

Rôle des métaux de transition (fer, cuivre, manganèse) dans la genèse des phytomélanines des feuilles sénescentes

par M. TRÉMOLIÈRES* et R. CARBIENER*

RÉSUMÉ

Des systèmes oxydo-réducteurs enzymatique et chimique (polyphénoloxydases et polyphénols) persistent dans les feuilles d'automne, même après la chute. Ces systèmes sont plus efficaces en présence des métaux de transition comme le Cuivre, le Fer et le Manganèse. Les résultats obtenus peuvent s'interpréter, dans le cas du Cuivre, par un rôle au niveau du site actif des polyphénoloxydases, dans le cas du Fer et du Manganèse par formation de complexes plus réducteurs que le métal ou le ligand seul. Or, les phytomélanines foliaires participent notablement à la genèse des humus des sols.

ZUSAMMENFASSUNG

Das herbstliche Fallaub vieler Laubbäume enthält oxydoreductive Systeme in Form von Enzymen (Polyphenoloxydasen) und polyphenolischen Substraten. Mehrere Metalle (Cu, Fe, Mn) fördern, in den meisten Fällen, die oxydative Polykondensation der Phenole die durch diese Systeme induziert wird. Jedoch ist diese Aktivität nicht katalytischer Art wie öfter angenommen wurde. So scheint im Fall des Kupfers eine Einwirkung auf den aktiven Lokus der Phenolasen (Kupferproteine) vorzuliegen. Im Fall des Eisens und Mangans (reduzierte Formen), ist offenbar die Bildung von polyphenolischen Komplexen für die Aktivierung verantwortlich, da sich diese Metal-komplexe durch erhöhte reduzierende Aktivität auszeichnen. Die Fallaubphytomelanine spielen eine wichtige Rolle in der Genese der organischen Fraktion der Böden.

* Laboratoire de Botanique et Cryptogamie, U.E.R. de Sciences pharmaceutiques, B.P. 10, 67048 Strasbourg Cedex.

I. — INTRODUCTION.

Des systèmes polyphénoloxydases-polyphénols extraits à partir de feuilles sénescents d'arbres forestiers jouent un rôle prépondérant dans les réactions d'oxydation initiant la polycondensation phytomélanique (allomélanique) (TREMOLIERES *et al.*, 1981). Un processus auto-oxydatif, stimuable par alcalinisation, s'y surajoute. Sur des extraits aqueux, on observe in fine la formation de polycondensats mélaniques. Nous avons pu montrer (TREMOLIERES *et al.*, 1982) la rapidité de formation de ces polycondensats phytomélaniques d'origine foliaire, à monomères polyphénoliques (Aréolales...) ou iridoïdes (« pseudo-indicans »). Ces derniers, non encore étudiés de ce point de vue, concernent surtout des plantes herbacées gamopétales. Nous avons ainsi vérifié l'extrême réactivité de la polycondensation oxydative conduisant au noircissement des feuilles de *Lithospermum purpureo-coeruleum* (Borraginacée). Le système consommateur d'oxygène de cette plante herbacée est plus actif encore, dans des extraits aqueux frais in vitro, que ceux du Frêne et du Peuplier que nous avons étudiés, entre autres, en détail (TREMOLIERES *et al.*, 1981). Or, nous avons pu observer par ailleurs que cette plante provoque en peu d'années l'apparition d'un horizon d'humus noirâtre sur des sols carbonatés. La grande propension à engendrer rapidement des polycondensats humiques explique sans doute l'utilisation empirique privilégiée de quelques gamopétales à « iridoïdes » ou polyphénols (Consoudes du genre *Symphytum*, Valérianes du groupe *Valeriana officinalis*) pour le « mulching » en jardinage « biologique ». En effet, les phytomélanines représentent des analogues structuraux et fonctionnels des acides humiques des sols (MANGENOT *et al.*, 1966, JACQUIN *et al.*, 1966, CARBALLAS *et al.*, 1972). Elles participent à la composition des humus des sols ainsi que des dépôts organiques subaquatiques.

Or, dans des travaux de pédologie, on attribue, en géochimie acide (non calcaire), au Fer et au Manganèse, un rôle catalytique dans les réactions d'oxydation de substances phénoliques simples (très voisines des précurseurs mélaniques foliaires). En présence de ces métaux, les acides humiques des sols évoluent vers des polycondensats insolubles de PM élevé, alors que dans des sols déficients en ces métaux, ces acides humiques restent en partie sous des formes solubles de PM faible, ce qui induit des pédogénèses très divergentes, podzoliques ou non.

Le rôle pilote du Fer à cet égard a été mis en évidence par SOUCHIER (1971) au cours d'une étude des processus d'humification sur sol acide : le Fer agit entre autres par insolubilisation de composés phénoliques pauvres en azote (TOUTAIN, 1974). Il joue de ce fait un rôle analogue à celui du Calcium en géochimie calcaire, où cet ion représente un réactif de précipitation d'acides humiques peu condensés (fulvates calciques insolubles). Cependant, les ions Ca^{++} forment avec les polycondensats des précipités par liaison de type salin, alors que les ions Fe^{+++} , ainsi que les ions Al^{+++} forment des complexes vrais insolubles en milieu acide (liaison avec les groupements — COOH et — OH) (PORTAL *et al.*, 1977). Nous montrerons que le Fe^{+++} n'agit que peu, au pH foliaire, sur la polycondensation elle-même. En géochimie silicatée acide, la carence des sols en Fer provoque ainsi la podzolisation : les acides humiques persistent à l'état de molécules solubles de faible PM et percolent à travers les sols en entraînant cations, argiles, métaux. Il avait été montré depuis longtemps que les substances hydrosolubles des litières (acides humiques peu polycondensés) agissent en vecteur du lessivage du Fer par réduction et complexation sous forme de fulvates (chélates) ferreux (LOSSAINT, 1959). On retrouve de même dans les eaux traitées pour la potabilisation des traces de métaux toxiques (Cadmium, Plomb, Zinc) sous des formes liées à la matière organique soluble de faible poids moléculaire. Ce fait pose le problème de traitements supplémentaires éventuels des eaux contenant des traces d'acides humiques (L'HOPITALAULT *et al.*, 1981). Par ailleurs, BRETELLER *et al.* (1981) ont montré que les litières en décomposition de *Spartina alterniflora* (Graminées formant des herbiers au niveau des vases salées du littoral) concentrent des métaux à partir des vases polluées enrichies en ces métaux.

Tous ces travaux confirment donc :

- que les métaux forment des complexes avec les polyphénols humiques ou foliaires, complexes solubles proches des chélates dans les premières phases ;
- que ces complexes ont tendance, en présence d'une quantité suffisante de certains métaux tels le Fer, le Manganèse, à évoluer vers des polycondensats insolubles de PM élevé, alors qu'en cas de carence en métal les complexes solubles de faible PM restent prédominants.

Les auteurs cités, notamment SOUCHIER, concluent à une action catalytique marquée du Fer et du Manganèse dans la polycondensation humique ou phytomélanique au niveau des sols.

Aussi nous a-t-il semblé intéressant d'analyser le rôle de certains métaux dans le cadre de nos travaux sur la polycondensation oxydative des polyphénols foliaires extraits de feuilles automnales d'arbres forestiers.

Ces métaux agissent-ils en catalyseurs vrais ? Sont-ils incorporés dans les mélanines et sous quelle forme ? Un rôle d'activateur enzymatique (ou d'inhibiteur) pourrait également se concevoir, étant donné la présence de **Cuivre** dans le site actif des polyphénol-oxygène-oxydoréductases (métalloprotéines) responsables de la polycondensation, du moins dans la phase initiale.

Notre travail a pour but d'éclaircir quelques-unes de ces questions.

II. — MATÉRIEL ET EXPÉRIIMENTATION.

1. MATÉRIEL.

Les feuilles d'automne de 10 espèces d'arbres feuillus ont été expérimentées : le Peuplier noir (*Populus nigra*, P.N.), le Peuplier « canadien » (*Populus x canadensis*, P.C.), le Peuplier blanc (*Populus alba*, P.A.), le Chêne pédonculé (*Quercus robur* = *pedunculata*, Q.R.), le Charme (*Carpinus betulus*, C.B.), le Noyer (*Juglans regia*, J.R.), l'Aulne (*Alnus glutinosa*, A.G.), le Hêtre (*Fagus sylvatica*, F.S.), le Bouleau verruqueux (*Betula pendula*, B.P.), le Frêne (*Fraxinus excelsior*, F.E.) Toutes les litières proviennent de forêts de plaine poussant sur substrat carbonaté calcique.

Les feuilles récoltées, immédiatement après la chute, encore jaunes, voire même vertes, sont séchées rapidement à la température du laboratoire (19-21 °C), réduites en poudre (Ø mailles du tamis 500 µ), puis conservées à — 20 °C (en congélateur).

2. DOSAGE DES MÉTAUX : Fe, Mn, Cu.

Le Fer, le Cuivre et le Manganèse totaux sont dosés dans 100 ml d'un minéralisant sulfonitrique de 0,1 g de poudre de feuilles. La fraction de ces métaux aisément extractible par l'eau est dosée dans les extraits aqueux de poudres de feuilles à 1%, obtenus par agitation pendant 10 minutes et filtration. On effectue les dosages par absorption atomique sur appareil IL 453 (Instrument Laboratory)*.

3. MESURE DE L'ACTIVITE DE DESOXYGENATION.

Celle-ci nous permet d'évaluer l'intensité de la polycondensation, puisque cette dernière s'accompagne d'une absorption d'oxygène moléculaire.

La mesure est faite en cellule cloise d'un oxygraphe GILSON, à l'aide d'une électrode à oxygène (électrode de Clark). Les conditions opératoires sont les suivantes :

* Nous remercions le laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Pharmacie d'avoir bien voulu réaliser ces dosages.

- Concentration en poudre de feuilles : 2,5 % (p/v) ;
- Température : 25 °C ;
- Tampon phosphate 100mM de pH faiblement acide, 6, ou tampon barbital 5 mM /acide acétique de pH 3 et 5 (réaction enzymatique) ;
- Tampon carbonate-bicarbonate de pH 9 (étude de l'autooxydation).

L'oxygraphe nous donne les enregistrements de la consommation d'oxygène en fonction du temps ; la polycondensation oxydative étant, dans les conditions de pH normales des extraits foliaires (faiblement acides), principalement sous dépendance enzymatique.

Nous étudierons, d'une part, l'action des métaux sur la réaction enzymatique. Mais comme une auto-oxydation des polyphénols est également possible (surtout à pH alcalin), nous étudierons, d'autre part, l'action des métaux sur la polycondensation auto-oxydative.

III. — RÉSULTATS.

1. LES TENEURS EN FER, CUIVRE ET MANGANESE des litières et des extraits aqueux de litières (tableau 1).

TABLEAU 1. — *Teneur en fer, Manganèse et Cuivre de litières et extraits aqueux (%/∞) rapportée au gramme de poudre de feuilles desséchées à la température du laboratoire (20-21 °C).*

TABLE 1. — *Concentration of Iron, Manganese and Copper in leaf litter and extracts expressed as % per gr of dessicated leaf powder*

	P.N.	P.C.	P.A.	Q.R.	C.B.	J.R.	A.G.	F.S.	B.P.	F.E.
Fe total (1) ..	0,33	0,26	0,44	0,51	0,29	0,4	0,6	0,62	0,69	0,38
Mn total (1) ..	0,062	0,046	0,082	0,078	0,047	0,055	0,132	0,085	0,186	0,058
Cu total	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02
Fe extrait (2) .	0,003	0,004	0,003	0,004	0,008	0,007	0,008	0,004	0,010	0,0035
Mn extrait (2).	0,006	0,011	0,007	0,005	0,006	0,011	0,025	0,006	0,06	0,0085
Fe (2) / (1) .. (%)	1	1,5	0,7	0,8	2,7	1,75	1,3	0,6	1,4	0,9
Mn (2) / (1) .. (%)	9,6	24	8,5	6,4	13	20	19	7	32	15

On constate que le Fer se trouve en quantité dix fois plus importante que le Manganèse dans les litières étudiées ; le Cuivre est présent en quantités particulièrement faibles dans toutes les litières. Cependant, 1 à 3 % de Fer seulement passe en solution dans les extraits contre 10 à 30 % du Manganèse, dans nos conditions d'extraction, ce qui tend à établir dans les extraits aqueux une certaine parité entre les deux métaux (en expression pondérale). Le Bouleau, l'Aulne et le Hêtre sont les espèces les plus riches en Fer et Manganèse des dix espèces expérimentées.

On notera que 30 % de Manganèse passe en solution dans les extraits de Bouleau contre 10 % dans les extraits de Peuplier noir. Or, l'activité de désoxygénation biochimique des feuilles de Bouleau est quasi nulle (TREMOLIERES et al., 1977,

1981), au pH foliaire faiblement acide, par suite d'une déficience en phénoloxydases, alors que les feuilles de Peuplier noir sont très actives dans les mêmes conditions (dix fois plus que le Bouleau). Ces faits ne cadrent pas avec l'hypothèse d'une activité catalytique du Manganèse sur la polycondensation (auto-oxydative dans ce cas) en milieu faiblement acide.

2. MISE EN EVIDENCE D'UN ROLE CATALYTIQUE EVENTUEL DES METAUX DE TRANSITION (FER FERRIQUE ET FERREUX, MANGANESE Mn²⁺, CUIVRE CUIVRIQUE) SUR LA POLYCONDENSATION MELANIQUE.

Cette activité a été expérimentée, d'une part, sur des macérats aqueux effectués à froid et contenant des phénoloxydases (réaction enzymatique) et, d'autre part, sur des extraits obtenus à chaud, donc à enzymes dénaturées (auto-oxydation).

2.1. Action des métaux sur la désoxygénation enzymatique :

— Première expérience qualitative d'orientation :

Nous avons testé Mn²⁺, Cu²⁺ sous forme de chlorure et de sulfate, Fe²⁺ sous forme de sulfate, Fe³⁺ sous forme de chlorure à la concentration de 1 g/l (sel). La consommation d'oxygène de suspensions de poudre de feuilles de Peuplier noir, de Bouleau et de Chêne a été mesurée à l'oxygraphe, en présence de ces métaux (fig. 1).

1 g/l (sel de métal) correspond à 2,9 meq/l Cu²⁺ (CuCl₂, 2 H₂O), 2 meq/l Cu²⁺ (CuSO₄, 5 H₂O), 2,5 meq/l Mn²⁺ (MnCl₂, 4 H₂O), 2,9 meq/l Mn²⁺ (MnSO₄, H₂O), 1,8 meq/l Fe²⁺ (FeSO₄, 7 H₂O), 1,2 meq Fe³⁺ (FeCl₃, 6 H₂O).

— Deuxième expérience quantitative :

Les variations d'activité désoxygénante enzymatique des suspensions de poudre de feuilles de Peuplier noir ont été mesurées en fonction de la concentration en ion métallique. Les expériences sont conduites dans le tampon barbital sodique/acide acétique de pH 5, pour le Manganèse, Mn²⁺ (MnSO₄, H₂O) et le Cuivre Cu²⁺ (CuSO₄, 5 H₂O), de pH 3 pour le Fer Fe³⁺ (FeCl₃, 6 H₂O) qui passe à l'état d'hydroxyde en milieu moins acide. Par ailleurs, nous avons vérifié que l'enzyme reste active à pH 3.

Les résultats sont exprimés en vitesse initiale d'oxydation en mg/l/min pour une concentration en poudre de feuilles de 2,5 %, p/v (tableau 2).

TABLEAU 2. — Vitesses initiales d'oxydation (mg/l/min.) des suspensions de poudre de feuilles de Peuplier noir (2,5 %, p/v) en fonction de la concentration en ion métallique (à 25 °C)

TABLE 2. — Initial rates of oxidation (mg/l/min) of Poplar leaf powder suspensions (2,5 %, p/v) as a function of the metal ion concentration (25 °C)

meq/l	Témoin	0,16	0,25	0,5	0,6	1	1,5	2	3	4	5	6
Fe ³⁺ (pH 3)	2	1,9	2	1,9	—	2,3	—	2	—	1,9	—	—
Cu ²⁺ (pH 5)	2,3	—	—	—	2,5	3,3	4,7	6,5	9,6	8,7	8,3	8,0
Mn ²⁺ (pH 5)	2,3	—	—	—	—	2,3	—	—	2,25	—	2,5	—

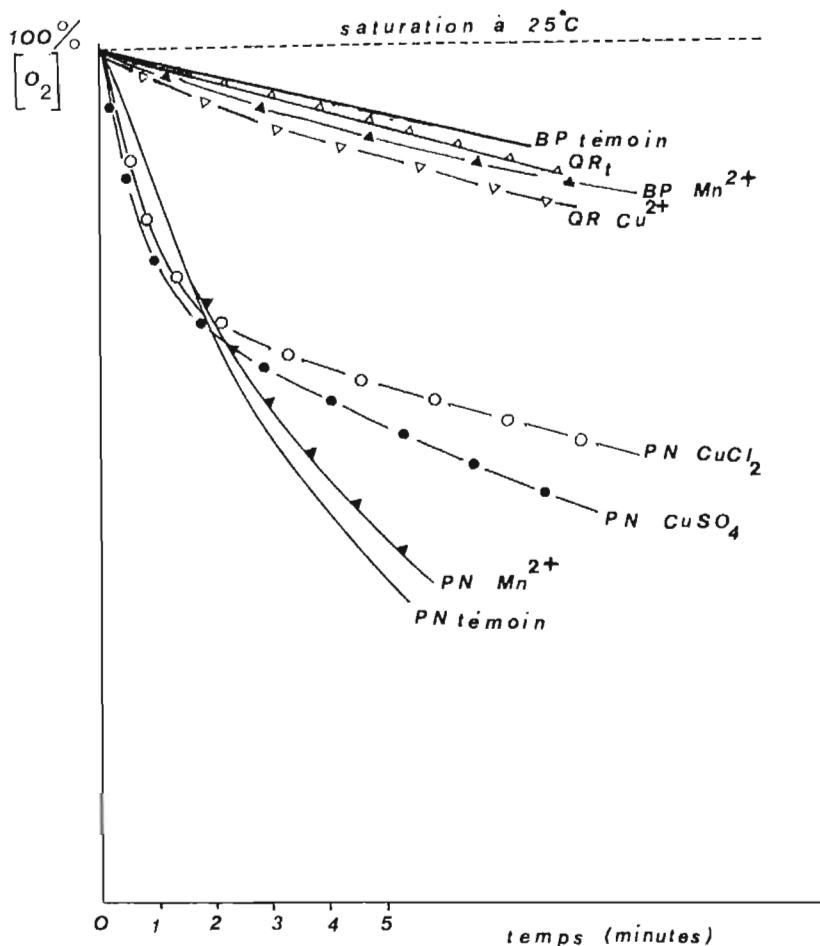


FIGURE I. — Action des métaux de transition ($MnSO_4$, $CuSO_4$, $CuCl_2$ 1 ‰) sur la désoxygénation biochimique de suspensions de poudre de Peuplier noir (P.N.), de Bouleau (B.P.) et de Chêne (Q.R.) à 25° C

FIGURE I. — Action of transition metals ($MnSO_4$, $CuSO_4$, $CuCl_2$ 1‰) on the enzymatic deoxygenation of powder suspensions of black Poplar (P.N.), birch tree (B.P.) and oak (Q.R.) (at 25°C)

2.1.1. Le cas du Cuivre cuivrique :

Dans le cas du Peuplier noir, on constate une activation de la réaction pendant environ une minute, suivie d'un ralentissement très net (fig. I). Par contre, le Cuivre ne modifie pas, à concentration égale, la cinétique de désoxygénation d'une suspension de poudre de feuilles de Chêne.

On sait que la plupart des polyphénoloxydases étudiées jusqu'à présent sont des hétéroprotéines à Cuivre (NICOLAUS, 1968, MALKIN *et al.*, 1970, MAYER *et al.*, 1979). MALKIN *et al.* (1970) ont étudié l'état et la fonction du Cuivre dans des systèmes biologiques tels que les oxydases « bleues » et ils admettent l'hypothèse que le cuivre participerait à des réactions d'oxydo-réduction selon le schéma suivant repris par ROBB (1981) :



L'addition de Cu^{2+} provoque un déplacement rapide de l'équilibre de formation du complexe $E-Cu^+$. L'augmentation de la concentration en $E-Cu^{2+}$ provoque tout d'abord une accélération de la réaction (1) et, par suite, une augmentation de vitesse de la consommation de O_2 . Pour expliquer le ralentissement qui suit, à la même concentration en Cu^{2+} , on pourrait émettre l'hypothèse d'un mécanisme non enzymatique, au niveau du substrat (cf. paragraphe 2.2.2., fig. VI).

L'inhibition de l'activité désoxygénante enzymatique aux fortes concentrations en ions Cu^{2+} (tableau 2) pourrait être expliquée par une dénaturation progressive de l'enzyme, par l'excès d'ions Cu^{2+} . En effet, Cu^{2+} forme des liaisons très fortes avec la plupart des ligands ; en particulier dans son état ionisé, il se lie facilement à l'azote peptidique (CLARKSON et HANSON, 1980). Par sa haute compétitivité au niveau des ligands, c'est un métal potentiellement toxique.

2.1.2. Le cas du Fer ferrique et du Manganèse manganoux :

Ces ions métalliques ne modifient guère la réaction enzymatique de polycondensation oxydative des deux espèces expérimentés à ce titre, Peuplier noir et Chêne pédonculé (en milieu tamponné pH 6 pour Mn, pH 3 pour Fe, fig. II). Cette observation pourrait impliquer que Fe^{3+} et Mn^{2+} n'interfèrent pas avec le site actif de la polyphénoloxydase responsable de la première étape de la polycondensation. De même, TOUTAIN (1974) a constaté que le Manganèse, bien que mieux représenté que le Fer dans les feuilles en géochimie acide (au contraire de nos mesures concernant des feuilles d'arbres croissant sur substrats calcaires) (tableau 1), n'a pas d'effet probant sur les processus d'humification en milieu acide. En revanche, pour cet auteur, le Fer ferrique s'avère être un agent actif d'humification : il favorise l'adsorption et la polymérisation des composés polyphénoliques.

Or, nous n'avons observé aucune influence du Fer ferrique sur l'activité désoxygénante enzymatique. De plus, pour une concentration donnée suffisamment élevée en Fer ferrique (fig. II), on observe au contraire un ralentissement de l'activité. Ceci laisserait supposer la formation rapide de complexes polyphénols-fer ferrique, peu réactifs par blocage de fonctions phénoliques, et ainsi la diminution de la concentration en polyphénols oxydables.

2.1.3. Le cas du Fer ferreux à pH 6 :

L'addition de Fe^{2+} à nos extraits foliaires provoque, au contraire, une accélération considérable de la réaction. Ceci est particulièrement net dans le cas du Bouleau, pourtant riche en Fer au départ. On observe en même temps un noircissement du milieu réactionnel contenu dans la cellule de l'oxygraphe. De plus, on remarque que les courbes obtenues avec le Bouleau et le Peuplier noir en présence de Fe^{2+} sont pratiquement superposables, alors qu'en absence de « supplémentation » par le Fer, le Peuplier est beaucoup plus réactif que le Bouleau (TREMOLIERES et al., 1977, 1981). Or, les feuilles du Bouleau sont, au contraire de celles du Peuplier noir, pauvres en phénoloxydases, alors que le contenu en phénols réducteurs des feuilles d'automne des deux essences est comparable. L'addition de Fer ferreux, au pH des extraits foliaires, peut donc compenser une carence en phénoloxydases et déclencher une polycondensation auto-oxydative des polyphénols qui ne se produit pas en l'absence de Fer réduit. Ce métal peut donc, au point de vue efficacité réactionnelle de la polycondensation oxydative phytomélanique, compenser une carence en enzymes foliaires, voire se substituer à ces enzymes. On le vérifiera par les expériences relatées aux prochains aînées. Toutefois, l'auto-oxydabilité du Fe^{2+} étant importante au pH d'expérience, il était nécessaire de procéder à des expériences complémentaires et comparatives (fig. III et IV).

a) Sur la poudre des feuilles brute :

— Solution témoin de $FeSO_4$ à plusieurs concentrations :

1, 0,1, 0,01 g/l dans un tampon phosphate-acide citrique de pH 5,9.

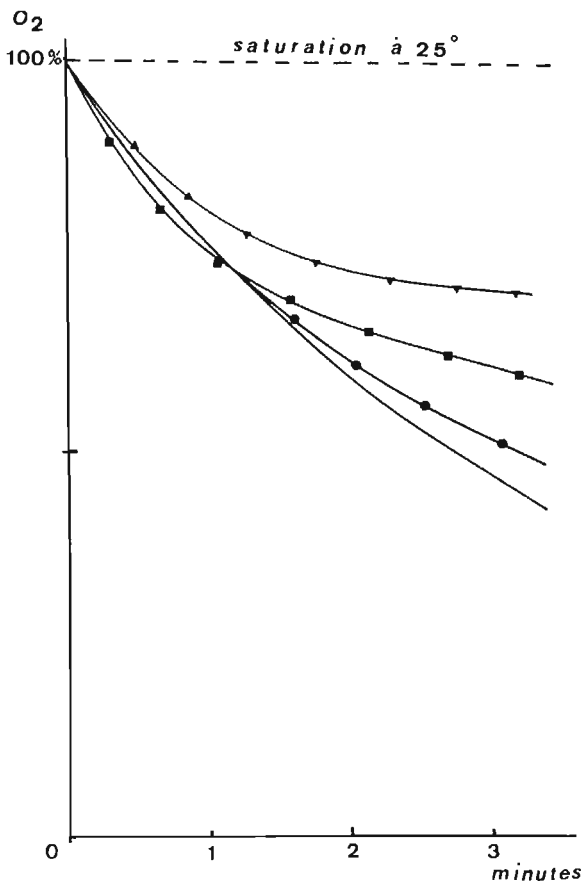


FIGURE II. — Action des ions Fe^{3+} sur la désoxygénation biochimique de suspensions de poudre de feuilles (2,5 %, p/v) à 25°C à pH 3
— Témoin — 12 mM ▲▲ 6 mM ■■ 1,5 mM ●●

FIGURE II. — Action of ions Fe^{III} on the enzymatic deoxygenation of leaf powder suspensions (2,5 %, p/v) at 25°C, pH 3

— Solution de $FeSO_4$ aux mêmes dilutions en milieu tamponné, additionnée de poudre de feuilles de Peuplier noir (2,5 % p/v).

On constate qu'à pH 5,9, la solution témoin de $FeSO_4$ à 1‰ s'auto-oxyde très facilement, son oxydabilité augmente avec la concentration. Nous avons donc corrigé les courbes de cinétique de désoxygénation des suspensions de poudre en présence d'ions Fe^{2+} en déduisant les courbes d'oxydation des ions Fe^{2+} seuls.

Cependant, à forte concentration en ions Fe^{2+} ($FeSO_4$ 1‰), le phénomène d'oxydation de ces ions prend une importance prépondérante, si bien que la désoxygénation par les extraits n'est plus mesurable. Au contraire, de faibles quantités d'ions Fe^{2+} qui, d'après les valeurs élevées des constantes de stabilité des complexes polyphénols-Fer (SILLEN, 1964, 1971) sont presque totalement complexées, accélèrent la consommation d'oxygène par les extraits (cf. courbes corrigées, fig. III). Pour ces faibles concentrations, l'intensité de l'accélération est proportionnelle au logarithme de la concentration en Fe^{2+} .

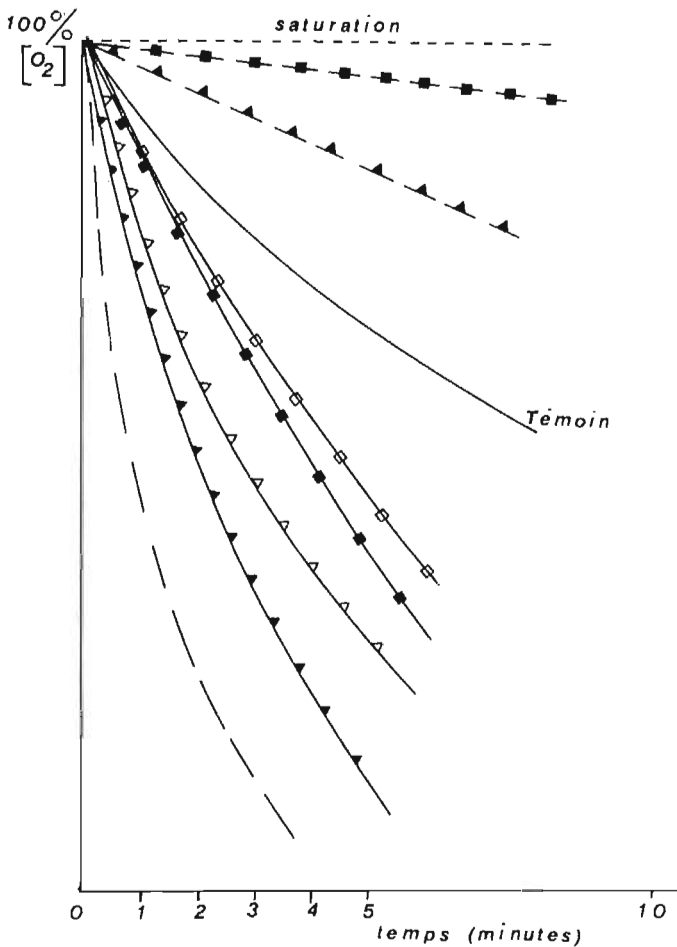


FIGURE III. — Action des ions Fe^{2+} sur la désoxygénation biochimique de suspensions de poudre de feuilles (2,5 %, p/v) à 25° C à pH 5,9 (concentrations exprimées en $FeSO_4$)

$FeSO_4$	seul	+ poudre	courbe corrigée
1 g/l	▲▲▲	▲▲▲	△△△
0,1 g/l	■■	■■	□□
0,01g /l	■	■	□

FIGURE III. — Action of Fe II ions on the enzymatic deoxygenation of leaf powder suspensions (2,5 %, p/v) at 25°C, pH 5,9 (conc. in $FeSO_4$)

Pourtant, cette variation est trop faible pour nous permettre de définir un ordre réactionnel par rapport au Fer. On aurait conclu à un effet catalytique si l'augmentation était importante et indépendante de la concentration. Or, tel n'est pas le cas.

b) Sur la poudre de feuilles acétonique :

L'extraction par l'acétone conserve les enzymes encore actives et élimine les substrats polyphénoliques de la poudre brute. On obtient ainsi une préparation enzymatique brute (poudre acétonique = poudre de feuilles épuisée par l'acétone).

Nous avons enregistré, à l'oxygraphe à pH 6, les consommations d'oxygène :

- d'une solution de sulfate ferreux 0,66 mM ;
- d'une solution de sulfate 0,66 mM et de catéchol 3,3 mM ;
- d'une suspension de poudre acétonique en présence de catéchol 3,3 mM ;
- d'une suspension de poudre acétonique en présence de catéchol 3,3 mM et de sulfate ferreux 0,66 mM.

Les enregistrements sont reproduits dans la figure IV. On constate que :

- le catéchol qui, dans les conditions expérimentales, ne s'oxyde pas spontanément, augmente l'oxydabilité du Fer ferreux ;

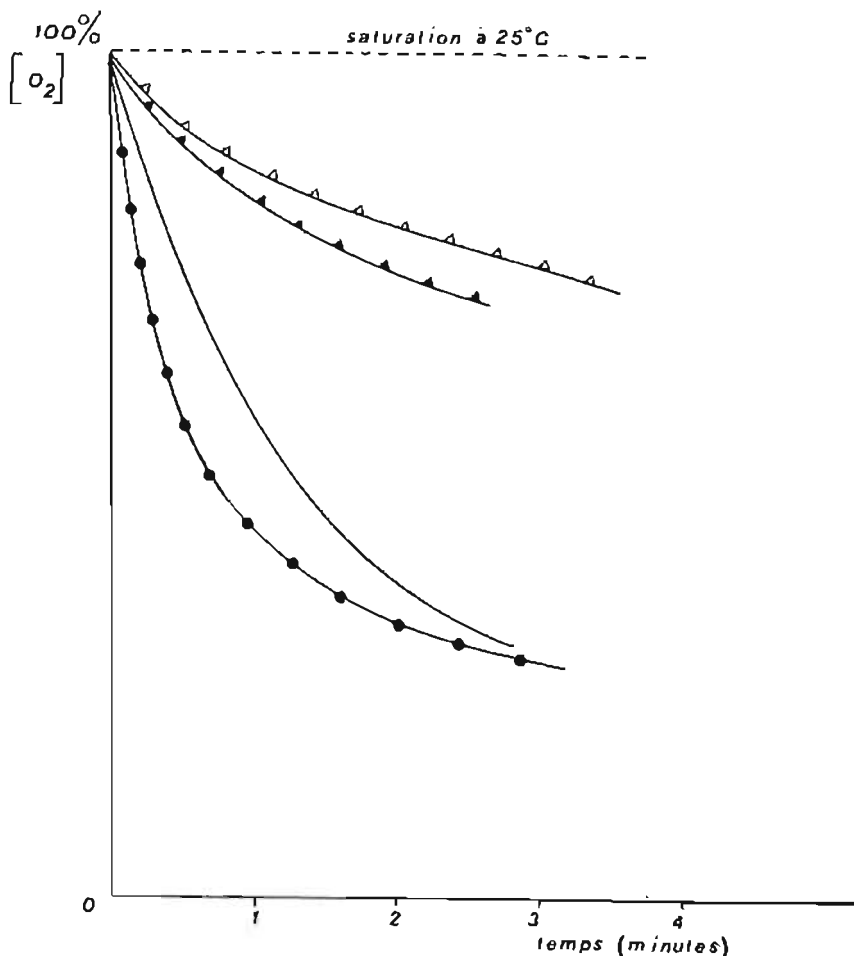


FIGURE IV. — Action des ions Fe^{2+} ($FeSO_4$, 0,66 mM) sur la désoxygénation biochimique de la poudre acétonique de feuilles de Peuplier noir en présence de catéchol (3,3 mM) à pH 6
 Fe^{2+} ($\triangle \triangle$), Fe^{2+} + catéchol ($\blacktriangle \blacktriangle$), poudre acétonique + catéchol (—), poudre acétonique + catéchol + Fe^{2+} ($\bullet \bullet \bullet$).

FIGURE 4. — Action of Fe^{2+} ions ($FeSO_4$, 0,66 mM) on the oxidizing activity of leaf acetone powder of black Poplar in the presence of catechol 3,3 mM, pH 6

— le Fer ferreux provoque une accélération de la consommation d'oxygène des suspensions de poudre acétonique en présence de catéchol supérieure à celle de son oxydabilité propre.

Il reste à savoir si l'enzyme augmente l'oxydabilité du diphénol en présence d'oxygène. Or, si on calcule les consommations d'oxygène au bout d'une minute, pour chacune des expériences, on notera que l'activation de la désoxygénation des suspensions de poudre acétonique en présence de catéchol par le Fer ferreux correspond en fait à l'interaction catéchol- Fe^{2+} : l'enzyme n'intervient pas dans le processus.

Aussi les faits observés permettent de proposer une interprétation nouvelle : l'augmentation de la vitesse d'absorption d'oxygène est due à la formation de complexes polyphénols-Fer ferreux, complexes plus réducteurs que le fer seul ou le ligand seul dans les mêmes conditions, d'où aussi l'activation également intense du pouvoir réducteur des extraits de feuilles de Bouleau, dépourvus d'enzymes, par le Fer ferreux au pH foliaire.

LOSSAINT (1959) avait d'ailleurs montré que des complexes colloïdaux polyphénol-fer se forment dans les sols et que c'est à l'état réduit que le fer est le plus facilement complexé. Or, le potentiel redox des extraits de litières et leurs pH sont suffisamment bas pour faire passer à l'état réduit et ionique une partie du Fer.

2.2. Action des métaux sur l'auto-oxydation des polyphénols foliaires :

2.2.1. A pH 6 :

Les extraits obtenus à chaud (ébullition 10 mn), donc à enzymes dénaturés montrent une activité de désoxygénation nulle à ce pH.

L'addition d'ions Mn^{2+} ou Fe^{3+} à ces extraits ne provoque aucune modification, ce qui était prévisible à la suite du constat de la non-oxydabilité des extraits de Bouleau au pH foliaire, extraits riches en Manganèse, mais dépourvus d'enzymes. Par contre, l'addition d'ions Fe^{2+} entraîne une désoxygénation (fig. V). D'après les expériences précédentes, ce résultat était parfaitement prévisible : le Fer ferreux se substitue à l'enzyme comme activateur de polycondensation. Or, nos essais comparatifs démontrent, ici encore, que cette désoxygénation n'est pas due à la seule auto-oxydation du Fer ferreux, mais bien à une synergie due à l'oxydabilité particulièrement élevée du complexe polyphénol- Fe^{2+} formé. La réactivité de décoctés de feuilles de Peuplier noir en présence d'ions ferreux est due à la formation de complexes polyphénol- Fe^{2+} , plus réducteurs. Il se confirme donc que les processus sont effectivement les mêmes que l'enzyme soit présente ou non, (ce qui viendrait d'ailleurs à faire admettre que, par ailleurs, le Fer ferreux inactive cette enzyme).

2.2.2. A pH 9 :

Lorsqu'on alcalinise des extraits sans enzyme par un tampon (Na_2CO_3 , NaHCO_3) de pH 9, on provoque une forte auto-oxydation que nous enregistrons à l'oxygraphe. Nous obtenons ainsi les courbes de la cinétique de désoxygénation chimique auto-oxydative. L'addition de métaux (de l'ordre de 0,2 mM en concentration finale) aux extraits alcalinisés provoque des modifications divergentes dépendant de la nature du métal (fig. VI).

Cependant, à pH 9, les métaux ne sont plus sous forme ionique, mais sous forme d'oxyde ou d'hydroxyde, le plus souvent insoluble. Il faut donc admettre leur influence sur la polycondensation phytomélanique sous une forme non ionique.

On constate que l'addition de Manganèse aux extraits déjà réactifs provoque une accélération de l'absorption d'oxygène.

Au contraire, le Cuivre cuivrique ralentit fortement la désoxygénation.

Le Fer ferrique n'a aucun effet.

Ces expériences ont été réalisées pour l'ensemble des dix espèces feuillues étudiées, et sont concordantes. La figure VI, à titre d'exemple, représente l'influence des ions métalliques sur l'auto-oxydation d'extraits du seul Peuplier noir.

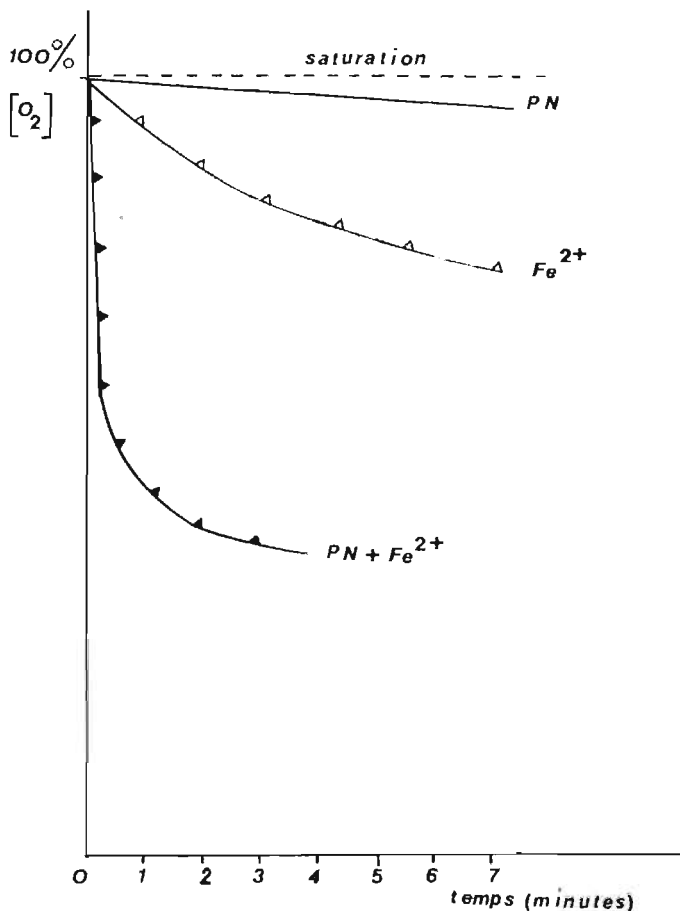


FIGURE V. — Action des ions Fe^{2+} ($FeSO_4$, 3,5 mM) sur l'auto-oxydation à pH 6 d'extraits sans enzymes de Peuplier noir

FIGURE V. — Action of Fe^{II} ions ($FeSO_4$, 3,5 mM) on the autooxidation of black Poplar extracts without enzyme at pH 6

Comment expliquer ces résultats ?

Nous proposons l'explication suivante :

Les ions Mn^{2+} deviennent plus réducteurs en milieu alcalin, en présence de polyphénols. Le couple Mn^{II}/Mn^{IV} joue alors le même rôle à pH 9 que le couple Fe^{II}/Fe^{III} en milieu faiblement acide (pH 5 à 6) : ainsi le Manganèse manganéux stimule-t-il l'auto-oxydation des polyphénols à pH alcalin, par formation de complexes polyphénols-métal, complexes plus réducteurs que le métal seul ou le ligand seul dans les mêmes conditions.

Fe^{2+} et Mn^{2+} agiraient de la même façon, l'un en milieu acide, l'autre en milieu alcalin.

Dans les deux cas, ces métaux n'agissent donc pas par un effet catalytique vrai, mais par modification du potentiel d'oxydoréduction (dans le sens d'une baisse, donc d'un plus grand pouvoir réducteur) d'un ligand organique déjà réducteur en lui-même au pH considéré.

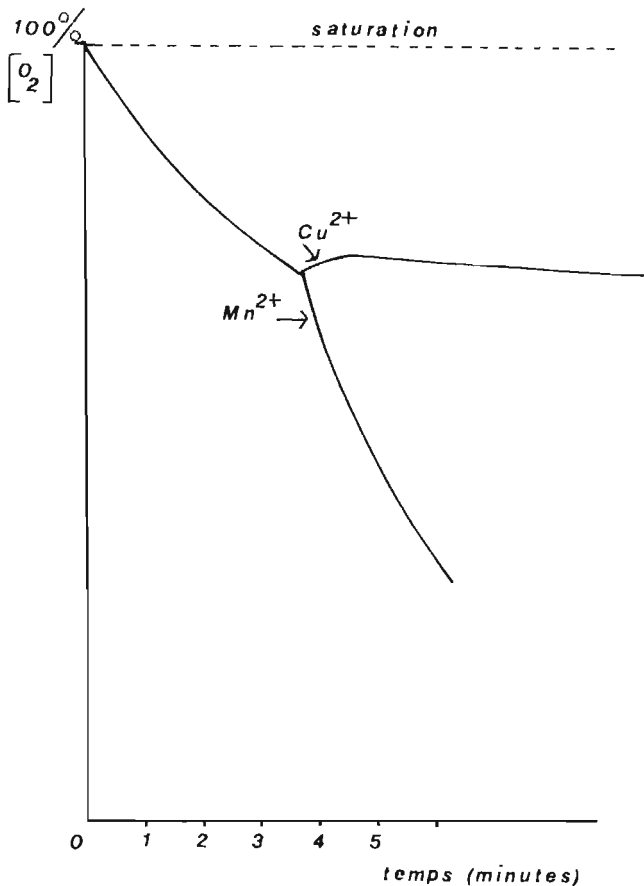


FIGURE VI. — Action des ions Mn^{2+} et Cu^{2+} sur l'auto-oxydation à pH 9 d'extraits sans enzymes de Peuplier noir

FIGURE VI. — Action of Mn II and Cu II ions on the autooxidation of extracts without enzyme of black Poplar at pH 9

Le Cuivre cuivrique est également connu pour former des complexes avec les polyphénols. Il est cité comme donnant facilement des complexes de constante de formation élevée, avec l'acide protocatéchique, le catéchol, le pyrogallol, l'acide salicylique et même l'acide p-hydroxybenzoïque (pK plus faible cependant), par exemple. Les complexes ainsi formés avec le Cuivre cuivrique ne sont plus réducteurs. En conséquence, l'oxydabilité des phénols sera réduite par diminution de la proportion des fonctions phénoliques libres.

Le Fer ferrique agit de la même façon. Ainsi, nous avons vu (§ 2.1.2.) que, bien que sans effet sur la réaction enzymatique, le Fer ferrique à la concentration 1,5 mM et au-delà, à pH 3, est susceptible de former des complexes avec les polyphénols et ainsi de ralentir nettement la réaction par diminution du nombre d'hydroxyles phénoliques libres réactifs. A plus faible concentration (concentration testée 0,2 mM), nous n'avons relevé aucun effet inhibiteur des ions Fe^{3+} sur l'auto-oxydation. De plus, au pH 9 d'expérimentation de l'auto-oxydation, une grande partie des ions Fe^{3+} sont sous forme d'hydroxyde ferrique, insoluble, la quantité de complexes ferriques formés à ce pH doit être faible.

Il a été mentionné précédemment que les complexes polyphénols-Fer ferreux, très réducteurs se forment préférentiellement dans les conditions de milieu étudié (riche en polyphénols) ; ainsi, dans le cas des extraits du Peuplier noir, de pH 6 environ et de potentiel redox bas, 120 mV, le Fer se trouve essentiellement sous forme Fe^{2+} . C'est donc sous cette forme que le Fer sera le plus actif sur la mélanogénèse et en particulier sur l'auto-oxydation des polyphénols foliaires.

CONCLUSION - RÉSUMÉ.

L'action des métaux de transition : Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} sur la polycondensation phytomélanique est complexe. Elle n'est pas de nature catalytique pour l'ensemble des métaux testés.

A faible concentration : dans une première phase le Cuivre Cu^{2+} est un activateur enzymatique de la polycondensation chez certains arbres feuillus à phénolases cupriques, dans une deuxième phase il bloque la réactivité du substrat phénolique, par complexation. L'excès d'ions Cu^{2+} provoque la dénaturation des phénoloxydases, et ainsi l'inhibition de l'oxydation.

Le Fer ferrique n'a aucune action sur la polycondensation mélanique, du fait, d'une part, de son inertie vis-à-vis des phénolases, et, d'autre part, de la formation de complexes stables avec les polyphénols, complexes peu réactifs.

Le Manganèse manganoux active fortement l'auto-oxydation à pH alcalin des polyphénols foliaires, par formation de complexes polyphénols- Mn^{2+} plus réactifs que les ligands seuls. Il est par contre inactif vis-à-vis des phénoloxydases.

Le Fer ferreux joue un rôle d'activateur efficace à tous les pH, du fait de sa forte affinité pour les polyphénols et de la formation de complexes polyphénols-Fer ferreux, à effet réducteur nettement supérieur à celui des ligands isolés. Mais il semble être sans action sur les phénoloxydases, voire susceptible de les inhiber.

Fe^{2+} et Mn^{2+} semblent avoir une action analogue sur la polycondensation mélanique : cependant, l'activité du Fer ferreux s'étend à une large gamme de pH alors que celle du Manganèse n'agit qu'aux pH alcalins.

REMERCIEMENTS.

Nous remercions vivement M. Laugel, professeur de Chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, et M. Jost, maître-assistant à l'École nationale supérieure de Chimie de Strasbourg, pour la lecture critique de ce manuscrit.

Bibliographie

- BRETELLER R.J., TEAL J.-M., GIBLIN A.E., VALIELA I. (1981). — Trace element enrichments in decomposing litter of *Spartina alterniflora*, *Aquatic Botany*, 11 (2), 111-120.
- CARBALLAS T., ANDREUX F., METCHE M. (1972). — *Bull. E.N.S.A.I.A.*, XIV (2), 245-261.
- CLARKSON D.T., HANSON J.B. (1980). — The mineral nutrition of higher plants. *Ann. rev. of plant physiol.*, 31, 239-293.
- JACQUIN F., MANGENOT F. (1966). — Formation de composés de type humique à partir d'extraits foliaires. Compte rendu du Congrès International de Pédologie d'Aberdeen, pp. 53-57.
- L'HOPITALAULT J.-Cl., PHILIPPO A., POMMERY J., THOMAS P., ERB F. (1981). — Evolution d'une eau de surface au cours des traitements de potabilisation, comportement des espèces métalliques au contact des matières humiques, *J. Français d'Hydrologie*, T. 12, 1 (34), 7-28.
- LOSSAINT P. (1959). — Etude expérimentale de la mobilisation du fer des sols sous l'influence des litières forestières. Thèse doc. spéc. Strasbourg, 107 p.
- NICOLAUS R.A. (1968). — Mélanins, *Actualités Scientifiques*.
- MALKIN R., MALMSTROM Bo.G. (1970). — The state and function of copper in biological systems. *Advances in Enzymology*, 33, 174-244.
- MANGENOT F., JACQUIN F., METCHE M. (1966). — A propos des interactions plante-sol. I. - Les exsudats foliaires peuvent-ils être une source de substances humiques. *Oecol. plant.*, 1, 79-102.
- MAYER A.M., HAREL E. (1979). — Polyphenoloxidasen in plants, *Phytochemistry* 18, 193-215.
- PORTAL J.-M., ANDREUX F., JEANSON P. (1977). — Sur la nature saline ou complexe des liaisons entre matières humiques et cations : étude des combinaisons d'un modèle synthétique d'acide humique avec les cations Al^{+++} , Fe^{+++} et Ca^{++} . *C.R. Ac. Sc. Paris*, T. 285 D, 865-868.
- ROBB D.A. (1981). — Molecular properties of plant tyrosinases, in *Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables*, ed. J. Friend.
- SILLEN (1964) (1971). — Stability constants of metal ion complexes *Chemical Society of London*.
- SOUCHIER B. (1971). — Evolution des sols sur roches cristallines à l'étage montagnard (Vosges). Thèse doc. d'Etat, Nancy, 134 p.
- TOUTAIN F. (1974). — Etude écologique de l'humification dans les hêtraies acidiphiles. Thèse doc. d'Etat, Nancy, 124 p.
- TREMOLIERES M., CARBIENER R. (1977). — Molysmologie - Pollution naturelle des eaux continentales par l'effet anti-oxygène de la genèse des phytomélanines dans les extraits aqueux de feuilles d'automne, notamment de Peupliers. *C.R. Acad. Sc. Paris*, T. 284, 2561-2564.
- TREMOLIERES M., CARBIENER R. (1981). — Aspects de l'impact de litières forestières sur des écosystèmes aquatiques. I. - L'effet désoxygénant de systèmes polyphénoloxidasen-polyphénols. *Acta Oecologica, Oecol. Gener.*, vol. 2, n° 3, pp. 199-212.
- TREMOLIERES M., CARBIENER R. (1982). — Aspects de l'impact de litières forestières. II. - Evolution à moyen et long terme de l'activité de désoxygénation. De quelques propriétés des phyto-mélanines formées. *Acta Oecologica, Oecol. Gén.* vol. 3, n° 2, pp. 241-257.

SUMMARY

ROLE OF TRANSITION METALS (IRON, COPPER, MANGANESE)
IN THE PHYTOMELANINS FORMATION OF SENESCENT LEAVES

Mots clés : Fer, Cuivre, Manganèse, polyphénoloxydase, polyphénol, phytomélanines.
Key words: Iron, Copper, Manganese, polyphenoloxidase, polyphenol, phytomelanins.

Enzymatic and chemical redox systems (polyphenoloxidase and polyphenols) are present in the autumn leaves of many tree species even after defoliation. In most cases, these systems are more efficient in the presence of transition metals such as iron, copper and manganese. Phytomelaninic polycondensates appear at the end of the reaction by both the enzymatic and the chemical polymerization. The role of iron II, copper II and manganese II in the polycondensation reaction are not well understood.

It has been suggested by Souchier (1971) that the metal ions catalyse polymerization of phenols yielding the large insoluble polymers. Our experiments confirm that the metal ions can play a non catalytical role in the polyphenol oxidation, but instead react directly with the polyphenols. However, we also find that copper is a cofactor to the enzyme polyphenoloxidase.

— A first experimental serie shows the role of metal ions on the enzymatic oxydation. We have tested metal ions, on the one hand, on the crude powder of senescent leaves; and we study the enzymatic deoxygenation of leaf powder suspensions, by measuring the O₂ uptake in an oxygraph with an O₂ specific electrode.

On the other hand, we study the oxydizing activity of an acetone powder (without leaf polyphenolic substrates but with active enzyme).

We observe that, when metal ions are added in the variable concentrations, for example Fe II, the acceleration of the enzymatic oxidation is proportionnal o the logarithm of the metal in concentration (Fig. III). To confirm a catalytical effect, the acceleration of oxidation must be independant of the metal in concentration.

— A second experimental serie shows the role of these same metal ions on the chemical (autooxidation) oxidation of polyphenols at acid and alkaline pH.

The role of metal ions in polyphenol oxidation is very complex. Each metal has a different effect, and in the case of copper II, the effect becomes inhibition at high concentrations of copper.

1 - Copper II participates in redox reactions, at the active site of polyphenol-oxidase. First, we see that at low concentration, copper II is an enzymatic activator of the polyphenoloxidases (Fig. I);

Secondly, we see that at the same concentration Cu II inhibits the oxidation by complexing polyphenols (Fig. I-VI).

The high concentrations (Table 2) of Cu II inhibit the oxidation by denaturing the enzyme. Copper has a high affinity for sulfhydryl groups, therefore it is a potentially toxic metal (Clarkson and Hanson, 1980).

2 - The Fe (III) (Fig. II) has no effect on the polycondensation. It forms very stable complexes with polyphenols (Sillen, 1964, 1970) and these complexes are not reactive. Even, high concentrations decrease the oxidation rate by decreasing the number of reactive phenolic groups which are complexed with Fe III.

3 - Mn (II) increases the rate of leaves polyphenols oxidation at alkaline pH (Fig. VI) (autooxidation). It complexes the polyphenols (Sillen, 1964, 1971) and these complexes are more reactive than the ligands alone. But it has no influence on the enzymatic oxidation (Fig. I).

4 - Fe (II) play an activation role at acide and alkaline pH, though it is unstable and quickly oxidized from Fe (II) to Fe (III). It has a good affinity for polyphenols-Fe II complexes have a more oxido-reducing effect than the ligands alone. However, it is not efficient on the enzymatic oxidation.

Fe II and Mn II have a similar effect on the phytomelaninic polycondensation in that they both facilitate the oxidation at low concentrations; however, they differ in that the role of Fe (II) takes place at both high and low pH's while the manganese serves only at alkaline pH on the autooxidation.