 1, 229.

³ Bertel, R. — *Ueber Tyrosinabbau in Keimpflanzen.* — Chem. Ber., 1902,, 20, 454.

Czapek⁴ ont admis la formation d'acide homogénisinique par oxydation de la tyrosine, et cet acide pourrait ensuite subir une oxydation ultérieure par la laccase que Czapek appelle phénolase. La même année, Dewitz⁵ prétend avoir trouvé un parallélisme entre la formation de pigments et la présence de la tyrosinase chez des larves de mouches. Il a fait l'observation que ces larves se colorent lors de la métamorphose en nymphe. Mais si on élimine l'air en couvrant, par exemple, les larves avec de l'eau, elles restent blanches, et seulement les parties exposées à l'air se colorent. Le même auteur démontre aussi que les extraits de la mouche dorée (*Lucilia Cæsar*) noircissent à l'air. D'après Gessard⁶ (1903), la formation de tumeurs mélanotiques chez le cheval serait également due à l'action de la tyrosinase. Il prétend avoir aussi trouvé la tyrosine dans ces tumeurs, c'est-à-dire le chromogène. Gessard admet aussi que la pigmentation dans la peau de l'homme, surtout des nègres, serait également due à la tyrosinase. En 1903, Cuénot⁷ a admis une hypothèse

⁴ Czapek. — *Stoffwechsel in der geotropisch gereizten Wurzelspitze und in phototropisch sensiblen Organen.* — Ber. d. d. bot. Ges., 1902, 20, 464, et 1903, 21, 404.

⁵ Dewitz. — *Sur l'action des enzymes (oxydases) dans la métamorphose des insectes.* — Soc. de biol., 1902, 54, 45.

⁶ Gessard. — *Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval.* — Compt. rend., 1903, 136, 1086.

⁷ Cuénot. — *Hypothèse sur l'hérédité des couleurs dans les croisements des souris noires, grises et blanches.* Soc. de biol., 1903, 55, 301.

d'après laquelle la coloration jaune et la coloration noire des poils des souris, seraient provoquées par deux ferments analogues à la tyrosinase. Mais l'auteur n'a pas entrepris des expériences pour soutenir ces idées. En 1904, Gessard ⁸ a repris les travaux de Dewitz ⁵ et a trouvé que la tyrosinase dans la larve de la mouche dorée s'y trouve de très bonne heure, même avant que l'on y trouve la tyrosine. Le tégument de la nymphe est seul coloré, la nymphe elle-même est incolore au moment d'éclore, mais la jeune mouche se colore bientôt à l'air et prend son éclat d'or métallique caractéristique. La présence de l'air est nécessaire pour cette pigmentation.

Cette coloration a aussi lieu quand on a tué la jeune mouche par le chloroforme. Le même auteur, a observé que dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine on observe différentes phases. Il admet que seulement la première, le passage au rose ou rouge, est due au ferment. Après un certain temps qui est déterminé par plusieurs facteurs, la coloration rouge passe au violet et finalement il se forme un précipité noir, tandis que le liquide surnageant reste complètement clair. Il a effectué plusieurs réactions sans arriver à un résultat bien défini. C'est de même

⁸ Gessard, C. — *Sur la tyrosinase de la mouche dorée.* — *Compt. rend.*, 1904, 139, 644.

⁹ Gessard, C. — *Sur les réactions colorées consécutives à l'action de la tyrosinase.* — *Compt. rend.*, 138, 774.

en 1904 que Durham ¹⁰ aurait observé, pour la tyrosinase obtenue à partir de la peau de différents animaux, que le pigment correspond avec la couleur de la peau employée. Le pigment obtenu est soluble dans les alcalis et insoluble dans les acides. En 1905, Phisalix ¹¹ fait des observations analogues, sur *Phyllodroma germanica*, à celle de Gessard ⁸ sur la mouche dorée. La larve étant d'abord blanche a pris après trois heures une coloration grise qui passe par l'intermédiaire du brun, puis finalement au noir. Ceci n'aurait lieu que sous l'influence de la tyrosinase et de l'oxygène de l'air. Nous avons déjà vu précédemment que le noircissement de beaucoup de plantes est dû aussi à la tyrosinase (Bertrand, Bourquelot, etc.). De même quand on travaille avec de l'eau la farine qui n'a pas été débarrassée de la couche de gluten, on observe un noircissement. En 1907, Bertrand et Muttermilch ¹² ont démontré que c'est la tyrosinase, qui se trouve dans la couche du gluten des grains, qui donne au pain bis sa couleur grise. C'est le cas actuellement pour notre pain de guerre. Ces auteurs ont supposé que le brunissement du pain bis se fait en deux phases. Il y aurait d'abord formation d'un chromogène ana-

¹⁰ Durham, M. — *On the presence of the tyrosinase in the skins of some pigmented vertebrates.* — Proc. of the Roy. Soc., 1904-1905, 74, 390.

¹¹ Phisalix. — *Sur le changement de coloration des larves de Phyllodroma germanica.* — Soc. de biol., 1905, 57, 17.

¹² Bertrand et Muttermilch. — *Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son du froment.* — Compt. rend., 1907, 144, 1285.

logue à la tyrosine, par l'action d'un ferment protéolytique; ce chromogène serait ensuite oxydé par l'action de la tyrosine. En 1907, v. Fürth et Jerusalem¹³ entreprirent des expériences pour savoir si des ferments oxydants jouent un rôle dans la formation de pigments mélanotiques, et ils ont étudié de plus près le noircissement des sucs animaux par formation de pigments. Ils en ont également tiré la conclusion que les pigments mélanotiques se sont formés à partir de tyrosine ou d'un chromogène analogue. Les même auteurs se sont aussi occupés des mélanines formées par la tyrosinase végétale (*Agaricus melleus*). Ces mélanines sont plus riches en oxygène que la tyrosine et plus pauvres en hydrogène; elles ne se laissent pas distinguer de l'hippomélanine, tout en faisant la réserve que la nature des mélanines n'est pas encore connue. L'analyse chimique donne une même composition élémentaire que pour les mélanines ordinaires. Déjà en 1894, Bertrand¹⁴ a admis que le noircissement des jus de betteraves est dû à l'action d'un ferment oxydant sur la tyrosine. En 1900, Gonnermann¹⁵ a admis que le noircissement des sucs de

¹³ v. Fürth, O. et Jerusalem, E. — *Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung*. — Hofm. Beitr., 1907, 10, 131.

¹⁴ Bertrand, G. — *Sur le latex de l'arbre à laque*. — Compt., rend., 1894, 115, 1215.

¹⁵ Gonnermann. — *Homogentisinsäure, die farbbedingende Substanz dunkler Rübensäfte*. — Pflügers Arch., 1900, 82, 289.

betteraves en présence d'air est dû à la formation de l'acide homogentisinique qui se formerait à partir de la tyrosine contenue dans le suc, par l'action d'un ferment identique ou analogue à la tyrosinase. L'acide homogentisinique se transformerait ensuite sous l'action de l'oxygène de l'air et prendrait une couleur bleu-noir. En 1907, Schulze¹⁶, au contraire, en pressant le suc des betteraves, n'en a pas pu isoler de l'acide homogentisinique et n'y a trouvé que de très petites quantités de tyrosine. Il en tire la conclusion que le noircissement intense que prennent ces sucs en les exposant à l'air n'est pas dû à la tyrosine et à l'acide homogentisinique. La même année, Gonnermann¹⁷ cherche à donner une autre explication pour ce phénomène. En se basant sur une série d'expériences avec des sucs de betteraves fraîches et des réactions *in vitro*, il suppose que dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine il se formerait en premier lieu de la pyrocatéchine. C'est ce corps qui serait ensuite transformé en une matière colorante bleu-noir sous l'action de l'oxygène de l'air et de sels de fer que l'auteur a trouvés

¹⁶ Schulze, E. — *Ist die bei Luftzutritt eintretende Dunkelfärbung des Rübensaftes durch einen Tyrosin- und Homogentisinsäuregehalt dieses Saftes bedingt?* — Zeitschr. f. physiol. Chem., 1907, 50, 508.

¹⁷ Gonnermann, M. — *Zur Dunkelfärbung der Rübensäfte.* — Zeitschr. d. V. der deutsch. Zuckerindustrie, 1907, 57, 1068.

dans ses sucs. En 1908, le même auteur¹⁸ a pu constater qu'à côté des combinaisons dioxybenzéniques il se trouve encore l'acide cafféique, l'acide cafétannique et l'acide hydrocaffétannique, qui peuvent aussi causer le noircissement. En 1915, Gonnermann démontre que la tyrosinase a une action hémolytique (nouvelle propriété) et est en conséquence plus faible que la tyrosinase de pomme de terre. En 1907, Weindl¹⁹ a publié une étude sur la formation de pigments chez des céphalopodes d'une manière analogue à celle observée par v. Fürth et Schneider pour le sang des insectes et des crustacés, ainsi que de Prizbram sur la poche d'encre de sépia. Déjà en 1899, Harlay²⁰ avait donné une méthode pour étudier la peptolyse et en 1907, Chodat et Staub²¹ ont démontré que cette réaction est due à la présence de polypeptides qui contiennent la tyrosine. Si on continue l'hydrolyse par l'action de trypsine, la tyrosine est mise en liberté et la solution donne avec la tyrosinase la coloration rouge bien

¹⁸ Gonnermann, M. — *Die Anteilnahme des Brenzkatechins bei der Dunkelfärbung der Rübensäfte.* — Pflüg. Arch., 1908, 125, 635.

¹⁹ Weindl. — *Pigmentstehung auf Grund vorgebildeter Tyrosinase.* — Arch. f. Entwickl. Mechan., 1907, 23, 633.

²⁰ Harlay. — *Caractères différentiels des produits de la digestion pepsique et de la digestion pancréatique de la fibrine.* — Journ. de phar. et chim., 1899, 9, 225.

²¹ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques.* Arch. d. Sc. ph. et nat., 1907, 24, 172.

connue qui est suivie de formation de mélanine. C'est ainsi qu'on met en évidence la présence de tyrosine dans un produit de protéolyse. Mais on doit retenir que c'est Bougault²² qui, en 1897, s'est servi le premier de la tyrosinase pour rechercher la tyrosine, dans les produits de protéolyse de différentes albumines. En partant des travaux de Chodat et Staub, Abderhalden et Guggenheim²³ ont encore étudié cette formation de mélanines sur quelques acides aminés que les premiers n'avaient pas à leur disposition. Ils n'ont que confirmé les résultats précédents. Il est intéressant de mentionner que des corps à constitution analogue à la tyrosine donnent aussi cette réaction (d-tryptophane, oxytryptophane, ac. homogentisinique, phénylalanine, diiod-tyrosine, proline, cystine), ainsi que tous les polypeptides qui renferment la tyrosine, mais pas le glycyldijod-l-tyrosine. De même les travaux de Bertrand²⁴, publiés la même année, confirment ces observations. Par l'étude d'un grand nombre de dérivés de la tyrosine et de composition analogue

²² Bougault. — *Sur la recherche de la tyrosine dans divers produits d'origine animale.* — Soc. de biol., 1897, 49, 455.

²³ Abderhalden, E. et Guggenheim, M. — *Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus Russula delica auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide und einige andere Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen.* — Zeitschr. f. physiol. Chem., 1908, 54, 331 et 57, 329.

²⁴ Bertrand, G. — *Action de la tyrosinase sur quelques corps voisins de la tyrosine.* — Bull. de la Soc. chim., 1908, III, (4), 335.

(p - oxyphényléthylamine, p - oxyphénylméthylamine, p - oxyphénylamine, acide p - oxyphénylpropionique, acide p - oxyphénylacétique, acide p - oxybenzoïque, p - crésol, phénol, éthyltyrosine, chloracétyltyrosine et glycytyrosine)*, ce même auteur²⁵ est arrivé à la conclusion que l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase est liée au groupe C_6H_5-OH . Les groupes latéraux apportent seulement des modifications de coloration. L'attaque a donc lieu au noyau et c'est le groupe hydroxyle qui est nécessaire. Tous les corps attaquables par la tyrosinase le possèdent. Bertrand démontre encore, en collaboration avec Rosenblatt²⁶, que la tyrosinase oxyde aussi la tyrosine racémique obtenue par synthèse, les deux stéréoisomères avec la même vitesse. Il n'y a donc pas de tyrosinases spécifiques pour les deux modifications. (Contrairement à Abderhalden et Guggenheim²³). En 1909, Bach²⁷ a démontré encore que l'hypothèse de Gonnermann, d'après laquelle

* La réaction a été négative pour la phénylamine, phényléthylamine, phénylméthylamine, ac. phénylaminoacétique, ac. phénylpropionique, ac. phénylacétique, alanine, glyocolle, etc.

²⁵ Bertrand, G. — *Recherches sur la mélanogénèse*. — Action de la tyrosinase sur la tyrosine. — Ann. de l'Inst. Pasteur, 1908, 22, n° 5.

²⁶ Bertrand, G. et Rosenblatt, M. — *Tyrosinase et tyrosine racémique*. — Compt. rend., 1908, 146, 304.

²⁷ Bach, A. — *Zur Kenntnis der Tyrosinase*. — Chem. Ber., 1909, 42, 594.

la tyrosinase provoque d'abord une scission hydrolytique de la tyrosine qui sera suivie d'une oxydation non spécifique des produits facilement oxydables de l'hydrolyse, n'est pas juste. Si on traite d'abord la tyrosine avec de la trypsine, de l'endotryptase ou de la tyrosinase à l'abri de l'air, la vitesse de l'oxydation n'est pas accélérée en comparaison avec une solution de tyrosine qui n'a pas été traitée au préalable. De même un mélange des produits de l'hydrolyse de la tyrosine (phénol et sérine, hydroquinone et alanine, p - crésol et dl - sérine, alcool p - oxybenzylique et glycocolle) ne donne pas avec la tyrosinase le noircissement caractéristique. Aussi l'hypothèse de Gessard, que la formation du corps noir est due aux sels minéraux contenus dans la tyrosinase, n'a pas été confirmée par ces expériences. Il n'est non plus question d'un coferment. La peroxydase neutre retarde au contraire l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase purifiée. Seulement dans le cas où des corps réducteurs, retardant l'action de la tyrosinase, sont détruits par l'oxydase, on observe une accélération. En 1909, Roques²⁸ a constaté que la lymphe de *Limnophilus flavicornis* possède la propriété de se colorer en noir au contact de l'air, comme nous l'avons déjà vu chez d'autres insectes. Il explique cette transformation également par l'action d'un ferment oxydant.

²⁸ Roques. — *Sur les variations d'une enzyme oxydante pendant la métamorphose chez un trichoptère.* — *Compt. rend.*, 1909, 149, 418.

Gortner ²⁹, en 1910, a démontré que la pigmentation des téguments des larves de *Tenebrio molitor* est le résultat d'une réaction entre un chromogène et une oxydase. On trouve aussi un pigment brun dans le cas d'une affection rare, appelée ochronose. Poulsen ³⁰ admet que c'est aussi la tyrosinase qui provoque l'ochronose chez l'homme et les animaux. En 1911, Gortner ³¹ publie encore une étude qui lui permet la conclusion que aussi la pigmentation chez *Fibicen septemdecim* L. est produite d'une part par un chromogène et d'autre part par la tyrosinase. Le même auteur ³² suppose que dans les cheveux blancs il y a un antienzyme qui empêche l'action de l'oxydase (tyrosinase) qui se trouve dans ce matériel sur le chromogène (tyrosine). Il démontre que les phénols, la résorcine, l'orcine et le phloroglucine agissent dans le sens de cet antienzyme. En ajoutant à un mélange de tyrosine et de tyrosinase un peu de ces corps, la réaction colorée bien connue n'a plus lieu.

²⁹ Gortner, Ross Aiken. — *The origine of the brown pigment in the integments of the larva of Tenebrio molitor.* — Journ. of biol. Chem., 1910, 7, 365.

³⁰ Poulsen, V. — *Ueber Ochronose bei Menschen und Tieren.* — Zieglers Beitr. z. path. Anat., 1910, 48, 346.

³¹ Gortner, R. A. — *Studies on melanin. II. The pigmentation of the adult periodical cicada.* (Fibicen septemdecim L.) — Journ. of biol. Chem. 1911, 10, 89.

³² Gortner, R. A. — *Studies on melanin. III. The inhibitory action of certain phenolic substances upon tyrosinase. A suggestion as to the cause of dominant and recessive whites.* — Journ. of biol. Chem. 1911, X, 113.

Il me reste enfin à mentionner qu'en 1912, Funk³³ a encore publié une étude sur l'oxydation de quelques dérivés de la tyrosine. Les travaux sur la formation des pigments mélanotiques sont donc en grand nombre. Mais la question n'est pas encore définitivement résolue. Pour la composition des mélanines, je renvoie à un travail de Piettre³⁴ paru en 1912.

Mais la tyrosinase n'agit pas seulement avec la tyrosine. Comme je l'ai déjà dit, elle a encore des *actions communes avec la laccase*. Ainsi elle oxyde des phénols (surtout pyrogallol, phénol et crésols). C'est en 1907 que Chodat et Staub³⁵ ont démontré que la tyrosinase donne avec le p - crésol un corps jaune d'or, qui, en présence de glyocolle, leucine, etc., passe au rouge et ensuite au bleu avec fluorescence rouge. Mais ils démontrent aussi que d'autres crésols et phénols sont oxydés et que la chaîne latérale ne doit pas être nécessairement en position para.

L'indol, le scatol, le β -naphtol, la phénylalanine,

³³ Funk, C. — *The constitution of aminotyrosine and the action of oxydases on some tyrosine derivatives*. — Jour. of chem. Soc., 1912, 101, 1004.

³⁴ Piettre, Maurice. — *Recherches sur la constitution chimique du pigment mélanique*. — 1^{er} Congrès intern. de Pathol. comp., 17-23 oct. 1912.

³⁵ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques*. — Arch. des Sc. phys. et nat., 1907, 24, 172.

l'aniline et d'autres ne sont pas attaqués. Ces auteurs se sont servis de la réaction p - crésol-tyrosinase, qui est une précieuse méthode pour l'étude de la protéolyse. La tyrosinase en présence de p-crésol ne donne pas seulement des colorations avec des acides aminés, mais aussi avec des polypeptides et des matières protéiques. Les colorations finales sont différentes suivant les acides aminés employés, et on peut donc ainsi identifier ces acides. Chodat³⁶ divise les peptides en deux classes suivant que la coloration finale est rouge ou bleue. Cette réaction permet aussi de reconnaître le commencement de la protéolyse, la présence d'enzymes protéolytiques et l'action de microorganismes, comme par exemple dans le cas de la liquéfaction de la gélatine³⁷. Les différents antipodes des acides aminés optiquement actifs donnent aussi des réactions d'intensité différente. Plusieurs polypeptides, peptones, albumoses, gélatine ovalbumine, édestine, caséine et des pigments donnent cette réaction. Il est probable que des matières colorantes végétales comme

³⁶ Chodat, R. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants*, IV et V. — Arch. des Sc. phys. et nat., 1912, 33, 70 et 225.

³⁷ Voir par exemple : Breslauer, Alice. — *Das Tyrosinase-Reagens als Mittel zur Feststellung des Grades der Eiweisszersetzung durch Bakterien*. — Zeitschr. f. Gährungsphysiol., 1914, IV, 353.

— Chodat, R. et Kummer, R.-H. — *Ueber den Nachweis von Peptiden im Harn mittels der p-Krésol-Tyrosinase-Reaktion*. — Bioch. Zeitschr., 1914. 65, 392.

l'indigo se forment d'une manière analogue par l'action de ferments.

En 1907, Cousin et Hérissé³⁸ prétendent qu'en présence de tyrosinase, une solution de thymol donne un précipité blanc qu'ils ont identifié comme dithymol.

Certains auteurs admettent qu'aussi l'oxydation de l'adrénaline est due à la tyrosinase. Neuberg³⁹ a obtenu avec un extrait de poche d'encre de *Sepia* en l'ajoutant à l'adrénaline un précipité brun-noir très fin. Ransom⁴⁰ a obtenu avec la tyrosinase de pomme de terre la réaction colorée de l'adrénaline. Mais la coloration de l'adrénaline semble plutôt être causée par la laccase.

Neuberg³⁹ a encore observé que l'extrait de *Sepia* agit aussi avec le tryptophane, mais pas avec le p-oxyphényléthylamine, d-glucosamine, pyrrol, ac. l-pyrrolidinecarbonique, indol, scatol, méso-inosite, d-l-phénylalanine, furfurol et alcool furfurolique.

De même Wolff⁴¹, en 1910, aurait encore trouvé

³⁸ Cousin, H. et Hérissé, H. — *Oxydation du thymol par le ferment oxydant des champignons*. — Journ. de pharm. et de chim., 1907, 26, 487.

³⁹ Neuberg, Carl. — *Enzymatische Umwandlung von Adrenalin*. — Bioch. Zeitschr., 1908, 8, 383.

⁴⁰ Ransom, F. — *The action of potato tyrosinase on adrenaline*. — Proc. of the Roy. Soc. Med., 1911, 5, 19.

⁴¹ Wolff, J. — *Contribution à la connaissance de divers phénomènes oxydasiques naturels et artificiels*. — Thèse, Paris, 1910.

quelques nouvelles propriétés de l'oxydase de *Russula delica*, c'est-à-dire l'oxydation de l'orcine, de la cochenille, des composés solubles de l'alizarine et de beaucoup d'autres matières colorantes naturelles et artificielles. Mais il ne sépare pas les actions lac-case et tyrosinase ; il ne sait pas distinguer ces deux ferments.

On observe en général que beaucoup d'auteurs ne se sont pas encore habitués à travailler avec des ferments physiologiquement purs. La plupart des travaux seront donc à vérifier.

Détermination de l'action de la tyrosinase

a) Détermination qualitative

La présence de la tyrosinase ne peut être démontrée qu'indirectement, car la plupart des plantes contiennent aussi la tyrosine.

De ce grand nombre de réactions que nous venons d'énumérer, c'est sans doute celle de Chodat et Staub¹ qui se prête le mieux. Le suc doit préalablement être neutralisé, et on le rend ensuite faiblement

¹ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques.* — Arch. de Sc. phys. et nat., 1907, 24, 172.

alcalin par du bicarbonate de soude. Avec une solution aqueuse de 1 ‰ à 1 % de *p* - crésol, on obtient une coloration jaune qui passe ensuite à l'orange. Mais si on ajoute encore du *glycocolle*, la réaction est accélérée et une couleur rouge se forme tout de suite, passant ensuite au bleu bien caractéristique avec dichroïsme rouge. On a soin d'ajouter toujours quelques gouttes de toluène comme antiseptique.

Il va sans dire que, si la *tyrosine* ne se trouve pas déjà dans le suc, on peut naturellement aussi ajouter cet acide aminé et observer la coloration rouge avec passage final au noir. Ici on aura également soin de neutraliser préalablement le liquide.

b) Détermination quantitative

En 1907, Chodat et Staub², dans leurs recherches quantitatives, se sont servis d'une *méthode colorimétrique* pour suivre l'action de la tyrosinase. Ils comparent la force colorante des produits d'oxydation de la tyrosine avec une solution alcoolique de brun Bismarck ou de coralline.

En même temps, v. Fürth et Jerusalem³ mesurent la quantité de mélanines formées par voie *spectrophotométrique*. Cette méthode est basée sur le

² Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. I. Sur le mode d'action de la tyrosinase.* — Arch. d. Sc. phys. et nat., 1907, 23, 265.

³ v. Fürth, O. et Jerusalem, E. — *Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung.* — Hofmeisters Beitr., 1907, 10, 131.

fait qu'il existe une proportionnalité entre la concentration d'une solution de matière colorante et le coefficient d'extinction.

Ces mêmes auteurs indiquent encore une méthode de *sédimentation*. Elle consiste à soumettre les mélanines formées à une centrifugation dans des éprouvettes graduées, Après centrifugation, la graduation indique approximativement le volume des mélanines.

Mais les meilleurs résultats sont obtenus par la *méthode au permanganate* de Bach⁴. Elle est basée sur le principe que les mélanines sont décolorées par une solution de permanganate (0,002 norm.) et qu'on peut donc déterminer ainsi leur quantité par voie titrimétrique.

En 1910, Agulhon⁵ démontre que la formation des mélanines est influencée par le milieu et que les mélanines ne peuvent donc pas servir à mesurer l'action de la tyrosinase. Il emploie encore le chlorure de calcium pour précipiter les mélanines solubles et détermine ensuite *par pesée*. Mais il tient aussi cette méthode pour imparfaite.

⁴ Bach, A. — *Zur Kenntnis der in Tyrosinase tätigen Peroxydase*. — Ber. d. d. chem. Ges., 1908, 41, 216.

⁵ Agulhon, H. — *Influence de la réaction du milieu sur la formation des mélanines par oxydation diastatique*. — Compt. rend., 1910, 150, 1066 et Ann. de l'Inst. Pasteur, 1910, 24, 668.

Cinétique de l'action de la tyrosinase

Pour faire des études critiques, il faut avoir de la tyrosinase pure, car nous avons vu que les acides aminés modifient la réaction (Chodat et Staub). De même nous avons vu que les acides à fonction acide libre empêchent l'action de la tyrosinase. C'est même le cas pour l'acide glutaminique et l'acide aspartique. Comme Chodat, Fürth, Agulhon et d'autres l'avaient démontré, la tyrosinase agit le mieux sur la tyrosine en milieu neutre.

Examinons tout d'abord si la tyrosinase suit la loi d'action des masses. En 1907, Chodat et Staub¹ ont démontré que les solutions faibles de tyrosinase exercent une action proportionnelle à la concentration du ferment. Pour les solutions concentrées, ils obtiennent la même loi que Chodat² avait déjà précédemment trouvée pour la laccase. Au lieu de la stricte proportionnalité, on obtient dans ce cas, quand les concentrations croissent comme 1, 2, 3, 4, une augmentation de mélanines qui est exprimée par les valeurs 2, 3, 4, 5. Ce résultat se laisse exprimer dans les limites de ces expériences par la formule générale:

$$ax + b$$

¹ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. I. Sur le mode d'action de l'oxydase.* — Arch. des sc. phys. et nat., 1907, 23, 265.

² Chodat, R. — *Sur le mode d'action de l'oxydase.* — Arch. des sc. phys. et nat., 1905, 19, 501.

où a est la quantité de produit obtenu, b la quantité de produit employé, et x la constante d'accroissement. Von Fürth et Jerusalem³ ont trouvé en même temps que la formation de mélanines n'est qu'au commencement proportionnelle à la quantité de tyrosinase d'*Agaricus*, mais que, depuis un certain point, l'augmentation de la quantité de tyrosinase diminue la formation des mélanines. Egalemeut avec la tyrosinase de l'hémolymphé de lépidoptères, ils sont arrivés à une limite, mais dans ce cas ils n'ont pas constaté une nouvelle diminution. En 1908, Bach⁴ démontre aussi pour la tyrosinase de *Russula delica* qu'elle suit la loi d'action des masses. Il explique les écarts par l'épuisement du ferment, phénomène qui a lieu plus vite suivant que la réaction est plus rapide (d'après la concentration plus forte de ferment ou de substratum). Le produit de quantité de ferment et du temps de réaction est donc égal à une constante, et les temps de réaction sont inversement proportionnels aux concentrations des substratums. Enfin la quantité du produit obtenu augmente avec la quantité de ferment. Aussi Piettre⁵, en 1912, a obtenu des résultats d'après lesquels le rendement

³ Von Fürth, O. et Jerusalem, E. — *Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und fermentativen Melaninbildung*. — Hofmeister Beitr., 1907, 10, 131.

⁴ Bach, A. — *Ueber die Wirkungsweise der Tyrosinase*. — Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1908, 41, 221.

⁵ Piettre, Maurice. — *Influence de quelques composés chimiques sur les mélanines artificielles*. — Compt. rend., 1912, 155, 594.

en mélanine est proportionnel à la quantité de ferment et à la quantité de tyrosine.

Mais comme les ferments sont altérés par la chaleur, leur action dépend de la *température*. La tyrosinase a une température optimum comme tous les ferments. Ainsi von Fürth et Schneider⁶ ont trouvé que la tyrosinase de l'hémolymphe des insectes a son maximum d'action à la température très basse et la perd déjà à 30°. Chodat et Staub¹ montrent que, pour la tyrosinase de pomme de terre, l'influence de la chaleur est exprimée par une hyperbole qui monte avec la température jusqu'au point où le ferment perd son action (60°). Von Fürth et Jerusalem³ ont observé que, pour la tyrosinase des pigments mélanotiques, le maximum d'action est d'abord à 55°, mais après 24 h. ce sont les réactions effectuées à la température de 5-7° qui forment le plus de mélanines. Ceci s'explique peut-être par la destruction du ferment à la température élevée.

De même la présence de certains *sels* semble modifier l'action de notre ferment. Les observations de Bertrand (1897), Cotte (1903), et Bach (1910) sur le rôle du fer et du manganèse se rapportent plutôt à la laccase. D'après Durham⁷, une substance activante, comme le sulfate de fer, serait nécessaire

⁶ Von Fürth et Schneider. — *Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehung zur Pigmentbildung*. — Hofmeisters Beitr., 1901-1902, 1, 229.

⁷ Durham, M. — *On the presence of the tyrosinase in the skins of some pigmented vertebrates*. — Proc. of the Royal Soc. of London, 1904-1905, 74, 390.

pour l'oxydation de la tyrosine par les extraits de peaux. V. Fürth et Jerusalem⁸ prétendent que l'action de la tyrosinase serait accélérée par du sulfate de manganèse. Le sulfate de fer aurait, d'après ces mêmes auteurs, seulement une action accélératrice en faibles doses, mais empêcherait la réaction en concentration plus forte. Weindl⁹ aurait aussi observé une accélération de l'action du ferment de céphalopodes par les sulfates de manganèse et de fer. D'après Wolff¹⁰, le phosphate disodique accélère l'action de la tyrosinase. Ce sel, ainsi qu'un citrate tribasique¹¹, réalise un milieu qui est neutre avec phénolphtaléine et qui correspond à l'optimum d'action. Ces sels n'interviennent donc pas dans le mécanisme de la réaction. En 1909, Bach¹² a démontré que l'hypothèse de Gessard d'après laquelle la formation des mélanines à partir de la tyrosine serait due à des sels minéraux n'est pas juste. Le lactate de manganèse est sans influence, comme Chio¹³ l'a

⁸ Von Fürth, O. et Jerusalem, E. — *Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung*. — Hofm. Beitr., 1907, 10, 131.

⁹ Weindl. — *Pigmentenstehung auf Grund vorgebildeter Tyrosinase*. — Arch. f. Entwickl.-Mechan, 1907, 23, 633.

¹⁰ Wolff, J. — *Influence du phosphate disodique sur la tyrosinase*. — Soc. de biol., 1910, 68, 366.

¹¹ Wolff, J. — *Contribution à la connaissance de divers phénomènes oxydasiques et artificiels*. — Thèse de Paris, 1910.

¹² Bach, A. — *Zur Kenntnis der Tyrosinase*. — Chem. Ber., 1909, 42, 594.

¹³ Chio. — *Sull'azione dei perossidi sulle ossidasi*. — Arch. it. de biol., 1908, 50, 230.

remarqué en 1908. Il semble donc que les sels n'ont pas une grande importance pour l'action de la tyrosinase.

En 1903, Gessard¹⁴ indiqua le premier que l'eau oxygénée accélère l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase. En 1906, Bach¹⁵ prétend que c'est également le cas pour la tyrosinase de pomme de terre et celle de *Lactarius vellereus*. Mais Chodat et Staub¹ (1907) ne peuvent pas confirmer les résultats de Gessard et de Bach. En ajoutant de l'eau oxygénée, soit en petite, soit en grande quantité, elle retarde toujours l'action de la tyrosinase. En 1908, Bach¹⁶ disait que l'eau oxygénée en dilution convenable n'empêche pas l'action de la tyrosinase. Mais, la même année, Bach¹⁷ doit reconnaître que ce peroxyde accélère l'oxydation de la tyrosine seulement au commencement, mais la ralentit plus tard. Il s'explique cette accélération préliminaire par une destruction de substances nuisibles par l'eau oxygénée ajoutée. Chio¹³ prétend par contre que l'influence de l'eau oxygénée est différente suivant la tyrosinase employée et son état. Quelquefois l'oxydation serait activée et d'autres fois complètement

¹⁴ Gessard. — *Antilaccase*. — Soc. de biol., 1903, 55, 227.

¹⁵ Bach, A. — *Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme*. — Chem. Ber., 1906, 39, 3126.

¹⁶ Bach, A. — *Zur Kenntnis der in Tyrosinase tätigen Peroxydase*. — Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1908, 41, 216.

¹⁷ Bach, A. — *Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Licht*. — Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1908, 41, 225.

arrêtée. Il a observé que c'est aussi le cas pour le peroxyde de césium.

Il faut encore mentionner que l'action de la tyrosinase peut être arrêtée par l'action d'une *antityrosinase*. C'est Gessard¹⁸, en 1901, qui a obtenu le premier une antityrosinase par injection. Il¹⁹ démontre aussi que la tyrosinase végétale donne un anticorps qui n'arrête pas l'action de la tyrosinase animale. Czapeck²⁰ trouve dans les extrémités des racines soumises au géotropisme un anticorps qui peut être extrait avec de l'eau ; il est altérable par la chaleur et filtrable à travers les bougies Chamberland. L'alcool précipite cette substance, qui est plus sensible à l'échauffement que l'oxydase correspondante. On peut donc réactiver la tyrosinase en la chauffant à une température donnée. Cet auteur montre que l'antioxydase est spécifique pour l'oxydase de la même espèce de plantes. Gessard²¹ trouva encore une antityrosinase dans le plasma incoagulable de poules qui ont préalablement été traitées par la tyrosinase. Et nous avons déjà vu que Gortner²² suppose aussi un anticorps dans les cheveux blancs.

¹⁸ Gessard, C. — *Étude sur la tyrosinase*. — Ann. de l'Inst. Pasteur, 1901, XV, 593.

¹⁹ Gessard, C. — *Tyrosinase animale*. — Soc. de biol., 1902, 54, 1304.

²⁰ Czapeck. — *Antifermente im Pflanzenorganismus*. — Ber. d. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, 229.

²¹ Gessard, C. — *Sur l'antityrosinase*. — Soc. de biol. 1911, 71, 591.

²² Gortner, R. A. — *Studies on melanine. III. The inhibitory action of certain phenolic substances upon tyrosinase. A suggestion as to the cause of dominant and recessive whites*. — Journ. of biol. Chem., 1911, 10, 113.

Constitution et synthèse

En 1903, Chodat et Bach¹ ont émis l'hypothèse que les oxydases ne sont que des systèmes peroxydes-peroxydases. Pour la tyrosinase aussi, Chodat² admet en 1905 qu'elle consiste d'un peroxyde lié à une peroxydase spécifique. L'année suivante, Bach³ a cherché à démontrer cette hypothèse de Chodat d'une manière expérimentale. Par traitement de la tyrosinase de pomme de terre avec l'alcool, il a obtenu une préparation qui oxyde faiblement la tyrosine. Il prétend avoir observé qu'en ajoutant de l'eau oxygénée, l'action oxydante serait énormément accélérée. Mais nous avons déjà vu que ce n'est le cas qu'au commencement de la réaction, et que l'eau oxygénée empêche l'action de la tyrosinase. Des recherches publiées par Gonnermann⁴ en 1915 semblent plutôt démontrer que la tyrosinase de pomme de terre, par exemple, est un seul ferment.

¹ Chodat, R. et Bach, A. — *Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. V. Zerlegung der sogen. Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen.* — Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1903, 36, 606.

² Chodat, R. — *Sur le mode d'action de l'oxydase.* — Arch. d. Sc. phys. et nat., 1905, 19, 501.

³ Bach, A. — *Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme.* — Chem. Ber., 1906, 39, 2126.

⁴ Gonnermann. — *Ueber Tyrosinasen.* — Die Zuckerindustrie, 1915, 40, 751.

Mais il ne faut pas oublier qu'en 1909, Chodat, Zahorski et Freederickz⁵ ont démontré que la laccase pourrait être transformée en tyrosinase en ajoutant un coferment thermostable qui se trouve dans quelques plantes comme *Vicia faba*, etc. Tandis que pour la laccase on aurait un système peroxyde-peroxydase, la tyrosinase représenterait un système peroxyde-peroxydase-coferment. La spécificité de la tyrosinase serait donc due à la présence d'un coferment spécifique.

⁵ Chodat, Zahorski et Freederickz. — *Synthèse et constitution des ferments oxydants*. — Arch. des sc. phys. et nat., 1909, 27, 306.

II

DÉSAMINATION

Généralités sur la désamination

C'est une chose bien connue que, dans la protéolyse qui passe par les stades albumoses — peptones — acides aminés, on obtient finalement de l'ammoniaque. Ce sont donc en dernier lieu les acides aminés qui perdent leur azote en le délibérant comme ammoniaque. C'est cette mise en liberté d'ammoniaque que l'on appelle *désamination*.

L'ammoniaque peut être dégagée comme telle ou être éliminée comme urée, comme c'est le cas chez les animaux. Elle peut enfin servir chez certaines levures pour une nouvelle synthèse de protéines (Ehrlich). C'est, par exemple, cette propriété des levures dont on se sert en Allemagne depuis la guerre pour transformer l'ammoniaque en protéines.

Tandis que, chez les animaux supérieurs, la désamination, sans destruction de la chaîne de carbone, ne joue qu'un rôle secondaire, celle avec destruction de la chaîne de carbone avec mise en liberté du groupe amino et oxydation en un acide cétonique, est plutôt générale¹. La désamination du

¹ Neubauer, O. et Fischer, H. — *Beiträge zur Kenntnis der Leberfunktion*. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1910, 67, 230.

second genre se fait aussi par les levures, telle que Neubauer et Fromherz², ainsi que Ehrlich et Jacobson³ l'ont démontré.

² Neubauer, O. et Fromherz, K. — *Ueber den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung.* — Zeitschr. f. physiol. Chem., 1911, 70, 326.

³ Ehrlich, F. et Jacobson, K.-A. — *Ueber die Umwandlung von Aminosäuren durch Schimmelpilze.* — Ber. d. deutsch. Chem. Ges., 1911, 44, 888.

Désamination par la tyrosinase

Butkewitsch¹ a démontré en 1902 que la désamination par un champignon, *Aspergillus niger*, nécessite la présence de l'oxygène. En absence d'oxygène, aucune trace d'ammoniaque ne s'était mise en liberté, et on trouve, dans ce cas, une grande accumulation d'acides aminés. Il constatait aussi la même chose chez les embryons de plantes supérieures. On peut donc supposer que la formation d'ammoniaque à partir des acides aminés n'est pas exclusivement due à une hydrolyse, mais aussi à une oxydation.

Ceci est encore appuyé par le fait que plusieurs auteurs ont constaté la mise en liberté d'ammoniaque par des agents oxydants. Neuberg et Blumenthal² ont constaté que les acides aminés ordinaires donnent des aldéhydes avec un atome de carbone en moins, si on les soumet à l'action de l'eau oxy-

¹ Butkewitsch, W. — *Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze*. — Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., 1902, 38, 147.

² Neuberg, C. et Blumenthal, F. — *Deutsch. med. Wochenschr.* 1901, n°. 1 et *Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, 2, 238.

génée et de sels de fer, en libérant en même temps de l'ammoniaque. Par les mêmes moyens, Dakin³ a obtenu l'aldéhyde formique et l'acide glyoxylique avec le glyocolle. En prenant le glyocolle, l'alanine et la leucine, il obtient toujours de l'acide carbonique, de l'ammoniaque et une aldéhyde. Neuberg⁴ a aussi remarqué une action oxydante sur les acides aminés par la lumière solaire en présence d'oxyde d'uranyle comme catalyseur. De même le courant électrique⁵ peut avoir une action oxydante et donne, avec les acides aminés, également de l'aldéhyde avec un atome de carbone en moins et de l'ammoniaque. Il est intéressant de voir que la lumière solaire aussi bien que le courant électrique montrent simultanément dans ces conditions une action hydrolysante, comme ce serait le cas dans la désamination naturelle.

D'autre part, nous avons vu que Chodat⁶ avait trouvé que la tyrosinase, dont on ne connaît jus-

³ Dakin. — *The oxydation of aminoacids with the production of substances of biological importance.* — Journ. of. Biol. chem., 1906, 1, 171 et 1907-1911.

⁴ Neuberg, C. — *Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten. I. Mitteilung. Katalytische Reaktionen des Sonnenlichtes.* — Bioch. Zeitschr., 1908, 13, 305.

⁵ Neuberg, C. — *Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten. II. Mitteilung. Wirkungen des elektrischen Stromes.* — Bioch. Zeitschr., 1909, 17, 270.

⁶ Chodat, R. et Staub, W. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants.* — Arch. d. Sc. phys. et nat., 1907, 23, 172.

qu'alors que des actions oxydantes, donne avec les acides aminés, les peptides, les polypeptides et les matières protéiques solubles, en présence d'un phénol et plus particulièrement du p-crésol, une réaction qui se manifeste par une magnifique couleur, dite crésol-azur. Il était donc intéressant de savoir si dans cette réaction, oxydante sans doute, on aurait aussi une désamination.

M. R. Chodat⁷ avait émis l'hypothèse que la tyrosinase agit, dans ce cas, comme une oxydo-désaminase. C'est sur cette hypothèse qu'il m'avait proposé de faire les recherches suivantes.

J'ai tout d'abord étudié l'action de la tyrosinase du *Solanum tuberosum* sur l'acide aminé le plus simple, le glycocolle. Pour *extraire le ferment*, on a appliqué une méthode qui n'est qu'une abréviation de la méthode décrite déjà antérieurement par R. Chodat⁸. J'ai broyé 7 à 8 kg. de pelures de pommes de terre, humectées avec un peu d'alcool, dans une machine à hacher (comme on s'en sert pour hacher la viande); le produit haché est immédiatement porté dans une presse. Le suc qui s'en écoule est dirigé dans un grand récipient rempli de 4 à 5 litres d'alcool à 94 %. Il se forme un précipité qu'on

⁷ Chodat, R. et Schweizer, K. — *La tyrosinase est aussi une désamidase*. — Arch. der Sc. phys. et nat., 1913, tome 35.

⁸ Chodat, R. — *Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft. Methoden ihrer Anwendung*. — « Hdb. der bioch. Arbeitsmethoden (Abderhalden) », Berlin, 1910, III, 57.

laisse reposer. Ensuite on décante le liquide clair et on porte le précipité sur un filtre. Avant que le précipité soit sec, on le triture dans un mortier avec de l'eau, en ajoutant comme antiseptique du toluène. Quand on a obtenu une émulsion homogène, on laisse digérer pendant une nuit et on filtre le lendemain. Le filtrat clair est de nouveau ajouté à de l'alcool fort. Il se forme un nouveau précipité qui, après décantation et filtration, m'a servi pour mes recherches. J'ai séché ce ferment sur des assiettes à l'air libre. La tyrosinase ainsi obtenue est faible, mais elle a l'avantage d'être plus pure que celles qu'on extrait des champignons (russules ou lactaires) qui sont souillées par de la laccase ou par des acides aminés.

Avec cette tyrosinase, nous avons essayé d'oxyder le *glycocolle*. Si c'est possible, on peut prévoir deux *hypothèses* : ou bien cette oxydation donne lieu à la formation d'aldéhyde formique, d'acide carbonique et d'ammoniaque, suivant l'équation suivante :

Nous avons déjà publié cette réaction dans un

⁹ R. Chodat et K. Schweizer. — *La tyrosinase est aussi une désamidase.* — Arch. des Sciences physiques et naturelles, IV^e période, 35, 140, 1913.

¹⁰ A. Bach. — *Biochem. Zeitschrift*, 60, 221 (1914).

travail sommaire⁹. Cette théorie a tout de suite été compliquée en introduisant dans notre équation une combinaison du ferment¹⁰. En désignant le ferment par le symbole F, notre équation aurait pris la forme suivante :

et la réaction aurait été une hydrolyse. Si dans l'action des ferments on doit souvent supposer des combinaisons, nous n'avons dans nos expériences constaté aucun fait qui confirmerait cette hypothèse. La première équation nous a suffi, puisqu'elle présente bien les produits que l'on peut déceler. Nous verrons en outre plus tard que cette désamination ne se fait pas à l'abri de l'air, ce qui rend l'hypothèse de Bach encore moins probable.

On aurait pu supposer que l'oxydation se continue, en formant à partir de l'aldéhyde formique de l'acide formique. Le ferment pourrait oxyder l'aldéhyde suivant la réaction qui est générale pour les aldéhydes :

ou bien la réaction de Cannizaro interviendrait ici. Elle consiste en ce qu'une molécule d'aldéhyde réagit sur une seconde molécule d'aldéhyde pour donner, en présence d'eau, l'acide formique et l'alcool méthylique.

La deuxième hypothèse que l'on peut prévoir serait la formation d'acide glyoxylique par l'action oxydante de la tyrosinase sur le glyocolle. Mais les expériences nous ont donné des résultats qui parlent en faveur de la première hypothèse, car nous avons constaté la formation d'aldéhyde formique et d'ammoniaque.

Il était à prévoir que la quantité de ces deux corps n'augmenterait dans des proportions notables, car l'ammoniaque aussi bien que la formaldéhyde sont des corps susceptibles de réagir très facilement. D'après Trilliat¹¹, l'aldéhyde formique entre en réaction avec le groupe amino des acides aminés.

D'autre part, les produits obtenus peuvent entrer en réaction entre eux. L'acide carbonique forme avec l'ammoniaque du carbonate d'ammonium :

L'ammoniaque en présence de la formaldéhyde, comme en présence des aldéhydes en général, se combine pour donner l'aldéhyde-ammoniaque correspondante :

¹¹ Trilliat. — *Sur les propriétés antiseptiques de la formaldéhyde.* — Comptes rendus, 114 (1892), 1278.

On sait en outre que les aldéhydes possèdent une fonction réductrice, ce qui peut contre-balancer l'action oxydante du ferment. On s'attendait donc à ce que cette réaction ne puisse progresser très loin que si, par un dispositif approprié, on ne s'arrange à éliminer l'un ou l'autre ou les deux produits principaux de la réaction.

La première chose à faire, c'est de rechercher l'aldéhyde formique et l'ammoniaque.

Pour *déceler la formaldéhyde*, je me suis servi :

1^o De son action réductrice sur le nitrate d'argent ammoniacal.

2^o De la réaction de Rimini, qui a été modifiée par Schryver¹².

La seconde réaction étant encore peu connue, je donnerai ici les détails. Elle consiste à préparer les deux solutions aqueuses suivantes :

1. Chlorure de phénylhydrazine 1 %
2. Ferricyanure de potassium 5 %

Pour effectuer la recherche de la formaldéhyde, on ajoute à 10 ccm. de liquide à essayer 2 ccm. de la solution de phénylhydrazine et puis 1 ccm. de la solution de ferricyanure de potassium. Ensuite on acidifie fortement par 5 ccm. d'acide chlorhydrique concentré. En présence d'aldéhyde formique, il se forme une coloration rouge. Cette réaction se fait par condensation de la formaldéhyde avec la

¹² Schryver, S. B. — *Photochemical formation of formaldehyd in green Plants*. — *Proceed. of the Royal Soc. Lond.* Ser. B. LXXXII (1910), 227.

phénylhydrazine. Le produit de condensation donne par oxydation une base faible qui, en la diluant, en présence d'un acide fort, se dissocie. Rimini a employé comme oxydant le chlorure ferrique. Schryver de son côté a cherché un oxydant, qui, ajouté en excès, ne détruise pas la couleur. C'est lui qui recommande l'emploi du ferricyanure de potassium. Il emploie de même de l'acide chlorhydrique au lieu de l'acide sulfurique pour réaliser la formation d'un sel coloré. Cette réaction indique des traces de formaldéhyde et agit encore dans une dilution de $\frac{1}{10000}$ (d'après Schryver).

La *recherche de l'ammoniaque* se fait au moyen des réactifs suivants :

1° de Nessler ;

2° de Trilliat¹³.

Il est recommandable de distiller le mélange des produits que l'action de la tyrosinase fournit. On peut ainsi rechercher l'aldéhyde formique dans le distillat recueilli dans l'eau froide. Avant de distiller, on acidifie par un acide organique, tel que l'acide tartrique. Mais, pour rechercher l'ammoniaque, on distille sans ajouter d'acide. Pour mettre en évidence l'ammoniaque, il faut ajouter une solution de soude caustique. Il y a probablement combinaison de l'ammoniaque avec l'aldéhyde d'après l'équation précédemment indiquée.

¹³ Trilliat et Turchet, dans Bertrand et Thomas. — *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, p. 326 (Paris, 1910).

Tout d'abord, nous avons *vérifié* si *les réactifs* employés, tels que le glyocolle et la tyrosinase, ne donnent pas par eux-mêmes les réactions supposées. Nous avons fait ces essais à blanc, parallèlement avec le glyocolle et l'asparagine.

Pour savoir si l'ammoniaque ne se forme pas en absence de la tyrosinase, j'ai fait distiller les mélanges suivants :

1.

0,2 g. glyocolle
20 cc. eau de chaux
20 cc. eau

2.

0,3 g. asparagine
20 cc. eau de chaux
20 cc. eau

Après distillation avec magnésie, nous avons ajouté à 10 ccm. du distillat 1 ccm. de solution de soude caustique (diluée) et 1 ccm. de réactif de Nessler. Avec le glyocolle, j'ai pu constater une trace négligeable d'ammoniaque, tandis que pour l'asparagine le réactif Nessler ne nous indique rien,

Pour montrer la différence en présence de la tyrosinase, j'ai fait en même temps les essais suivants :

1 a)

0,2 g. glyocolle
20 ccm. eau de chaux
20 ccm. eau
0,05 g. tyrosinase

2 a)

0,3 g. asparagine
20 ccm. eau de chaux
20 ccm. eau
0,05 g. tyrosinase

Après avoir distillé, également en présence de magnésie, on a trouvé pour le glyocolle une forte réaction d'ammoniaque, et en même temps une faible réaction d'acide formique par le nitrate d'argent ammoniacal. Pour l'asparagine, on trouve une faible réaction d'ammoniaque.

J'ai enfin vérifié si la tyrosinase seule ne donne pas de l'ammoniaque en distillant dans les mêmes conditions :

20 cc. eau de chaux
20 cc. eau
0,05 g, tyrosinase

On ne constate qu'une trace négligeable d'ammoniaque, comme c'était le cas pour le glyocolle seul.

Comme on sait que la tyrosinase n'agit habituellement qu'en *milieux neutres ou faiblement alcalins*, nous avons essayé plusieurs alcalis faibles pour faciliter la réaction.

Nous nous sommes servi en premier lieu de l'*eau de chaux*, qui a en outre l'avantage de combiner l'acide carbonique supposé se dégager dans la réaction. Soit qu'il se forme du carbonate de calcium, soit qu'il se forme avec l'acide aminé, en présence

de l'eau de chaux, le dérivé de l'acide carbamique étudié par Siegfried ¹⁴ :

J'ai tout d'abord recherché l'optimum de la quantité d'eau de chaux. Pour cela j'ai fait cinq solutions de 0,05 gr. tyrosinase et 0,20 gr. glycocolle dans :

1.	40	ccm.	eau				
2.	30	»	»	et 10	ccm.	eau de chaux	
3.	20	»	»	» 20	»	»	»
4.	10	»	»	» 30	»	»	»
5.	—			40	»	»	»

Les réactions ont été effectuées à 25°, température favorable à l'action de la tyrosinase. Le réactif de Schryver pour la formaldéhyde nous donne, après différents intervalles, les résultats suivants :

I ^{er} jour	II ^e jour	III ^e jour	IV ^e jour
1. faible réaction	rose	rien	—
2. moins faible	»	»	—
3. la plus forte	»	rose faible	—
4. forte réaction	abricot	»	—
5. couleur abricot	»	rose un peu plus fort	plus de réaction

En distillant, après avoir acidifié par l'acide tartarique et en recueillant le distillat dans de l'eau froide, la réaction de la formaldéhyde est presque

¹⁴ Siegfried, M. — *Ueber die Bindung von Kohlensäure durch amphotere Amidkörper.* — *Zeitschr. für physiol. Chemie*, 44 (1905), 85 et 46 (1905), 410.

supprimée. Par contre, j'ai constaté l'acide formique par son action sur le nitrate d'argent : trouble qui noircit rapidement. Une autre partie ayant été distillée sans l'acidifier préalablement nous a servi pour la recherche de l'ammoniaque. Soit qu'on prenne le réactif de Nessler, soit qu'on utilise le réactif de iodure de potassium-hypochlorite de Trilliat, on trouvera dans les deux cas beaucoup d'ammoniaque. Dans le flacon 3, la quantité d'ammoniaque est également plus forte que dans les autres.

Comme dans l'essai précédent l'aldéhyde formique a disparu après quelques jours, il m'a paru intéressant de savoir si la tyrosinase a effectué cette réaction. Pour vérifier ceci, j'ai pris :

1.

Aldéhyde formique $\frac{1}{1000}$
+ 0,05 g. tyrosinase.

2.

Aldéhyde formique $\frac{1}{10000}$
+ 0,05 g. tyrosinase.

Après 48 heures, on constate encore une forte réaction de formaldéhyde, un peu plus faible dans le flacon 2. L'aldéhyde formique de la même dilution, mais non traitée par la tyrosinase, donne des réactions de même intensité. Ce n'est donc probablement pas la tyrosinase qui a effectué la destruction de la formaldéhyde.

J'ai ensuite remplacé l'eau de chaux par le *bicarbonate de soude*. Comme échelle comparative, j'ai préparé en même temps des flacons avec de l'eau de chaux :

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Tyrosinase	—	0,05 gr.	0,05
Glycocolle	0,20 g.	0,20 gr.	—
<i>Eau de chaux</i>	20 ccm.	20 ccm.	20 ccm.
Eau	20 ccm.	20 ccm.	20 ccm.

et de même avec le bicarbonate de soude :

	α	β	γ
Tyrosinase	—	0,05 g.	0,05 g.
Glycocolle	0,2 g.	0,2 g.	—
<i>Na H C O³</i>	0,2 g.	0,2 g.	0,2 g.
Eau	40 ccm.	40 ccm.	40 ccm.

De cette manière, nous avons toujours en même temps pu vérifier si le glycocolle seul (*a* et α) et le ferment seul (*b* et β) ne donnent pas d'ammoniaque ou de formaldéhyde par eux-mêmes. On laisse la réaction s'effectuer dans des flacons fermés par un bouchon de liège et on recherche ensuite l'ammoniaque et la formaldéhyde (ou l'acide formique). Après avoir laissé agir une première fois pendant 8 heures, le réactif de Schryver nous donne les résultats suivants :

a rien
b rouge framboise
c rien
 α rien
 β rose faible
 γ rien.

Cette expérience nous montre donc que le bicarbonate de sodium (β) a une influence faible sur l'action de la tyrosinase. L'eau de chaux (*b*) par contre favorise beaucoup plus la réaction. Nous pouvons aussi de nouveau constater que ni le glycocolle seul (*a* et α), ni la tyrosinase seule (*c* et γ) ne donnent lieu à la formation de formaldéhyde.

J'ai ensuite répété la même expérience, mais en laissant agir cette fois pendant un temps double, c'est-à-dire pendant 16 heures. En présence de l'eau de chaux, nous constatons une réaction rouge vif, si le glyocolle et la tyrosinase sont simultanément en présence (*b*). Pour le glyocolle seul (*a*) on observe cette fois aussi un léger virement, mais qui ne va que jusqu'à une teinte à peine rosée. La tyrosinase seule (*c*) donne une couleur jaune-paille. Mais ces réactions ne sont en aucun cas comparables avec celles du flacon *b*. Dans les liquides où nous avons pris comme alcali le bicarbonate de sodium, la réaction est toujours beaucoup moins forte. Comme c'était le cas après 8 heures, le glyocolle seul (α) et la tyrosinase seule (γ) ne donnent rien. La différence avec le flacon (β), qui contient glyocolle et tyrosinase à la fois, est donc excessivement nette.

Si nous soumettons les mélanges de réaction à la distillation, en présence de magnésie, et que nous récoltions le distillat dans l'eau froide comme précédemment indiqué, nous aurons encore les mêmes résultats. Nous savons déjà que l'ammoniaque doit être mise en liberté par la potasse caustique, tandis que la réaction de la formaldéhyde est devenue moins forte, probablement par suite d'une transformation en acide formique.

Enfin nous avons essayé un troisième milieu alcalin, celui obtenu en ajoutant du *carbonate de calcium*. Dans ces circonstances, on peut encore reconnaître la production d'aldéhyde formique, mais la réaction est excessivement faible. En prenant :

1.	glycocolle	+	tyrosinase	
2.	»	+	»	+ Ca CO ₃
3.	»	+	»	+ NaH CO ₃
4.	»	+	»	+ Ca (OH) ₂

on observe aussi bien avec le carbonate de calcium (2) comme avec le bicarbonate de sodium (3) une réaction plus nette que sans alcali (1). Mais c'est toujours l'eau de chaux qui favorise le plus cette désamination.

Dès lors nous avons donc choisi comme type le mélange suivant :

20 ccm. d'eau de chaux
20 ccm. d'eau distillée
0,2 gr. de glycocolle
0,05 gr. de tyrosinase.

Nous avons pris ces proportions pour vérifier si la réaction n'a pas lieu avec le ferment inactivé par la chaleur. On sait qu'une température de 66° suffit pour tuer la tyrosinase, c'est-à-dire à lui enlever son action spécifique sur la tyrosine, ainsi que les autres actions. En chauffant le ferment en solution aqueuse à l'ébullition, pendant dix minutes, on peut être sûr d'avoir enlevé au ferment complètement son action spécifique. C'est avec un ferment ainsi traité que nous avons fait une comparaison avec l'action du ferment non altéré :

1.

20 ccm. d'eau de chaux.
20 ccm. d'eau distillée.
0,2 gr. de glycocolle.
0,05 gr. de tyrosinase vivante.

2.

20 ccm. d'eau de chaux.
20 ccm. d'eau distillée.
0,2 g. de glycocolle.
0,05 g. de *tyrosinase tuée*.

3.

0,2 g. *bicarbonate de sodium*.
40 ccm. d'eau distillée.
0,2 g. de glycocolle.
0,05 g. de *tyrosinase vivante*.

4.

0,2 gr. *bicarbonate de sodium*.
40 ccm. d'eau distillée.
0,2 g. de glycocolle.
0,5 g. de *tyrosinase tuée*.

5.

0,2 gr. de *carbonate de calcium*.
40 ccm. d'eau distillée.
0,2 g. glycocolle.
0,05 g. de *tyrosinase vivante*.

6.

0,2 gr. de *carbonate de calcium*.
20 ccm. d'eau distillée.
0,2 g. de glycocolle.
0,05 gr. de *tyrosinase tuée*.

7.

40 ccm. d'eau distillée.
0,2 gr. de glycocolle.
0,05 g. de *tyrosinase tuée*.

8.

40 ccm. d'eau distillée.
2,2 gr. de glycocolle.
0,05 g. de *tyrosinase vivante*.

La recherche de la formaldéhyde d'après Schryver nous donne :

1. réaction rouge.
2. à peine coloré.
3. un peu plus rose que 4.
4. à peine coloré.
5. rose très net.
6. à peine coloré.
7. rose net.
8. à peine coloré.

Avec le ferment inactivé on n'obtient donc pas de formation de formaldéhyde dans des quantités appréciables (2, 4, 6 et 8).

Ces essais ayant été faits sans addition d'antiseptique, nous les avons répétés en ajoutant à chaque flacon deux gouttes de toluène. Les résultats ont été les mêmes.

Il me reste encore à mentionner quelques essais que j'ai faits d'une manière analogue avec quelques *autres acides aminés*, tels que l'acide phénylamido-acétique, l'asparagine et la leucine. Pour avoir une comparaison nous avons en même temps répété l'expérience avec le glycocolle. J'ai donc laissé agir pendant 24 heures et à une température de 25° (dans un thermostat) les quatre mélanges suivants :

1.

- 0,2 g. de *glycocolle*.
- 0,05 g. de tyrosinase.
- 20 ccm. d'eau.
- 20 ccm. d'eau de chaux.

2.

0,4 g. d'acide *phénylamidoacétique*.
0,5 g. de tyrosinase.
20 ccm. d'eau.
20 ccm. d'eau de chaux.

3.

0,3 g. d'*asparagine*.
0,05 g. de tyrosinase.
20 ccm. d'eau.
20 ccm. d'eau de chaux.

4.

0,10 g. *leucine*.
0,05 g. de tyrosinase.
20 ccm. d'eau.
10 ccm. d'eau de chaux.

J'ai toujours d'abord dissous le ferment dans 10 ccm. d'eau et l'acide aminé à part dans 10 ccm. d'eau. En mélangeant les deux, on ajoutait les 20 ccm. d'eau de chaux. Il va sans dire qu'à partir d'autres acides aminés que le glycocolle il ne se formerait pas de formaldéhyde, mais une autre aldéhyde correspondante. Mais nous aurons d'après notre hypothèse toujours un dégagement d'ammoniaque. Après distillation avec magnésie (le n° 1 sans magnésie), on a trouvé :

1. forte réaction d'ammoniaque.
2. réaction faible (douteuse).
3. forte réaction.
4. rien.

C'est donc la leucine qui ne donnerait pas lieu à cette désamination. C'est probablement une ques-

tion de configuration qui intervient et qui joue un si grand rôle dans la spécificité des ferments. L'action désaminante de la tyrosinase ne se laisse donc pas encore généraliser. Mais nous avons vu que la preuve expérimentale de cette théorie nouvelle de la fonction de la tyrosinase se laisse particulièrement bien démontrer en ce qui concerne le glyocolle et le phénylglyocolle, le premier fournissant de l'aldéhyde formique, le second, de la benzaldéhyde immédiatement reconnaissable à sa forte odeur d'essence d'amandes amères.

Désamination par la tyrosinase en présence d'un phénol

Nous avons donc précédemment mis en évidence une *nouvelle propriété de la tyrosinase*, c'est-à-dire qu'elle agit sur les acides aminés en les désaminant, libérant de l'ammoniaque et de l'acide carbonique et les ramenant à une aldéhyde (produit d'oxydation) qui contient un atome de carbone en moins. Je me posais maintenant la question si une réaction analogue se passait dans la réaction du crésol-azur de R. Chodat¹ que j'ai déjà mentionnée. Dans cette réaction, à côté des acides aminés et de la tyrosinase, prend encore part un *phénol*. Ce savant s'est surtout servi d'un phénol substitué, le p-crésol $C^6H^5(CH^3) - OH$. On obtient ainsi une réaction rouge qui, par l'intensité de la coloration, a trouvé aujourd'hui une application pour connaître le degré de la protéolyse. Je tiens à rappeler que des phénols et surtout le

¹ R. Chodat. — *Nouvelles recherches sur les ferments oxydants*, IV et V. — Archives des Sciences physiques et naturelles, IV^e période, XXXIII (1912), 70-95; Ibid. (1912) 225.

p-crésol se forment aussi dans la protéolyse. C'est probablement le cas dans la désagrégation de la tyrosine par exemple :

Le p-crésol peut encore s'oxyder plus loin :

Il est très probable que, dans la désagrégation des acides aminés, se produisent continuellement des réductions et des oxydations. J'ai développé ici cette formation de phénols à partir des acides aminés pour démontrer que, si nous ajoutons *in vitro* du p-crésol aux acides aminés, nous ne nous sommes pas trop éloignés des conditions réalisées dans la nature.

M. R. Chodat avait trouvé que cette présence d'un phénol n'est pas seulement due à une action catalytique en ce qui concerne la réaction du crésol-azur, mais se fait complètement seulement si, à une molécule de p-crésol, on ajoute un multiple de glycocolle, d'alanine, etc. La conclusion était que ces acides aminés et leurs produits de condensation, les polypeptides, entrent en réaction pour former la matière colorante, rouge ou bleue, dont il a été question. Ce derniers n'étant pas isolables, on ne connaît pas encore les produits finaux. On ne peut par conséquent connaître la fonction du p-crésol dans cette réaction ; mais nous pouvons supposer, en partant du glycocolle, qu'une partie au moins de l'aldéhyde formique et de l'ammoniaque, produites par l'action de la tyrosinase, entrent en réaction avec le p-crésol et qu'ils sont ainsi éliminés. Ceci faciliterait l'action du ferment, qui devient alors relativement continue, au lieu d'être limitée. Il est hors de conteste que, dans l'organisme aussi, la plupart des actions ferments peuvent se continuer sans arriver rapidement à un équilibre, grâce au déplacement de ce dernier par élimination des produits.

Nous avons vu au chapitre précédent que la tyrosinase agit d'après l'équation :

Il fallait donc chercher si ces produits se laissent aussi déceler dans la réaction du p-crésol-azur. Les produits colorés qui se forment au cours de cette réaction empêchent la recherche directe des aldéhydes et de l'ammoniaque. J'ai par conséquent toujours distillé les solutions, mais sans ajouter de magnésie, et recueilli le distillat dans 10 ccm. d'eau froide. Ici la méthode du nitrate d'argent ammoniacal n'est malheureusement plus applicable, parce que le p-crésol, qui distille aussi sous ces conditions, donne déjà une réduction de ce réactif. La quantité d'acide carbonique est trop faible pour l'analyse qualitative.

Un étude gravimétrique par contre nous a donné des résultats nets. J'ai effectué la réaction dans des flacons-laveurs. J'ai tout d'abord introduit les solutions de p-crésol et de glycolle, ainsi que la quantité d'eau nécessaire pour avoir toujours la même dilution. Ensuite j'ai fait couler la solution du ferment par le tube qui va jusqu'au fond du flacon, et tout de suite après, j'ai fermé les deux ouvertures par des robinets rodés à l'émeri. Après 24 heures, la réaction étant effectuée, j'ai attiré dans ce mélange, avec une trompe à eau, un courant d'air, précédemment lavé dans une solution de potasse caustique. En faisant passer ce courant d'air par des boules de

Liebig, j'ai absorbé l'acide carbonique dégagé dans la réaction. En prenant pour chaque essai :

15 ccm. d'une solution de p-crésol ($1/_{250}$)
 10 ccm. » » » tyrosinase ($0,05/_{20}$)

j'ai fait varier la quantité de glycolle :

1. 45 ccm. d'une solution de glycolle ($0,75/_{250}$)
2. 30 » » » » » + 15 ccm. d'eau
3. 15 » » » » » + 30 » »
4. 10 » » » » » + 35 » »

La pesée des boules de Liebig m'a donné les quantités d'acide carbonique suivantes :

	1 ^{re} observation	2 ^{me} observation	Calculé
1.	0,0092 g.	0,0075 g.	0,0879
2.	0,0165 »	0,0200 »	0,0586
3.	0,0190 »	0,0165 «	0,0293
4.	ne donne plus le bleuissement.		

A la dilution du flacon numéro 3, nous sommes donc arrivés à nous approcher le plus de la valeur calculée. Si on n'arrive pas à une réaction complète, ces résultats confirment du moins le dégagement d'acide carbonique.

Après cette expérience quantitative, j'ai étudié l'action désaminante de la tyrosinase, en présence d'un phénol, avec plusieurs acides aminés. J'ai aussi ici commencé par la plus simple, le *glycolle*. $\text{CH}^2(\text{N H}^2) - \text{COOH}$. Dans ces expériences, je me suis toujours servi, comme pour les autres acides aminés, de solutions équimoléculaires. C'est ainsi que j'ai pris :

30 ccm. d'une solution de p-crésol $1/_{250}$
 90 » » » » glycolle $0,75/_{250}$
 0,05 g. de tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau

Pour éliminer l'action de microorganismes, j'ai dès lors toujours ajouté deux gouttes de toluène à chaque essai.

Après 12 heures, j'ai distillé le mélange et recherché dans le distillat l'ammoniaque et la formaldéhyde. Le réatif de Nessler m'a donné une forte réaction, tandis que la formaldéhyde se fait remarquer par une coloration rose du réactif de Schryver. Après avoir répété la même expérience avec :

10 ccm. d'une solution de p - crésol $1/_{250}$
30 » » » » glycocolle $0,75/_{250}$

c'est-à-dire sans ferment, le réactif de Nessler aussi bien que le réactif de Schryver n'indiquent plus rien. C'est donc bien la tyrosinase qui, aussi ici, produit l'ammoniaque et l'aldéhyde.

Pour savoir si cette réaction serait aussi favorisée par un milieu alcalin, j'ai fait les essais comparatifs suivants avec l'eau de chaux :

1.

30 ccm. d'une solution de p - crésol $1/_{250}$
90 » » » » de glycocolle $0,75/_{250}$
0,15 g. tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau
70 ccm. d'eau distillée.

2.

30 ccm. d'une solution de p - crésol $1/_{250}$
90 » » » » de glycocolle $0,75/_{250}$
0,15 g. tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau
70 ccm. d'eau de chaux.

Dans le distillat, je n'ai pu constater la formation d'ammoniaque dans l'essai où j'avais ajouté l'eau

de chaux (2), tandis que l'autre essai montre toujours une réaction d'ammoniaque. Pour la formaldéhyde, on peut constater la même chose, et d'ailleurs la formation du crésol-azur n'a pas lieu en présence d'eau de chaux. Le milieu alcalin empêche donc la réaction, et le liquide reste même pendant plusieurs jours incolore. L'eau de chaux sature sans doute le groupe - OH en position p.

Un second acide aminé, le *phénylglycocolle*, se prête admirablement à la vérification de notre théorie. On aura ici d'après le même schéma :

Mais la benzaldéhyde est un corps bien reconnaissable par son odeur d'amandes amères, tandis que le phénylglycocolle ne donne aucune odeur par lui-même. Et en effet nous avons constaté la formation de cette odeur en faisant agir pendant 12 heures :

30 ccm. d'une solution de p - crésol 1/250
 90 » » » » *phénylglycocolle* 1,51/250
 (solut. saturée)
 0,05 g. de tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau.

En outre, dans le distillat on peut constater une très forte réaction d'ammoniaque. En répétant la même opération sans ferment, on n'observe plus aucune odeur de benzaldéhyde, et le réactif de Ness

ler ou de Trilliat indique seulement, par une coloration jaune paille et sans précipité, une trace d'ammoniaque, tandis qu'avec le ferment nous avons formation d'un précipité.

J'ai encore constaté qu'aussi vis-à-vis de l'*alanine* $\text{CH}^3 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{COOH}$, la tyrosinase fonctionne comme oxydo-désaminase. En prenant :

30 ccm. d'une solution de p-crésol $1/_{250}$
90 » » » d'alanine $0,98/_{250}$
0,05 g. de tyrosinase dans 20 ccm. d'eau

et en ajoutant toujours un antiseptique, on constate après distillation, sans magnésie et après 12 heures, également la formation d'ammoniaque. L'exemple du phénylglycocolle nous a déjà montré que le produit d'oxydations désaminantes n'est pas toujours l'aldéhyde formique, sauf dans le cas du glycocolle. Aussi la recherche de la formaldéhyde, dans la fermentation de l'alanine par la tyrosinase, donne un résultat négatif. Nous n'avons pas encore constaté la formation d'une aldéhyde d'une façon sûre, car, comme je l'ai déjà indiqué, la présence du p-crésol gêne la recherche d'une aldéhyde. Dans le cas de l'alanine, on peut aussi bien supposer une oxydation en α avec production d'une cétone, l'acide pyruvique. Si tel était le cas, on verrait une relation étroite entre cette forme de désamination et la production d'acide lactique, etc.

Enfin j'ai étudié la réaction de Chodat avec un quatrième acide aminé, la *tyrosine* $\text{C}^6\text{H}^4(\text{OH}) - \text{CH}^2 - \text{CH}(\text{NH}^2) - \text{COOH}$. On prend comme d'habitude les proportions suivantes :

30 ccm. d'une solution de p - crésol $1/_{250}$
 90 » » » » *tyrosine* $1,01/_{250}$
 0,05 g. tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau

Après 12 heures, j'ai ici aussi reçu le distillat dans de l'eau froide. Encore une fois, on peut constater la production d'ammoniaque et, d'une manière analogue aux expériences précédentes si nous laissons agir ensemble le p-crésol et la tyrosine seuls, on n'observe aucune formation d'ammoniaque.

Si nous résumons les résultats obtenus avec ces quatre acides aminés, nous pouvons construire le tableau suivant :

	Ammoniaque formée	Formaldéhyde formée
Glycocolle	très forte réaction	coloration rose
Phénylglycocolle	» » »	—
Alanine	forte réaction	—
Tyrosine	» »	—

Il m'a paru intéressant de savoir si la *peptone* subirait aussi une désamination par l'action de la tyrosinase. Pour étudier cette question, j'ai remplacé l'acide aminé des essais précédents par la *peptone* :

10 ccm. d'une solution de p-crésol $1/_{250}$
 30 ccm. » » » *peptone* $0,76/_{250}$
 0,05 g. tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau.

Comme antiseptique, j'ai aussi ajouté deux gouttes de toluène. Le distillat, recueilli après 12 heures d'action, a montré avec le réactif de Nessler une assez grande quantité d'ammoniaque. La recherche d'aldéhyde formique n'a donné qu'une coloration rose très faible, donc : résultat douteux. Si on laisse agir

ensemble le p-crésol et la peptone, pendant 12 heures, on n'obtient après distillation qu'une trace d'ammoniaque et aucune réaction de formaldéhyde. Dans ce cas, la quantité d'ammoniaque n'est pas comparable avec celle produite par l'action du ferment.

Il nous a paru intéressant de savoir si la peptone a une influence sur la désamination des acides aminés par l'action de notre ferment. A cet effet, j'ai étudié la *peptone en présence du glyocolle et du phénylglyocolle*. J'ai d'abord préparé dans deux flacons le mélange suivant :

10 ccm. d'une solution de p-crésol $1/_{250}$
30 ccm. » » de glyocolle $0,75/_{250}$
0,5 g. de tyrosinase dissoute dans 20 ccm. d'eau.

Ensuite j'ai ajouté à l'un des flacons 10 ccm. d'une solution de peptone $5/_{250}$ (saturé) de manière à avoir deux essais comparatifs avec :

1. p-crésol + *glyocolle* + tyrosinase
2. » + » + » + peptone.

D'une manière analogue, j'ai préparé deux flacons avec le phénylglyocolle :

1° p-crésol + *phénylglyocolle* + tyrosinase
2° » + » + » + peptone.

Dans les deux flacons sans peptone, nous constatons après 12 heures la formation du crésol-azur. Celui qui contenait le glyocolle (1) donne après distillation la réaction de Schryver, et l'autre (1°) possède l'odeur d'aldéhyde benzoïque. Mais dans le flacon contenant de la peptone, nous ne trouvons ni

dans le flacon du glyocolle, ni dans celui du phénylglyocolle la matière colorante de Chodat. Dans les deux, le liquide est devenu brun-rougeâtre avec fluorescence verte, et nous avons donc ici un autre corps que le crésol-azur. La quantité d'ammoniaque formée dans ces deux essais (2 et 2°) est plus grande que sans peptone. Mais dans celui du glyocolle la réaction de la formaldéhyde n'est pas aussi forte que sans peptone. La formation de l'aldéhyde benzoïque à partir du phénylglyocolle a aussi lieu en présence de peptone (2°).

Pour savoir si les réactions d'ammoniaque plus fortes dans les flacons qui contiennent de la peptone ne proviennent pas d'une simple décomposition de la peptone, j'ai distillé, sans ferment, les mélanges suivants:

1.

10 ccm.	d'une solution de p-crésol	$1/_{250}$
20 ccm.	»	» glyocolle $0,75/_{250}$
10 ccm.	»	» peptone $5/_{250}$

2.

10 ccm.	d'une solution de p-crésol	$1/_{250}$
30 ccm.	»	» phénylglyocolle $1,5/_{250}$
10 ccm.	»	» peptone $5/_{250}$

Dans les deux cas, la recherche de l'ammoniaque m'a donné des résultats négatifs. L'ammoniaque des essais précédents ne s'est donc formée que sous l'influence de la tyrosinase.

Comme nous le savons déjà, le p-crésol se forme aussi pendant la protéolyse. Il était donc d'un certain intérêt de savoir si dans nos réactions un

produit plus complexe de la protéolyse, la *peptone*, pourrait *remplacer le p-crésol* dans nos réactions. En laissant agir ensemble :

10 ccm. d'une solution de peptone (5/250)
20 ccm. » » » glycocolle (0,75/250)
0,05 g. de tyrosinase dans 20 ccm. d'eau.

en présence de deux gouttes de toluène, on peut obtenir une réaction nette d'ammoniaque. Par contre, ni la réduction du nitrate d'argent ammoniacal par une aldéhyde, ni la réaction de Rimini-Schryver pour la formaldéhyde n'ont lieu. Si on fait un même essai, mais en remplaçant le glycocolle par une quantité équimoléculaire (30 ccm. d'une solution 1,51/250) de phénylglycocolle, nous ne constatons même plus la formation d'ammoniaque. Le stade peptone ne peut donc pas encore remplacer le p-crésol.

Comme pour la peptone, nous avons aussi observé une action retardatrice du *glucose* sur la production du crésol-azur et la formation de l'aldéhyde formique, à partir du glycocolle, ou de l'aldéhyde benzoïque à partir du phénylglycocolle. Nous avons pris les proportions suivantes pour démontrer cette action :

1°.

0,20 g. de glycocolle
0,05 g. » tyrosinase
1,2 g. » glucose
40 ccm. d'eau.

et pour avoir un milieu alcalin :

2°.

0,20 g. de glyocolle
0,05 g. » tyrosinase
1,2 g. » glucose
20 ccm. d'eau
20 ccm. d'eau de chaux.

Un troisième essai, sans glucose, nous a servi comme flacon-témoin :

3°.

0,20 g. de glyocolle
0,05 g. » tyrosinase
20 ccm. d'eau
20 ccm. d'eau de chaux.

Le réactif de Schryver nous a donné la plus forte réaction dans le cas sans glucose (3°); en milieu alcalin nous avons un faible rougissement malgré la présence du glucose (2°), mais en milieu neutre on n'a plus du tout de réaction.

Comme la tyrosinase du *Solanum tuberosum* contient toujours encore d'autres ferments, on peut encore nous faire l'observation que la désamination est due à un de ces autres ferments. Nous avons pris cette tyrosinase, parce qu'elle ne contient pas du tout des acides aminés. Tel n'est pas le cas pour la *tyrosinase de champignons*, qui n'a, par contre, ni propriété laccase, ni même propriété peroxydase. Ceci a été vérifié par le fait qu'elle n'oxyde directement ni le gaïac, ni les autres réactifs spécifiques de la laccase, et ne donne plus en présence du p-crésol le précipité blanc laiteux si caractéristique pour le ferment de Bertrand, alors qu'elle oxyde le

p-crésol de la manière que nous avons décrite. J'ai préparé cette tyrosinase d'après la méthode indiquée par M. R. Chodat².

Un autre moyen de séparer les actions de la laccase et celle de la tyrosinase s'obtient par le fait que la première agit en milieu acide, tandis que la tyrosinase est favorisée dans son action par un milieu neutre ou alcalin. Mais nous avons constaté que notre tyrosinase de champignons n'a plus d'action laccase. Il nous restait donc à vérifier si la peroxydase n'agit pas dans la réaction crésol-azur. Ceci semblait déjà peu probable, puisque nous n'avons pas de peroxyde dans notre réaction, dont la peroxydase a besoin pour entrer en fonction.

A cet effet, j'ai préparé les cinq éprouvettes suivantes :

	1.	2.	3.	4.	5.
Solut. de glycocolle 0,75/250	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.
Solut. de p — crésol 1/250	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.
Solut. de tyrosinase de champignon 0,05/20	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.
Solut. de peroxydase non chauffée 0,1/10	0 ccm.	0,5 ccm.	1 ccm.	1,5 ccm.	2 ccm.
Eau	2 ccm.	1,5 ccm.	1 ccm.	0,5 ccm.	0 ccm.

En laissant agir, j'ai observé après des durées différentes :

Après 5 minutes :

1. rose (maximum)
2. » (plus fort que 3)

² R. Chodat. — *Oxydationsfermente*, dans : Abderhalden, *Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden*, 3, 1 (1910), 57.

3. » (» » » 4)
 4. » (» » » 5)
 5. » (minimum).

Après 2 heures :

1. violet (maximum)
 2. rose
 3. rose
 4. rose
 4. rose
 5. rose (minimum).

Après 6 heures :

1. bleu (maximum)
 2. violet
 3. violet
 4. violet-rougeâtre
 5. rose-bleuâtre (minimum).

Après 48 heures :

1. bleu avec fluorescence violette
 2. violet foncé, » » »
 3. » » » » »
 4. » » » » »
 5. » » » » »

La peroxydase ne favorise donc pas la réaction, puisque le crésol-azur se forme en dernier lieu dans le flacon qui contient la plus grande quantité de peroxydase. Pour vérifier ceci, nous avons répété la même recherche avec peroxydase bouillie :

	1.	2.	3.	4.	5.
Solut. de glyocolle 0,75/250	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.
Solut. de p — crésol 1/250 .	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.
Solut. de tyrosinase de champignon 0,05/20 . .	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.
Solut. de <i>peroxydase chauffée</i> 0,1/10	0 ccm.	0,5 ccm.	1 ccm.	1,5 ccm.	2 ccm.
Eau.	2 ccm.	1,5 ccm.	1 ccm.	0,5 ccm.	0 ccm.

Dans ce cas, les résultats ont été les suivants :

Après 5 minutes :

1. rose
2. rien
3. rien
4. rien
5. rose très faible.

Après 2 heures :

1. faiblement violet
2. » »
3. rose bleuâtre (faible)
4. rose faible
5. » »

Après 48 heures :

1. bleu avec fluorescence violette
2. » » » »
3. » » » »
4. bleu-violet » »
5. » » » »

Dans ce cas, il y a à peine une différence dans les différents flacons.

Comme la peroxydase est toujours mêlée d'un peu d'acides aminés, on attendait plutôt des résultats contraires à ceux obtenus dans ces expériences. Mais la quantité d'acides aminés qui souille la peroxydase est probablement trop petite pour modifier la réaction du crésol-azur. C'est ainsi que nous avons cherché si par hasard cette quantité d'acide aminé pourrait suffire pour la réaction du crésol-azur. Nous avons donc pris la peroxydase à la place de l'acide aminé :

	1.	2	3.	4.	5.
Eau.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.	3 ccm.
Solut. de p — crésol 1/250	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.	1 ccm.
Tyrosinase de <i>Solanum</i> 0,05/20	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.
Solut. de <i>peroxydase vivante</i> 0,1/10	0 ccm.	0,5 ccm.	1 ccm.	1,5 ccm.	2 ccm.
Eau pour amener au même titre	2 ccm.	1,5 ccm.	1 ccm.	0,5 ccm.	0 ccm.

Les résultats ont été les suivants :

Après 10 minutes :

1. rien
2. rose
3. rose fort
4. rose fort
5. rose très fort.

Après 3 heures :

1. rose très faible
2. rouge (minimum)
3. »
4. »
5. » (maximum).

Après 48 heures :

1. rose-jaune
2. rouge
3. »
4. rouge-brun
5. rouge-brun très foncé.

Ici, la réaction du crésol-azur montre donc une intensité proportionnelle à la quantité de peroxydase ajoutée pour remplacer l'acide aminé. Faisons la même expérience avec la peroxydase tuée. On constate alors :

Après 10 minutes :

1. rose
2. »
3. rose très faible
4. » » »
5. rose faible.

Après 3 heures :

1. rose très faible
2. rouge (minimum)
3. »
4. »
5. rouge (maximum).

Après 48 heures on observe encore la même intensité comme dans les expériences avec la peroxydase vivante.

On en tire donc les conclusions que la peroxydase, à laquelle adhèrent des acides aminés, peut remplacer les acides aminés de la réaction du cré-sol-azur. La réaction est un petit peu plus forte avec peroxydase vivante qu'avec peroxydase bouillie. Ceci laisse supposer qu'une petite quantité d'acide aminé est altérée en chauffant la peroxydase. On observe d'ailleurs, en chauffant la solution de peroxydase, un léger précipité colloïdal.

III.

Désamination par la tyrosinase en présence de chlorophylle

On sait que dans les plantes vertes la tyrosinase apparaît habituellement dans les feuilles. La présence d'*aldéhyde formique dans le végétal chlorophyllé* pourrait donc aussi être ramenée à une action de ce ferment oxydant sur le glyocolle ou sur les produits de dégradation des matières protéiques contenant cet acide aminé en liaison de polypeptide.

Nous nous sommes tout d'abord assuré que la plupart des plantes contiennent de la tyrosinase. Nous avons pris un grand nombre de plantes. J'ai chaque fois broyé 2 gr. de feuilles ou de bourgeons avec 2 cc. d'une solution de p-crésol (1/250) et 6 cc. d'une solution de glyocolle (0,75/250) et ensuite j'ai filtré le tout. Pour neutraliser le suc cellulaire, qui est toujours acide, on ajoute encore à chaque essai 1 cc. d'eau de chaux. En même temps j'ai fait un essai à blanc, en prenant de l'eau, en quantité équivalente, soit 8 cc. De même 1 cc. d'eau de chaux était ajouté. Toutes ces recherches ont été faites en ajoutant une goutte de toluène comme antiseptique. La plupart des plantes m'ont donné une réaction positive plus ou moins forte.

D'autre part, nous savons que dans la plante verte on a trouvé de la formaldéhyde. Polacci¹ l'a déjà démontré en 1902, et Harvey² confirme cette observation en 1908. Ce fait a encore été démontré par d'autres auteurs, comme Gibson, A.-W. Titherley, Schryver³, etc., et confirmé par les travaux de Angelico et Catalano⁴, qui l'ont mis en évidence en 1913 au moyen d'une nouvelle réaction colorée.

J'ai voulu me convaincre moi-même de la présence de la formaldéhyde dans la plante verte sous l'influence de la lumière. A cet effet, j'ai choisi une plante qui contient de la tyrosinase en quantité appréciable, un gros pavot horticole à fleurs rouges, cultivé dans le jardin de l'institut botanique de notre Université. J'ai enveloppé une feuille de cette plante, le soir, d'un capuchon de papier noir et je l'ai laissé jusqu'au lendemain après midi. La journée était radieuse, sans nuage. Alors j'ai pris une portion de la feuille obscurcie, et une autre de la feuille éclairée, de la même plante, des morceaux semblables comme situation. J'ai pris pour chaque essai 5 gr. de feuilles que j'ai broyées dans un mortier. Le produit broyé a été soumis à la distillation en recevant le distillat dans 10 cm. d'eau. Dans le

¹ Polacci. — Inst. Bot. d. Real Univ. di Pavia, 1902.

² Harvey. — *Annals of Botany*, 1908, 32, 117.

³ Schryver, S.-B. — *Proceed. of the royal Soc.*, 1910, (B) 82, 227.

⁴ Angelico, F. et Catalano, G. — *Ueber die Anwesenheit von Formaldehyd in den Säften der grünen Pflanzen.* — *Gazz. chim. ital.*, 1913, 43, 38.

distillat, on recherche la formaldéhyde, comme précédemment, par le réactif de Schryver. La feuille qui avait été exposée au soleil fournit alors une faible réaction rose, tandis que l'autre ne donne aucune coloration.

Il est très probable que cette formaldéhyde s'est formée à partir de l'acide carbonique et de l'eau, d'après l'hypothèse de Bayer, qui admet cette aldéhyde comme premier produit de la photosynthèse. Mais les chapitres précédents nous ont montré que l'aldéhyde formique peut provenir d'autres sources et tout particulièrement du glycocolle, sous l'influence de la tyrosinase. Il m'a donc paru intéressant de savoir si la chlorophylle, à laquelle la formation d'aldéhyde formique semble être liée dans les plantes, pourrait influencer la réaction de la tyrosinase, et dans quelle mesure le pigment chlorophyllien pourrait intervenir dans le phénomène de la désamination des acides aminés par la tyrosinase.

Je me suis *procuré la chlorophylle* devant servir à ces expériences en extrayant des feuilles (graminées), avec de l'alcool, dans l'obscurité. Cet extrait a été versé sur des morceaux de craie pure et laissé évaporer, toujours dans l'obscurité. J'ai alors utilisé ces morceaux imprégnés de chlorophylle.

L'expérience a été mise en train en préparant les quatre mélanges suivants, chaque fois deux dont l'un avait été exposé à la lumière, tandis que l'autre fut conservé dans l'obscurité.

1.

0,2 gr. de glycocolle
10 c. c. d'eau
10 c. c. d'eau de chaux.

2.

0,2 gr. de glycocolle
10 cc. d'eau
10 cc. d'eau de chaux
Craie sans chlorophylle.

3.

0,2 gr. de glycocolle
10 cc. d'eau
10 cc. d'eau de chaux
Craie avec chlorophylle.

4.

0,2 gr. de glycocolle
10 cc. d'eau
10 cc. d'eau de chaux
Craie + chlorophylle
0,05 gr. de tyrosinase.

Le glycocolle a fourni les résultats suivants pour la réaction de la formaldéhyde :

	Lumière	Obscurité
1.	rose	rien
2.	rose	rien
3.	rose	rose
4.	rouge	rouge.

On peut donc observer qu'une solution de glycocolle fournit dans la lumière très intense des traces de formaldéhyde (1), comme Neuberg⁵ l'a d'ailleurs

⁵ Neuberg, C. — *Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten*, I. *Mitteilung. Katalytische Reaktionen des Sonnenlichts.* — *Bioch. Zeitschr.*, 1908, 13, 305.

déjà démontré en 1908. De même la craie seule (2), aussi bien que celle imprégnée de chlorophylle (3), n'accélère pas cette réaction d'une manière appréciable. Mais si on ajoute la tyrosinase (4), on voit que, tant à la lumière que dans l'obscurité, la chlorophylle accélère énormément cette réaction.

En faisant encore un cinquième essai avec :

0,2 gr. de glyocolle
10 cc. d'eau
10 cc. d'eau de chaux
0,05 gr. de tyrosinase

on observe, en comparant avec le flacon (4), que la présence de chlorophylle donne lieu à une désamination rapide aussi bien dans la lumière que dans l'obscurité. Mais cette observation ne parlerait pas en faveur d'une formation de formaldéhyde dans les plantes par l'action de la tyrosinase, puisque dans les végétaux on constate ce phénomène seulement à la lumière. C'est donc encore un appui indirect de l'hypothèse sur la photosynthèse de Bayer.

Il est très probable que la chlorophylle agit dans ces réactions que je viens d'énumérer seulement par son pouvoir réducteur, comme c'était le cas pour le p-crésol dans les travaux mentionnés dans le chapitre précédent.

Avec des essais faits d'une manière analogue avec l'*alanine*, et en cherchant, après distillation, l'aldéhyde formée par le nitrate d'argent ammoniacal, je n'ai pas pu arriver à des résultats nets.

J'ai de même examiné le rôle de la chlorophylle dans la désamination du *phénylglyocolle* par la tyrosinase, en prenant :

1.

0,4 gr. phénylglycocolle
0,05 gr. de tyrosinase
Craie *sans* chlorophylle
20 cc d'eau
20 cc. d'eau de chaux.

2.

0,4 gr. phénylglycocolle
0,05 gr. de tyrosine
Craie *avec* chlorophylle
20 cc. d'eau
20 cc. d'eau de chaux.

Ici encore, la production de la benzaldéhyde est fortement augmentée par la présence de chlorophylle. Ces observations, ainsi que celles des chapitres précédents, ont un intérêt singulier pour le physiologiste et expliquent l'origine probable de benzaldéhyde à partir des matières protéiques et de leurs produits d'hydrolyse. Il est probable que la chlorophylle intervient dans cette réaction en raison de son action réductrice, comme cela pourrait être le cas dans la désamination du glycocolle.

Désamination par la tyrosinase en l'absence d'oxygène

Nous avons déjà vu que dans la nature existe une désamination oxydative qui en l'absence d'oxygène n'a plus lieu. Il était donc intéressant de savoir si, dans la désamination par la tyrosinase, la présence de l'oxygène de l'air serait aussi nécessaire. J'ai donc cherché à effectuer la réaction en remplaçant l'air par un autre gaz.

Je me suis tout d'abord servi de l'*acide carbonique*, parce qu'il était justement à ma disposition. J'ai placé dans un flacon-laveur le mélange qui fournit le crésol-azur selon la méthode de Chodat :

9 cc.	d'une solution de glyocolle	(0,75/250)
3 cc.	»	» p - crésol (1/250)
2 cc.	»	» tyrosinase (0,05/20)
2 gouttes	de toluène (= antiseptique)	

En dirigeant un courant d'acide carbonique soigneusement lavé pendant une demi-heure à travers ce mélange, on remarque que la réaction rouge, qui dans les cas ordinaires commence à se faire au bout de 15 minutes, n'a plus lieu. Même après 12 heures

on ne constate aucune coloration. Il semblait donc bien que la présence de l'air est nécessaire pour que la réaction de Chodat se fasse. Mais, chose curieuse, si on expose cette même solution, qui a passé au courant d'acide carbonique, à l'air, la coloration n'apparaît tout de même pas. Seulement si on ajoute de nouveau du ferment, le rougissement est net dans peu de temps et le lendemain on a une forte coloration crésol-azur.

L'acide carbonique n'est donc pas un gaz inerte pour notre réaction. Et en effet, nous avons vu précédemment que la tyrosinase est excessivement sensible à l'action des acides, son action oxydante étant supprimée par ces derniers. Il semble donc qu'aussi l'acide carbonique lui-même a une action inhibitoire remarquable.

Pour mesurer le temps nécessaire au courant d'acide carbonique pour empêcher l'action du ferment, j'ai soumis le même mélange à l'action de l'acide carbonique pendant 5 et 15 minutes et pendant une heure. En le remettant après ce temps à l'air, j'ai observé avec les mélanges exposés à l'acide carbonique pendant :

1. 5 minutes : rien après $\frac{1}{2}$ heure
 rose fort après 48 heures
2. 15 minutes : rien après $\frac{1}{2}$ heure
 rose après 48 heures
3. 1 heure : rien.

En même temps, j'ai fait un essai-contrôle qui, sans avoir été traité par l'acide carbonique, a été mis en

train en même temps que l'autre mélange a été exposé à l'air. Il donna toujours une coloration :

rose après $\frac{1}{2}$ heure

bleue (crésol-azur) après 48 heures.

Les dites expériences exposées à l'air n'ont donc rougi que très tardivement et n'ont pas passé aux teintes intermédiaires ni par conséquent au bleu crésol-azur avec dichroïsme rouge.

J'ai ensuite voulu savoir sur lequel des membres de ce mélange l'acide carbonique avait une action inhibitoire.

On aurait pu supposer que le glyocolle protégerait la tyrosinase contre l'acide carbonique en formant peut-être une combinaison; à cet effet j'ai fait passer un courant d'acide carbonique dans un mélange de

9 cc. d'une solution de glyocolle ($0,75/_{250}$)

2 cc. » » » tyrosinase ($0,05/_{20}$)

2 gouttes de toluène.

Je l'ai laissé d'abord pendant 1 heure avant d'y diriger le courant d'acide carbonique. Après le traitement avec ce gaz, je l'ai exposé à l'air et ajouté :

3 cc. d'une solution de p-crésol ($1/_{250}$), pour voir si la réaction du crésol-azur se produit. Mais après une heure, je n'ai constaté aucune coloration, tandis qu'un essai-contrôle qui a seulement été exposé à l'air montre toujours la réaction rose après ce temps. La tyrosinase n'est donc pas protégée par le glyocolle contre l'anhydride carbonique, en tous cas pas la

quantité entière de la tyrosinase. Une combinaison de glyocolle avec le ferment n'avait également pas lieu.

Ensuite j'ai fait l'essai inverse pour savoir si le p-crésol ne forme pas une combinaison avec l'acide carbonique. Si tel est le cas, nous n'obtiendrons plus la réaction du crésol-azur, ou du moins on aura une réaction moins forte que l'essai-contrôle. J'ai donc exposé pendant 1 heure à l'action de l'anhydride carbonique :

3 cc. d'une solution de p - crésol($1/_{250}$).

En le mettant ensuite à l'air, on ajoute maintenant :

9 cc. d'une solution de glyocolle ($0,75/_{250}$)

2 cc. » » » tyrosinase ($0,05/_{20}$)

2 gouttes de toluène.

On constate alors :

après $1/2$ heure une coloration rose

» 12 heures une coloration crésol-azur.

L'essai-contrôle montre exactement la même intensité, c'est-à-dire que l'acide carbonique n'a donc pas d'action sur le p - crésol.

Ainsi le glyocolle n'a pas protégé la tyrosinase, et la quantité d'anhydride carbonique qui, dans le liquide au p-crésol, a été la même que dans les autres essais, n'a pas empêché le rougissement du mélange, si la tyrosinase et le glyocolle ont été ajoutés après le traitement par l'acide carbonique.

Les mêmes expériences ont été faites avec la tyrosinase seule. Son action étant arrêtée par l'acide carbonique ainsi que par les autres acides, elle devrait reprendre son activité en ajoutant de l'alcali

après le traitement à l'acide. Pour cela, on expose à l'action du courant d'anhydride carbonique le mélange suivant :

9 cc. d'une solution de glycocolle ($0,75/_{250}$)
3 cc. » » » p-crésol ($1/_{250}$)
2 cc. » » » tyrosinase ($0,05/_{20}$)
2 gouttes de toluène

pendant 4 heures. Ensuite on divise en deux parties en exposant à l'air et en ajoutant à l'une des moitiés une solution d'alcali faible (bicarbonate de soude) jusqu'à réaction faiblement alcaline.

L'essai sans alcali nous donne :

après $\frac{1}{4}$ heure : rien
» $\frac{1}{2}$ » : rose faible
« 24 heures : rose

tandis que celui avec alcali montre :

après $\frac{1}{4}$ heure : rouge
» $\frac{1}{2}$ » : rouge intense
» 24 heures : bleu crésol-azur.

L'action nuisible de l'acide carbonique est donc détruite en ajoutant un alcali. Il se pourrait donc que l'acide carbonique formât une combinaison avec le ferment, qui ensuite serait de nouveau détruite en ajoutant un alcali.

Pour vérifier s'il s'est vraiment formé une combinaison, on expose :

2 cc. d'une solution de tyrosinase ($0,05/_{20}$)
2 gouttes de toluène

au courant d'anhydride carbonique. Ensuite on fait la réaction du crésol-azur en ajoutant

9 cc. d'une solution de glycocolle ($0,75/_{250}$)
3 cc. » » de p-crésol ($1/_{250}$)

On observe alors :

après $\frac{1}{4}$ heure : rien
» 3 heures : rose.

L'essai-contrôle donne :

après $\frac{1}{4}$ heure : rouge
» 3 heures : bleu-violet.

Ce résultat rendrait donc une combinaison avec l'acide carbonique très probable. Mais comme il m'avait semblé avoir fait l'observation que la réaction avec le ferment inactivé par l'anhydride carbonique avait lieu plus vite en présence de l'air, j'ai fait les vérifications suivantes :

2 cc. d'une solution de tyrosinase ($0,05/_{20}$)
2 gouttes de toluène

ont été exposés au courant d'anhydride carbonique pendant 4 heures. On divise en deux parties et on ajoute à chacune :

9 cc. d'une solution de glycocolle ($0,75/_{250}$)
3 cc. » » de p-crésol ($1/_{250}$).

L'un des flacons est laissé tranquille et montre :

après $\frac{1}{4}$ heure : rien
» 4 heures : coloration rose

tandis que l'autre est agité avec de l'air. Dans ce second flacon, le mélange donne :

après $\frac{1}{4}$ heure : coloration rose
» 4 heures : réaction crésol-azur.

Il ne s'agit donc pas dans cette action de l'anhydride carbonique sur la tyrosinase, d'une altération

du ferment, puisqu'on peut, par simple agitation prolongée, dissocier cette combinaison (adsorption?) et ramener plus ou moins la tyrosinase à l'état normal.

Ce gaz n'étant donc pas inerte pour la tyrosinase, j'ai enfin choisi l'*hydrogène* pour démontrer que l'oxygène est nécessaire à la désamination par ce ferment oxydant. J'ai de nouveau pris :

9 cc. d'une solution de glyocolle (0,75/250)
3 cc. » » » p-crésol (1/250)
2 cc. » » « tyrosinase (0,05/20)
2 gouttes de toluène

que j'ai laissés agir ensemble dans une atmosphère d'hydrogène. Aucun rougissement ne s'est produit.

Pour savoir si l'hydrogène n'a pas altéré le ferment, comme c'était le cas avec l'acide carbonique, j'ai ensuite exposé ce même mélange à l'air. La réaction crésol-azur a alors lieu comme dans un mélange qui n'a pas été exposé préalablement à l'hydrogène.

Une autre question se pose, maintenant, à savoir dans quelle mesure le travail d'oxydation est précédé par des phénomènes préparatoires ; il y a sans doute union ou combinaison du ferment avec la substance fermentescible, pour laquelle réaction il faut un temps déterminé.

Nous reprenons notre dernière expérience en la traitant pendant 1 heure par un courant d'hydrogène. Si maintenant on l'expose à l'air en même temps qu'un essai-contrôle préparé de manière à rendre les deux expériences concordantes pour ce qui est du début de l'action de l'oxygène, on voit alors que l'expérience, où les masses ont été en présence

pendant 1 heure, mais où l'oxydation a été rendue impossible par le courant d'hydrogène, rougit déjà fortement au bout de 5 minutes, alors qu'il faut au contrôle 30 minutes pour commencer.

Il est clair qu'il y a eu une action préparatoire, sans doute une combinaison du ferment avec la substance fermentescible.

Il m'a également paru intéressant de savoir si cette action préparatoire produit une combinaison du ferment qui le protégerait contre l'acide carbonique. En exposant un mélange comme je viens de l'indiquer pendant 1 heure au courant d'hydrogène, et en le traitant ensuite également pendant 1 heure avec l'acide carbonique, j'ai obtenu, en exposant ensuite à l'air, une réaction rose, mais qui ne va pas plus loin, même en 24 heures. L'intensité de cette réaction rose est la même que lorsqu'on a exposé le mélange directement pendant 1 heure à l'air. La teinte est pourtant un peu plus jaunâtre.

Ce n'est donc probablement pas le ferment qui donne une combinaison avec le glyocolle ou p-crésol, qui le protégerait alors contre l'action de l'anhydride carbonique. Il est plus probable qu'en absence de l'oxygène (pendant 1 heure), s'est formé un leucocorps. En l'exposant ensuite à un courant d'acide carbonique, le ferment serait dans ce cas-là également inactivé; si nous l'exposons enfin à l'air, ce ne serait que le leucocorps formé qui se colore en s'oxydant et qui prendrait une intensité de coloration, comme si on avait exposé le mélange simplement à l'air pendant 1 heure et tué ensuite le ferment.

Et en effet, si on expose le mélange plus longtemps au courant d'hydrogène, ou qu'on le traite ensuite par l'acide carbonique, on obtient des colorations plus fortes. On observe ainsi en le traitant par l'hydrogène pendant :

1 heure :		réaction rose
4 heures :	»	rouge (fluorescence verte)
24	»	» crésol-azur.

C'est d'ailleurs un fait bien connu que, lorsque la proportion d'anhydride carbonique augmente dans l'atmosphère, la respiration dite normale, aérobie, est entravée ; alors commence la respiration anaérobie avec dislocation des molécules, et, si le sucre est présent, avec formation d'alcool. Dans la pratique du maltage, on sait que cette modification se fait déjà remarquer lorsque la quantité de CO_2 n'est encore que de 7 %.

CONCLUSION

Mes recherches ont donc démontré que la désamination n'est pas nécessairement produite par des ferments hydrolytiques. Elle peut aussi se faire par l'action d'oxydases et en particulier de la tyrosinase. Ces recherches ont rendu l'existence déjà problématique des désaminases (ferments hydrolytiques) encore plus douteuse. Il serait intéressant de voir si on ne pourrait pas démontrer l'identité des désaminases et des ferments oxydants, au moins en partie.

Les résultats de cette thèse pourraient faire supposer une théorie générale de la désamination par la tyrosinase. Il y aurait production d'ammoniaque et d'acide carbonique, accompagnée de la formation d'un produit d'oxydation à un atome de carbone en moins.

Au point de vue de la physiologie animale, on aurait les éléments de la formation de l'urée. La désaminoxydase dégraderait les polypeptides et les acides aminés, non par un simple procès d'hydrolyse, mais par une oxydation dans le sens de la théorie de Hofmeister¹.

¹ Hofmeister, G. — *Ueber Bildung des Harnstoff's durch Oxydation.* — Arch. f. exp. Pathol. 1894, 33, 198.

On n'a jusqu'à présent jamais isolé des tissus une désaminase-oxydase proprement dite, et la supposition de l'existence de matières ferments semblables est basée sur des expériences *in vivo*, ou tout au moins sur des expériences faites sur des organes en survie. Certains auteurs ont ainsi démontré l'existence de désaminases des acides aminés chez des tissus broyés et le foie² dans le placenta³, dans le foie et les intestins⁴, ainsi que dans des levures vivantes⁵. Mais par contre ces ferments n'ont pas été trouvés par d'autres auteurs dans le suc des tissus⁶, dans des organes broyés⁷, chez des plantes supérieures⁸, ainsi que chez des champignons⁹ et certaines levures vivantes¹⁰.

Mais pour nous en tenir à nos résultats, nous voyons dès maintenant une espèce de respiration de

² Lang. — *Desamidierung im Tierkörper*. — Hofm. Beitr. 1904, V, 321.

³ Savaré. — *Zur Kenntnis der Fermente der Plazenta*. — Hofm. Beitr., 1907, IX, 141.

⁴ Bostock, G. — *On deamidization*. — Biochem. Journ., 1911-2, 48, 388.

⁵ Effront. — *Action de la levure de bière sur les ac. aminés*. — Compt. rend., 1908, 146, 779, et 1910, 151, 1007.

⁶ Abderhalden et Schittenhelm. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1906, 49, 26.

⁷ Fürth et Friedmann. — *Bioch. Zeitschr.*, 1910, 26, 435.

⁸ Butkewitsch, W. — *Bioch. Zeitschr.*, 1909, 16, 410.

⁹ Pringsheim. — *Ueber Pilzdesamidase*. — *Bioch. Zeitschr.*, 1908, 12, 15.

¹⁰ Ehrlich, F. — *Bioch. Zeitschr.*, 1906, 18, 416 et 425.

matières azotées, aboutissant à l'aldéhyde formique en présence de l'ammoniaque. Nous nous approchons ainsi du formiate d'ammonium, du formamide et, par élimination d'eau, phénomène si général dans les procès physiologiques, de l'acide cyanhydrique.

SMITHSONIAN INSTITUTION LIBRARIES

3 9088 00624 7381