

50376
1955
1

50.376
1955
1

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

(mention : Sciences)

par

CLAUDE LAMORT

Ingénieur de l'Institut de Fermentation
et des Industries Alimentaires de Bruxelles

le 17 Mai 1955



PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DES MODIFICATIONS DES CHLOROPHYLLES a ET b SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Jury	}	M. MICHEL	}	Président
		M ^{lle} DELWAULLE		Examineurs
		M.M. BONNEMAN		



AVANT-PROPOS

Après avoir terminé nos études à l'Institut National des Industries de Fermentation de Bruxelles, Monsieur LONCIN, qui fut notre Professeur de Chimie alimentaire, nous a suggéré d'entreprendre une thèse de doctorat, dans un domaine en relation avec des problèmes particuliers à l'Industrie de la conserve, celui de la DEGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE.

L'occasion s'étant présentée à nous de préparer cette thèse à l'Université de Lille, nous sommes très reconnaissant à Monsieur LEFEBVRE, Doyen de la Faculté des Sciences de nous y avoir admis et de nous avoir proposé de travailler dans les laboratoires de Monsieur le Professeur BOULANGER, à la Faculté de Médecine et de Pharmacie.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur BOULANGER, qui, avec tant de gentillesse, nous a ouvert les portes de ses laboratoires, et nous a sans cesse facilité le travail par son aide, ses conseils précieux et ses encouragements.

C'est grâce à Monsieur le Professeur LONCIN que nos recherches ont pu être menées à bien; il nous a sans cesse guidé avec son autorité habituelle et ne nous a pas ménagé son temps. Nous lui sommes très reconnaissant de nous avoir permis de poursuivre une partie de nos recherches dans ses laboratoires.

Nous remercions également Monsieur JACQMAIN, assistant au Laboratoire de Recherche des Industries Alimentaires du C.E.R.I.A. qui n'a cessé de nous témoigner sa bienveillante sympathie, et à qui nous sommes redevable de tant de bons conseils, tant scientifiques que pratiques.

Que James HOLLEMAN reçoive ici le témoignage de mon amitié et toute ma gratitude pour l'aide généreuse qu'il m'a apportée durant les mois que nous avons passé ensemble au Laboratoire.

Nous remercions Monsieur P.H.LEFEBVRE, Directeur Technique de l'INACOL, qui nous a permis de réaliser dans ses laboratoires, des recherches du domaine pratique.

Nous adressons enfin nos remerciements à Madame PETIT et à Mademoiselle BERGHMANS pour leur amicale collaboration technique au travail d'impression de cette publication.



030 020663 1

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

Doyen: M. Lefebvre, Professeur de chimie appliquée
et Chimie de la houille.

Assesseur: M. Rouelle, Professeur de Physique et Electricité
industrielles.

Doyens Honoraires:

MM. Chatelet
Pruvost

Professeurs Honoraires:

MM. Beghin, Cau, Chapelion, Chaudron, Cordonnier,
Decarrière, Dehorne, Doie, Fleury, Gallissot,
Mazet, Normant, Pariselle, Pascal, Pauthenier,
Swyngedauw, Wiemann.

Professeurs: MM. Arnoult, Radioélectricité générale

Corsin, Paléobotanique

Decuyper, Mathématiques appliquées

Mlle Delwaulle, Chimie P.C.B.

MM. Duparquet, Géologie et minéralogie

Germain, Chimie générale et chimie organique

Hocquette, Botanique générale et appliquée

Kampe de Feriet, Mécanique des fluides

Lamotte, Zoologie générale et appliquée

Mme Lelong, Calcul différentiel et intégral

MM. Michel, Chimie minérale

Roig, Physique générale

Waterlot, Géologie houillère

Zamansky, Analyse supérieure

N... Physico-chimie industrielle

Professeurs sans chaire

M. Bonneman-Bemia, Chimie appliquée

Bonte, Géologie appliquée

Dehors, Physique Industrielle

Dreyfuss, Géologie

Heim de Balsac, Zoologie

Kourganoff, Astronomie

Savard, Chimie générale

Maitres de conférences

MM. Brochard, Physique

Descombes, Mathématiques appliquées

Lebègue, Chimie agricole et botanique P.C.B.

Martinot-Lagarde, Mécanique des fluides

Michel, Physique théorique

Pérez, Physique

Roubine, Physique

Chargés de cours:

MM. Bouchez, Physique théorique

Germain, Mécanique rationnelle

Secrétaire: Mme Bouchez

TABLE DES MATIERES

Introduction

Chapitre I: Historique et nomenclature

Chapitre II: Préparation des solutions pures de chlorophylles

Chapitre III: Méthodes de dosage - Techniques utilisées

Chapitre IV: Dégradation de la chlorophylle en milieu acide
et formation de phéophytine

Chapitre V: Dégradation de la chlorophylle en milieu alcalin
et formation de chlorophylline

Chapitre VI: La photooxydation de la chlorophylle

Chapitre VII: Effet des cations inorganiques sur la formation
de phéophytine

Chapitre VIII: Effet des cations organiques sur la formation
de phéophytine

Chapitre IX: Etudes comparatives de réactions des chlorophylles
dans les plastes (traitement direct de végétaux
verts)

Conclusion générale

Bibliographie

INTRODUCTION

En dépit des nombreux travaux réalisés chaque année dans le domaine de la chlorophylle, les études ayant trait aux divers facteurs de dégradation et de modification sont peu complètes et ne mettent pas en lumière les relations entre ces divers facteurs.

Les cinétiques des divers modes de dégradation en fonction de la température, des ions H^+ ou OH^- , les vitesses des réactions sont inconnues ou imparfaitement connues. L'étude du remplacement de l'atome de Magnésium par d'autres atomes métalliques a été réalisée seulement dans des cas particuliers et il était intéressant de connaître les stabilités respectives de ces nouveaux corps formés.

D'autre part, l'état de la chlorophylle dans les végétaux étant indéterminé, il n'est pas certain à priori que la chlorophylle "in vivo" réagisse comme le produit d'extraction, qu'on appelle chlorophylle. Si l'on sait qu'il existe des complexes chlorophylle-protéines ou chlorophylle-lipides, ceux-ci n'ont jamais pu être extraits. De même, à titre d'exemple, si il est prouvé que l'ion Cu^{++} peut remplacer facilement l'atome de Magnésium de la chlorophylle en solution acide, on ne peut affirmer pour autant que cet ion Cu^{++} (qui cependant reverdit des végétaux dont la chlorophylle a été dégradée en milieu acide) agisse de façon semblable sur la chlorophylle non extraite. Il se pourrait dans ce cas que le cuivre produise plutôt un arrachement dans

les complexes existants, qui provoquerait des réactions différentes.

En regard de ces problèmes existe un point de vue pratique, industriel, celui de la perte de la coloration verte des végétaux, par suite des opérations technologiques de l'industrie de la conserve.

Si la cause principale en est la conversion de la chlorophylle en phéophytine, par arrachement (dû aux ions H^+) de l'atome de Magnésium, on assiste parfois à des phénomènes de recoloration ou de décoloration ne correspondant plus directement avec la formation de phéophytine, et dont l'origine est inconnue.

Les relations entre ces diverses questions nous ont incité à entreprendre une étude systématique, à partir de solutions pures de chlorophylles a et b, de nombreux facteurs susceptibles de transformer, d'accélérer ou de retarder les divers modes de dégradation dont nous étudierons aussi les cinétiques.

Enfin, une étude comparée, dans certains cas, aura trait aux réactions de la chlorophylle dans les plantes, envisageant le point de vue industriel et pratique.

- - - - -

temps. Cependant, malgré les publications nombreuses, ce n'est que vers la fin du siècle passé que l'on a acquis quelques données positives sur ce corps. Les difficultés étaient énormes, car le pigment qu'on essayait d'isoler était en réalité un mélange de 4 corps (2 chlorophylles et 2 caroténoïdes).

Le pionnier dans ce domaine est WILLSTAETTER (2 à 4) qui a pu réaliser la séparation entre chlorophylles et caroténoïdes et découvert la présence de Magnésium. Il a pu aussi réaliser une hydrolyse avec séparation et découverte du phytol. Plus tard, en 1928, H. FISHER (5-6) précise l'individualité des dérivés de WILLSTAETTER et pas à pas, établit des détails de structure qui finalement ont abouti à une formule développée et à des synthèses partielles (7). La formule fut modifiée en 1938 (8). Citons parmi les auteurs qui ont contribué à l'établissement de la formule, CONANT et coll. (9), STOLL et WIEDERMANN (10-11).

Si WILLSTAETTER a pu réaliser la séparation des pigments par solvants, une méthode bien meilleure consiste à employer la chromatographie, découverte par TSWETT (12), précisément pour la chlorophylle, et perfectionnée depuis (13-14).

2) Propriétés physiques

La chlorophylle a est un corps d'un aspect noir bleuté, celui de la chlorophylle b est plus vert. Les chlorophylles sont insolubles dans l'eau, avec laquelle elles forment des suspensions colloïdales. Elles se dissolvent bien dans l'alcool absolu, dans l'éther, l'acétone, le benzène, le chloroforme. Dans l'éther de pétrole, la composante b est moins soluble que a.

En solution, la chlorophylle a est vert-bleu, la chlorophylle b est

verte. Les nuances varient avec le solvant. Le spectre d'absorption possède une série de bandes dans le visible, dont l'une, dans le rouge, est très large et intense. Dans le violet, se trouve une autre bande très forte. Nous détaillerons plus loin (chap. III) les longueurs d'onde des maxima d'absorption pour les chlorophylles et leurs principaux dérivés. Comme on le verra, ces longueurs d'onde sont variables selon le solvant. C'est pourquoi, étant donné la particularité du solvant utilisé au cours de cette étude (50% eau - 50% propanol), nous avons dû, à partir des produits purs, déterminer à nouveau les spectres complets dans la région visible.

3) Propriétés chimiques

Magnésium: la chlorophylle perd facilement son métal sous l'influence des acides, même très dilués. On obtient ainsi la phéophytine. La formation de phéophytine en relation avec divers facteurs fait l'objet d'un chapitre de ce travail.

Fonction éther-sel: la chlorophylle est aisément attaquable non seulement par les agents d'hydrolyse habituels, mais plus particulièrement par un enzyme, la chlorophyllase, qui sépare le phytol du reste de la molécule. On obtient ainsi la chlorophyllide. Nous étudierons plus particulièrement l'hydrolyse du phytol et la saponification, par les alcalis. La deuxième fonction éther-sel est bien plus stable.

Allomérisation: on a constaté que la chlorophylle conservée dans des conditions mal définies, s'altérait et perdait son pouvoir de cristallisation. Cette allomérisation (appelée ainsi par WILLSTAETTER) conduit à la formation de chlorines (dihydro-porphine) et purpurines

(dihydro-porphine avec anneau isocyclique et liaison éther entre les carbones C₉ et C₁₀). Il s'agit d'une oxydation sous l'influence de l'air. Elle se produit aussi sous l'action des alcalis forts.

Dérivés d'oxydation alcaline: la chlorophylle et ses dérivés immédiats subissent des dégradations progressives avec modification du squelette carboné. Grâce à une longue mise au point des détails opératoires, des chercheurs ont pu suivre pas à pas ces transformations et obtenir une abondante série de dérivés du groupe des chlorines et purpurines. Par dégradation alcaline de la phéophorbide (phéophytine moins phytol) à chaud dans le méthanol, on obtient la chlorine e. Mais à froid, dans l'alcool propylique, on obtient des composés violets en solution étherée, découverts par CONANT, qui les a appelés purpurines. On a pu montrer qu'il y a eu oxydation par l'air. L'action des alcalis peut donc avoir un effet plus profond qu'une simple saponification. A partir des chlorophyllides, WILLSTAETTER, par les alcalis à chaud, a pu obtenir des composés appelés isochlorophyllines, qui par enlèvement du Magnésium, conduisent à des chlorines et des purpurines.

- - - - -

CHAPITRE II. PREPARATION DE
SOLUTIONS PURES DE CHLOROPHYLLE a ET DE CHLOROPHYLLE b

1) Matières premières et extraction

La chlorophylle est extraite de végétaux verts, par exemple d'orties (*ortica dioica*). Les pigments sont obtenus en solution dans l'éther, par la méthode de ZSCHEILE et COMAR (15):

15 g. de tissu frais et une petite quantité de CO^3Ca (pointe de canif) sont placés dans un broyeur à couteaux avec 100 cm^3 d'acétone.

Remarques a) le CO^3Ca est destiné à neutraliser les acides et à faciliter l'extraction de la chlorophylle en la séparant de ses attaches avec des protéines ou des lipides.

b) d'autre part, (16) l'extraction serait facilitée par l'effet de cations tels que Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ . C'est pourquoi nous utilisons de préférence le CO^3Mg au lieu de CO^3Ca pour l'extraction. On évite ainsi le remplacement éventuel d'une petite partie du Magnésium de la chlorophylle par du Calcium (voir chap.VII) (17).

Après 5 minutes de mixage, on filtre sur Buchner et lave à l'acétone. Une portion de 100 cm^3 est ajoutée à 50 cm^3 d'éther sulfurique redistillé sur réducteur pour éviter les peroxydes. Puis, dans une ampoule à décanter, on ajoute 100 cm^3 d'eau distillée.

Le transfert de la chlorophylle de l'acétone dans l'éther est une modification de la technique de ZSCHEILE et COMAR, décrite par LE ROSEN (18). Cette modification évite une perte importante due à

l'émulsion. En effet, l'acétone est enlevé de la phase étherée contenant les pigments, par lavage à l'eau, non par mélange, ce qui donne des émulsions considérables, mais en faisant tomber de l'eau goutte à goutte d'un tube effilé au-dessus de la solution. On fait couler ainsi 300 cm³ d'eau environ. La solution étherée est séchée en plaçant l'ampoule au réfrigérateur, ce qui fait diminuer la solubilité de l'eau dans l'éther. Enfin, on sèche définitivement sur sulfate de sodium.

Remarques: a) quoique les chlorophylles soient très solubles dans l'éther, on ne peut les extraire en triturer simplement le tissu dans ce solvant, Il faut un matériau ionique. Mais, même alors, on utilise de préférence un solvant miscible à l'eau et à l'éther, à cause de la tendance générale des porphyrines à s'adsorber sur des protéines (19).

b) pour prévenir toute adsorption excessive de la chlorophylle sur la matière solide, il vaut mieux diluer l'acétone par 15 à 20% d'eau. Au-delà de cette quantité, on risquerait de voir se former une émulsion (20).

c) il est absolument nécessaire de faire passer la chlorophylle dans l'éther après extraction si on veut l'obtenir pure, parce qu'ainsi on élimine les pigments hydrosolubles, comme les anthocyanines (21).

- - -

2) Séparation des pigments

La seule méthode permettant une séparation totale des pigments est la chromatographie d'adsorption (43-44). Celle-ci peut être réalisée

sur colonnes d'adsorbants les plus variés, tels que l'urée (22), l'amidon (23-45), l'acétate de plomb (24), la poudre d'os (25), etc...

Nous avons choisi la méthode de ZSCHEILE et COMAR (26), légèrement modifiée, sur colonne de saccharose commercial impalpable, contenant des matières amylacées. La méthode est pratique et rapide.

(Nous avons utilisé le "sucre de Tirlemont", impalpable, contenant 3% d'amidon).

Solvant: il est prévu 30% d'éther sulfurique redistillé, et 70% d'éther de pétrole. Nous avons préféré établir les proportions à 27% d'éther sulfurique et 73% d'éther de pétrole (P.E.: 30°-70°).

Ceci permet d'éviter un léger pourcentage de carotènes élués avec la chlorophylle a.

Ordre d'élu^{tion} des pigments: carotènes et zéaxanthène, chlorophylle a, chlorophylle a isomérisée, chlorophylle b, xanthophylles.

Dimensions des colonnes: il est évident qu'il est plus facile d'obtenir des zones horizontales et régulières avec des colonnes de petite section (2,5 cm.). En pratique, nous avons préféré utiliser des colonnes de grande section (5 cm.), que nécessite la préparation d'une grande quantité de chlorophylle. Le débit étant fonction du carré de la section est donc 4 fois plus important pour une section double.

La longueur des colonnes a été portée, des 35 cm. prévus, à 45 cm., ceci permettant d'obtenir la chlorophylle b pure, exempte de chlorophylle a, en un seul chromatogramme. Mais, d'autre part, l'augmentation de la longueur nécessite l'emploi d'une système d'élu^{tion} sous

pression de gaz (env. 0,3 Kg.). L'élution sous vide donnerait lieu à des fendillements de l'adsorbant.

- - -

3) Critères de pureté

Aucun pigment ne s'élue entre les zones de chlorophylle a et la zone de chlorophylle b, ce qui semble indiquer que leur séparation est totale. Mais il existe un critère de pureté spectrophotométrique. On se base sur des rapports d'intensité de divers maxima d'absorption dans l'éther de pétrole. Le rapport $\frac{\text{maximum rouge}}{\text{maximum bleu}}$, pour chacune des deux chlorophylles, permet d'établir l'absence de carotènes ou de xanthophylles, qui absorbent dans la région bleue du spectre. Ces rapports sont, respectivement d'après MACKINNEY (27) et ZSCHEILE (28): 0,76 et 0,77 pour la chlorophylle a.

0,38 et 0,33 pour la chlorophylle b.

Vérifications: nous avons obtenu les nombres suivants pour diverses solutions pures:

0,77 pour la chlorophylle a

0,35 pour la chlorophylle b.

La phéophytine a est décelée par son maximum d'absorption à 5.050A° ou à 5.350 A°. La rapport $\frac{\text{maximum rouge}}{\text{maximum } 5.350 \text{ A}^\circ}$ est de 23 d'après MACKINNEY et de 52 d'après ZSCHEILE.

La phéophytine b est décelée par son maximum à 5.280 A°. Le rapport correspondant est établi par MACKINNEY à 13, et par ZSCHEILE à 19.

Vérification: nous avons obtenu les nombres suivants pour diverses solutions de phéophytines pures:

0,27 pour la phéophytine a

0,13 pour la phéophytine b.

- - -

Remarques: 1) les colonnes sont enveloppées d'une gaine opaque pour éviter l'action destructrice de la lumière.

2) les chromatogrammes réalisés dans les conditions décrites permettent d'obtenir de 0,005 à 0,01 g. de chlorophylle a, et une proportion variable selon les végétaux, de chlorophylle b.

Le pourcentage de celle-ci est moindre que la moitié de la quantité de chlorophylle a.

- - -

CHAPITRE IIIMETHODES DE DOSAGE - TECHNIQUES UTILISEES

Il existe plusieurs méthodes de dosage:

- a) la colorimétrie (29-30); elle est peu précise.
- b) la fluorométrie (31) est très précise et permet de doser des quantités très minimes de chlorophylle. Malheureusement, elle nécessite l'emploi d'un spectrophotomètre adapté aux dosages de la fluorescence à diverses longueurs d'onde pour être d'utilité pratique.
- c) la spectrophotométrie: cette méthode est la plus employée parce que la plus pratique tout en étant précise. Elle permet en outre de doser plusieurs corps en présence, de déceler la formation de nouveaux produits et même, nous le verrons au chap.VII, peut rendre possible une évaluation du mode de liaison des noyaux pyrroliques avec divers métaux. (32 à 34)

- - -

1) Spectre des chlorophylles a et b: les chlorophylles, comme les porphyrines en général, ont une absorption caractéristique dans toute

la région visible du spectre. Nous donnons au graphique I, fig.1 et 2, (page 16) les spectres des chlorophylles a et b. Ces spectres ont été étudiés précisément dans le cas du solvant qui sera utilisé le plus souvent au cours des expériences qui suivront (50% eau - 50% propanol). Les spectres varient selon le solvant, probablement d'après la "règle de Kundt":

"Le spectre d'un corps en solution est dévié vers le rouge ou le violet suivant que le solvant a un indice de réfraction plus élevé ou plus faible".

Les auteurs ne s'accordent pas entièrement sur cette question (35, 36, 37). Mais il existe de toute façon des modifications considérables dans le spectre de chacune des chlorophylles, selon le solvant. Ceci est précisé par l'étude spectrophotométrique de HARRIS et ZSCHEILE, détaillant les spectres des chlorophylles pour 13 solvants (38).

- - -

2) Dosages:

Les dosages sont effectués par mesure de la densité optique.

$$\Delta = \log. I^0/I.$$

I^0 est l'intensité de la lumière incidente.

I est l'intensité de la lumière transmise.

Lorsqu'un solvant contient un corps dissout, on a en accord avec la loi de BEER-LAMBERT (ou de BOUGUER):

$$\Delta = K \times c \times d = \log. I^0/I.$$

K est le coefficient spécifique d'absorption, propre à chaque corps pour une longueur d'onde donnée.

Δ

Graphique I

Fig. 1

Spectre d'absorption
de la Chlorophylle a.

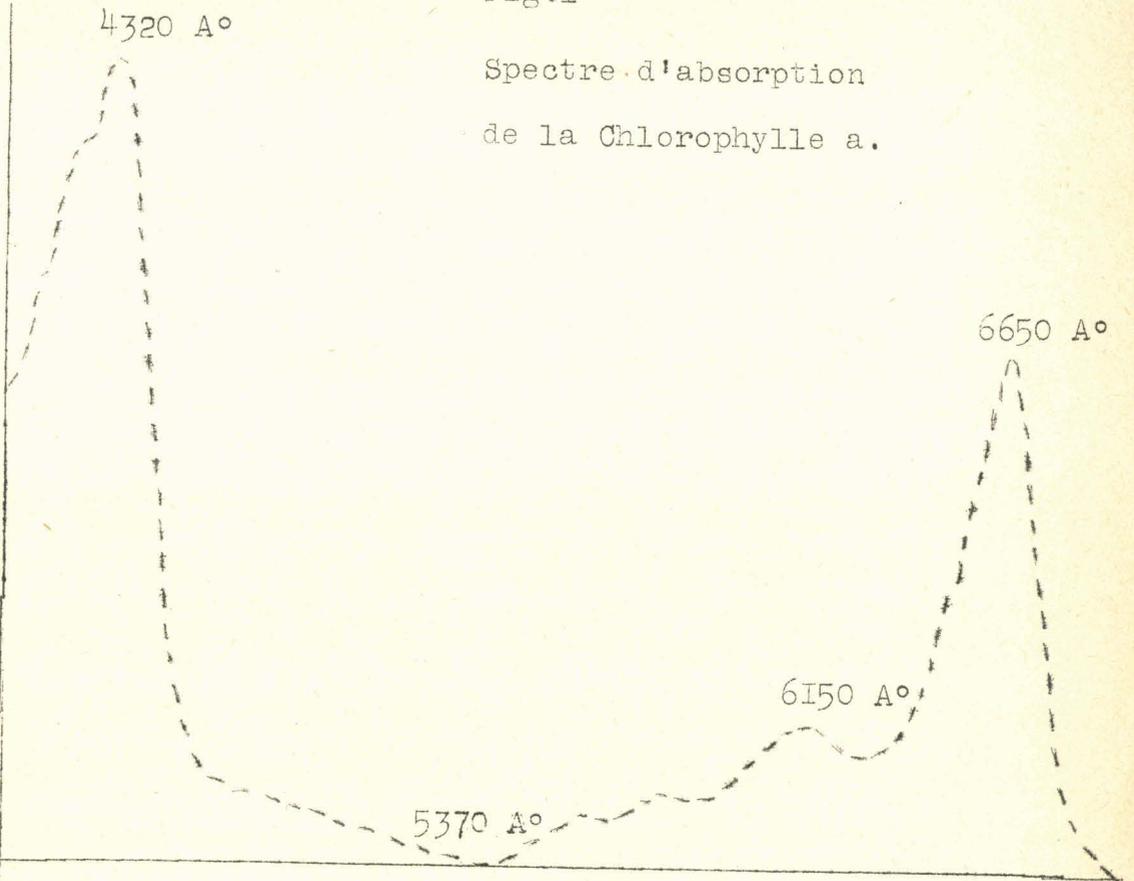
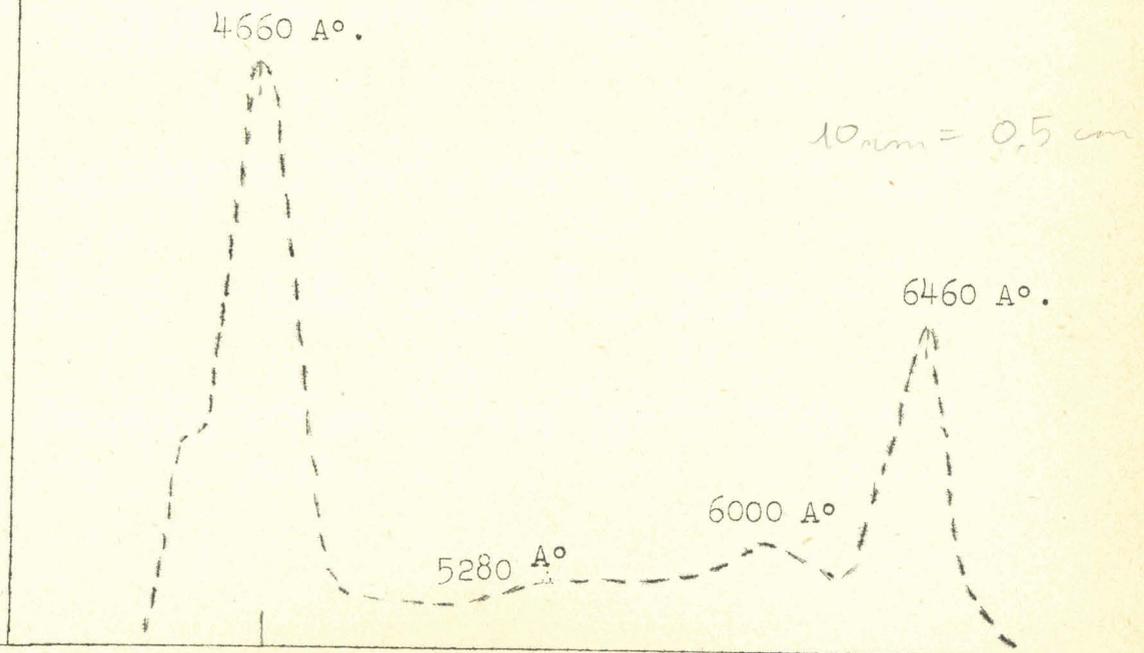


Fig. 2.

Spectre d'absorption
de la Chlorophylle b.

Δ



c est la concentration en mg par litre.

d est l'épaisseur de la cuvette du spectrophotomètre.

- - -

Remarque:

Les spectres d'absorption sont additifs, pour autant que l'intensité en soit calculée par la densité optique; il est donc possible de doser deux corps en solution par mesures de l'absorption à deux longueurs d'onde données, connaissant le coefficient spécifique de chacun de ces corps pour ces longueurs d'onde. Un système d'équations à deux inconnues permettra de déterminer les quantités de chacun des corps de la solution. Nous utiliserons couramment cette méthode, notamment pour la conversion de la chlorophylle en phéophytine et en chlorophyllide.

Lorsque 3 corps sont en solution, il est encore possible de les doser par mesures d'absorption à 3 longueurs d'onde caractéristiques mais dès lors, toute précision du dosage est illusoire étant donné l'importance des erreurs expérimentales.

- - -

3) Erreurs de dosage vis-à-vis de la loi de BEER-LAMBERT

L'intensité d'absorption du spectre obéit à la loi de BEER-LAMBERT pour des densités optiques variant entre 0,2 et 0,8, nombres qui conviennent parfaitement pour les diverses solutions de chlorophylle utilisées (39). Dans le cas où la densité optique à n'importe quelle longueur d'onde serait inférieure à 0,2, dans le cas de cuvettes de 1 cm. d'épaisseur, nous avons utilisé des cuvettes de 4 cm. d'épaisseur. On évite ainsi une concentration trop forte des produits de la

solution, ce qui pourrait donner lieu à des émulsions.

Erreurs expérimentales

Les erreurs les plus importantes sont dues (27-85) spécialement dans la région rouge du spectre, aux largeurs de fente du spectrophotomètre. Elles peuvent être de 5% dans le bleu et de 7% dans le rouge. Cependant, pour un dosage à une même longueur d'onde, les erreurs relatives n'ont jamais, pour diverses solutions, dépassé 2%.

- - -

4) Appareillage

Les dosages ont été effectués au spectrophotomètre UNICAM S.P.500 (C.E.R.I.A., Bruxelles), au spectrophotomètre JOBIN-YVON (Institut de Recherches sur le Cancer, Lille).

- - -

5) Traitement de la chlorophylle - Techniques

Un des buts de ce travail est notamment d'étudier le comportement des chlorophylles a et b vis-à-vis de la chaleur, en présence de solutions acides et basiques. Dans ce cas, examinons quelles sont les conditions expérimentales les plus favorables:

A) Traitement par la chaleur:

a) la première méthode essayée fut de faire absorber la chlorophylle sur du papier filtre, de placer ce papier filtre dans des solutions aqueuses d'acidité donnée et aux diverses températures. Ceci présentait l'avantage de pouvoir utiliser une phase aqueuse contenant la chlorophylle. On se rapprochait peut-être ainsi de l'état natif de la chlorophylle, qui, dans les plastes, se trouvait aussi

absorbée sur diverses protéines. Malheureusement, pour une cause indéterminée, l'extraction de cette chlorophylle ou de ses produits de dégradation s'avère en partie ou même totalement impossible dès qu'il y a eu chauffage à température élevée (100° ou plus) à des pH au-delà de 5 environ. Il y a fixation irréversible sur le papier.

En faisant monter le solvant par capillarité le long du papier filtre, l'extraction est facilitée. Des divers solvants utilisés, l'acétone semble donner l'extraction la plus efficace, mais celle-ci n'est complète qu'avec de l'acétone saturé d'acide chlorhydrique. Mais dès lors, la destruction de la chlorophylle est très rapidement totale et tout dosage est rendu irréalisable.

b) Ce procédé s'étant donc révélé imparfait, nous avons tenté des essais d'absorption sur microcolonnes de Magnésie, d'Alumine ou de cellulose, mais les résultats de l'extraction sont identiques aux précédents.

c) Nous avons donc été obligé d'utiliser un procédé de traitement direct de la chlorophylle en solution mixte, par la chaleur. Les expériences nécessitant l'emploi de solutions acides à divers pH, requièrent un solvant de la chlorophylle miscible à l'eau. D'autre part, le chauffage à 100° ou davantage nécessite l'utilisation de tubes scellés pour éviter l'évaporation. On utilisera, pour empêcher l'éclatement de ces tubes, un solvant à point d'ébullition relativement élevé, Dans la série des alcools, solvants adéquats, le propanol bout à 97° et le butanol à 117°. Ce dernier n'est cependant pas miscible à l'eau en des

proportions suffisamment importantes. Or, nous devons utiliser une solution à 50% d'eau environ, de façon à pouvoir déterminer d'une part avec précision au pHmètre la concentration en ions H^+ . D'autre part, il est nécessaire de pouvoir y dissoudre un sel tamponnant relativement concentré. C'est pourquoi nous avons choisi le propanol qui, bien que formant avec l'eau un azéotrope à point d'ébullition minimum de 87° lors d'un mélange en parts égales, permet cependant d'utiliser sans danger les ampoules de verre. Un pourcentage trop grand d'eau dans la solution ne permettrait pas de dissoudre une quantité suffisante de chlorophylle pour permettre un dosage spectrophotométrique en évitant une émulsion.

- - -

B) La concentration en ions H^+ :

Nous discuterons au chapitre IV, à propos d'une étude de MACKINNEY et JOSLYN (40) de l'opportunité de choisir un tampon pour stabiliser la concentration en ions H^+ . Nous estimons par exemple qu'une solution à pH 6 contenant 50% ou davantage d'un solvant organique ne saurait être stable durant un dosage de la vitesse de formation de phéophytine, si elle contient seulement un acide de normalité connue. D'une part, l'acidité varierait au cours de la réaction, et d'autre part, toute détermination de l'acidité n'aurait aucune valeur, par suite du manque de sensibilité de l'appareillage potentiométrique.

- - -

C) Choix du tampon:

Le solvant (50% eau - 50% propanol) contient suffisamment

d'eau pour permettre de dissoudre facilement des sels tamponnants sans risquer de précipitation. Mais les tampons n'ont-ils pas une influence propre sur la destruction, ce qu'il convient évidemment d'éviter? Or, on peut constater certaines différences dans la destruction de la chlorophylle en milieu acide avec différents tampons. Mais chaque fois il a pu être constaté qu'il s'agissait d'une "chélation" (fixation de l'ion métallique du sel tamponnant, en lieu et place du Magnésium; par exemple, di-Sodium phéophytine). Une possibilité subsiste, celle d'utiliser un tampon réalisé avec un sel de Magnésium. Les résultats dès lors ne peuvent être faussés: il n'est pas possible de constater la formation de chlorophylle à partir de phéophytine mise en présence d'ions Mg^{++} libres. Nous avons d'autre part comparé la formation de phéophytine en présence d'un tampon au Magnésium et en présence d'un acide seul (citrique), à des pH cette fois mesurables et identiques dans les deux cas (3,7). Les vitesses sont égales.

Mais peu de sels de Magnésium sont solubles et il faut couvrir une étendue importante de pH (de 2,5 à 7 environ. Au-delà de 7, il ne forme plus de phéophytine.). Nous avons pu réaliser un tampon adéquat à partir d'acide citrique et d'acétate de Magnésium. Nous en avons déterminé le pK: 5,5, et la zone tampon s'étend de 3 environ à 7,5.

- - -

D) Influence du pH sur le spectre de la chlorophylle

L'influence du pH sur le spectre est nulle. Celui-ci ne varie ni en intensité ni par déplacement des longueurs d'onde des ma-

xima d'absorption.

- - -

E) Influence des tampons sur le spectre de la chlorophylle

Les divers sels tampons ajoutés aux solutions de chlorophylle dans le propanol-eau ne provoquent aucune modification du spectre.

- - -

F) Détermination du pH:

Le pH est vérifié avant et après traitement des solutions sans jamais montrer aucune variation. Il a été déterminé au pHmètre Radiometer type 22, ajusté au tampon de biphtalate de Potassium M/20: pH = 3.97.

- - -

CHAPITRE IV

DESTRUCTION DE LA CHLOROPHYLLE EN MILIEU ACIDE ET FORMATION DE PHEOPHYTINE.

On sait que la chlorophylle en solution, en présence d'acide même très faible, se décolore rapidement. Autrement dit, il se forme de la phéophytine qui est le résultat de l'arrachement de l'atome de Magnésium, lequel est remplacé par deux ions H^+ .

Ce chapitre a pour but d'étudier la cinétique de formation de la phéophytine en fonction de divers facteurs: température, temps, concentration de la solution en ions H^+ .

D'autre part, des facteurs secondaires seront envisagés, qui pourraient avoir une influence sur la formation de phéophytine. Nous nous efforcerons de préciser si ces facteurs tendent à former des produits de dégradation en relation ou non avec la phéophytine.

- - -

1) Détermination de l'ordre de la réaction de conversion de la chlorophylle en phéophytine

(vitesse de la réaction)

On travaille avec une concentration constante en ions H^+ , à température constante et à l'abri de la lumière, en l'absence d'autres ions métalliques que Mg^{++} , de réducteurs ou d'oxydants.

-

Remarque: on a tout d'abord établi que les expériences réalisées en présence d'air et dans des conditions strictes de température donnaient des résultats absolument identiques aux essais réalisés en l'absence d'air. Seuls, comme nous le verrons, des durées très longues ou des températures trop élevées fausseraient les résultats.

A) Conditions expérimentales pour la chlorophylle a.

acidités: les solutions étudiées, à 50% eau-propanol, contenant le tampon (acide citrique - acétate de Magnésium) ont un pH respectivement de: 3,7 - 4 - 4,5 - 5 - 5,5 - 6 - 6,5.

températures: 20°C - 50°C - 100°C - 120°C. 20°C est la température qui permet la plus grande précision; il s'agit en effet de la température ambiante et aucune erreur ne peut donc résulter du temps de chauffage et de refroidissement des solutions.

durées: des dosages sont effectués après diverses durées pour chaque essai, jusqu'à ce que le pourcentage de phéophytine approche du maximum.

concentrations en chlorophylle a: x, 2x, 5x et 10x, respectivement pour chaque essai.

x = 2 mg. par litre.

pureté des solutions: la chlorophylle a est supposée être absolument pure, l'extraction ayant été réalisée le jour même, suivie d'une vérification du critère de pureté.

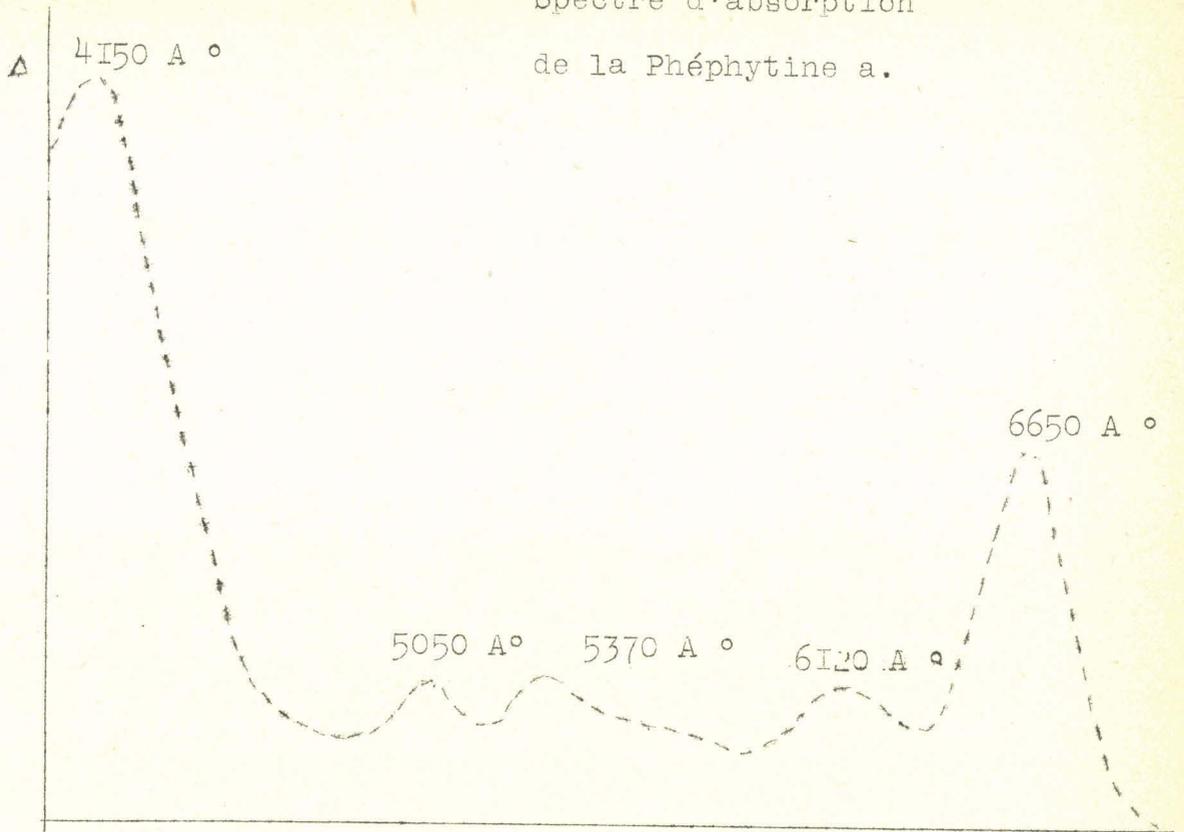
méthodes de dosage spectrophotométrique: au graphique II, fig.1, page 26, se trouve le spectre de la phéophytine a dans le solvant utilisé. Si la proximité des maxima de la chlorophylle a et de la phéophytine a dans la région bleue ne permet pas un dosage précis, il est possible de doser la phéophytine, en opérant d'une part à 5.370 A° où l'absorption de la chlorophylle a est très minime, et d'autre part à 6.650 A°, longueur d'onde à laquelle correspond un maximum d'absorption de la chlorophylle et de la phéophytine, mais avec une intensité très différente. Connaissant le rapport des coefficients spécifiques d'absorption respectifs aux longueurs d'onde citées (ce qui détermine expérimentalement avec des solutions équimolaires de chlorophylle et de phéophytine), le dosage sera déterminé par la résolution d'un système d'équations à deux inconnues. On applique la loi de BEER-LAMBERT, en tenant compte comme nous l'avons dit, du fait que les densités optiques sont entièrement additives. Si x représente la quantité de chlorophylle a et y la quantité de phéophytine a à tout moment de l'essai, on a:

$$\Delta \text{ à } 6.650 \text{ A}^\circ = k_1x + K_1y$$

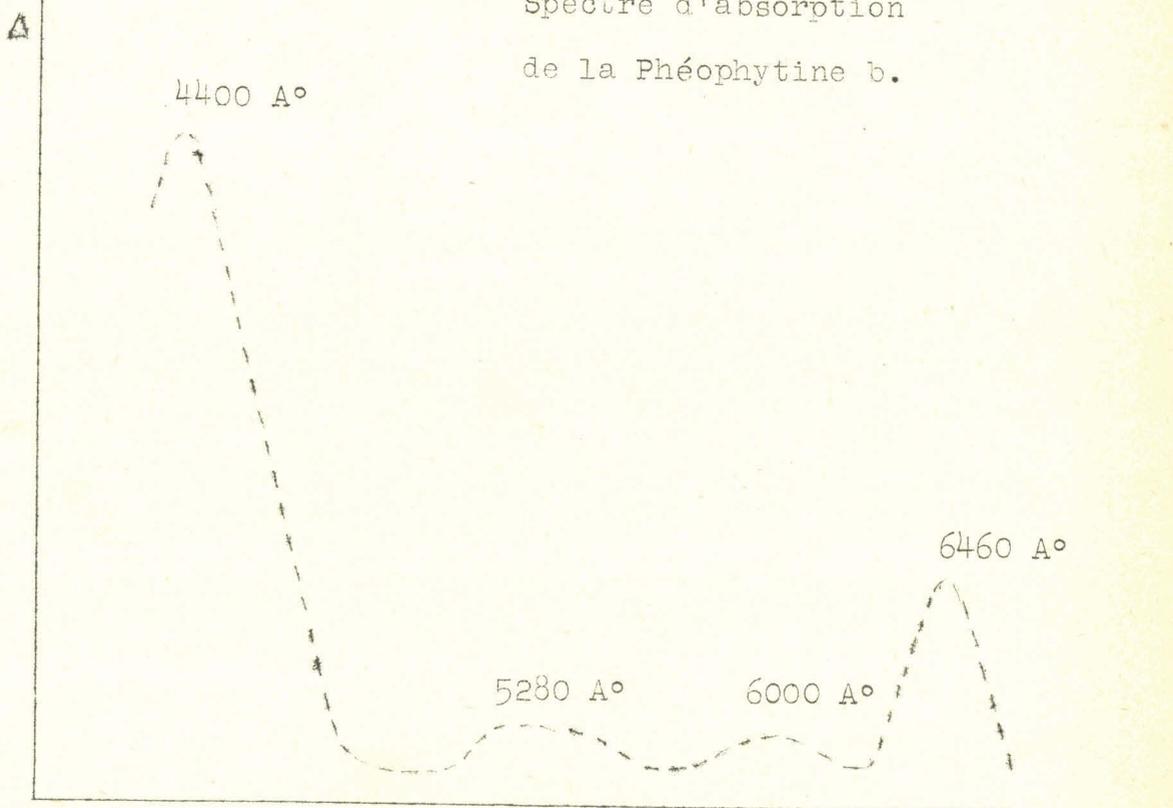
$$\Delta \text{ à } 5.370 \text{ A}^\circ = k_2x + K_2y$$

k et K représentent pour chaque longueur d'onde le coefficient spécifique de la chlorophylle et de la phéophytine ou des nombres proportionnels.

Spectre d'absorption
de la Phéphytine a.



Spectre d'absorption
de la Phéophytine b.



RESULTS

a) Quelle que soit la concentration initiale de chlorophylle, la vitesse de formation de phéophytine est toujours égale, sauf pour des températures supérieures à 100°, et des pH supérieurs à 6,5.

b) Le spectre des produits de la solution n'indique à aucun moment un produit autre que la chlorophylle ou la phéophytine.

c) Au graphique III figure 1, page 28, se trouve une courbe AI donnant la vitesse de la conversion de la chlorophylle a en phéophytine. Il s'agit de l'expérience ayant permis des dosages les plus précis: à 20°C., à pH = 4. Après 90 min., il n'est plus possible de déceler une modification dans la forme ou l'intensité du spectre d'absorption jusqu'à une durée de 36 heures environ. Après quoi, l'absorption s'affaiblit lentement aux divers maxima étudiés (il se forme des produits d'oxydation qui seront étudiés plus loin).

Si on appelle x le pourcentage de phéophytine formée, et t la durée, une réaction monomoléculaire répondrait à l'équation:

$$\frac{dx}{dt} = k (100 - x) \text{ ou } kt = 2,3 \log_{10}(100 - x) \quad (I)$$

k étant une constante variant avec la température ou l'acidité.

Or, cette équation est entièrement vérifiée comme le montre la droite AII tracée sur le graphique III. Les ordonnées de chaque point de cette droite ont pour valeur: $\log_{10}(100 - x_1)$, $\log_{10}(100 - x_2)$, etc...

Il s'agit donc incontestablement d'une réaction monomoléculai-

Graphique III

Fig.1

Formation de Phéophytines a et b.

$t^{\circ} = 20^{\circ} \text{C.}$

$\text{pH} = 4,1$

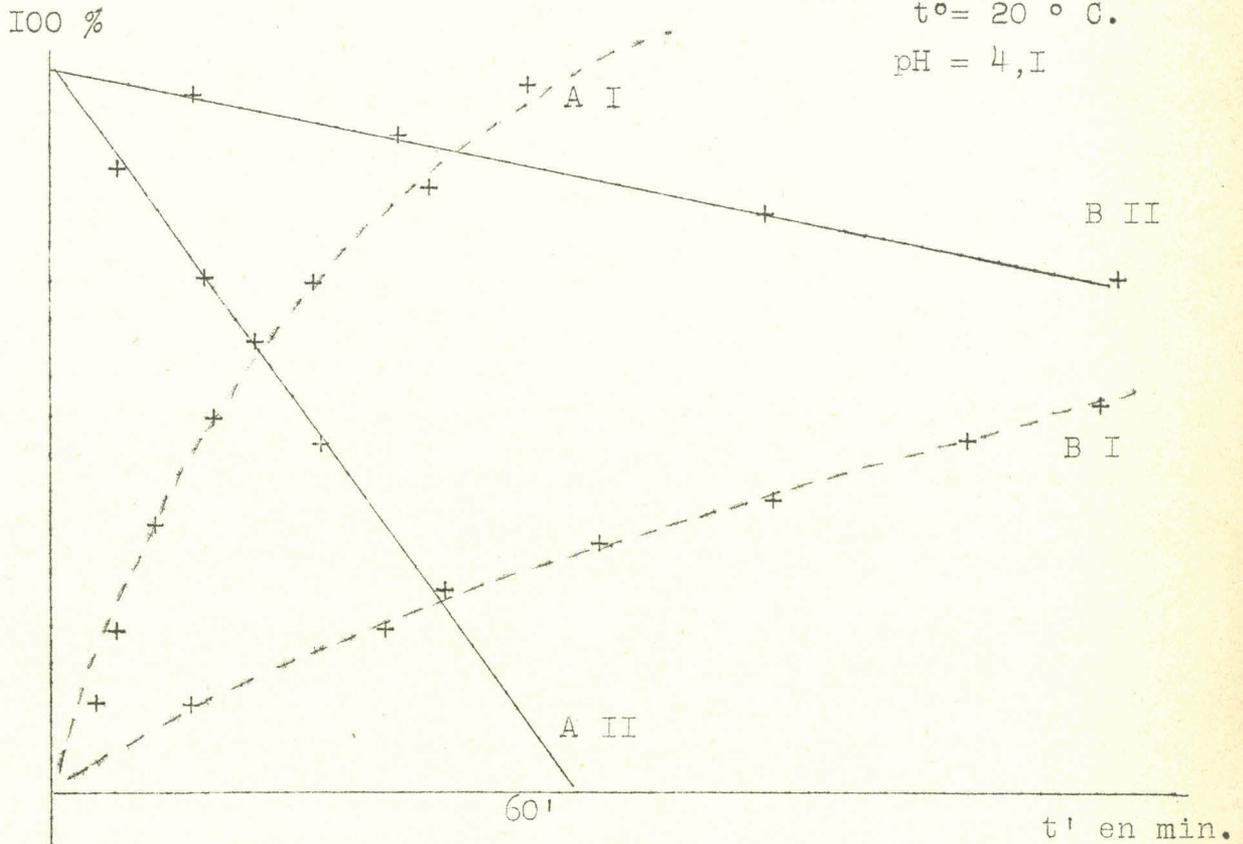
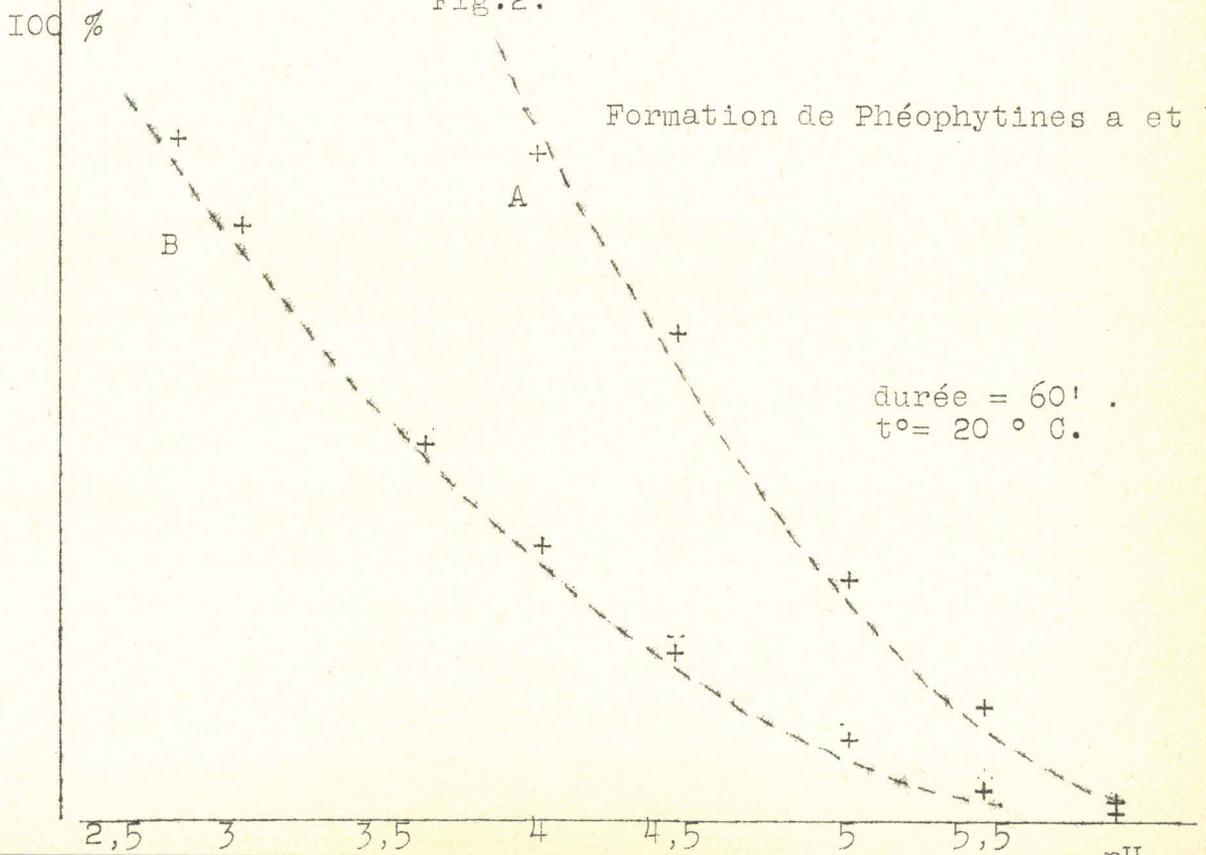


Fig.2.

Formation de Phéophytines a et b.

durée = 60' .
 $t^{\circ} = 20^{\circ} \text{C.}$



re, ce qui confirme d'ailleurs le résultat a).

A tout moment, toute la chlorophylle a détruite correspond à la quantité de phéophytine existante.

Remarque: MACKINNEY et JOSLYN (40) étaient plutôt favorables à cette réaction monomoléculaire.

d) L'équation (I) est vérifiée pour les diverses acidités inférieures à $\text{pH} = 6,5$ et pour des températures de 20°C , 50°C , et 100°C . Les essais effectués à 120°C indiquent une réaction complémentaire.

B) Conditions expérimentales pour la chlorophylle b

Elles sont identiques en ce qui concerne les températures envisagées, les durées des expériences, les concentrations en chlorophylle, la pureté des solutions, aux conditions énoncées pour la chlorophylle a.

Acidité:

La chlorophylle b est plus résistante à l'hydrolyse par les acides. Les solutions étudiées, à 50% propanol-eau, contenant le tampon, ont un pH respectivement de : 2 - 2,5 - 3 - 3,7 - 4 - 4,5 - 5 - 5,5.

Méthode de dosage spectrophotométrique: Au graphique II, fig2 page 26, se trouve le spectre de la phéophytine b dans le solvant utilisé. D'après la méthode employée pour le dosage de la phéophytine a, nous choisissons cette fois

le maximum caractéristique de la phéophytine b à 5.280 A° et celui commun à la chlorophylle b et à la phéophytine b situé à 6.460 A°.

RESULTATS

a) Ils confirment entièrement la réaction monomoléculaire obtenue dans le cas de la chlorophylle a. Seule la vitesse d'hydrolyse est différente.

Au graphique III, fig.1, se trouve la courbe B1 résultant de l'expérience. La droite BII démontre la réaction monomoléculaire.

b) Il est intéressant de connaître le rapport des vitesses respectives de conversion en phéophytine pour chacune des deux chlorophylles. MACKINNEY et JOSLYN (40) ont déjà établi approximativement ce rapport:

$$\frac{k_{\text{chl.a}}}{k_{\text{chl.b}}} = \text{approximativement } 9 \text{ à } 11.$$

Au cours de nos expériences, nous avons comparé notamment les vitesses d'hydrolyse pour chacune des deux chlorophylles, à pH = 3,7 et à 20°C. Nous avons obtenu pour ce même rapport établi pour des coefficients k du premier ordre: 6,6.

2) Effet de la concentration en ions H^+

MACKINNEY et JOSLYN (id.) ont précédemment estimé que la conversion de la chlorophylle en phéophytine était du premier ordre par rapport à la teneur en ions H^+ de la solution.

Cependant, ces auteurs ont effectué cette détermination en solution 80% acétone- 20% acide de normalité connue, tout comme pour la détermination des vitesses respectives d'hydrolyse de chacune des deux chlorophylles, dont nous avons parlé au paragraphe précédent. Si la quantité d'ions H^+ présents dans cette solution peut être suffisamment importante pour que la concentration en soit déterminée avec précision et reste pratiquement constante durant les expériences pour des pH de 3 à 4,5 environ, nous pensons d'autre part que pour un pH compris entre 5 et 7, le nombre d'ions H^+ , excessivement faible, peut varier très facilement. Les résultats ne peuvent plus être précis, de même que la détermination de la normalité de l'acide envisagé. Or, pour obtenir une cinétique complète de la formation de phéophytine, il est bien nécessaire de travailler en milieu très faiblement acide (pH = 5,5 à 7).

C'est pourquoi nous avons établi à notre tour la cinétique de formation de phéophytine vis-à-vis de la teneur en ions H^+ de la solution. Mais cette fois, nous l'avons établie par une méthode semblable à celle qui nous a donné des résultats satisfaisants lors de l'étude envisagée au paragraphe 1) de ce chapitre: la chlorophylle est en solution 50% propanol 50% eau; la solution contient un tampon à l'acide citrique et à l'acétate de Magnésium.

Avantages de la méthode:

a) Elle permet d'obtenir des pH rigoureusement précis, ce qui est absolument nécessaire. Le pH ne peut varier au cours de la réaction.

b) Elle permet de travailler à n'importe quelle température et de vérifier la concordance des résultats en ce qui concerne l'ordre de la courbe; ceci n'était pas possible en milieu 80% acétone.

Conditions expérimentales pour les chlorophylles a et b

Comme pour l'étude du paragraphe précédent, les diverses expériences ont été réalisées à 20°C, 50°C et 100°C. Les diverses concentrations en ions H^+ sont celles pour lesquelles le pH est situé entre 3,5 et 7 pour la chlorophylle a et entre 2,5 et 7 pour la chlorophylle b. Aux pH inférieurs, la formation de phéophytine est trop rapide pour pouvoir être déterminée avec précision, même aux basses températures. Aux pH supérieurs à 7, il ne se forme pas de phéophytine. Les durées des expériences varient entre 30 minutes et 36 heures.

RESULTATS

Quels que soient les facteurs de l'expérience, les courbes obtenues pour chacune de deux chlorophylles sont du même type avec des coefficients variables. Nous donnons au graphique III fig.2, page 28, les courbes expérimentales obtenues pour une température de 20°C. Les dosages sont effectués après 60 min. d'action des ions H^+ . A cette température, les résultats sont

les plus précis, parce qu'ils évitent l'erreur du réchauffage et du refroidissement de ces solutions.

Sachant que la réaction de conversion de chlorophylle en phéophytine est du premier ordre vis-à-vis de la chlorophylle, on a vu au paragraphe 1 que l'équation

$$\frac{dx}{dt} = k (100 - x) \text{ est vérifiée.}$$

si k représente une constante du premier ordre, et x le pourcentage de phéophytine formée.

Dès lors, si on admet d'après les travaux de MACKINNEY et JOSLYN que cette réaction est aussi du même ordre vis-à-vis des ions H^+ , on doit avoir:

$$\frac{dx}{dt} = k_2 (100 - x)y,$$

si k_2 représente une constante de second ordre, et y la concentration en ions H^+ .

On aurait donc:

$$\frac{dx}{100 - x} \times \frac{1}{dt} = k_2 y,$$

ou

$$\log_{.n}(100 - x) = k_2 y$$

ou

$$\frac{\log_{.n}(100 - x_1)}{y_1} = \frac{\log_{.n}(100 - x_2)}{y_2} = \text{etc...}$$

Or, ces relations ne sont pas vérifiées.

On pourrait avoir, si on tient compte de ce que deux ions H^+ remplacent un atome de Magnésium:

$$\frac{dx}{dt} = k_2(100 - x)y^2.$$

et cette équation n'est pas vérifiée.

On ne peut donc admettre que la réaction de conversion de chlorophylle en phéophytine soit du premier ordre vis-à-vis des ions H^+ . Le graphique III, fig.2, page 28, montre en effet que la réaction est plus lente. Pour une concentration double en ions H^+ , la vitesse d'hydrolyse n'est pas doublée.

Les courbes expérimentales obtenues nous ont permis d'établir les valeurs de k suivantes pour chacune des deux chlorophylles. Nous avons déjà vu précédemment que le rapport des vitesses respectives d'hydrolyse pour les chlorophylles a et b avait été établi à 6,6.

pH	k_a	k_b
6	0,015	(non déterminé)
5.5	0,05	id.
5	0,264	0,04
4.5	0,66	0,1
4	1	0,215
3,5	-	0,39
3	-	0,751
2.65	-	1

Ces coefficients ont été déterminés à une température de 20°C., et pour une unité de durée de réaction d'une heure.

Les valeurs de k inférieures à 0,02 sont peu précises ou n'ont pu être déterminées.

- - -

3) Mesure du coefficient de température

Les réactions chimiques obéissent souvent à la loi suivante:

$$\log.k = \frac{-A}{T} + B. \quad (\text{II})$$

k étant le coefficient de vitesse, T la température absolue et A et B sont les constantes.

Il est donc facile de vérifier si cette loi est respectée, sur graphique.

En abscisse: $1/T$

En ordonnée: $\log.k$.

On doit obtenir une droite.

A) Conditions expérimentales pour la phéophytine a

pH: On a choisi des solutions de chlorophylle a à un pH situé entre 5 et 5.5.

Températures: Les solutions sont traitées à des températures s'échelonnant entre 0 et 120°.

Durée: Les solutions ont été traitées dans les conditions de pH et de température énoncées, pendant 60 minutes. Ces expériences permettent ainsi de répartir la formation de phéophytine entre 0 et

100% environ.

Dosages: Les dosages sont réalisés aux longueurs d'onde déjà utilisées lors des expériences détaillées aux paragraphes 1 et 2.

RESULTATS

La courbe expérimentale de la formation de phéophytine obtenue en fonction de la température, est donnée au graphique IV, fig.1, page 37.

Le graphique IV, fig.2, établi d'après l'équation (II) montre que celle-ci est vérifiée entièrement pour toutes les températures jusqu'à 102°.

Remarque: Ce résultat entre en contradiction avec celui de MACKINNEY (41) qui, étudiant la réaction en milieu 80% acétone non tamponné et jusqu'à une température maximum de 51°, ne peut obtenir une vérification de la loi de coefficient de températures que pour des basses températures, la réaction étant plus rapide ensuite.

On pourrait peut-être expliquer ces divergences, soit par un effet propre du solvant (acétone), soit par une modification de pH en cours de réaction lorsque le milieu n'est pas tamponné.

Calcul de la chaleur d'activation:

Celle-ci peut être calculée pour des températures comprises entre 0 et 102°, étant donné la vérification de la loi (II).

Graphique IV

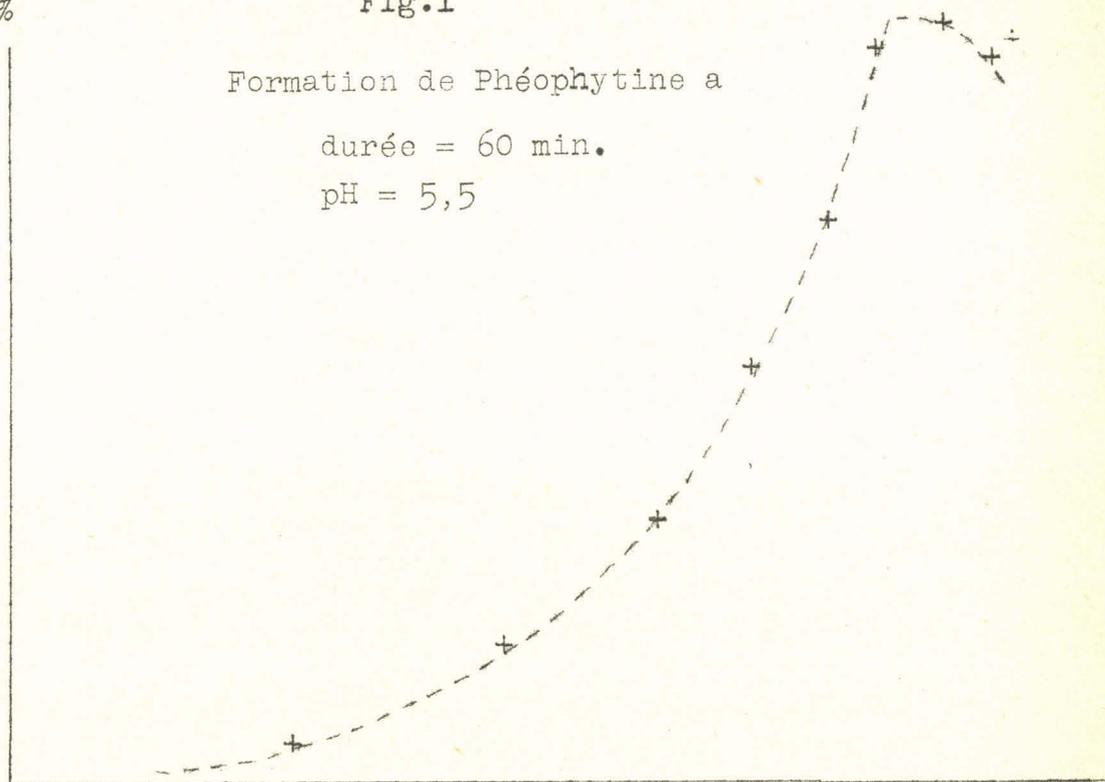
Fig.1

100 %

Formation de Phéophytine a

durée = 60 min.

pH = 5,5

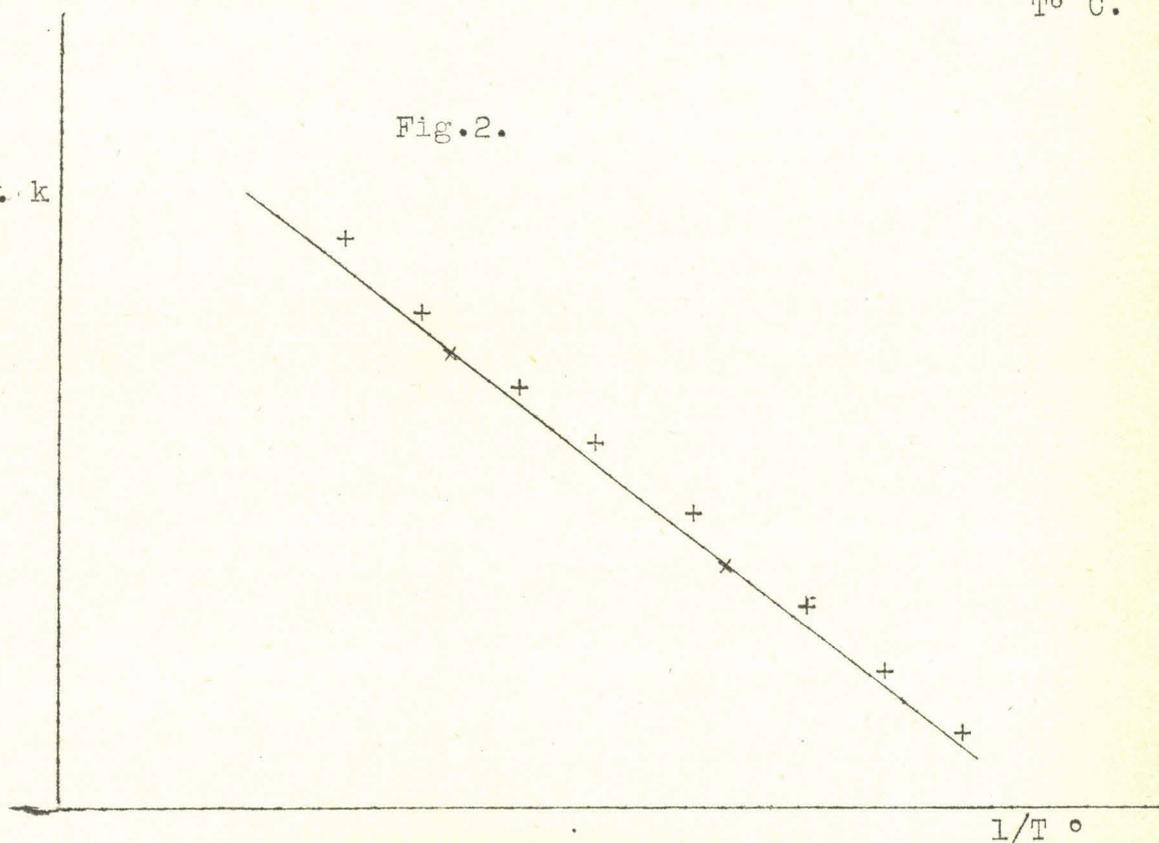


0 °

100 ° T° C.

Fig.2.

log k



1/T °

Il est donc naturel de penser que les molécules ne sont chimiquement actives que si leur énergie dépasse une certaine limite ordinairement très supérieure à la moyenne. Cette idée, développée par BERTHOUD (42), puis par d'autres auteurs, est aujourd'hui généralement admise.

Résultats: nous avons obtenu une chaleur d'activation de:

$$q = 13.500 \text{ calories.}$$

B) Conditions expérimentales pour la phéophytine b

pH: La chlorophylle b étant plus résistante à l'hydrolyse en milieu acide, le pH des expériences a été porté entre 4,5 et 5.

Les autres données expérimentales sont identiques à celles établies pour la phéophytine a.

RESULTATS

=====

Ils confirment entièrement la vérification de la loi (II) pour des mêmes conditions de température.

4) Effet de la lumière

On sait que la lumière a pour effet de décolorer rapidement la chlorophylle en solution. Dans ce chapitre qui a trait à la formation de phéophytine, nous avons étudié l'effet de la lumière sur la formation de ce corps:

nos conclusions rejoignent celles de ARONOFF et MACKINNEY (43).

La photooxydation de la chlorophylle produit des corps totalement différents de la phéophytine, sans que celle-ci soit un stade intermédiaire. Nous l'avons montré par un dosage spectrophotométrique aux longueurs d'onde des maxima de la phéophytine (phéophytine a: 5.370 Å et 5.050 Å: phéophytine b: 5.280 Å) comparant en même temps la dégradation de la chlorophylle par dosage des maxima respectifs de 6.650 Å et 6.460 Å pour les chlorophylles a et b, les solutions de ces chlorophylles étant soumises à une vive illumination. Une même série d'expériences a été réalisée par lumière ultraviolette. Nous reviendrons en détail sur la photooxydation au chapitre VI.

D'autre part, nous avons montré par d'autres essais que la lumière, tant visible qu'ultraviolette n'accélérait aucunement la formation de phéophytine due aux ions H^+ . A cet effet, nous avons dosé la formation de phéophytine dans un tube A (pH = 4,5 température = 20°C) à l'abri de la lumière et dans un tube B (pH = 4,5, température = 20°C), vivement illuminé.

Cette expérience a été réalisée pour chacune des deux chlorophylles.

5) Effet de l'air, de l'oxygène occlus et des oxydants

Nous montrerons au chapitre VI que le rôle de ces facteurs est identique à celui de la lumière en présence d'air.

Ils n'ont aucune influence sur la formation de phéophytine.

Comme dans le cas de la photooxydation, les produits formés ont un spectre très différent de ceux de la chlorophylle et de la phéophytine.

- - -

6) Effet des réducteurs

Ils n'ont aucune influence sur la formation de phéophytine.

Nous montrerons aussi qu'ils ont pour action de réduire la fonction vinyl, et par là, de rendre la chlorophylle plus résistante à l'oxydation.

Les réducteurs utilisés lors de nos expériences étaient: l'hydrazine, l'acide ascorbique, l'hydroxylamine et l'hydrosulfite de Sodium. Dans ce dernier cas, les résultats sont différents, par suite d'une "chélation" due à l'ion Na^+ .

Remarque: en plus des expériences réalisées aux paragraphes 5 et 6, nous avons étudié l'influence, nulle, des oxydants et des réducteurs par électrolyse entre électrodes de platine. Pour ce faire, des solutions de chlorophylles a et b en milieu acide tamponné, ont été placées à la cathode et à l'anode. On a comparé les cinétiques de formation de phéophytine. Dans aucun cas, la cinétique ne varie sous l'effet de la réduction ou de l'oxydation.

7) Effet des métaux

Nous avons signalé l'importance qu'il y avait à éviter dans les solutions de chlorophylle traitées, la présence de tout autre ion métallique que Mg^{++} . En effet, le remplacement du Magnésium par d'autres métaux constitue un problème important vis-à-vis de la formation de phéophytine, de la décoloration de la chlorophylle en milieu acide, et de la stabilité des différents produits formés. Nous traiterons cette question au chapitre VII.

- - -

8) Effet des anions

L'action des anions est identique: la destruction de la chlorophylle en phéophytine est la même sous l'effet des acides tels que: l'acide chlorhydrique, citrique, acétique, pour un pH identique. La conclusion est logique, puisqu'il s'agit en effet d'une réaction faisant intervenir uniquement des ions H^+ .

- - -

9) Effet des cations organiques

L'effet des cations organiques pose un problème important et totalement irrésolu que nous étudierons au chapitre VIII.

- - -

CHAPITRE V

DEGRADATION DE LA CHLOROPHYLLE EN MILIEU ALCALIN ET FORMATION DE CHLOROPHYLLIDE.-

Nous considérons ce problème sous le même angle que celui de la formation de phéophytine, c'est-à-dire qu'on envisage une dégradation ménagée de la chlorophylle en milieu alcalin, en précisant dans quelles conditions la réaction la plus simple peut être obtenue, et quelles sont les actions de divers facteurs sur cette réaction.

La chlorophylle, on l'a vu, possède deux fonctions esters, dont l'une (phytyl) est moins stable que l'autre (méthyl).

En milieu alcalin, il peut y avoir arrachement et saponification. De plus, dans le cas d'un traitement plus énergique, peuvent se former des produits d'oxydation alcaline tels que les chlorines (ou rhodines) et les purpurines.

-

1) Détermination de l'ordre de la réaction de dégradation de la chlorophylle a ou b en milieu alcalin. Vitesse de la réaction.

Pour ce faire, les expériences sont réalisées avec des concentrations constantes en ions OH^- , des températures constantes, à l'abri de la lumière et en l'absence d'air.

Conditions expérimentales pour les chlorophylles a ou b

pH: Un tampon alcalin réalisé avec un sel de Magnésium n'existe pas, mais il ne s'avère plus nécessaire: l'hydrolyse du Magnésium n'est pas réalisée en milieu alcalin.

Les solutions de chlorophylle étudiées (50% eau - 50% propanol) sont tamponnées à des pH respectifs de:

8,5 - 9,5 - 10 - 10,5 - 11 - 11,5 - 11,7 - 11,9 - 12.

Tampon: NaOH - $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$

Température: 20°C - 50°C - 100°C pour chacune des solutions.

Durées: Un grand nombre de dosages est effectué pour chaque essai pour des durées de réaction variant entre 10 min. et 180 min.

Concentrations: X, 2X, 5X et 10X respectivement pour chaque essai avec X = 2 mg. par litre.

Pureté des solutions: Les solutions de chlorophylles sont supposées être absolument pures, l'extraction ayant été réalisée le jour même, suivie d'une vérification du critère de pureté.

Méthodes de dosage: Les produits de dégradation des chlorophylles a et b par les alcalis à froid ont des spectres d'absorption caractéristiques.

En effet, leur absorption dans la région rouge est constituée par une bande très forte déplacée de 250 Å° vers le bleu par rapport à la chlorophylle: c'est-à-dire respectivement à 6.400 et 6.210 Å°. Ceci permet de réaliser pour chacune des deux chlorophylles un dosage précis par mesure de l'absorption respectivement à 6.650 Å° et 6.400 Å° pour la chlorophylle a et 6.460 Å° et 6.210 Å° pour la chlorophylle b, dégradées par les alcalis à froid.

On résoud ensuite le système d'équations à deux inconnues que nous avons déterminé, connaissant par expérience le rapport des coefficients d'absorption de chacun des produits aux longueurs d'onde indiquées.

RESULTATS

=====

a) Quelle que soit la concentration initiale de chlorophylle a ou b, la vitesse de dégradation est proportionnelle, pour

tous les essais réalisés à 20°C. Pour les autres températures, le spectre indique une réaction complémentaire.

b) A 20°C, le spectre des produits de la solution n'indique à aucun moment de la réaction un produit autre que ceux que nous avons cités.

c) Au graphique V, fig.1, page 47, se trouve une courbe donnant la vitesse de dégradation de la chlorophylle a, réalisée à 20°C et à pH = 12. La courbe correspond à celle d'une réaction du premier ordre; or, une réaction de saponification est généralement (45) monomoléculaire. Dans les conditions décrites, on serait donc en présence d'une réaction simple de saponification d'une fonction ester avec formation correspondante de chlorophyllide.

d) La courbe est semblable pour tous les essais réalisés à 20°C et pour chacune des deux chlorophylles. Seul le coefficient k du premier ordre varie en fonction du pH et de la température.

e) Lorsque l'action des alcalis est étudiée à chaud, on observe une ou plusieurs réactions complémentaires caractérisées par une diminution de l'absorption respectivement obtenues à froid à 6.400A° et 6.210A°.

Graphique V

100 % de chloro-
phyllle a.

fig.1

Dégradation de la chlorophylle a
en milieu alcalin.

pH = 12, température = 20 ° C.

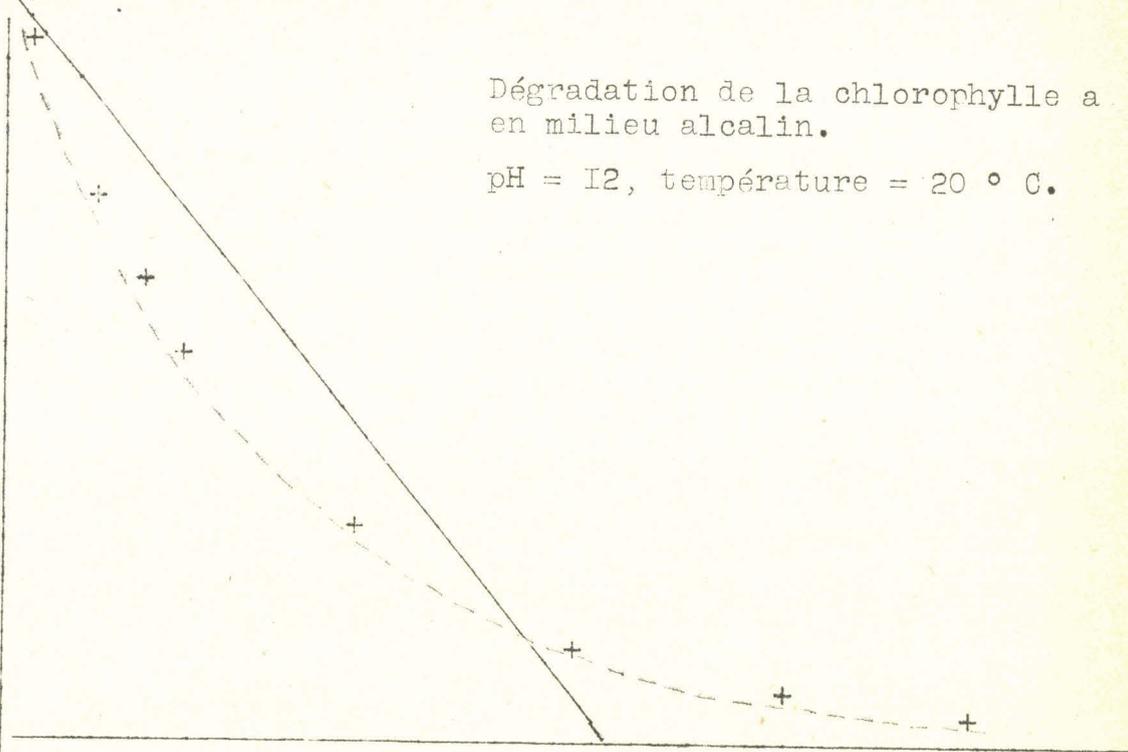
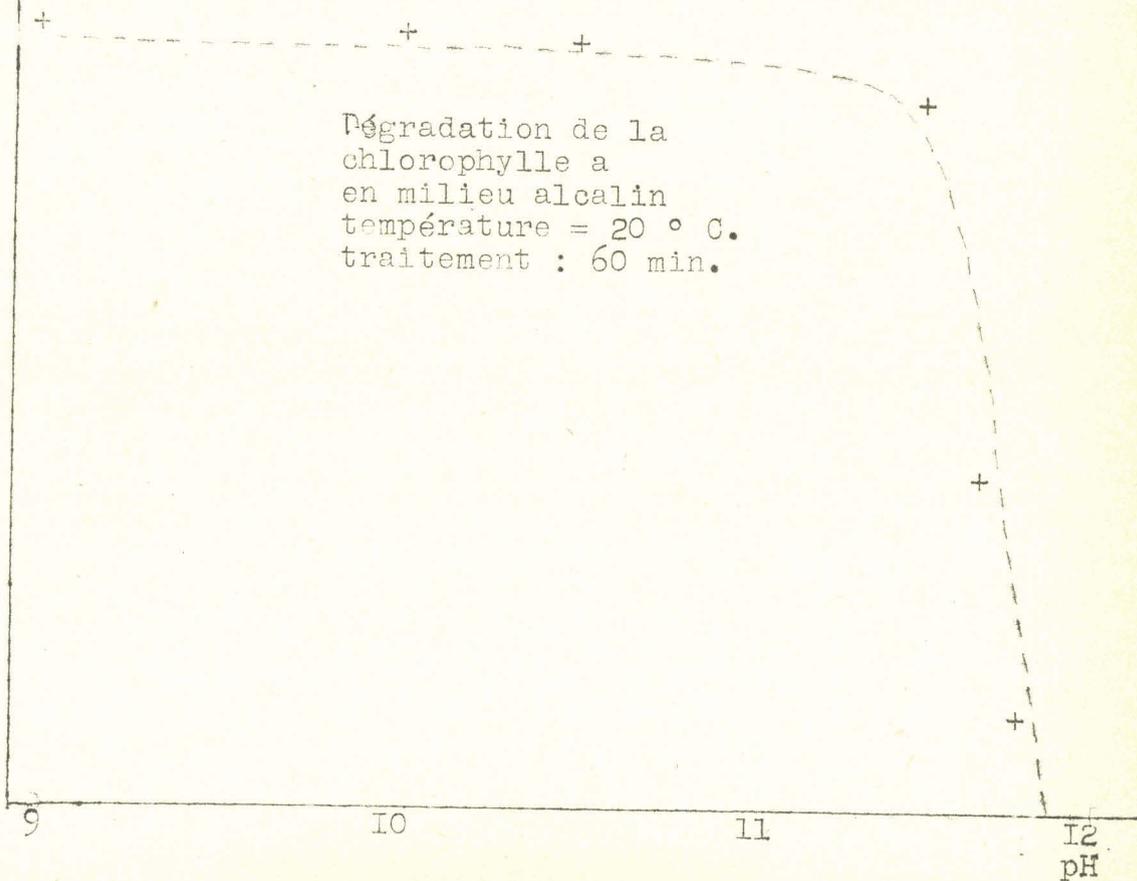


fig.2

100 %
chloro-
phyllle a

Dégradation de la
chlorophylle a
en milieu alcalin
température = 20 ° C.
traitement : 60 min.



2) Effet des ions OH⁻

Nous avons établi que la réaction de dégradation de la chlorophylle en milieu alcalin était monomoléculaire, à froid. Elle correspond donc à la formation de chlorophyllide. Cette dégradation simple a été aussi étudiée par rapport à la concentration en ions OH⁻ du milieu. Une réaction de saponification comme celle qui nous intéresse est en général proportionnelle à la fois à la concentration de l'ester, ce que nous avons vérifié, et à la concentration en ions OH⁻.

Ce paragraphe a trait à cette vérification.

Conditions expérimentales pour les chlorophylles a et b:

pH: Les solutions sont ajustées aux pH suivants: 10 - 10,5 - 11 - 11,3 - 11,5 - 11,7 - 11,9 - 12.

Température: 20°C. Les températures supérieures n'ont pas été envisagées afin d'éviter des réactions complémentaires.

Durées: 30 min. - 60 min. - 90 min.

RESULTATS =====

La précision peu rigoureuse de l'appareillage potentiométrique fournit une source d'erreurs en ce qui concerne la détermination exacte du pH. En effet, la destruction constatée dans les conditions données varie fortement pour une très faible varia-

tion de pH.

Cependant, comme le montre le graphique V, fig.2, page 47, la réaction semble très proche d'une réaction du premier ordre: à une concentration double des ions OH^- correspond une vitesse double.

Conclusions: On est en présence d'une réaction caractéristique de saponification, c'est-à-dire bimoléculaire: elle est à la fois proportionnelle à la concentration en ester et à la concentration en ions OH^- .

- - -

3) Effet de la température.

Nous avons vu que des réactions complémentaires apparaissent rapidement avec l'élévation de température. Dès lors, toute mesure du coefficient de température serait peu significative et n'a pas été envisagée.

- - -

CHAPITRE VI

LA PHOTOOXYDATION DE LA CHLOROPHYLLE

Le problème de la photooxydation de la chlorophylle qui a été très étudié ces dernières années présente pour nous un intérêt moindre que les autres questions traitées, étant donné l'objet particulier de cette étude. Cependant, nous avons d'une part repris les données de certains travaux et en avons confirmé les résultats afin de préciser d'une façon plus complète les divers modes de dégradation de la chlorophylle.

D'autre part, il était intéressant de déterminer l'effet possible, sur la formation de phéophytine, de certains corps agissant sur la photooxydation. Si le mécanisme de ces deux réactions est entièrement différent, on ne peut à priori écarter toute relation entre elles.

-

1) Etude cinétique de la photooxydation de la chlorophylle

Cette étude a été réalisée par ARONOFF et MACKINNEY (81) qui ont montré que: a) la réaction de photooxydation est probablement de second ordre;

b) il ne se forme au cours de la réaction aucun produit intermédiaire, et les produits d'oxydation complète sont stables.

c) les vitesses comparées de l'oxydation des chlorophylles a et b n'ont pu être obtenues, celles-ci étant probablement très variables selon la longueur d'onde de la lumière émise.

Nous avons repris l'étude cinétique et confirmé la courbe obtenue, par un dosage spectrophotométrique. (graphique VI, courbe 1 vérification par la droite 2). Ces expériences ont été réalisées pour diverses longueurs d'onde d'émission de la lumière.

Remarques: l'effet de la photooxydation donne des corps dont l'absorption est très faible dans la région visible du spectre et est en ce point semblable à celui de l'oxydation par les corps tels que le peroxyde d'hydrogène ou d'autres oxydants.

- - -

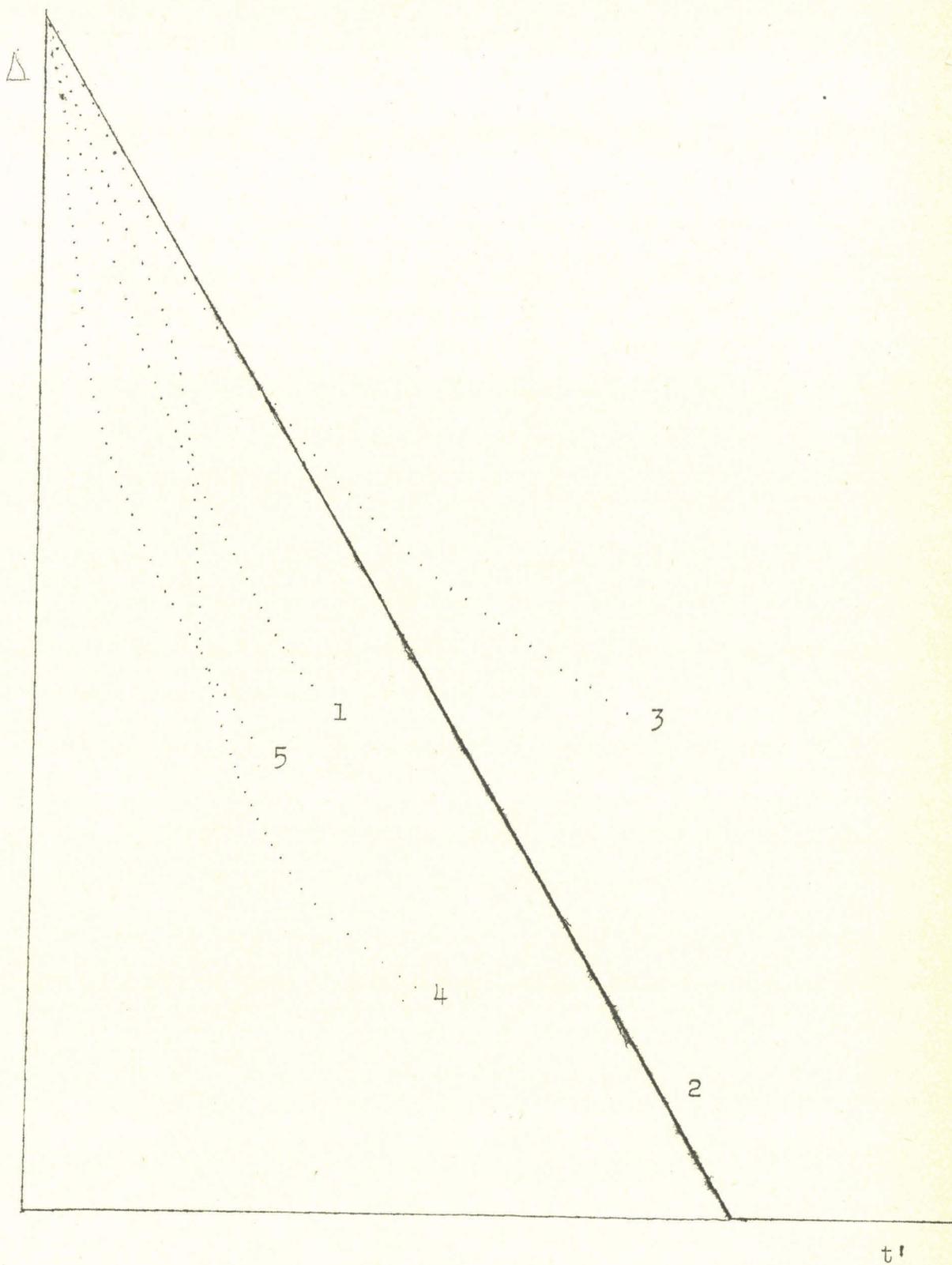
2) Etude des modifications possibles dans la réaction de photooxydation

Une étude très complète a été réalisée par URBOSKI et coll. (82-83) sur l'action stabilisante de certains corps vis-à-vis de la photooxydation. Il s'agit principalement d'amines, de diamines, de dérivés de l'aniline, et naturellement de réducteurs.

Notre but n'est pas de confirmer ces résultats, mais:

- a) d'étudier ces réactions par spectrophotométrie.
- b) de déceler l'effet possible de ces corps sur la formation de phéophytine.

Graphique VI



a) Il a été établi (83) que la nitrosodiméthylaniline avait la propriété d'éviter la décoloration de la chlorophylle en solution, exposée à une vive lumière. La preuve d'un complexe formé avec la chlorophylle était fournie par la disparition de la fluorescence de celle-ci après irradiation de la solution.

Un effet semblable a été constaté dans le cas de diverses amines. (82).

Nous avons comparé la cinétique de la photooxydation de la chlorophylle a en l'absence et en présence d'amines (mono- et diéthanolamine) et de paranitrosodiméthylaniline. (ce produit a été préparé à partir de diméthylaniline.- 84)

L'étude est réalisée par spectrophotométrie et le dosage effectué à 6.650 A°. La chlorophylle a est en solution dans l'alcool éthylique.

RESULTATS =====

1°) Les doses actives des divers produits varient essentiellement pour chacun d'eux.

2°) URBOSKI et coll. avaient montré que des faibles doses des divers corps envisagés avaient le pouvoir de stabiliser la chlorophylle à la photooxydation, et que des doses fortes avaient un effet contraire. Ces résultats sont confirmés ici comme le montre le graphique VI, courbes 3, 4 et 5, page 52. Ces courbes donnent les cinétiques obtenues pour des concentrations X, 2X et 5X du stabilisant envisagé. La courbe 1 constitue la dégradation du témoin.

Mais, de plus, il est intéressant de remarquer que quel que

soit le produit stabilisant envisagé, on obtient pour certaines concentrations intermédiaires, un effet stabilisant suivi d'une brusque déformation de la courbe de photooxydation, par accélération du phénomène. Après quoi, la cinétique est rétablie normalement.

3°) Preuve de la formation d'un complexe: si celle-ci a été fournie par URBOSKI et coll. sur la base d'une disparition de la fluorescence de la chlorophylle a, l'étude spectrophotométrique donne un résultat plus caractéristique, dans le cas de la paranitrosodiméthylaniline; un déplacement du maximum d'absorption de la chlorophylle a, de 6.650 A° à 6.550 A°, lors d'un effet stabilisant. Le phénomène a été observé en lumière visible et ultraviolette, et même lors d'une oxydation de la chlorophylle a en présence d'air à chaud et à l'abri de la lumière.

b) Nous avons voulu déceler l'influence possible des corps envisagés plus haut, sur la formation de phéophytine. Les essais ont été réalisés avec la paranitrosodiméthylaniline et des corps très semblables, comme la diméthylaniline et la nitrosoaniline, ainsi qu'avec des amines et diamines.

L'effet de ces produits sur la cinétique de formation de phéophytine a, en milieu acide, a été étudié en deux séries d'expériences:

1°) sans irradiation.

2°) après irradiation ménagée, et après vérification de la formation d'un complexe stable à la photooxydation.

Ensuite, la cinétique de formation de phéophytine a été comparée à un témoin, à $\text{pH} = 4$ et à 20°C .

RESULTATS

=====

Dans aucun cas, il ne peut être constaté de modification dans la réaction du premier ordre qu'est celle de la conversion de la chlorophylle en phéophytine.

Il semble donc que les stabilisants ne soient pas liés, même indirectement, à la formation de phéophytine.

- - -

CHAPITRE VII

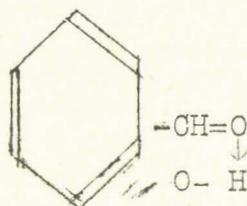
REMPACEMENT DE L'ATOME DE MAGNESIUM DE LA CHLOROPHYLLE PAR D'AUTRES ATOMES METALLIQUES

(Formation de chélates de phéophytine)

1) Définition et introduction

Le terme "chélate" correspond (46) à une structure cyclique formée par coordination intramoléculaire dans des systèmes contenant un donneur et un accepteur d'électrons, par exemple:

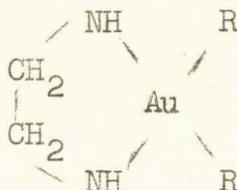
salicylaldéhyde



Il en est de même lorsque un anneau est constitué par coordination intramoléculaire dans des systèmes qui sont capables de former deux ou plusieurs liaisons coordonnées:

éthylène diamine-

R - R - Au:



Le nom de "chélate" est dérivé du grec "chela" = pince de crabe et fut proposé en 1920 par MORGAN et DREW (47).

La formation d'un chélate peut modifier considérablement les propriétés de certains corps. Par exemple (48), l'effet de la chélation sur les propriétés de l'acide salicylique (formation

d'une liaison hydrogène interne) rend cet acide beaucoup plus fort que ses homologues méta- et para-. Initialement d'ailleurs le terme "chelate" était employé uniquement dans le cas d'une liaison hydrogène interne formant le cycle, mais la notion a été étendue aux métaux en général. Dans des molécules organiques (49) contenant 2, 3, 4...., n, centres de coordination, des structures condensées de chélate peuvent se former. On les désigne sous le nom de : bi-, tri-, quadri-, ... polydentates.

La chlorophylle constitue un quadridentate.

-

Plutôt que de détailler dès à présent les résultats de nos expériences sur la formation de chélates de phéophytine, et que d'en tirer une conclusion empirique, il nous a semblé préférable de préciser les facteurs de formation de chélates et les caractéristiques spectrales de ceux-ci. Une documentation très détaillée nous est fournie par MARTELL et CALVIN (50), et dans la mesure du possible, nous avons mis en évidence les principaux éléments de ce problème très complexe en les illustrant des quelques études déjà effectuées dans un domaine proche, celui des porphyrines en général.

- - -

2) Lois générales de la formation des chélates métalliques

(51, 52)

Les facteurs qui gouvernent les tendances relatives pour les différents métaux à se combiner avec un donneur d'électrons, peuvent être divisés en deux classes:

a) Les tendances relatives des différents métaux à former des liaisons covalentes ou coordonnées.

Les liaisons entre un ion métallique et un donneur peuvent être soit ioniques, soit covalentes, soit de caractère intermédiaire: coordonnées. Dans ce dernier cas (résonance), la liaison se fait uniquement entre structures ayant le même nombre d'électrons impairs.

Dans le type de liaison réside une cause principale de la stabilité du chélate. Certains métaux (alcalins) forment presque toujours des liaisons ioniques, rapidement dissociées.

Par contre, d'autres forment toujours des liaisons covalentes, comme le Palladium et le Platine et celles-ci sont très stables.

Dans ce cas d'un type de liaison intermédiaire (par exemple: Cu- Phtalocyanine) le système de liaison qui complète la résonance existant dans la molécule est tellement stable que pour le dissocier il faut détruire la molécule tout entière. Dans ce dernier cas, l'ion possède donc des orbitales supplémentaires pour la formation de doubles liaisons nécessaires à l'obtention du système résonant (53).

Remarque:

En ce qui concerne le type de liaison du Magnésium dans la molécule de chlorophylle, on aboutit à une controverse:

- 1°) En général, on estimait que les liaisons étaient du type coordonné, le Magnésium, dont le nombre de coordination est 4, étant attaché aux 4 noyaux pyrroliques.

RUBBEN et coll. (54-55) montrent d'ailleurs qu'en solution, la chlorophylle, mise en présence d'ions Mg^{++} radioactifs ne permet aucun échange. Dans ce cas, on incline à penser que les liaisons ne peuvent être de nature ionique, ce qui impliquerait un échange très rapide (56). D'autre part, le spectre d'absorption de la chlorophylle qui contient une bande très forte dans la région rouge, est en faveur de liaisons covalentes.

2°) A l'encontre de ces résultats, on peut cependant remarquer:

- α) Lorsque le Fer est lié de façon ionique à l'hème il n'est pas possible de noter un échange avec des ions radioactifs (57).
- β) Le Magnésium forme difficilement des chélates de nature covalente.
- γ) La molécule de chlorophylle est plane, tandis que l'ion Mg^{++} possède sur ses couches extérieures des électrons disposés en tétraèdre, ce qui nécessiterait dans le cas de liaisons covalentes une distorsion de la molécule.
- δ) Un système de liaisons coordonnées est toujours très stable et on a vu que le Magnésium est rapidement arraché de la molécule.

C'est pourquoi l'hypothèse la plus plausible nous semble être celle d'ARONOFF (58): le Magnésium formerait une liaison tri-pôle avec les noyaux pyrroliques. On explique alors que l'effet

du chromophore électronégatif tel qu'il existe dans le groupement aldéhydique de la chlorophylle b pourrait renforcer, en conjugaison directe avec un azote pyrrolique, la liaison ionique Mg-N. On sait en effet que la chlorophylle b se dégrade moins vite que la chlorophylle a en milieu acide.

D'autre part, dans ce cas, le type de liaison n'implique aucunement une distorsion de la molécule.

Nous attachons une importance toute particulière au type de liaison du Magnésium dans la chlorophylle, parce que nous verrons au chapitre VIII que si l'on admet qu'il reste une ou plusieurs valences libres sur le Magnésium, la possibilité subsiste de fixer des molécules organiques, d'après le même principe que pour l'hème, qui peut être lié à diverses bases organiques par son atome de Fer. De plus, on peut admettre alors que la chlorophylle peut être liée de cette façon à des protéines et lipides dans les chloroplastes.

b) Les forces ioniques en relation avec la charge et le noyau de l'ion: (50)

Dans le cas où les liaisons formées sont de nature ionique, la stabilité du chélate est proportionnelle au carré de la charge de l'ion et inversement proportionnelle à son rayon. (e^2/r)

Corollaire:

On ne peut se limiter à ces deux lois générales. En effet, l'affinité entre cations et donneurs serait identique dans le cas des complexes et des chélates: or, on sait qu'il n'en est rien (50); cela indique que dans le cas des chélates existent d'autres facteurs, particulièrement de nature stéréochimique, qui compliquent l'interprétation du travail expérimental. La chlorophylle, comme toutes les porphyrines, est une molécule plane. Se fixeront donc le plus facilement sur les 4 pyrroles les métaux possédant sur leurs couches extérieures 4 électrons dans un même plan (métaux du type dsp^2 ; un électron sur d, un sur s et deux sur p). On évite ainsi une distorsion de la molécule lors de la chélation.

La constitution de la molécule de chlorophylle a aussi son importance, en ce sens qu'on se trouve en présence d'un donneur qui par sa structure doit complètement entourer l'ion métallique et impose donc ses propres conditions de forme, de structure, et de dimensions.

En résumé, d'après les lois énoncées, la chélation la plus stable appartiendra à un ion de dimensions optima, dsp^2 , permettant une augmentation du système résonant par son aptitude à la formation de liaisons coordonnées.

- - -

3) Coloration et spectre des chélates

Nous insisterons sur les modifications qui pourront apparaître

dans les spectres lors de la recherche de nouveaux chélates.

En effet, ce point constitue une méthode supplémentaire d'identification et souvent une preuve du remplacement du Magnésium par un autre métal. Lors d'une étude de différents chélates métalliques, SMITH et coll. (60 à 62) ont constaté que les spectres des chélates étaient très différents de ceux des ions métalliques et des donneurs, en ce qui concerne les longueurs d'onde des maxima d'absorption. Mais, et c'est encore un point capital, l'intensité d'absorption peut dépendre très fortement de la nature même du métal. MAC KENZIE (63) note que les chélates ioniques ont un spectre très proche de celui du donneur, et ces mêmes chélates (64) présentent un faible déplacement du spectre vers des longueurs d'onde plus courtes, mais d'autant plus prononcé que la stabilité du chélate est plus grande.

Par contre, dans le cas de liaisons covalentes, le chélate présente un spectre très différent de celui du donneur et de celui de l'ion. L'explication pourrait être : une plus grande interaction entre le métal et le donneur que dans le cas de liaisons ioniques. Une plus grande stabilité correspond à un déplacement plus grand du spectre vers des longueurs d'onde plus élevées, ce qui s'expliquerait par le fait qu'une fixation d'électrons au métal produit des états d'excitation plus bas.

Une augmentation de la résonance (doubles liaisons additionnelles donc liaisons mixtes) aurait aussi tendance à faire dévier le spectre vers des longueurs d'onde plus élevées.

Cette loi n'est cependant pas rigoureuse comme le montre BABAEVA (65): des chélates d'oxalate donnent en effet les maxi-

ma suivants:

Ni^{++} : 3.920 A°

Cu^{++} : 3.551 A°

Pd^{++} : 3.200 A°

Pt^{++} : 2.800 A°

alors que ceux-ci sont rangés par ordre de stabilité décroissante. Mais on explique partiellement ce fait en supposant que les deux premiers ont un caractère principalement ionique tandis que les autres sont certainement covalents comme tous les chélates de Platine et de Palladium.

Cet exposé sur les spectres des chélates ne permet pas de conclusions très précises, mais cependant on saura que tout déplacement du spectre de la chlorophylle vers des longueurs d'onde plus grandes indiquera des liaisons principalement covalentes tandis que le déplacement du maximum lui-même est une preuve de formation d'un nouveau chélate.

4) Discussion théorique sur la formation des chélates de phéophytine

Au cours de cette discussion, on examinera quels sont, du point de vue théorique, et sur la base des lois énoncées précédemment, les ions qui ont la plus grande affinité à la formation de chélates. Nous comparerons ensuite avec les résultats expérimentaux. Aucune détermination de constantes de stabilité des chélates n'a encore jamais été réalisée dans le cas de la chlo-

rophyllite, ni même des porphyrines en général (53).

a) Aptitudes des métaux à la formation de liaisons covalentes

Presque toujours: Pd^{++} , Pt^{++} ;

Souvent: Zn^{++} , Co^{++} , Fe^{++} , Cr^{+++} , Al^{+++} , Au^{+++} , Cu^{++} , Ni^{++}

Parfois: Be^{++} , Mg^{++} , Ag^+ , Fe^{+++} , Mn^{+++} , Ca^{++} , Cd^{++} , Sn^{+++}

Jamais: Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Ba^{++} , Sr^{++}

b) Le facteur e^2/r , dans le cas des chélates ioniques

1°) Dans le cas des métaux du premier groupe, le Rubidium et le Césium sont très défavorables à la formation de chélates, étant donné que leur rayon est très grand. Tous les métaux du premier groupe ont un facteur e^2/r très défavorable par rapport au Magnésium.

2°) Parmi les métaux du second groupe, le Béryllium est plus favorable ($r = 0,44$) que le Magnésium ($r = 0,82$). Le Calcium ($r = 1,18$) est défavorable par rapport au Magnésium, mais constitue l'exception générale à la règle (66). Le Zinc ($r = 0,88$) est aussi défavorable, mais a une plus forte tendance aux liaisons covalentes. Le Baryum ($r = 1,53$), le Strontium ($r = 1,32$) et le Cadmium ($r = 1,14$) sont très défavorables.

3°) Parmi les autres groupes, la plupart ont un facteur e^2/r favorable mais se lient souvent de manière covalente.

Corollaire:

1°) En ce qui concerne l'espace disponible, les plus aptes sont les métaux suivants: le Palladium, le Platine et le Fer bivalent (67)

2°) Le Fer bivalent convient cependant moins: il a une moindre tendance à la configuration dsp^2 .

3°) Les métaux les plus aptes à former des chélates avec des donneurs d'électrons plans du fait de la disposition des électrons sur leurs couches extérieures sont: le Palladium, le Platine, le Nickel, le Cuivre, l'Or, tous dsp^2 et le Cobalt.

-

Conclusion:

Après avoir éliminé un certain nombre de métaux qui, ou bien ne peuvent former d'ions positifs, ou bien ne peuvent donner d'ions dans des conditions de pH compatibles avec les molécules organiques, on pourrait admettre la formation des chélates suivants (dans un ordre relatif de stabilité décroissante):

1°) le Palladium et le Platine, le plus facilement (dsp^2 , espace disponible, augmentation du système résonant)

2°) le Cuivre, le Nickel, le Cobalt et l'Or, pourraient aussi former des chélates très stables. (dsp^2 , résonance)

3°) le Chrome et l'Aluminium, trivalents, le Zinc, le Fer et le Manganèse, l'Etain, pourraient former des chélates (liaisons covalentes).

4°) Le Béryllium et le Calcium bivalents pourraient former des chélates légèrement plus stables que la chlorophylle

de même que l'Argent.

5°) les métaux alcalins et NH_4 pourraient former des chélatees rapidement dissociés.

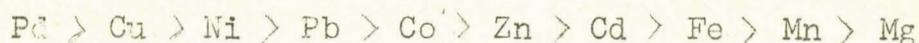
6°) Le Rubidium, le Césium, monovalents, le Strontium, le Cadmium, le Baryum bivalents et les métaux lourds en général, ne formeraient pas de chélatees.

5) Bibliographie

Ayant ainsi déterminé quelles seraient les conditions optima de chélation, il est bon de passer brièvement en revue avant de noter les résultats de nos essais, les conclusions expérimentales de divers auteurs. Il s'agit de chélatees en général ou plus particulièrement d'expériences traitant des porphyrines

a) BARNES et DOROUGH (64) ont étudié le remplacement des métaux par d'autres plus stables, pour des porphyrines synthétisées: 2Na^+ remplacent 2K^+ ; Cu^{++} remplace Zn^{++} ; Zn^{++} remplace rapidement Pb^{++} et Hg^{++} .

b) MELLOR et MALEY (68-69) ont déterminé un ordre de stabilité pour la chélation de différents ions bivalents, avec l'éthylène diamine:



c) ASKINAZI et GLIKMAN (70-71) déterminant les réactions de la chlorophylle avec des ions métalliques établissent tout d'abord en contradiction avec RABINOWITCH et WEISS (72), que la décoloration de solutions alcooliques de chlorophylle par addition de Fer trivalent sous forme de chlorure, ne serait pas due à la formation d'un complexe hypothétique: l'oxychlorophylle.

Les auteurs montrent qu'il se produit, par la dissolution du sel de Fer, une augmentation de la teneur en ions H^+ de la solution et par suite, une dégradation de la chlorophylle en phéophytine. La preuve en est fournie par la mesure d'un effet semblable avec des sels d'Aluminium. Cette conclusion, qui d'ailleurs peut sembler évidente, a pu être confirmée par nous au moyen d'un dosage comparé de la teneur en phéophytine de la solution, par rapport à un témoin, au cours d'une expérience semblable. Nous avons tenu compte de l'acidité en tamponnant les solutions.

La suite de cette étude de ASKINAZI et GLIKMAN est consacrée à l'effet de quelques autres ions testés par des expériences semblables. Il s'agit de K^+ , Pb^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Sn^{++} , Fe^{++} , Al^{+++} pour lesquels on s'est efforcé d'établir si des chélates peuvent se former, par dosage, par rapport à un témoin après une durée donnée, du maximum rouge d'absorption de la chlorophylle. Seuls Cu^{++} et Zn^{++} montrent une absorption nettement plus intense que le témoin, ce qui prouve la formation d'un chélate. Dans le cas de Fe^{++} , une légère différence à la forme du spectre incline à penser que le Fer s'est fixé sur la molécule. Ceci est d'ailleurs prouvé par extraction et calcination. Les autres ions sont sans effet.

-

Cette dernière série d'expériences est très proche du travail que nous nous sommes proposé d'entreprendre, mais à notre avis on peut leur faire les reproches suivants:

1°) les essais sont très incomplets: ils ne portent que sur un petit nombre de métaux.

- 2°) il n'est pas prouvé par exemple que Sn^{++} ou Al^{+++} n'ont pas aussi la possibilité de former un chélate: l'augmentation considérable de la teneur en ions H^+ , de la solution mise en présence d'un sel d'Etain ou d'Aluminium pourrait inhiber une chélation relativement peu stable. La destruction ne serait pas compensée par la chélation et l'étude spectrophotométrique ne peut donner aucun résultat.
- 3°) il n'est pas tenu compte du fait que des ions peuvent former des chélates dont le spectre serait moins intense que celui de la chlorophylle, ou même de la phéophytine. Dès lors, ces résultats ne sont plus décelables au spectrophotomètre dans les conditions données.

- - -

6) Expériences personnelles

Méthode d'obtention des chélates

a) Pour éviter toute erreur, même minime, due à une variation de la teneur en ions H^+ dans la solution de chlorophylle, nous avons procédé comme pour le dosage de la phéophytine. On emploie un solvant mixte eau-propanol, en parties égales, contenant un tampon. Celui-ci est ici réalisé nécessairement avec un sel de Magnésium, pour éviter une interaction de cations.

b) Le pH des solutions est situé entre 2 et 6, de façon à mesurer la stabilité relative des chélates. On facilitera la dégradation de la chlorophylle par un chauffage standard de 1 h.

à 100°C, ce qui a pour but d'accélérer les réactions.

c) D'autre part, des expériences seront effectuées à partir de phéophytine pure afin de déterminer dans quelles conditions on peut obtenir la formation d'un chélate.

d) Pour chaque métal envisagé et expérimenté, le spectre entier de la chlorophylle est tracé dans le visible, avec dosage précis aux maxima d'absorption.

e) Les expériences avec Cu^{++} , Zn^{++} et Fe^{++} qui, on l'a vu, forment des chélates, sont reprises ici afin de comparer les stabilités respectives avec celles des autres chélates.

f) Les expériences sont réalisées avec les chlorophylles a et b, pures, après séparation par chromatographie.

g) Diverses concentrations d'ions métalliques ont été envisagées, mais toujours avec un excès d'ions dans la solution par rapport à la quantité de chlorophylle.

h) Nous avons dit que certains métaux ne peuvent être essayés pour des raisons de compatibilité de pH. D'autres ne peuvent être mis en oeuvre en raison de leur rareté: Scandium, Gallium, Indium Radium, etc...

7) Vitesse de réaction de la chélation dans un cas particulier

Nous avons voulu analyser de façon plus précise la formation d'un chélate en général, et pour ce faire, nous avons choisi le chélate de "Cu-phéophytine a". Il est particulièrement facile d'étudier la cinétique de formation de ce chélate étant donné qu'il possède dans la région rouge du spectre un maximum d'absorption à une longueur d'onde différente de celle du maximum d'absorption de la chlorophylle a. (6.500 A°)

Dès lors, il est possible d'étudier la cinétique aux deux longueurs d'onde suivantes: 6.650 A° et 6.500 A° et de résoudre comme auparavant un système d'équations à deux inconnues.

L'expérience est réalisée à partir de phéophytine a pure. Le milieu est légèrement acide, ce qui est nécessité par la présence d'ions Cu^{++} . La réaction de chélation est en réalité une réaction d'équilibre entre les ions Cu^{++} et 2H^+ . Mais comme on travaille en présence d'un grand excès d'ions Cu^{++} , nous admettons qu'en fin de réaction toute la phéophytine est transformée en chélate de Cuivre. Ceci est en effet une condition sine qua non de dosage, qui nécessite de connaître les absorptions proportionnelles de la phéophytine et du chélate aux deux longueurs d'onde citées.

Conditions expérimentales

a) On opère à la température de 50°C qui active la réaction. Celle-ci sera presque complète en quelques heures, ce qui évite les réactions subsidiaires. D'autre part, la phéophytine n'est

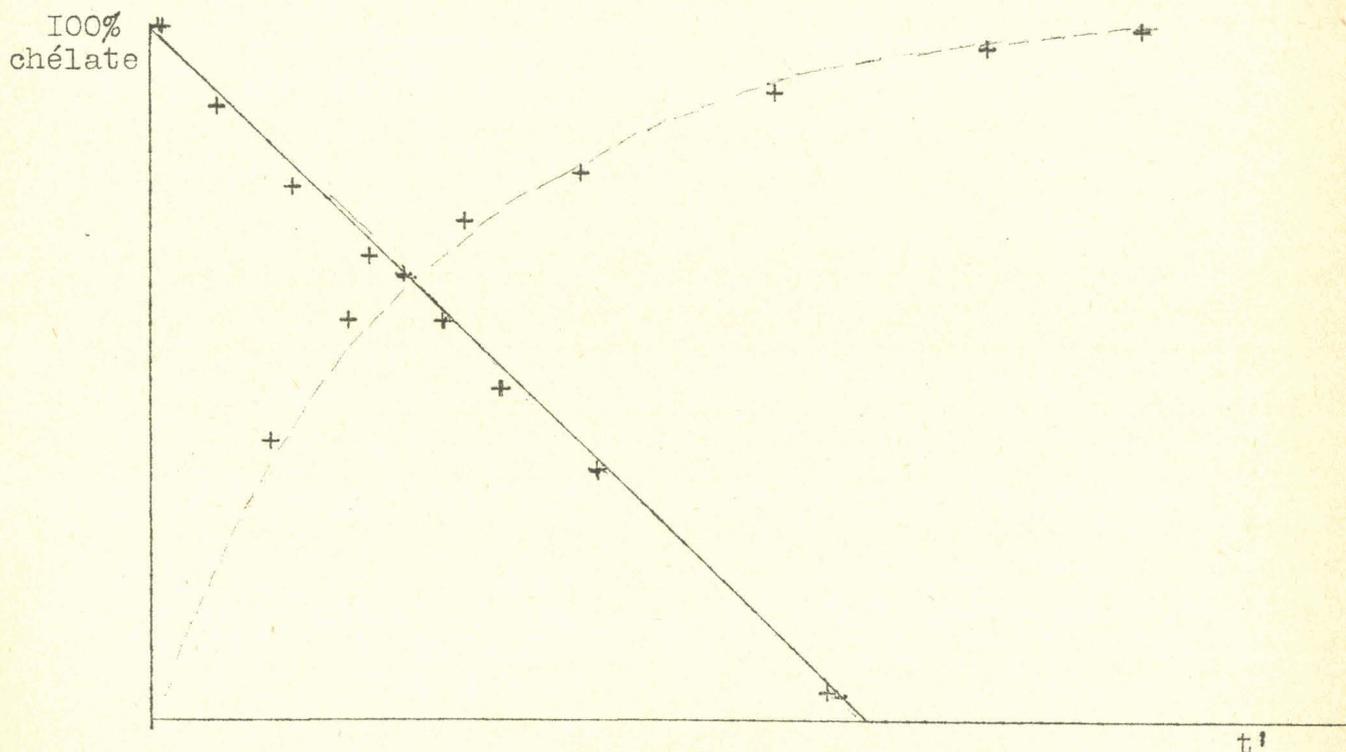
nullement altérée à cette température.

b) le pH de la solution contenant la phéophytine a, et un sel de Cuivre est fixé à 5. On a intérêt à travailler au pH le plus élevé possible pour déplacer l'équilibre, tout en évitant le risque de précipitation d'un sel de Cuivre.

RESULTATS

=====

Ci-dessous se trouve un graphique donnant la vitesse de formation du chélate. Cette réaction est très proche d'une réaction monomoléculaire (la droite du graphique représente les nombres proportionnels aux logarithmes des pourcentages de phéophytine transformée).



Les légères divergences pourraient provenir du fait qu'on n'a pas exactement en fin de réaction 100% de chélation.

Conclusion

La réaction est du même ordre que celle de la conversion de chlorophylle en phéophytine.

- - -

8) Résultats généraux des essais de chélation

1°) Les métaux du groupe I et l'Ammonium - a) Ammonium, Sodium et Potassium⁺ : Leur effet de remplacement est du même ordre. Une solution de chlorophylle (5 mg. par litre) chauffée à 100°C, pendant 60 min., à pH 5,5, c'est-à-dire convertie en grande partie en phéophytine, ne subit qu'un remplacement très faible du Magnésium par l'un de ces trois ions, lorsque ceux-ci se trouvent en solution 0,001 M. Ces ions n'ont pas, quelles que soient les conditions de pH ou de température, une grande affinité de chélation vis-à-vis des ions H⁺. Par contre, si la teneur de la solution en un de ces ions est fortement augmentée, (solution saturée en chlorure de Sodium par exemple), le remplacement est beaucoup plus considérable.

La chélation est révélée de la façon suivante: un témoin traité dans des conditions identiques, indique la formation d'une quantité supérieure de phéophytine qui est dosée à 5.370 A°. D'autre part, la formation du chélate est aussi prouvée par un déplacement du maximum d'absorption de la chlorophylle ou de la

phéophytine, (situé à 6.650 A°), à 6.580 A° après l'expérience en présence d'un sel d'Ammonium, de Sodium ou de Potassium.

Le graphique VII, fig.1, 2 et 3, page 74, montre des cas particuliers de chélation par un de ces trois cations.

Remarquons que les chélates cités sont moins colorés que la chlorophylle, comme le montre l'absorption dans la région rouge du spectre.

Les expériences réalisées à partir de chlorophylle b donnent des résultats similaires.

b)- Lithium: Des essais absolument semblables à ceux du paragraphe a) ont été réalisés avec un sel de Lithium. Dans aucun cas il n'est constaté par rapport au témoin:

- a) un déplacement du spectre
- b) une formation moindre de phéophytine
- γ) une absorption moindre dans la région rouge du spectre.

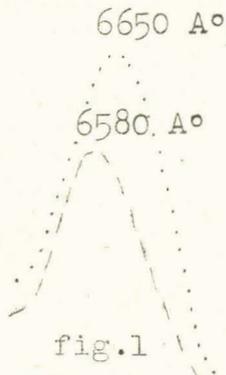
Le Lithium ne peut donc former de chélate.

c)- Cuivre Seuls les sels de Cuivre bivalent sont solubles. Il est bien connu que le Cuivre forme avec la phéophytine un chélate très stable. Cependant, nous avons voulu réétudier ce problème afin d'en préciser certaines caractéristiques (modifications spectrales, stabilité relative, etc...).

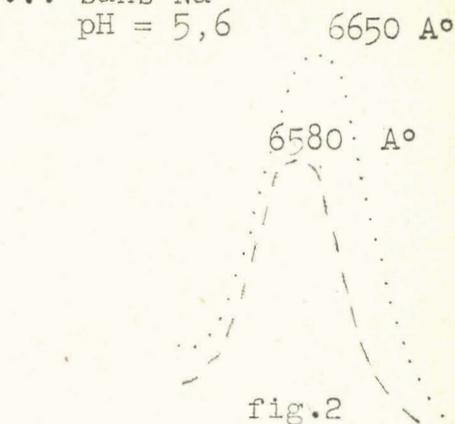
Graphique VII

△

-- avec NH_4^+
pH = 5,79
... sans NH_4^+
pH = 5,75

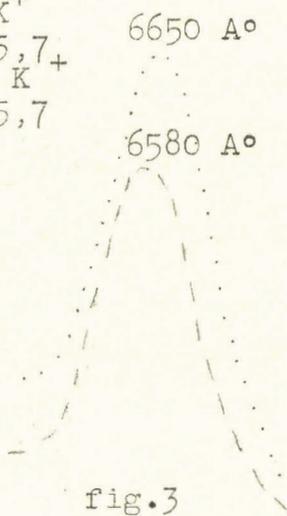


-- avec Na^+
pH = 5,6₊
... sans Na^+
pH = 5,6

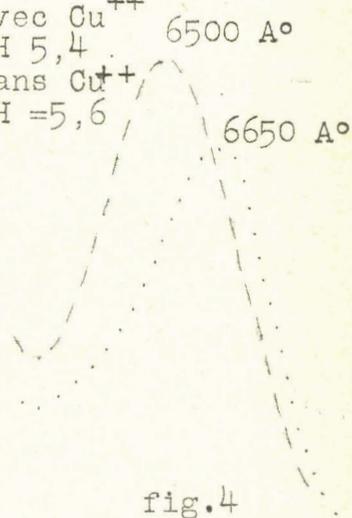


△

-- avec K^+
pH = 5,7₊
... sans K^+
pH = 5,7

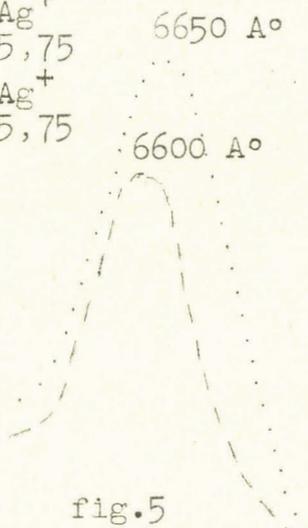


-- avec Cu^{++}
pH 5,4
... sans Cu^{++}
pH = 5,6

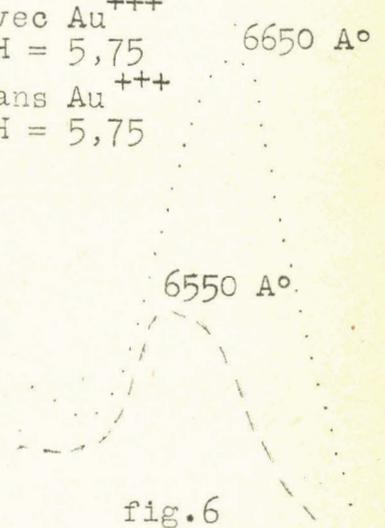


△

-- avec Ag^+
pH = 5,75
... sans Ag^+
pH = 5,75



-- avec Au^{+++}
pH = 5,75
... sans Au^{+++}
pH = 5,75



Chlorophylle a traitée 60 min. à 100 °C. en présence ou en l'absence de cations.

Résultats pour la chlorophylle a :

Lors de la formation d'un chélate de Cuivre, le maximum d'absorption est déplacé de 6.650 \AA à 6.500 \AA , accompagné d'une forte augmentation de l'intensité, par rapport au témoin.

Le chélate est excessivement stable en milieu acide: il est en effet possible d'en constater la formation à des pH tels que le noyau pyrrolique tout entier commence à se dégrader (par exemple à $\text{pH} = 2$ et à 100°C). Le Cuivre est donc aussi solidement attaché que le reste de la molécule, ce qui implique la formation de liaisons coordonnées. (voir exemple au graphique VII, fig.3)

Résultats pour la chlorophylle b :

Ils sont similaires aux précédents; en effet, la formation du chélate implique un déplacement du spectre, du même ordre (de 6.460 \AA à 6.310 \AA) et la stabilité est analogue.

d) Le Rubidium. Rb^+ ne forme pas de chélate, quelles que soient les conditions expérimentales.

e) L'Argent. Ag^+ forme un chélate avec un déplacement correspondant du maximum d'absorption, de 6.650 \AA à 6.550 \AA dans le cas de la chlorophylle a. L'absorption spécifique du chélate dans la région rouge est très faible, comme le montre un exemple donné au graphique VII, fig.5. Ce spectre est en faveur de l'existence d'un chélate de nature ionique. La stabilité du chélate est relativement élevée: environ $\text{pH} 4$ à 4.5 .

f) Le Césium: Cs^+ ne forme pas de chélate.
 - - - - -

g) L'Or: Au^{+++} forme un chélate très stable. Lors de sa formation, on constate un déplacement du maximum rouge d'absorption de 6.650 A° à 6.600 A° dans le cas de la chlorophylle a. (voir graphique VII, fig.6). D'autre part, l'absorption dans la région rouge est très faible.

La stabilité du chélate d'Or est élevée, et par chauffage à 100°C d'une solution de chlorophylle a, sa formation a pu être constatée pour des pH minima situés entre 3 et 4.

2°) Les métaux du groupe II.

a) Le Béryllium: Be^{++} forme probablement un chélate avec la phéophytine a, mais les résultats ne sont pas très nets. Il n'est constaté au cours des expériences aucun déplacement des maxima du spectre, mais cependant les intensités d'absorption peuvent être légèrement supérieures à celles du témoin; ceci est réalisé pour des pH situés entre 6 et 7. (graphique VIII, fig.1)

Il semble donc que le Béryllium forme un chélate légèrement plus stable que la chlorophylle. Il serait de même nature, étant donné la similitude des ions Be^{++} et Mg^{++} .

En ce qui concerne la chlorophylle b, les résultats ne permettent pas de définir avec certitude la formation du chélate. Les résultats sont encore moins sensibles.

b) Le Magnésium: Mg^{++} forme la chlorophylle, et ses caractéristiques ont déjà été étudiées.
 - - - - -

c) Le Calcium: Ca^{++} peut former un chélate. Le spectre n'indique aucun déplacement caractéristique. Seule l'absorption constatée peut être légèrement plus intense en présence d'un sel de Calcium.

En ce qui concerne la stabilité du chélate, il a été difficile d'établir un pH minimum de formation, étant donné des différences d'intensité d'absorption relativement faibles. Il nous a paru s'établir entre 4.5 et 5.5 (à 100°C). (voir graphique VIII, fig.2, page 78).

Pour la chlorophylle b, les différences sont trop minimes pour établir des conclusions plus précises.

d) Le Zinc: Zn^{++} forme facilement un chélate. La coloration de celui-ci est très intense, comme le montre l'intensité d'absorption du spectre dans la région rouge. Aucun déplacement du spectre n'accompagne la formation du chélate.

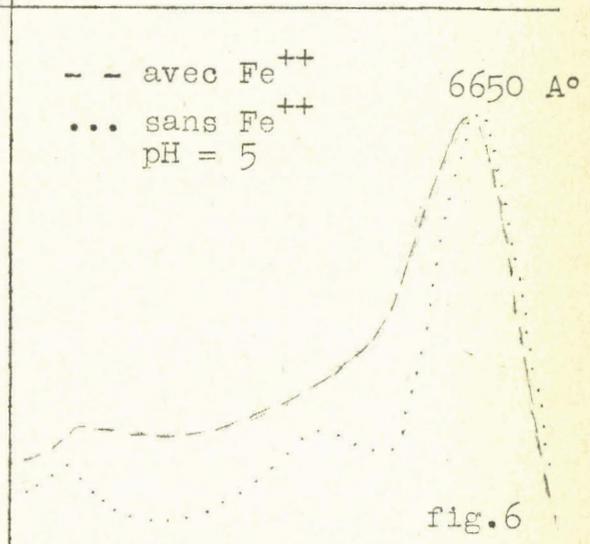
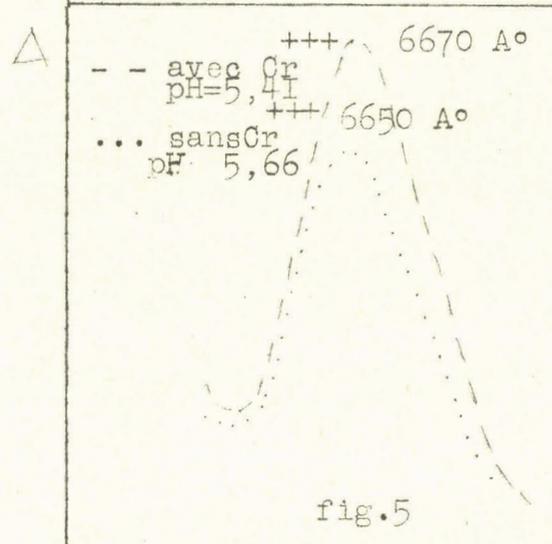
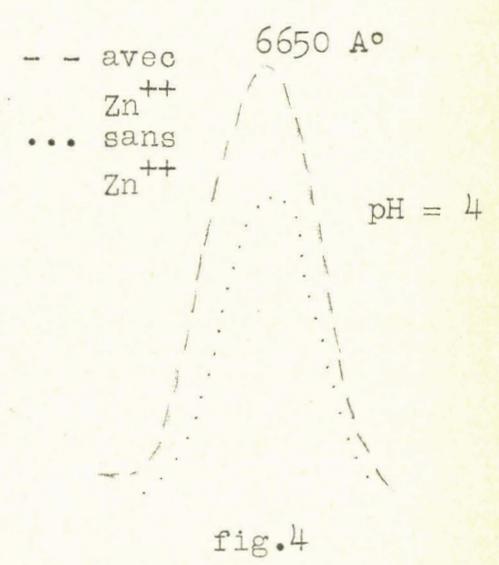
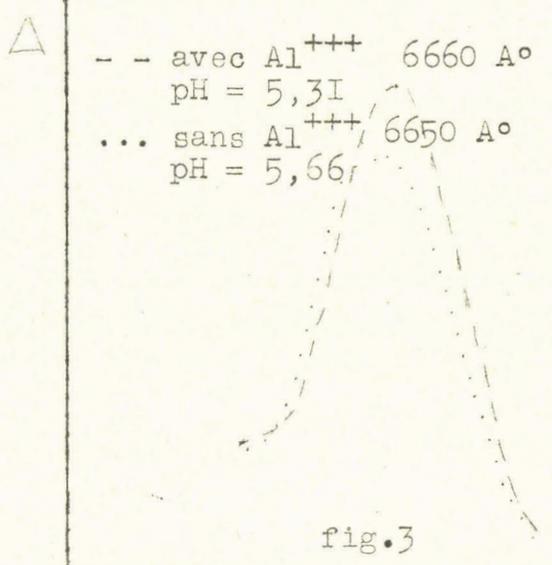
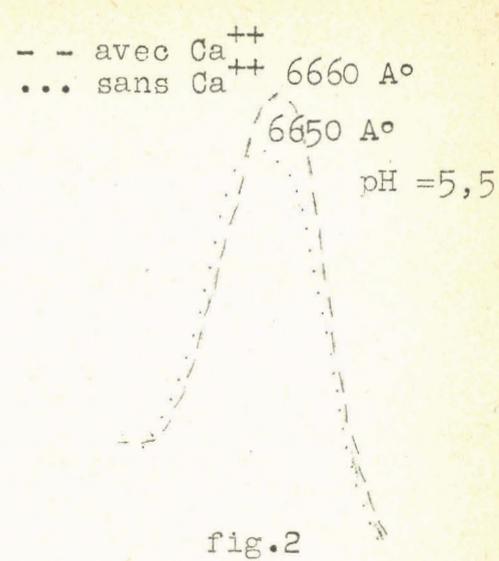
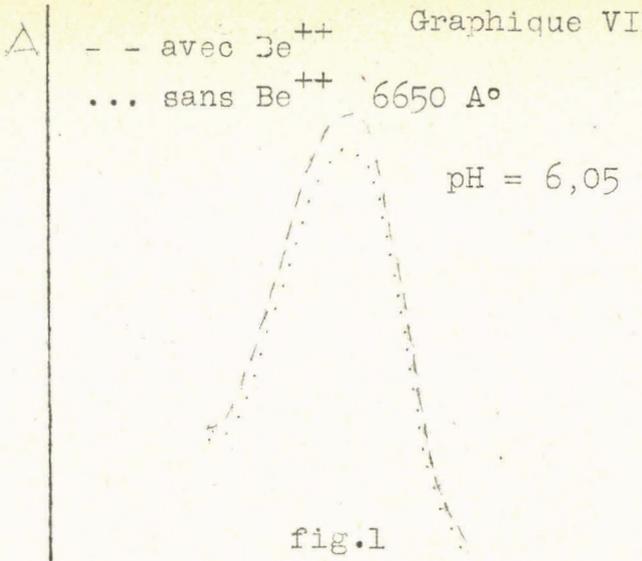
La stabilité est très grande, quoique légèrement moindre que dans le cas du chélate du Cuivre. Il se forme facilement à pH = 3. A pH = 2, le Zinc semble être sans action. Le graphique VIII, fig.4, donne un exemple de formation de chélate de Zinc.

Vis-à-vis de la chlorophylle b, les résultats sont similaires. L'intensité d'absorption est très grande dans la région rouge.

e) Le Strontium: Sr^{++} ne forme pas de chélate.

f) Le Cadmium: Cd^{++} ne forme pas de chélate.

Graphique VIII



Chlorophylle a chauffée à 100 °C. 60 min. en présence et en l'absence de cations.

g) Le Baryum: Ba^{++} ne forme pas de chélate.
 - - - - -

h) Le Mercure: Hg^{++} ne forme pas de chélate.
 - - - - -

3°) Les métaux des groupes III à VIII donnant des cations dans des conditions expérimentales compatibles avec les molécules organiques.

a) L'Aluminium: Al^{+++} est très acide et il n'est possible d'obtenir des ions Al^{+++} en solution qu'à des pH relativement bas en évitant une précipitation. L'Aluminium cependant peut former un chélate très coloré comme en témoigne l'intensité très élevée de l'absorption du spectre dans la région rouge (voir graphique VIII, fig.3). Il semble de plus, qu'un léger déplacement du spectre se produise avec la chélation, vers des longueurs d'onde plus grandes, mais il est difficile de le certifier. (Chl.a: de $6.650A^\circ$ à $6.660 A^\circ$). La stabilité du chélate est relativement faible et par chauffage d'une solution à 100° , il n'est pas possible d'en constater la formation à des pH $< 4,5$

Les conditions de chélation sont donc très limitées, étant donné qu'on ne peut constater de chélation que jusqu'à un pH maximum de 5.8 (à $100^\circ C$); au-dessus de cette valeur, l'ionisation est pratiquement nulle.

En ce qui concerne la chlorophylle b, les résultats sont semblables en ce qui concerne la stabilité et l'intensité d'absorption. Aucun déplacement du spectre n'est remarqué.

b) L'Etain: L'Etain, à l'état minimum ou maximum, ne forme pas de chélate.

c) Le Plomb: Pb^{++} ne forme pas de chélate.

d) Le Chrome: Cr^{+++} forme un chélate très coloré. La chélation déplace le maximum du spectre dans la région rouge, de 6.650 à 6.670 A° . La stabilité du chélate est relativement faible et aucune chélation ne se constate au-dessous de $\text{pH} = 5$. Toutefois, l'intensité d'absorption dans le rouge devient réellement très élevée par rapport au témoin aux environs de $\text{pH} = 5.5$ comme le montre le graphique VIII, fig.5.

e) Le Manganèse: Mn^{+++} ne forme pas de chélate.

f) Le Fer: Nous avons précisé qu'ASKINAZI et GLIKMAN (70-71) avaient prouvé la formation d'un chélate dans le cas du Fer à l'état minimum. Nos résultats se rapprochent de ceux de ces auteurs; toutefois, comme le montre le graphique VIII, fig.6 la seule différence réside dans le fait que par rapport au témoin, l'absorption du chélate de Fer n'est pas plus intense à 6.650 A° . Ceci étant, il n'est pas possible de déterminer avec précision la stabilité du chélate en milieu acide. Il semble que le pH minimum de formation se situe entre 3.5 et 4.5.

En ce qui concerne la chlorophylle b, les résultats sont très peu sensibles et ne permettent aucune précision. Nous verrons au chapitre IX que des résultats plus précis ont pu être

établis au cours d'expériences semi-industrielles ayant trait à des végétaux.

Au cours des expériences de chélation que nous avons réalisées sur les chlorophylles a et b avec du Fer ferreux, nous avons opéré en l'absence d'air et en présence d'un réducteur (hydrazine) pour éviter la précipitation d'une certaine quantité de Fer ferrique. Ce dernier ne permet pas de chélation.

g) Le Cobalt: Co^{++} forme un chélate caractéristique. Son absorption spécifique dans la région rouge est très faible. Elle est plus faible que celle de la chlorophylle et même que celle de la phéophytine. Une preuve de la formation d'un chélate est cependant fournie par un dosage de la phéophytine à 5.370 \AA .

Le chélate de Cobalt est très stable. Sa formation peut être constatée pour des pH minima situés entre 3 et 3.5. Il semble de plus que le maximum rouge du spectre soit très légèrement déplacé vers le bleu lors de la chélation (de 6.650 \AA à 6.630 \AA dans le cas de la chlorophylle a).

Pour la chlorophylle b, la faible intensité du spectre du chélate dans la région rouge ne permet pas des résultats aussi précis. Un exemple est donné au graphique IX, fig.1, page 82.

h) Le Nickel: Ni^{++} ne forme pas de chélate.

i) Le Platine: Nous avons vu que le Platine à l'état minimum a une configuration dsp^2 et une grande aptitude à la formation de chélates. Cependant, seul le Platine à l'état maximum

Graphique IX

△

-- avec Co ++
pH = 6,05
... sans Co ++
pH = 5,48

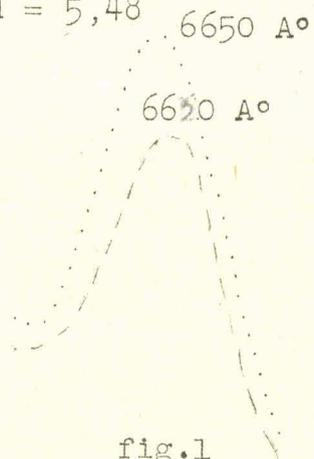


fig.1

-- avec Pd ++
... sans Pd ++
pH = 2,1

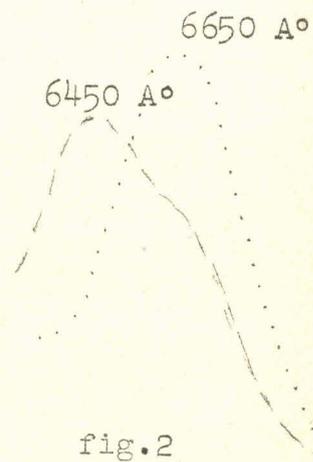


fig.2

△

-- avec Pt ++++
... sans Pt ++++
pH = 2,1

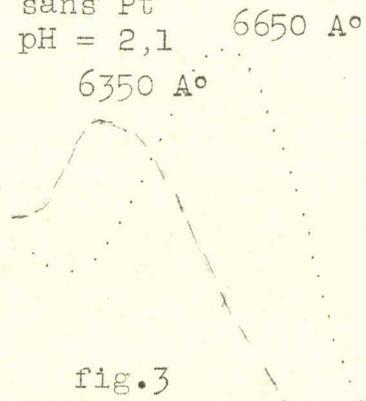


fig.3

-- avec "aminol"
... sans "aminol" 6650 Å°
pH = 5,5

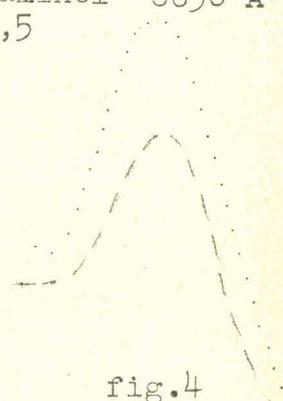


fig.4

Chlorophylle a traitée 60 min. à 100 ° C. en présence et en l'absence de cations.

est soluble. Nous avons utilisé celui-ci au cours de nos expériences. Si sa configuration est d^2sp^3 , le Platine à l'état maximum peut convenir cependant aussi à une chélation avec des donneurs d'électrons plans.

Au cours de nos expériences relatives à la chlorophylle a, le maximum d'absorption se déplace avec la chélation, de 6.650 \AA à 6.300 \AA , ce qui est considérable. L'intensité d'absorption est très faible. Un exemple le montre au graphique IX, fig.3.

La stabilité du chélate est remarquable. A $\text{pH} = 1.5$, alors que à 100°C la phéophytine commence à se dégrader, il est encore possible de constater la formation du chélate par son maximum à 6.300 \AA . Le déplacement considérable de la bande rouge du spectre vers des longueurs d'onde plus petites a pour résultat une coloration très bleue du chélate, ce qui se constate facilement.

Dans le cas de la chlorophylle b, les résultats sont analogues.

j) le Palladium: Pd^{++} est très acide, et il est nécessaire d'opérer à des pH très bas pour obtenir des résultats satisfaisants.

En effet, entre $\text{pH} = 3$ et $\text{pH} = 6$, seul un très léger déplacement du spectre vers le bleu indique la chélation sans qu'il ne soit constaté une différence dans l'intensité d'absorption.

A $\text{pH} = 2$, apparaît un maximum caractéristique, quoique faible, à 6.450 \AA , ce qui indique la formation d'un chélate stable. En fait, l'effet est très semblable à celui du Platine.

vis-à-vis de la chlorophylle b, les résultats correspondent aux précédents avec un déplacement semblable du maximum d'absorption de 6.460 \AA à 6.260 \AA ; mais les résultats sont moins bien définis que dans le cas de la chlorophylle a.

k) Yttrium: Yt^{+++} ne forme pas de chélate.

- - -

9) Discussion des résultats

a) Métaux du premier groupe:

1°) Le Sodium, le Potassium et l'Ammonium. Les résultats sont absolument en accord avec les hypothèses émises: un ion monovalent formant un chélate (p.ex. di-sodium-phéophytine), celui-ci sera nécessairement moins coloré (79), particulièrement dans le cas de liaisons ioniques.

On a vu d'autre part que ces métaux forment toujours des chélates de nature ionique, ce qui explique la stabilité excessivement faible de ceux-ci. Ils ne peuvent se former qu'en présence d'un grand excès de cations.

2°) L'Argent forme un chélate plus stable. Parmi les métaux monovalents du premier groupe, il est le seul à avoir une aptitude plus grande à la formation de chélate en général.

3°) Le Rubidium et le Césium ne forment pas de chélate. Ceci semble logique, étant donné qu'ils ont un facteur e^2/r très défavorable.

4°) Le Cuivre forme un chélate très stable. En effet, ce métal a une grande aptitude à la formation de liaisons coordonnées et il appartient au type dsp^2 .

5°) L'Or forme aussi un chélate très stable. Il appartient au type dsp^2 et possède en général une grande aptitude à la formation de chélates stables. Les résultats confirment donc encore l'hypothèse émise.

b) Métaux du second groupe

Parmi les métaux du second groupe, la plupart ont tendance à former des chélates de nature ionique. Si on tient compte, dès lors, de leur valeur e^2/r , seul le Béryllium est favorable à la formation d'un chélate plus stable que la chlorophylle. D'autre part, le Calcium, nous l'avons vu, constitue une exception générale et serait donc aussi favorable. En ce qui concerne le Zinc, le cas est différent en ce sens que son aptitude à la formation de liaisons covalentes est plus grande.

Expérimentalement, nous avons vu que le Béryllium et le Calcium forment des chélates plus stables que la chlorophylle. Nous avons vu aussi que le Cadmium, le Strontium, le Baryum, le Mercure, ne donnent pas de chélates. Par contre, le Zinc forme un chélate très stable.

c) Métaux des autres groupes

1°) L'Aluminium qui forme souvent des chélates colorés et relativement stables, forme ici un chélate avec la phéophytine, ce qui confirme l'hypothèse émise.

2°) Le Chrome est très semblable à l'Aluminium et nous avons vu en effet qu'il forme un chélate très coloré.

3°) Le Cobalt a une grande aptitude à la formation de liaisons covalentes. Il appartient au type d^2sp^3 , mais peut se combiner facilement avec des donneurs d'électrons plans. Nous avons vu en effet, que le cobalt forme un chélate stable avec la phéophytine; ce chélate est très caractéristique en ce sens que son absorption spécifique est très faible dans la région rouge du spectre.

4°) Le Fer à l'état minimum forme un chélate avec la phéophytine. Son aptitude aux liaisons de nature covalente est relativement grande et on sait (hème) qu'il se combine souvent à des porphyrines. Le Fer à l'état maximum ne permet pas la chélation, mais ceci peut s'expliquer par l'aptitude de moins grande du Fer sous cette forme à former des liaisons covalentes.

5°) Le Palladium et le Platine: nous avons vu qu'en théorie ces deux métaux possèdent toutes les conditions essentielles de formation d'un chélate avec une molécule de porphyrine. Les résultats expérimentaux confirment entièrement cette constatation: les chélates formés sont les plus stables.

- - -

Conclusion:

Cette discussion des résultats montre que ceux-ci concordent avec les diverses théories émises. Deux exceptions cependant:

a) Le Lithium ne semble pas former de chélate alors qu'il semblerait devoir se comporter comme le Sodium, le Potassium ou l'Ammonium.

b) Le Nickel a une configuration dsp^2 et des dimensions adéquates; de plus, il forme souvent des chélates très stables. Cependant, nous n'avons pas pu constater la formation d'un chélate dans le cas du Nickel.

- - -

Tableau de formation des chélates

Stabilité relative (pH minimum de formation)		Ordre d'intensité d'absorption dans le rouge (arbitraire)	Déplacement du spectre. (par rap- port à la chlorophylle)	
Cu-Pt-Pd	2	Zn	Pt	6350 A°
H		Cu	Pd	6450 A°
Zn	2-2,5	Cr	Cu	6500 A°
Co-Au-Fe	3-4	Al	Ag	6550 A°
Ca-Ag	4,5-5,5	Ca - Be - <u>Mg</u> - Fe	Na-K-NH ₄	6580 A°
Al	4,5-5	Na - K - NH ₄ - Ag	Ag	6600 A°
Cr	5-5,5	Pt - Pd ^{Au}	Co	6630 A°
Be	6-7	Co	<u>Mg</u> -Be-Zn	6650 A°
<u>Mg</u>			Al-Ca	6660 A°
(Na-K-NH ₄)			Cr	6670 A°

- - -

CHAPITRE VIII

EFFET DES CATIONS ORGANIQUES SUR LA FORMATION

DE PHEOPHYTINE

(en relation avec l'existence, in vivo, de complexes chlorophylles-protéines)

1) Introduction et discussion

On peut envisager plusieurs modalités de formation de complexes de la chlorophylle ou de la phéophytine avec des cations organiques:

a) par analogie avec les divers chélates métalliques de phéophytine, qui ont été étudiés au chap.VII, on pourrait imaginer la formation de complexes semblables avec des bases organiques. Ceux-ci seraient cette fois directement en relation avec la perte de l'atome de Magnésium, et ils pourraient être, soit plus stables en milieu acide, soit plus colorés. L'étude de ces complexes qui n'a encore jamais été envisagée, nécessite des essais empiriques avec différentes bases organiques caractéristiques.

b) On sait qu'il existe d'autre part des complexes encore indéterminés dans les chloroplastes: ceux de la chlorophylle avec des protéines. De nombreux travaux ont été réalisés dans ce domaine et de tels complexes n'ont jamais pu être extraits (72 à 78). Le type de liaisons en est encore inconnu.

Nous envisageons les expériences sous l'angle suivant: le Magnésium serait lié aux groupements pyrroliques par liaisons bi-pôles ou tripôles, ce dont il a déjà été discuté plus haut (chapitre VII), laissant 2 ou 1 valence libre. Ceci nous rapproche du cas de l'hème, qui, possédant un atome de Fer lié à 4 pyrroles possède encore 2 valences libres (le nombre de coordination étant 6). C'est pourquoi nous avons entamé cette recherche par l'essai de formation de complexes avec les amino-acides ou les bases organiques qui se combinent à l'hème. Les nouveaux complexes éventuellement formés pourraient avoir aussi une influence sur la formation de phéophytine, puisqu'ils seraient formés par liaison à l'atome de Magnésium. Ils pourraient aussi posséder des caractéristiques spectrales propres, qui fourniraient un moyen d'identification spectrophotométrique.

c) Nous avons vu au chap.VI que la chlorophylle pouvait former des complexes avec des corps organiques, ceux-ci ayant une action nette sur la photooxydation. Cependant, on a vu qu'ils n'ont aucune influence sur la formation de phéophytine. Ils constituent un problème très différent de celui que nous envisageons ici.

Remarque

Nous allons exposer en même temps les recherches impliquées dans les paragraphes a et b, qui donnent lieu à des expériences très semblables.

Conditions expérimentales

On établira la formation de complexes par des méthodes semblables à celles utilisées lors de l'étude des chélates métalliques. Un corps, quel qu'il soit, fixé soit sur le Magnésium, soit en remplacement du Magnésium, pourra être déterminé par un déplacement éventuel du spectre de la chlorophylle ou de la phéophytine. Un déplacement constitue une preuve de la formation d'un complexe. De même, une augmentation de la stabilité ou de la coloration sera indiquée par examens comparatifs des spectres par rapport à un témoin. Il sera nécessaire de travailler à divers pH, réalisant notamment une destruction ménagée de la chlorophylle en milieu acide, comme nous l'avons fait pour les chélates métalliques. On comparera après chaque expérience les spectres d'une solution témoin et d'une solution contenant le corps organique expérimenté, les traitements étant rigoureusement identiques quant au pH, à la température, à la durée de l'expérience.

Les essais sont faits avec les deux chlorophylles pures en solution, et avec un tampon identique à celui des expériences précédentes (acide citrique - acétate de Magnésium).

- - -

2) Effet des bases organiques

Des essais ont été réalisés avec les bases organiques suivantes:

a) Amines aliphatiques (primaires, secondaires, tertiaires, et ammonium primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire):

méthylamine, diméthylemine, triméthylamine, diéthylamine, nitrosodiméthylamine, octylamine et hexadécylamine; choline, détergents cationiques industriels du nom de: aminol, onyx, roccal (chlorures d'alkyl - diméthyl - benzyl - ammonium) et émulsept (où le benzyl est remplacé par un pyridinium).

b) diamines et polyamines: éthylène diamine et guanidine.

c) Alkanolamines: méthanolamine, monoéthanolamine, diéthanolamine, morpholine, triéthanolamine.

d) Composés azotés cycliques: pyridine, 2-aminopyridine, gamma-picoline, acide nicotinique, nicotinamide, diaminobenzidine, acide para-aminobenzoïque, aminodiméthylbenzène, aniline, diméthylaniline, paranitrosodiméthylaniline, pyrazole, amidopyrazoline, pyrrol, pyridoxine, pyridoxamine, aminoquinoléine, diphénylguanidine, guanine, xanthine, caféine, imidazole, indole.

RESULTATS

=====

1°) Les résultats des expériences ayant trait à l'imidazole, et à l'indole, seront détaillés, étant donné le rapprochement, avec les résultats des expériences du paragraphe 3).

2°) Parmi tous les autres produits expérimentés, les seuls donnant un résultat caractéristique vis-à-vis du témoin sont:

aminol, onyx et roccal. Ces produits qui constituent des détergents cationiques industriels, sont des dérivés d'Ammonium quaternaire. En solution à 0,5%, mélangés à la chlorophylle (5mg. par litre) ils ont un effet sur la formation de phéophytine. Comme le montre le graphique IX, fig.4, page 82, il se forme à pH = 5,5, et par chauffage de la chlorophylle a pendant 60 minutes à 100°C, moins de phéophytine que dans une solution témoin traitée dans les mêmes conditions. Ceci est déterminé par un dosage à 5.370A° et à 6.650 A°. Le maximum d'absorption dans la région rouge du spectre a une intensité très faible. Quoiqu'aucun déplacement du spectre ne soit constaté, on peut rapprocher ces résultats de ceux fournis par les ions Na⁺, K⁺ et NH₄⁺.

Il se forme aussi, semble-t-il, des chélates ioniques dont l'absorption est faible dans la région rouge. Par ailleurs, les détergents n'ont un effet de chélation, que pour autant qu'ils soient en solution en quantité suffisante (à 0,01%, on n'obtient aucun résultat.) De plus, la stabilité des chélates est très faible. Aucune chélation n'est constatée à des pH au-dessous de 5.

Il est significatif que l'émulsept ne donne aucun résultat. Il diffère seulement par un noyau pyridinium.

- - -

3) Effet des amino-acides et dérivés.

(en relation avec les complexes "hème-histidine", etc...)

Les divers amino-acides ont été expérimentés. Des résultats caractéristiques sont fournis par:

a) l'histidine:

Dans certaines conditions strictes, l'histidine modifie considérablement le spectre de la chlorophylle ou de la phéophytine. Des solutions de chlorophylle a, contenant un cristal d'histidine, sont chauffées durant 60 minutes à 100°C. Les pH des solutions s'échelonnent entre 3 et 7. Les résultats sont obtenus par comparaison avec des témoins identiques et traités dans les mêmes conditions.

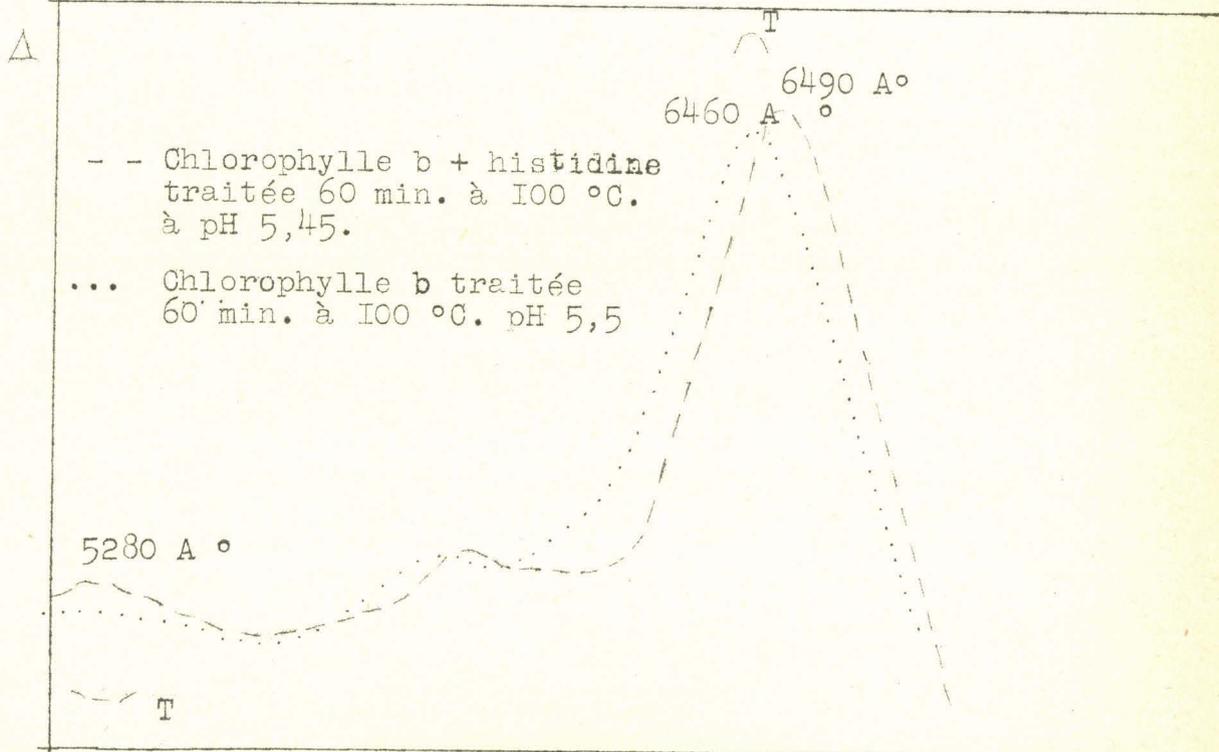
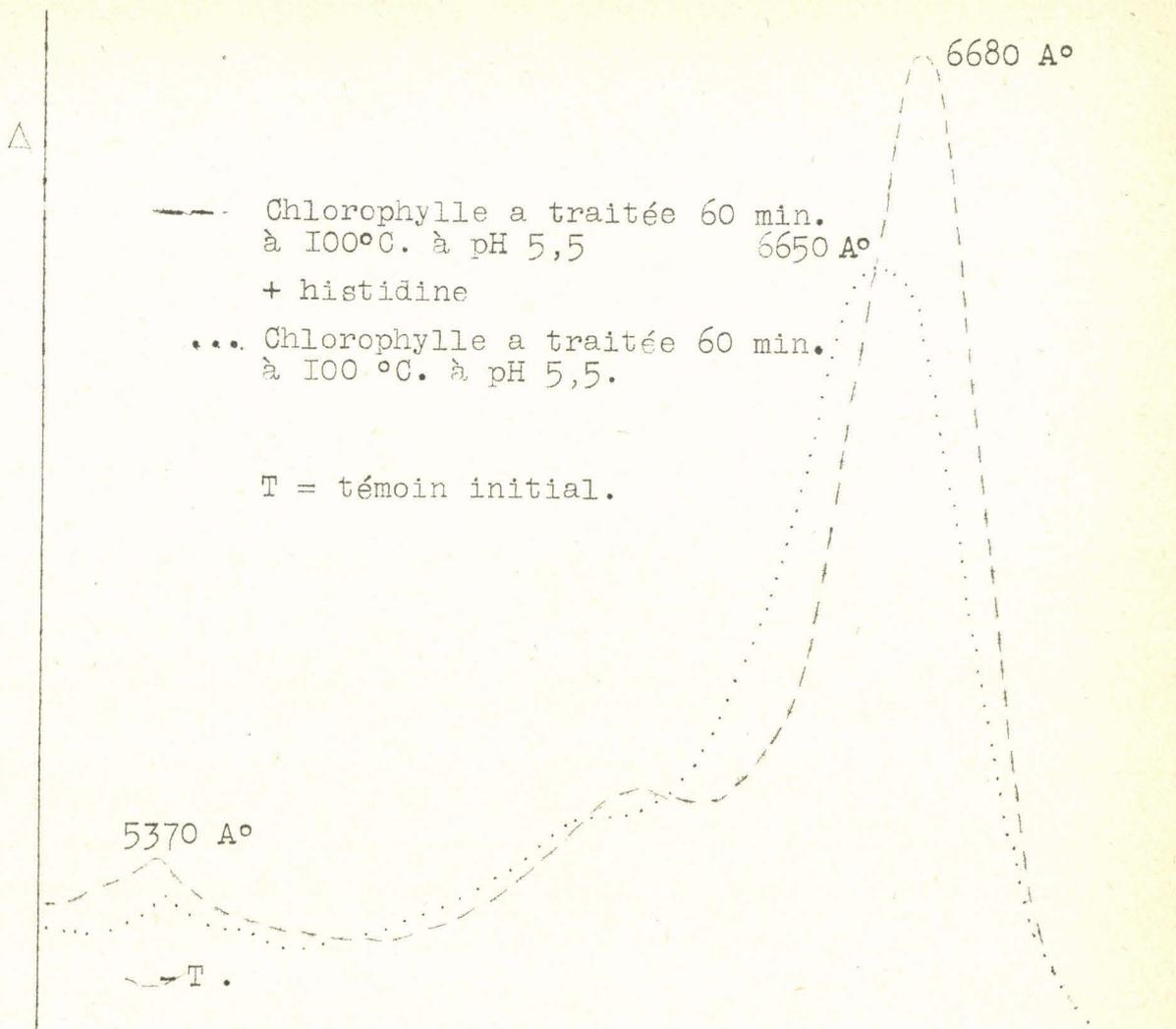
RESULTATS

=====

1°) Pour des pH situés entre 5 et 6,5, l'absorption dans la région rouge du spectre est nettement plus intense lorsque la solution contient de l'histidine.

2°) Un déplacement peu accusé (30 Å environ) du maximum rouge d'absorption se marque par rapport au témoin pour les solutions contenant de l'histidine et dans les conditions du paragraphe 1°).

3°) A une augmentation de l'intensité d'absorption dans la région rouge du spectre correspond une légère augmentation des autres maxima (notamment ceux de la phéophytine).



Expériences complémentaires

Des expériences complémentaires furent réalisées afin de préciser et de confirmer les résultats obtenus, dont un exemple est donné au graphique X, page 94, fig.1, dans le cas de la chlorophylle a.

Les nouvelles expériences sont caractérisées par des modifications des facteurs suivants: température et durée.

On peut en conclure facilement que l'histidine a un effet positif (modification du spectre) lorsqu'il reste en solution une certaine quantité de chlorophylle, après l'expérience. L'histidine est sans action lorsque les conditions expérimentales sont telles que toute la chlorophylle soit dégradée. (par exemple, lors d'un chauffage de chlorophylle a pendant 120 minutes à pH = 5,5, et à 100°C)

D'autre part, le milieu doit être légèrement acide: pH = 6,5 au maximum.

Des expériences du même type ont été réalisées avec la chlorophylle b. Les résultats sont encore positifs, mais cette fois, l'augmentation de l'intensité d'absorption est moins nette.

Le graphique X, fig 2, révèle cependant un effet caractéristique de l'histidine.

-

Interprétation des résultats

Quelles conclusions pouvons-nous tirer de cette série d'expériences?

1°) dans certains cas, l'histidine peut former des complexes plus colorés que les témoins traités dans les mêmes conditions comme l'indique l'absorption de la région rouge du spectre.

2°) La preuve d'un complexe chlorophyllea- histidine ou phéophytinea- histidine est fournie par le déplacement du maximum d'absorption de la chlorophylle et de la phéophytine de $6.650 \text{ \AA}^{\circ}$ à $6.680 \text{ \AA}^{\circ}$ lorsque les solutions sont traitées en présence d'histidine dans les conditions adéquates. L'histidine n'absorbe aucunement la lumière dans ses longueurs d'onde et ne peut interférer. Pour la chlorophylle b, déplacement du maximum de $6.460 \text{ \AA}^{\circ}$ à $6.490 \text{ \AA}^{\circ}$.

3°) Il est étonnant de constater qu'à une absorption plus forte dans la région rouge en présence d'histidine correspond aussi une absorption plus intense aux deux maxima de la phéophytine: à $5.050 \text{ \AA}^{\circ}$ et $5.370 \text{ \AA}^{\circ}$ après traitement de la chlorophylle a et au maximum situé à $5.280 \text{ \AA}^{\circ}$ après traitement de la chlorophylle b. Ceci est évidemment paradoxal s'il s'agit d'une chélation, étant donné que dans les conditions expérimentales, la réaction de destruction est monomoléculaire: toute la chlorophylle détruite correspond à une même quantité de phéophytine formée. Il n'est jamais possible d'avoir en solution une plus grande quantité de chlorophylle et de phéophytine que dans le témoin de comparaison.

C'est pourquoi on peut émettre les hypothèses suivantes:

a) On sait que l'histidine se fixe dans tous ses complexes soit par liaison covalente soit par liaison ionique. Si on ad-

met qu'il reste une valence libre sur l'atome de Magnésium de la chlorophylle, il se pourrait que l'histidine se fixe sur celui-ci. On se rapproche ainsi des complexes "hème-histidine" dont on a prouvé l'existence. Par analogie encore avec ces complexes, la fixation de l'histidine (79) entraînerait une augmentation de l'absorption dans toute la région visible du spectre. Ceci expliquerait l'augmentation d'absorption aux trois maxima cités.

Un autre argument existe en faveur d'un complexe histidine-chlorophylle: lorsque toute la chlorophylle est détruite au cours de l'expérience, l'histidine est sans effet. Dans ce cas, le phénomène serait logique, s'il s'agit d'une fixation au Magnésium. L'atome de Magnésium étant arraché de la molécule de chlorophylle, l'histidine redeviendrait libre et ne pourrait plus influencer le spectre.

β) Une autre hypothèse permise est celle de la formation d'un complexe histidine - phéophytine, c'est-à-dire dû au remplacement du Magnésium par l'histidine par un phénomène semblable à celui de la formation des chélates métalliques. Pour expliquer l'augmentation d'absorption aux divers maxima, le nouveau complexe formé devrait avoir une absorption plus intense que celle de la chlorophylle à ces longueurs d'onde. Mais alors, il serait difficile d'expliquer pourquoi l'histidine est sans effet lorsque le traitement est tel que la chlorophylle soit convertie en phéophytine. C'est pourquoi il nous semble plus probable que l'histidine soit fixée au Magnésium.

Nouvelles preuves d'un complexe "histidine-chlorophylle"

L'histidine ne pourrait être fixée à l'atome de Magnésium que si celui-ci possède au moins une valence libre. Par conséquent, s'il est possible de montrer que l'histidine ne se fixe pas sur le chélate de Cu-phéophytine, qui ne possède pas de valence libre, le résultat serait très en faveur de l'hypothèse émise. En effet, on sait que le Cuivre, dont le nombre de coordination est 4, est fixé aux 4 pyrroles de la molécule.

D'autre part, il est aussi intéressant de montrer que l'histidine ne pourrait se fixer sur la phéophytine. Ceci constituerait presque une preuve de la proposition avancée, pour autant que toutes les conditions expérimentales soient absolument identiques à celles des essais sur la chlorophylle.

Conditions expérimentales

Une solution de phéophytine a, obtenue par acidification d'une solution de chlorophylle a, à pH 2 environ, par de l'acide citrique, est alcalinisée jusqu'à pH 5,2 par de l'acétate de Magnésium. Une fraction A de cette solution est destinée aux essais relatifs à la phéophytine. Une autre fraction B est additionnée d'un cristal de chlorure cuivrique et placée au bain-marie, à 50°C pendant 5 heures, à l'abri de la lumière. On a vu que dans ces conditions, la plus grande partie de la phéophytine a est

transformée en chélate de Cuivre.

Ensuite, une moitié de chacune des fractions A et B est additionnée d'un cristal d'histidine. Chacune des autres moitiés constitue un témoin. Les quatre solutions sont chauffées en ampoule de verre pendant 60 minutes, à 100°C, refroidies et étudiées au spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions, on sait que la chlorophylle forme un complexe avec l'histidine, tandis que les résultats fournis par le chélate de Cuivre et par la phéophytine sont négatifs.

En conclusion, il apparaît très probable que l'histidine se fixe sur l'atome de Magnésium.

b) le tryptophane et la proline:

des expériences semblables à celles qui ont été réalisées avec l'histidine ont donné des résultats très semblables, pour le tryptophane et la proline:

dans certaines conditions de durée et de température, de pH, se constate une augmentation de l'intensité d'absorption aux divers maxima de la chlorophylle et de la phéophytine. Cependant, aucun déplacement de la bande rouge du spectre n'est constaté. Les conclusions sont les mêmes que dans le cas de l'histidine.

c) Le glyocolle et la tyrosine:

Le glyocolle ou la tyrosine semblent donner des résultats positifs en ce sens que dans certaines conditions, la bande rouge

est légèrement déplacée vers de plus grandes longueurs d'onde. Toutefois, le déplacement est très minime et il ne se constate aucune augmentation de l'intensité d'absorption. C'est pourquoi nous ne considérons pas ces résultats comme absolument significatifs.

Les autres amino-acides, aliphatiques ou cycliques, ne donnent aucun résultat.

d) Expériences complémentaires:

Etant donné les résultats positifs obtenus dans le cas de l'histidine, et du tryptophane, et étant donné la similitude entre ces résultats et ceux que l'on obtient avec l'hème, il était intéressant d'envisager les corps suivants:

L'imidazole (qui constitue le noyau de l'histidine)

L'indole (qui constitue le noyau de tryptophane)

La caféine et la pyridine, (qui se combinent à l'hème)

L'imidazole: donne des résultats caractéristiques. La chlorophylle a réagit dans les conditions expérimentales énoncées antérieurement en formant en présence d'imidazole une bande d'absorption à 6.600 Å°. L'intensité de l'absorption est beaucoup plus faible que celle du témoin. Il semble qu'un complexe soit formé.

L'indole: L'indole donne des résultats positifs en ce qui concerne l'intensité d'absorption, mais infiniment moins nets que ceux du tryptophane.

La caféine et la pyridine: ces corps ont été expérimentés lors de la première série d'essais en même temps que diverses bases organiques, sans résultat.

-

Nous avons encore procédé à une dernière série d'expériences avec l'histidylhistidine, qui conduit à un effet semblable à celui de l'histidine, quoique moins net, mais ceci est probablement dû à une question d'encombrement stérique.

- - -

En conclusion, il est caractéristique que les amino-acides présentent l'action la plus nette sur la chlorophylle. Les complexes formés sont probablement directement en relation avec les complexes chlorophylle-protéines des plastes, scindés à l'extraction.

Il serait intéressant, lors de recherches ultérieures, d'analyser l'effet des peptides et des protéines sur la chlorophylle en solution.

- - -

CHAPITRE IX
REACTIONS DE LA CHLOROPHYLLE DANS LES
VEGETAUX

I. Intérêt pratique

Nous avons dit, au début de ce travail, qu'il existe certaines différences dans la constitution de la chlorophylle telle qu'on l'obtient par extraction, et telle qu'elle se présente dans les chloroplastes. Il est donc intéressant de soumettre des végétaux à des traitements semblables à ceux que nous avons fait subir à la chlorophylle en solution. D'autre part, l'importance de la dégradation de la chlorophylle lors des traitements technologiques de l'industrie de la conserve est très grande. En effet, le problème de la décoloration n'a pas encore trouvé de solution pratique, si ce n'est le reverdissement au Cuivre, difficilement admis.

Certains auteurs ont étudié la formation de phéophytine (80-81) en relation avec ce problème, dans des conditions de traitement courantes, et notre but est:

a) d'étudier d'une part l'effet de cations, organiques et inorganiques sur des végétaux verts traités à la chaleur, par des procédés semi-industriels semblables à ceux de l'industrie de la conserve.

b) d'étudier les variations anormales de coloration de végétaux verts, et les produits obtenus, par traitements thermiques particuliers.

2) Méthode d'extraction

Après traitement des végétaux, les pigments doivent être extraits pour permettre l'analyse spectrophotométrique.

Il est rationnel d'utiliser la méthode qui nous a servi à obtenir la chlorophylle pure. Toutefois, dans le cas de l'extraction des pigments après traitement thermique, celle-ci donne lieu à des difficultés. La quantité d'eau que contiennent les végétaux traités par l'industrie de la conserve est en effet trop importante et empêche toute extraction directe à l'acétone. C'est pourquoi nous avons prévu les modifications suivantes à la méthode originale:

environ 20 gr. (pesés avec précision dans le cas d'un dosage quantitatif) de produits traités sont filtrés sur Büchner, avec 100 cm³ d'acétone.

La dessiccation par l'acétone est ainsi facilement obtenue. Le produit essoré est repris et traité au micro-broyeur à couteaux avec 100 cm³ d'acétone et un peu de carbonate de Magnésium. On filtre à nouveau, lave à l'acétone, mélange les deux filtrats et fait passer dans l'éther d'après la méthode originale. L'extraction est pratiquement totale.

3) Méthodes d'analyse

Lors d'une étude spectrophotométrique, il n'est pas nécessaire de réaliser au préalable une séparation chromatographique des pigments. En effet, nous avons vu qu'il est possible de déterminer les chlorophylles et les phéophytines dans le mélange. On sait que chacune des deux chlorophylles réagit de la même façon. Seuls diffèrent les coefficients. Pour permettre un dosage comparé de la formation de phéophytine, nous opérons de la façon suivante: on sait qu'avec la formation des phéophytines a et b, un maximum d'absorption commun croît à 5.300 \AA , tandis que le maximum commun aux deux chlorophylles, à 6.500 \AA , décroît au cours de la formation de phéophytine. Ceci permet donc d'établir avec une certaine précision un degré de destruction si nous établissons le rapport des densités optiques obtenues à ces deux maxima. La précision est même plus remarquable étant donné que pour un seul produit de destruction, les valeurs varient en sens inverse.

De plus, dans le cas de réactions avec des métaux, le spectre complet de la région visible est tracé afin de noter d'éventuels déplacements des maxima.

4) Expériences

a) Effet des cations

Des essais semi-industriels ont été réalisés à l'INACOL (Institut National pour l'Amélioration des Conserves de Légumes), Wesembeek, Belgique, dans les conditions suivantes:

1°) des végétaux (épinards) ont été traités avec différents

sels métalliques et des bases organiques.

2°) Les doses variaient entre 25 et 200 p.p.m.

3°) Les traitements thermiques subis étaient ceux prévus par le barème de l'Industrie de la Conserve, notamment avec blanchiment à 67°, qui permet des résultats plus nets.

4°) L'examen des boîtes a été réalisé à diverses époques, entre trois mois et un an après les essais (stockage à 20°C)

RESULTATS

=====

Nous résumons en un tableau pour chaque série d'essais caractéristiques les résultats importants, c'est-à-dire:

la coloration par rapport au témoin

le rapport $I_{5.300 \text{ \AA}}^V / I_{6.500 \text{ \AA}}^R$ des intensités d'absorption aux maxima cités.

Eventuellement, nous notons un déplacement de maxima d'absorption, ce qui indique la formation de chélate

1ère série d'essais

Métal	I^V/I^R	Coloration	pH	Max.abs.
témoin	1) 0,265 2) 0,270	brun-vert	5,6	6.500 \AA°
Fer Ferreux	1) 0,324 2) 0,314 3) 0,330	Beaucoup plus vert	5,55	6.500 \AA°
Chrome	0,252	un peu plus vert	5,65	6.500 \AA°
Sodium	0,270	un peu plus pâle	5,55	6.500 \AA°

Discussion

En ce qui concerne le Fer ferreux, le rapport des intensités d'absorption concorde avec les résultats obtenus dans le cas de la chlorophylle pure. D'autre part, la coloration indique nettement la formation d'un chélate. Le Chrome semble conduire à la formation d'une quantité légèrement moindre de phéophytine que dans le témoin. Il semble qu'un chélate soit formé. Le Sodium ne permet pas de conclusion précise. Il semble qu'il ne forme pas de chélate.

2ème série d'essais

Métal ou Base I^V/I^R	Coloration	pH	Max.abs.
témoin	0,173 brun-vert	5,58	6.500 Δ°
Cuivre	0,138 le plus vert	5,42	6.400 Δ°
Cobalt	0,210 = témoin	5,55	6.500 Δ°
Etain	0,180 = témoin	5,52	6.500 Δ°
Zinc	0,150 très vert	5,48	6.500 Δ°
Fer ferrique	0,200 un peu plus vert que t.	5,5	6.500 Δ°
Nickel	0,175 = témoin	5,5	6.500 Δ°
Aminol	0,180 très pâle (jaunâtre)	5,6	6.500 Δ°

Discussion

Le Cuivre forme un chélate très coloré et la preuve en est aussi fournie par le déplacement du maximum. Il se forme moins de phéophytine.

Le Cobalt formerait aussi un chélate: l'absorption dans le rouge est beaucoup plus faible que celle du témoin. L'Etain ne forme pas de chélate.

Le Zinc forme un chélate très coloré. Il se forme peu de phéophytine.

Le Fer ferrique donne des résultats beaucoup moins nets que le Fer ferreux. Il est possible qu'il forme un chélate, mais il s'agit plus probablement d'une chélation due à une petite quantité de Fer ferreux.

Le Nickel ne forme pas de chélate.

L'Aminol donne des résultats semblables à ceux obtenus dans le cas de la chlorophylle pure. L'absorption très faible dans la région rouge indique un chélate très peu coloré.

-

b) Essais spéciaux

Ces essais sont relatifs à l'amélioration de la coloration d'épinards en conserve qui peut être obtenue par des modifications dans les durées de blanchiment et les températures de blanchiment et de stérilisation. On avait remarqué que le blanchiment à 67°C avait pour effet une nette amélioration de coloration par rapport au blanchiment à 100°C.

Diverses boîtes ont été analysées et le tableau suivant donne les valeurs de I^V/I^R pour chacune de ces boîtes.

La température de stérilisation est de 115°C.

Les durées de stérilisation varient entre 30 et 180min.

Les durées de blanchiment à 65° varient entre 5 et 60 min.

	3' à 65°	30' à 65°	60' à 65°
30' à 115°	↓ 0,33 →	0,315	0,310
60' à 115°	0,340	-	0,355
180' à 115°	0,470	0,470	0,425

Discussion

Les rapports obtenus confirment entièrement l'augmentation du pourcentage du phéophytine avec le temps de stérilisation.

Par contre, il est remarquable que le pourcentage de formation de phéophytine varie en sens inverse de la durée de blanchiment.

D'autre part, en ce qui concerne la coloration, celle-ci augmente dans le sens indiqué par les flèches.

Il est paradoxal que lors d'un blanchiment à 65°, la coloration soit plus verte lors d'un temps de stérilisation plus long ou de blanchiment plus long.

Il semble donc que d'autres phénomènes interviennent, qui sont indépendants de la formation de phéophytine. Ces phénomènes restent inexpliqués et feront probablement l'objet d'études complémentaires réalisées à l'INACOL au cours des saisons prochaines.

CONCLUSION GENERALE

- 1) Nous avons précisé les cinétiques de formation de phéophytine en milieu acide.
- 2) Nous avons étudié les cinétiques de formation de chlorophyllide en milieu alcalin.
- 3) Nous avons montré l'effet de certains stabilisants sur la photooxydation de la chlorophylle.
- 4) Nous avons étudié la formation des divers chélates métalliques de phéophytine et leurs stabilités respectives.
- 5) Nous avons montré dans quelles conditions des aminoacides ou des bases organiques pouvaient se complexer avec la chlorophylle. Nous avons montré les relations entre ces complexes et les liaisons possibles de l'atome de Magnésium.
- 6) Nous avons réalisé en regard avec les expériences portant sur la chlorophylle pure, des essais semi-industriels ayant trait à des végétaux.

- - -

BIBLIOGRAPHIE

- 1) GRIGNARD - Traité de Chimie organique. I9, 229 (1942)
- 2) WILLSTAETTER et MIEG - Ann. 350 (1906)
- 3) - et STOLL - Untersuchungen über Chlorophyll
Berlin (1913)
- 4) - et PAGE - Ann. 406, 237 (1914)
- 5) FISHER et TREIBS - Ann. 466, 264 (1928)
- 6) - TREIBS et WIEDERMANN - Ann. 575, 241 (1929)
- 7) - WEICHMAN et ZEILE - Ann. 575, 241 (1929)
- 8) - et WENDEROTH - Ann. 537, 170 (1938)
- 9) CONANT et HYDE - J.A.C.S., 51, 3668 (1929)
- 10) STOLL et WIEDERMANN - Naturwiss. 20, 628 (1932)
- 11) - - - Helv. Phys. Acta, 15, 128 (1932)
- 12) TSWETT - Ber. Dtsch. Botan. Ges. 24, 384 (1906)
- 13) WINTERSTEIN et STEIN - Z. Physiol. Chem. 220, 263 (1933)
- 14) MACKINNEY - J. Biol. Chem. 132, 91 (1940)
- 15) ZSCHEILE et COMAR - Plant. phys. 17, 198-209 (1942)
- 16) GODNEV, TERENCEV et PARMON - Invest. Akad. Nauk Bielo. Russ.
SSSR 3, 75-79 (1948)
- 17) ZSCHEILE, COMAR and HARRIS - Plant Phys. 19, 627-37 (1944)
- 18) LE ROSEN - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 14, 165 (1942)
- 19) ARONOFF - Adv. Food Research, IV, 150 (1953)
- 20) MACKINNEY - J. Biol. Chem. 140, 315-22 (1940)
- 21) ZSCHEILE, COMAR and HARRIS - Plant Phys. 19, 627-37 (1944)
- 22) MASOOD, SIDDEI et QURESCHI - J. Osmania Univ. 7, 1-4 (1939)
- 23) BUKATSCH - Z. ges. Naturw. 8, 79-86 (1942)
- 24) BOSE et BATTACHARIA - Ann. Bioch. and Exptl. Med. (India) 5, 7-10
(1945)
- 25) MANN TB - Analyst, 69, 34-39 (1944)
- 26) ZSCHEILE and COMAR - Bot. Gaz. 102, 463-81 (1941)
- 27) MACKINNEY - J. B. Chem. 132, 91-109 (1940)
- 28) ZSCHEILE - Botan. Revue 7, 587-648 (1940)
- 29) PETERING et coll. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 236 (1941)
- 30) - - - - - 12, 148-51 (1940)
- 31) GOODWIN - Anal. Chem. I9, 789-94 (1947)

- 32) GRIFFITH and JEFFREY - Ind.Eng.Chem.Anal.Ed., 16, 438-40 (1945)
- 33) ZSCHEITL, COMAR and MACKINNEY - Botan.Gaz. 102, 163-81 (1942)
- 34) COMAR Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 877-79, (1942).
- 35) MACKINNEY - Plant Phys. 13, 427-30 (1938)
- 36) ARONOFF - Adv. Food Research, vol. IV, 154 (1953)
- 37) EGLE - Stitzber. Heidelberg. Akad Wiss. Math. Naturw. Klasse I
Abh 19-30
- 38) HARRIS and ZSCHEITL - Bot.gaz. 104, 505-27
- 39) ARONOFF - Adv. Food Res., vol. IV, 164 (1953)
- 40) MACKINNEY et JOSLYN - J. Am. Chem. Soc. 62, 231-2 (1940)
- 41) MACKINNEY - J. Am. Chem. Soc. 63, (1941)
- 42) BERTHOUD - Précis de Physico-Chimie
Paris, Gauthier-Villars (1945), p.337
- 43) STRAIN - Chromatographic adsorption analysis
New-York, Interscience Publishers (1945)
- 44) CASSIDY - Adsorption and Chromatography
New-York, Interscience Publishers (1951)
- 45) BENNE - J. Assoc. Agric. Chem. 25, 573-91 (1942)
- 46) GILMAN - Organic chemistry
Iowa, State College Press, p. 1868
- 47) MORGAN et DREW - J. A. C. S. 117, 1457 (1920)
- 48) PAULING - Nature de la liaison chimique
Paris, p.307 (1941)
- 49) GILMAN - Organic Chemistry
Iowa, State College Press, p. 1877
- 50) MARTELL et CALVIN - The Chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall (1952)
- 51) PAULING - The nature of the chemical bond
New-York, Cornell University Press, Ithaca (1940)
- 52) MARTELL et CALVIN - The Chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall p.176 (1952)
- 53) - - - The Chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall, p.205 (1952)
- 54) RUBEN et coll. - J. Applied Phys. 12, 308 (1941)
- 55) - - - J. Phys. Chemistry, 46, 710 (1942)
- 56) MARTELL et CALVIN - Chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall, p. 225 (1952)

- 57) RUBEN et coll. - J.A.C.S. 64, 2297 (1942)
- 58) ARONOFF - Chem.Rev. 47, 175 (1943)
- 59) CONWAY - Electrochemical Data
London, Elsevier, (1952)
- 60) SMITH and coll. - J.Am.Chem.Soc. 62, 1669 (1940)
- 61) - - - - 63, 3071 (1941)
- 62) - - - - 64, 1650 (1942)
- 63) MAC KENZIE et coll. - J.Proc.Roy.Soc.NS Wales 78, 70 (1944)
- 64) BARNES et DOROUGH - J.Am.Chem.Soc. 72, 4045 (1950)
- 65) BABAEVA et coll. - Doklady Akad.Nauk. SSSR, 64, 223 (1949)
- 66) MARTELL et CALVIN - The chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall, p. 191 (1952)
- 67) - - - The chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall, p.205 (1952)
- 68) MELLOR et MALEY - Nature, 159, 370
- 69) MELLOR et MALEY - Nature, 161, 436
- 70) ASHKINAZI et GLIKMAN - Doklady Akad Nauk SSSR, 73, 743-6 (1950)
- 71) - - - - Ukrain.Khim.Zhur, 18, 49-54 (1952)
- 72) a- RABINOWITCH et WEISS - Nature, 138, 1098 (1936)
b- OSIPOVA - Trudy Inst.Fiziol.Rasetenii im.K.A.Timiryazeva
1, 57-66 (1953)
- 73) OSIPOVA - Doklady Akad.Nauk.SSSR 57, 371-4 (1947)
- 74) - - - - 74, 979-81 (1950)
- 75) MOMMAERTS - Magyar Biol.Kutatointezet Munkai 15, 468 (1943)
- 76) GRANICK et PURTER - J.Botany, 34, 545-50 (1947)
- 77) MOYER et MYER FISHMAN - Botan.Gaz. 104, 449-54 (1943)
- 78) SMITH - Chronica Botan. 7, 148-49 (1942)
- 79) MARTELL et CALVIN - The chemistry of the metal chelates
compounds. Prentice Hall, p.215 (1952)
- 80) DUTTON - Ind.Eng.Chem. 35, 1173-77 (1943)
- 81) MACKINNEY et WEAST - Ind.Eng.Chem. 32, 392-95 (1940)
- 82) URBOSKI - Arkiv. Kem. 23, 187-97 (1951)
- 83) - - - - 22, 101-25 (1950)
- 84) VALLINO - Handbuch der Preparativener Chemie. Edwards Bros.
Michigan (1943)
- 85) ARONOFF - Adv.Food Res. vol.IV, p.165 (1953)
- 43) b- ARONOFF et MACKINNEY - J.A.C.S. 65, 956 (1943)

2è Thèse:

" LA LIPOXYDASE OU L' OXYDASE
DES ACIDES GRAS INSATURES "

Vu et permis d'imprimer

Lille, le 3 mai 1955

Le Recteur de l'Académie de Lille

Vu et approuvé

Le 29 avril 1955

Le Doyen de la faculté
des sciences