

COMPLEXES BORIQUES DE LA NINHYDRINE (HYDRATE DU TRICÉTOINDANE) (*)

E. NEUZIL ⁽¹⁾ , *J.-C. BRETON* ⁽²⁾ , *H. JENSEN* ⁽¹⁾

*Les borates inhibent la coloration que fournit la ninhydrine avec une amine particulièrement réactive, la cyclosérine. Nous montrons, en utilisant la technique conductimétrique de Böeseken, que la ninhydrine forme très facilement des complexes boriques de type 2:1, incapables de conduire au "pourpre" de Ruhemann. Les trois groupements carbonyles de la tricétone indanique peuvent donc s'hydrater en solution aqueuse pour donner des groupements gem-dihydroxylés. La ninhydrine se comporte donc comme les cis- α -diols, dont l'aptitude à réagir avec l'acide borique est bien connue; elle les surclasse même par sa forte réactivité. En raison de la formation de ces complexes, les ions borate inhibent l'action antimicrobienne de la ninhydrine vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.*

(*) *Manuscrit reçu le 6 Décembre 2000*

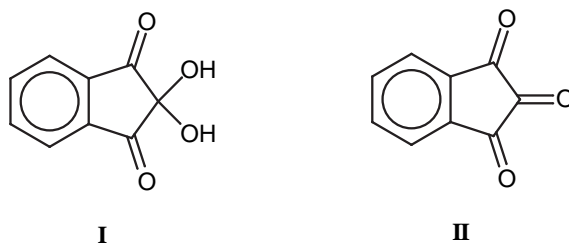
(1) *Laboratoire de Biochimie médicale, Faculté de Médecine Victor Pachon, Université Victor-Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, 30076-Bordeaux Cedex*

(2) *Laboratoire de Biochimie médicale, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marclant, 87032 Limoges-Cedex*

Ce mémoire est le développement d'une communication préliminaire, présentée à Bordeaux le 16 octobre 1964, lors de la réunion annuelle des sections de Bordeaux, de Montpellier et de Toulouse de la Société chimique de France [21]. Ces travaux, qui ont fait l'objet de recherches complémentaires exposées ici, ont été en outre partiellement inclus dans un chapitre de la thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie de Joly-Didavy [12]. Nos résultats expérimentaux sont précédés de quelques rappels sur la ninhydrine.

La ninhydrine

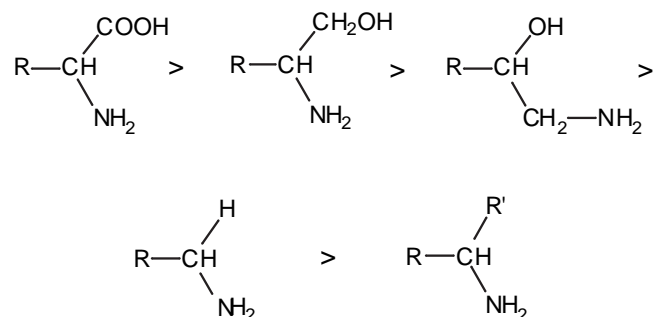
La ninhydrine (**I**) est le nom commercial, devenu classique, de la 2,2-dihydroxy-1,3-indanedione encore appelée, dans la nomenclature plus moderne de *Chemical Abstracts*, la 2,2-dihydroxy-1*H*-indène-1,3(2*H*)-dione. La ninhydrine, forme hydratée du tricétone indanique (**II**), a été synthétisée pour la première fois en 1910 par S. Ruhemann [27, 28].



Ce chimiste de Cambridge avait attiré l'attention sur la coloration bleu-violet intense qui apparaît lorsque la tricétone indanique réagit avec les acides α -aminés et les amines primaires. La ninhydrine est ainsi devenue un réactif classique du groupement —NH_2 , réactif dont l'audience est restée cependant assez longtemps limitée. Son utilisation s'est rapidement généralisée au lendemain de la deuxième guerre mondiale, avec l'essor des techniques d'analyse chromatographique, chromatographie de partage sur papier ou sur couche mince, puis d'analyse chromatographique quantitative sur résines échangeuses d'ions. Le réactif de Ruhemann, qui a permis tant d'avancées dans le domaine des protéines et dans l'étude du métabolisme

azoté, n'est pas au bout de sa carrière : diverses ninhydrines substituées sur le noyau benzénique ont trouvé depuis peu de nouvelles applications en médecine légale [9] ; associées aux ions europium ou terbium, elles permettent la détection des empreintes digitales avec une sensibilité fortement accrue [1].

Tous les composés possédant un groupement amine primaire ne réagissent pas avec la même vitesse avec la ninhydrine et conduisent à des colorations d'intensité variable. Nous avons montré que la présence dans le milieu réactionnel d'alcools aliphatiques, et tout particulièrement d'alcool butylique tertiaire, permet d'observer la réaction colorée à la température du laboratoire et donc de suivre aisément au spectrophotomètre la cinétique de formation de l'anion de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine [17, 6], produit couramment appelé en France "*pourpre de Ruhemann*", mauvaise traduction de *Ruhemann purple*, l'adjectif anglais *purple* qualifiant plutôt une couleur bleu-violet. Nous avons pu ainsi établir que, d'une manière générale, la réactivité des composés aminés avec la ninhydrine décroît selon l'ordre suivant :



Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation du pourpre de Ruhemann ; celui envisagé dans notre laboratoire dès 1959 [19] nous paraît toujours adapté aux résultats expérimentaux. La réaction entre la ninhydrine et les composés aminés évolue en quatre étapes, indiquées dans la Figure 1 qui illustre le cas particulier des acides α -aminés.

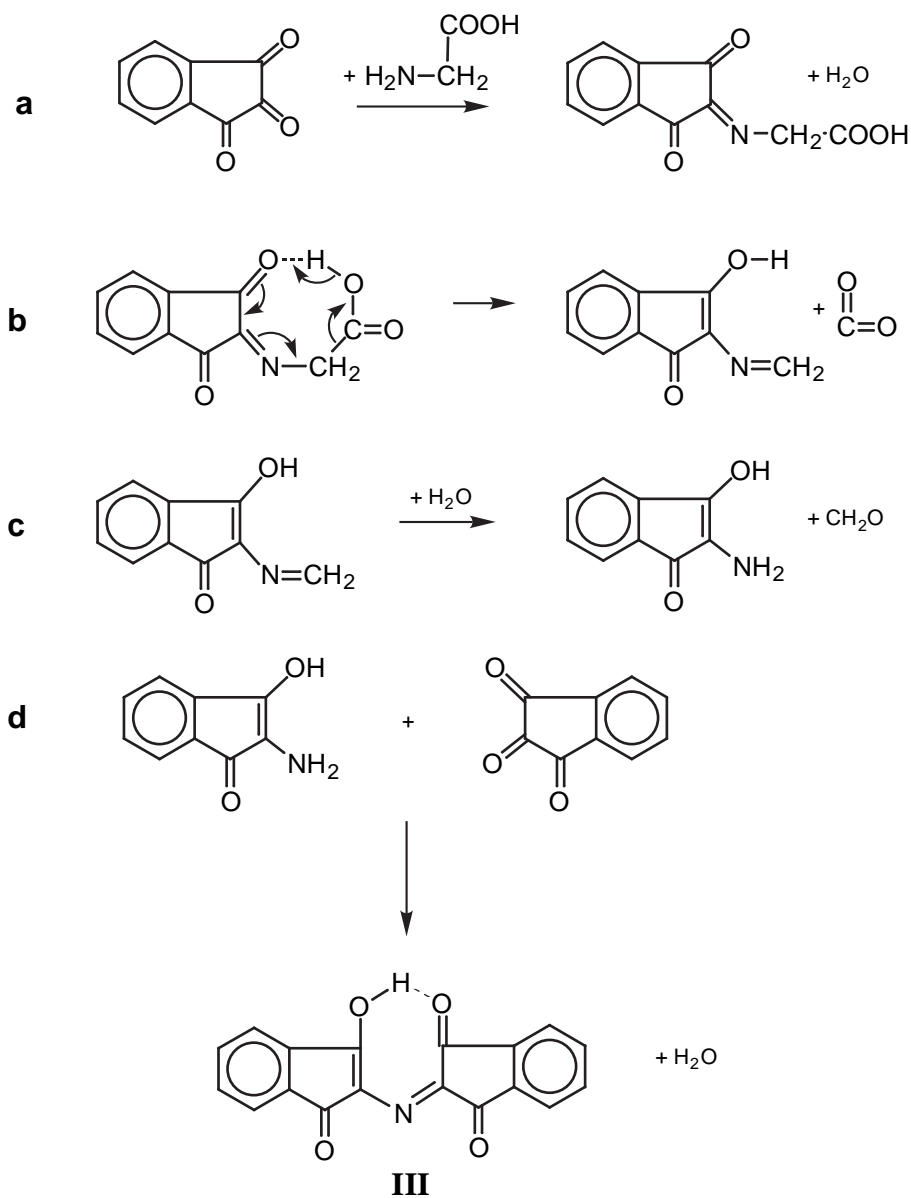


Fig. 1: Réaction ninhydrine – acides α -aminés

Ces réactions correspondent à la dégradation classique de Strecker ; elles conduisent à la décarboxylation oxydative de l'acide α -aminé. La glycine, prise ici comme exemple, se transforme ainsi en formaldéhyde et dioxyde de carbone

Dans un premier stade (**a**), la ninhydrine sous la forme activée, représentée en présence d'alcool butylique tertiaire par la trione déshydratée ou par son hémicétal instable [23, 24], réagit avec le groupement azoté en formant une cétimine ; cette dernière, sous une forme pseudo-cyclique octogonale (**b**), participe à une réaction de transfert électronique circulaire qui entraîne à la fois la décarboxylation et la formation d'une aldimine ; l'aldimine s'hydrolyse (**c**), libérant l'aldéhyde en C_{n-1} correspondant à l'acide- α -aminé initial ainsi que de la dicétohydrindamine, dont la condensation (**d**) avec une nouvelle molécule de ninhydrine conduit finalement au pourpre de Ruhemann **III**.

Les alcools primaires- α -aminés réagissent selon le même schéma général : la réaction de transfert électronique circulaire est cependant plus difficile, l'hydroxyle alcoolique cédant moins facilement son atome d'hydrogène que le carboxyle ; elle conduit à la libération de formaldéhyde [25].

Les amines primaires du type $R-CH_2-NH_2$ réagissent avec la ninhydrine, mais la coloration se développe plus lentement ; la cétimine peut encore conduire à l'aldimine, le départ d'un des atomes d'hydrogène liés à l'atome de carbone porteur du groupement amine primaire (*Figure 2*) étant favorisé par un phénomène d'hyperconjugaison.

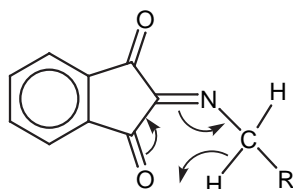
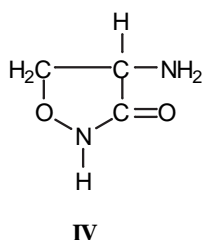


Fig. 2 : Réaction ninhydrine-amines $R-CH_2-NH_2$
Transfert électronique circulaire à 6 sommets

Les amines du type $(R,R')CH-NH_2$, dans lesquelles R et R' n'apportent pas de groupements réactifs (c'est le cas par exemple de l'amino-2-butane), ne donnent lieu à aucune coloration à la température du laboratoire et aux faibles concentrations sélectionnées pour nos essais [20, 26]. La formation du pourpre de Ruhemann (**III**, *Figure 1*) nécessite, pour la plupart de ces composés, une activation thermique ou photochimique [22, 30].

Influence des borates sur la réaction ninhydrine-cyclosérine

La D-4-amino-3-isoxazolidinone-3 (IV) ou oxamycine est un antibiotique à large spectre [7] qui, sous le nom de D-cyclosérine, a été utilisé dans le traitement de la tuberculose humaine [8]. La cyclosérine, bien qu'elle entre dans le cadre des amines de type (R,R')CH-NH₂ qui ne possèdent qu'un seul atome d'hydrogène sur le carbone porteur du groupement amine primaire, réagit très fortement avec la ninhydrine [16], ainsi d'ailleurs que quelques dérivés 5-substitués de cet antibiotique [18].



La coloration bleu-violet, rapide et intense, se développe non seulement dans les milieux hydro-alcooliques, mais aussi lorsque l'on mélange à la température du laboratoire de simples solutions dans l'eau distillée de cyclosérine et de ninhydrine, et ceci même à faible concentration : dans de telles conditions, les acides- α -aminés ne donnent pas lieu à la formation de pourpre de Ruhemann

La réaction cyclosérine-ninhydrine, effectuée en milieu aqueux permet donc d'étudier facilement l'influence de divers anions sur la réaction colorée. Nous avons réalisé au temps zéro, à 21,5°C et à pH = 6,75, des solutions correspondant aux concentrations finales indiquées ci-dessous :

— <i>Cyclosérine</i>	6,20 mM
.....	
— <i>Ninhydrine</i>	12,50 mM
.....	

— *Sel de sodium* variable, de 2 à 32 mM

.....

Nous avons mesuré dans des cuves de 1 cm d'épaisseur, en fonction du temps, la densité optique du mélange réactionnel à $\lambda = 570$ nm, maximum d'absorption du pourpre de Ruhemann.

L'influence des différents anions sur le développement de la coloration permet de les classer en trois groupes :

- les ions orthophosphate, pyrophosphate, phénylphosphate et arséniate sont de très forts activateurs ;
- une action favorable, mais plus faible, s'observe avec les ions formiate, acétate, propionate, butyrate, valérienate, oxalate, malonate, succinate, malate et citrate ;
- les ions borate sont au contraire de puissants inhibiteurs.

Les quelques exemples rassemblés dans le Tableau I reflètent nos résultats.

Tableau I : Réaction cyclosérine - ninhydrine en milieu aqueux

(voir texte)

Influence de la concentration en anion

Valeurs de la densité optique ($\times 1000$) après 3 minutes

Anion (mM)	0	2	4	8	16	32
<i>Orthophosphate</i>	57	325	435	650	990	1535
<i>Acétate</i>	80	119	130	145	188	258
<i>Succinate</i>	83	136	156	168	208	265
<i>Orthoborate</i>	90	35	21	0	0	0

L'influence de l'anion orthophosphate peut être interprétée en remarquant que le triacide qu'est l'acide orthophosphorique n'est pas

entièrement ionisé au pH de 6,75 ; il possède donc encore un hydroxyle susceptible de participer à un transfert électronique. Le transfert circulaire électronique à 6 sommets de la Figure 2, invoqué pour les amines primaires peu réactives, serait remplacé, pour la cyclosérine, par un transfert circulaire électronique à 8 sommets indiqué dans la Figure 3, mécanisme probablement plus efficace.

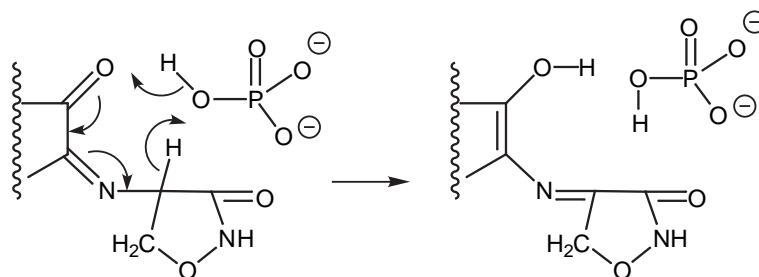


Fig. 3 : Réaction ninhydrine-cyclosérine
Transfert électronique circulaire à 8 sommets

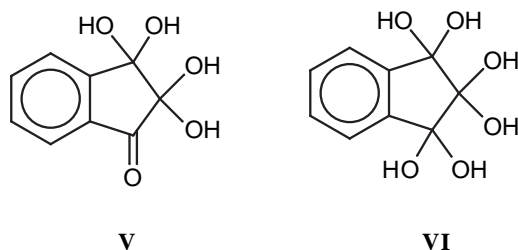
Les anions du deuxième groupe ont une action légèrement favorable ; ils proviennent d'acides ou de diacides organiques qui ne sont pas entièrement ionisés dans nos conditions expérimentales et qui peuvent donc fournir le proton qui déclenche le transfert circulaire. Remarquons encore que les hydroxyles des diacides organiques utilisés dans nos essais sont portés par deux atomes de carbone : ils ne sont pas comparables à ceux de l'acide phosphorique qui sont fixés sur un même atome, l'atome de phosphore.

La forte inhibition exercée par les ions borate sur le développement de la coloration peut provenir de la formation de complexes boriques de la ninhydrine.

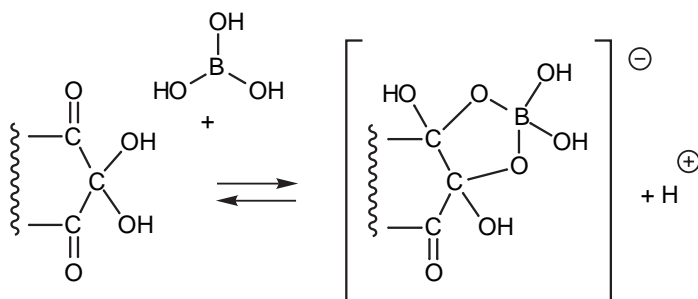
Complexes boriques de la ninhydrine

Au cours d'un travail sur le comportement chromatographique de la ninhydrine, Vlček *et coll.* [32] ont remarqué que les tracés présentaient

d'importantes différences selon que la tricétone était dissoute dans un tampon phosphate ou dans le tampon de Britton, qui contient des ions borate. Ces chimistes de l'Université technique de Prague envisagent qu'à côté de son groupement *gem*-dihydroxylé, la ninhydrine (**I**) puisse subir en milieu aqueux une hydratation supplémentaire intéressant un groupement cétonique latéral (**V**), ou même les deux (**VI**) :



Ils expliquent toutefois l'action de l'acide borique par la réaction suivante :



Les complexes boriques, depuis les travaux de Vignon [31], de Bouchardat [5] et de Klein [13], sont bien connus des analystes. Ils ont été particulièrement bien étudiés par J. Böeseken [2, 3, 4] ; ce professeur de l'Université de Delft a montré que la formation de complexes boriques nécessite :

- La présence dans une molécule de deux groupements hydroxylés fixés sur deux atomes de carbone voisins (α -diols) ;

— une situation favorable de ces deux groupements hydroxylés, correspondant à une configuration *cis*.

Ces deux conditions ne sont toutefois pas suffisantes, car les α -glycols les plus simples se montrent peu réactifs : ceci provient vraisemblablement de la répulsion mutuelle de ces groupements, l'hydroxyle pouvant tourner librement autour de l'axe C—C qui joint les atomes de carbone porteurs des deux groupements fonctionnels.

Dans ses travaux sur les complexes boriques des polyols, Böeseken s'est principalement servi d'une technique conductimétrique [3] que nous avons adoptée pour notre étude sur les complexes boriques de la ninhydrine.

• Étude conductimétrique

Cette technique repose sur la libération d'un proton lorsque l'acide borique, très peu ionisé, réagit avec le produit di- ou polyhydroxylé. La solution aqueuse d'acide borique, très peu conductrice et très peu acide, s'acidifie tandis que sa conductivité électrique augmente lorsque se forme le complexe borique.

La méthode de Böeseken consiste à déterminer :

- a** - la conductivité d'une solution aqueuse 0,5 M d'acide borique ;
- b** - celle d'une solution aqueuse susceptible de donner un complexe, si possible à la même concentration de 0,5 M si sa solubilité est suffisante ;
- c** - celle d'une solution contenant à la fois l'acide borique et la substance examinée, aux mêmes concentrations.

Les conductivités, mesurées à la température de 25°C, sont exprimées en unités Kohlrausch-Holborn ($\times 10^6$). L'augmentation de conductivité est donnée par l'incrément de conductivité Δ

$$\Delta = \text{conductivité en c} - (\text{conductivité en a} + \text{conductivité en b})$$

Les valeurs élevées de Δ indiquent la formation facile d'un complexe borique ; les quelques exemples suivants sont empruntés à Böeseken [3] :

<i>Produit (5 M)</i>	Δ
<i>Glycol</i>	0
<i>Glycérol</i>	9
<i>Érythritol</i>	72
<i>Ribitol</i>	90
<i>Mannitol</i>	685
<i>Pyrocatéchol (1 M)</i>	681

Nous avons donc soumis des solutions ninhydrine-acide borique à la technique conductimétrique de Böeseken. Si la concentration de 0,5 M en acide borique a été conservée, la faible solubilité de la tricétone dans l'eau à 25°C nous a imposé d'utiliser des concentration nettement plus faibles de ce produit (*Tableau II*).

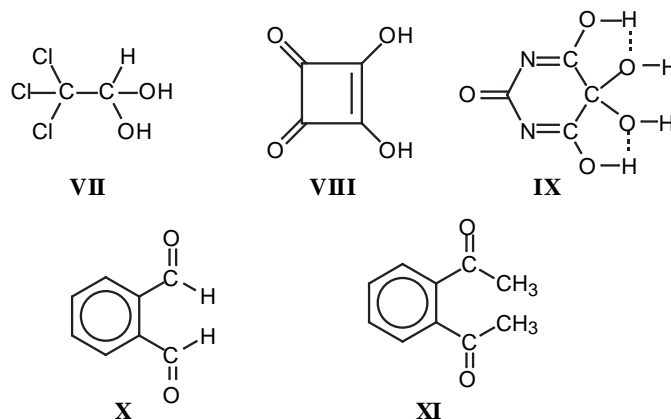
Les valeurs très élevées de Δ notées avec la ninhydrine montrent que l'aptitude de la tricétone à fournir des complexes boriques surclasse de loin celle des quelques polyols indiqués dans le tableau II (pour lesquels nos résultats concordent avec ceux de Böeseken) : la ninhydrine, à la concentration de 0,15 M, moins du tiers de celle utilisée pour le mannitol, conduit à un Δ presque cinq fois supérieur à celui noté pour cet itol, les résultats n'étant similaires que pour la concentration de 0,025 M, vingt fois inférieure.

Tableau II : Conductivité d'une solution 0,5 M d'acide borique contenant de la ninhydrine ou quelques polyols

Les produits dont le nom est suivi de () ont été étudiés par Böeseken [25], dont nous rapportons les résultats*

<i>Produits</i>	<i>Conc. (M)</i>	Δ
<i>Ninhydrine</i>	0,15	2960
- d°-	0,05	1301
- d°-	0,025	635
<i>Glycérol</i>	0,5	7
- d°-	0,15	0,5
<i>Érythritol</i>	0,5	59
<i>Mannitol</i>	0,5	620
<i>Pyrocatechol</i>	0,5	499
<i>cis-Cyclopentane diol (*)</i>	0,5	149
<i>trans-Cyclopentane diol (*)</i>	0,5	nég.
<i>cis-Indanediol-1,2 (*)</i>	0,14	63
<i>trans-Indanediol-1,2 (*)</i>	0,14	nég.

L'hydrate de chloral (**VII**) avec ses deux groupements hydroxylés portés par le même atome de carbone, des polycétones cycliques comme l'acide squarique (**VIII**) ou le monohydrate d'alloxane (**IX**), l'*o*-phtaldialdéhyde (**X**) ou l'*o*-diacétylbenzène (**XI**) dont les groupements carbonyles sont vraisemblablement hydratés en solution aqueuse étudiés en solution 0,2 M d'acide borique, ne nous ont donné que des résultats négatifs.



La mise en œuvre de la méthode des variations continues de Job [11] conduit au diagramme asymétrique de la figure 4, qui suggère la formation d'un complexe dans lequel une molécule d'acide borique s'associe à deux molécules de ninhydrine.

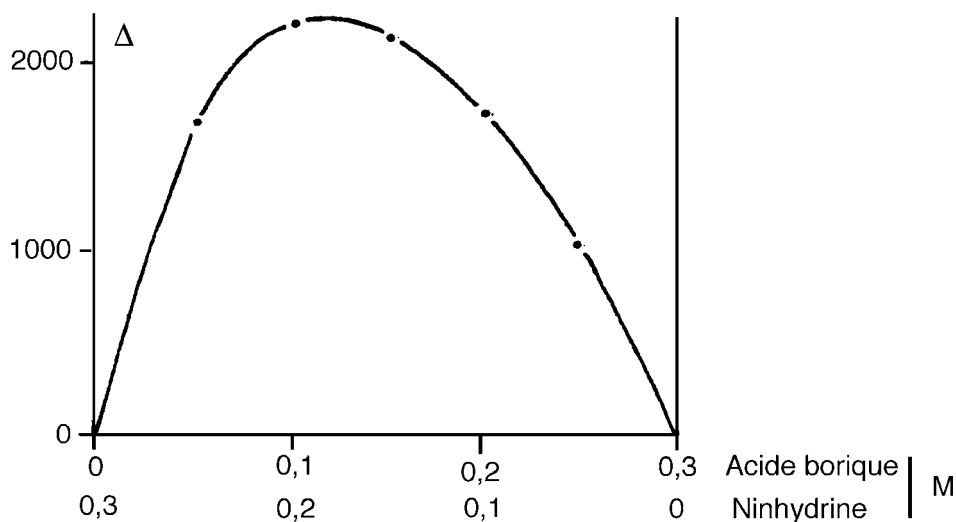


Fig. 4 : Complexes boriques de la ninhydrine

Étude conductimétrique par la technique des variations continues

• Étude potentiométrique

L'étude potentiométrique des solutions aqueuses de ninhydrine et d'acide borique a été également réalisée avec la méthode des variations continues de Job ; bien que le minimum de la figure 5 se situe dans une région de la courbe assez aplatie, nos résultats confirment cependant la composition du complexe borique indiquée ci-dessus.

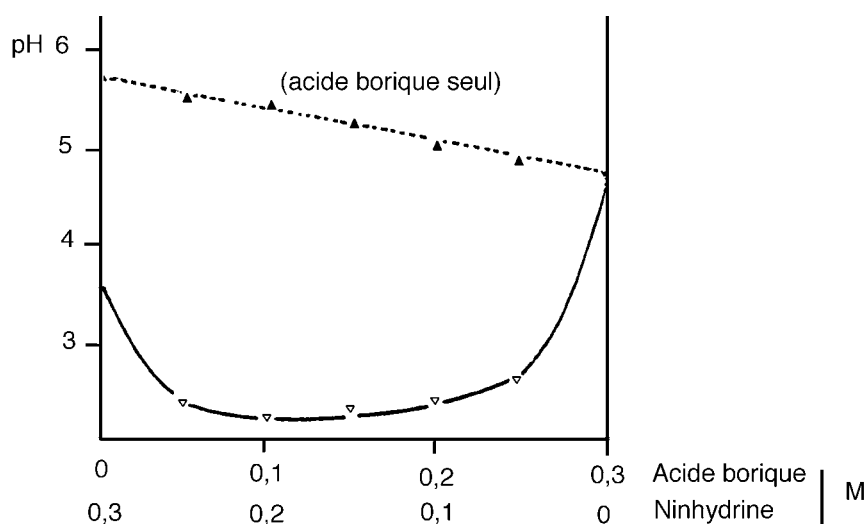


Fig. 5 : Complexes boriques de la ninhydrine

Étude potentiométrique par la technique des variations continues

• Étude spectrophotométrique

L'adjonction d'acide borique à une solution aqueuse de ninhydrine n'entraîne pas de modification de coloration visible à l'œil nu ; il n'en n'est pas de même dans la région ultraviolette (*Figure 6*).

En solution aqueuse, le spectre d'absorption de la ninhydrine dans la région 225-325 nm (*Figure 6*) présente deux épaulements : l'un à 305 nm, l'autre, plus accentué, au voisinage de 290 nm.

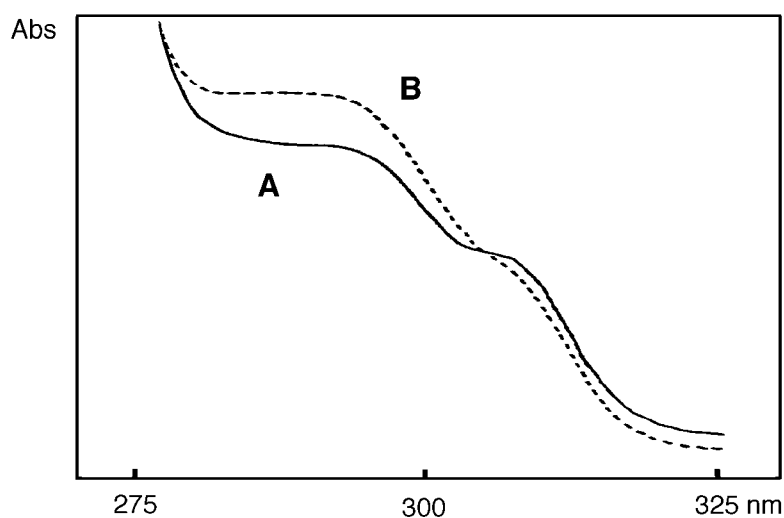


Fig. 6 : Spectre d'absorption UV d'une solution aqueuse de ninhydrine
A : solution de ninhydrine (1,25 mM)
B : solution A contenant de l'acide borique (250 mM)
 t = 25°C

L'adjonction d'une quantité croissante d'acide borique élimine progressivement le premier épaulement ; au niveau du deuxième accident, après une faible diminution, on observe une augmentation de l'absorption (Figure 7).

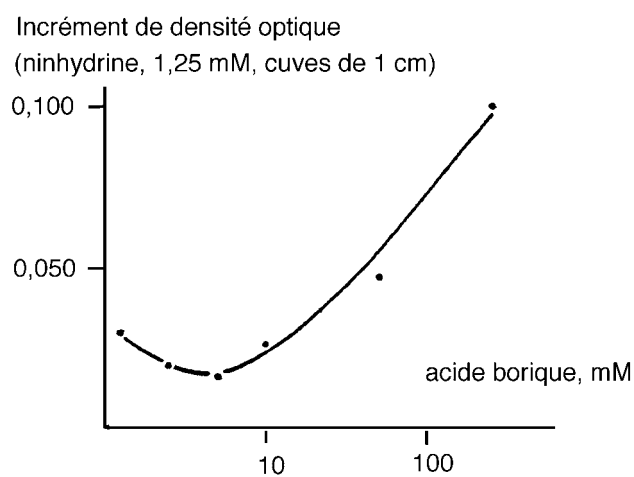


Fig. 7 : Absorption à $\lambda = 290$ nm d'une solution aqueuse de ninhydrine
 Influence de l'acide borique

Nous avons vérifié que ces modifications ne sont pas liées à la baisse de pH qui accompagne la formation des complexes boriques : le spectre d'absorption d'une solution aqueuse 5 mM de ninhydrine ne subit aucun changement par addition d'acide chlorhydrique jusqu'à la concentration finale de 5 mM.

• Mécanisme de formation des complexes boriques

Notre étude conductimétrique a montré l'aptitude remarquable de la ninhydrine (**NH**) à former des complexes avec l'acide orthoborique (**B**), complexes de composition :



Des complexes boriques du même type ne sont donnés ni par les monocétones, ni par les aldéhydes, ni par les hydrates d'aldéhydes (hydrate de chloral) : ils se forment au contraire très facilement à partir des *cis*- α -diols.

Ce sont donc les formes di- ou tri- hydratées de l'indanetrione, (**V**) ou (**VI**), qui seraient impliquées dans la formation des complexes boriques, comme l'avaient suggéré avant nous Vlček *et coll.* [32]. Ces formes hydratées expliquent également que la molécule de ninhydrine soit coupée au niveau de son cycle pentagonal par l'acide periodique [29]. Böeseken a obtenu des résultats positifs (*Tableau II*) avec le *cis*-cyclopentanediol et avec le *cis*-indanediol-1,2, molécules qui présentent quelques points communs avec les formes polyhydratées de l'indanetrione ; ceci indique que, dans la ninhydrine, seuls les groupements hydroxylés en position *cis* des groupement cétoniques hydratés peuvent participer à la formation de complexes boriques.

Nous pensons que les différentes étapes proposées par Isbell *et coll.* [10] pour expliquer la formation de complexes boriques d' α -diols peuvent s'appliquer à la ninhydrine (*Figure 8*). L'acide tétraborique (**T**) résulte de l'hydratation de l'acide orthoborique (**B**) et en serait la forme active.

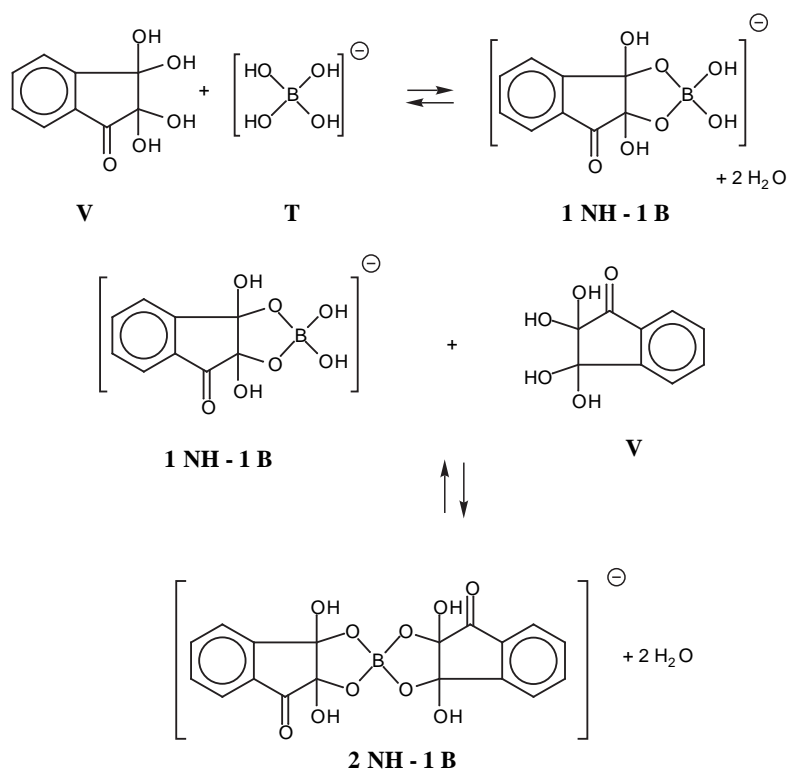
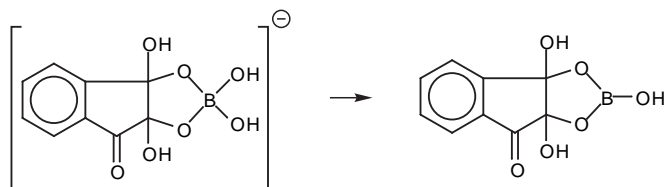


Fig. 8 : Formation des complexes boriques de la ninhydrine

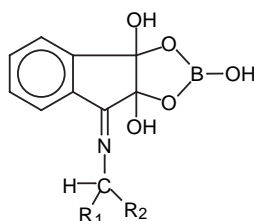
La ninhydrine réagit sous la forme de la tétrahydroxy-2,2,3,3-indanone-1

L'acide tétraborique réagit avec une molécule de ninhydrine dont un groupement carbonylé latéral a subi une hydratation supplémentaire (**V**) ; le complexe borique **1 NH - 1 B** ainsi formé, en présence d'une nouvelle molécule de **V** donne finalement le complexe **2 NH - 1 B**.

On peut aussi envisager que le complexe anionique **1 NH - 1 B**, en présence d'un proton, perde une molécule d'eau pour conduire au complexe neutre selon la réaction ci-dessous :



Ces complexes boriques de la ninhydrine ne possèdent plus les attributs structuraux leur permettant de réagir avec les composés aminés, selon les schémas réactionnels indiqués dans les figures 1 et 2. Ces complexes doivent être assez stables, puisqu'ils inhibent fortement - et peuvent même supprimer totalement - la formation de poupre de Ruhemann à partir de composés aminés par ailleurs très réactifs, comme la cyclosérine. Nous avons cependant remarqué que des solutions de ninhydrine renfermant cet antibiotique et comportant une concentration élevée en borate prennent progressivement une teinte jaune ; cette coloration est probablement due à la formation d'une cétimine, car les complexes boriques dont nous avons donné la structure possèdent encore un groupement carbonyle libre (complexe **1 NH - 1 B**) ou deux (complexe **2 NH - 1 B**), susceptibles de réagir avec une amine primaire. La formule ci-dessous est l'une de ces cétimines qui peuvent rendre compte de l'apparition de la couleur jaune :



Ions borate et action antimicrobienne de la ninhydrine

Nos expériences ont été réalisées avec la souche A₂₃₇ de *Pseudomonas aeruginosa*, de la collection de l'institut Pasteur de Paris, bactérie aérobie qui se développe rapidement sur des milieux synthétiques de composition très simple et qui a fait l'objet de nombreuses publications du laboratoire de Bordeaux.

Nous avons déterminé, dans une première série d'essais, les concentrations en borate susceptibles de ralentir la croissance de *Ps. aeruginosa* ; des expériences parallèles ont été réalisées avec la ninhydrine. Notre idée initiale était de rechercher les modifications du pouvoir antiseptique de l'acide borique par la ninhydrine. En raison du faible pouvoir antimicrobien de l'ion borate par rapport à celui de la ninhydrine, c'est en fait la démarche inverse qui a été effectuée : nous avons étudié l'influence de l'acide borique sur les propriétés antimicrobiennes de la ninhydrine.

Les techniques utilisées ont été décrites par ailleurs [12]. Indiquons seulement que le milieu de base **T** est une solution aqueuse de pH=7,2, contenant KH_2PO_4 (30 mM), MgCl_2 (4 mM) et K_2SO_4 (3 mM), dont NH_4Cl (34 mM) représente l'apport d'azote et l'acide succinique (36 mM) la source carbonée énergétique. La croissance microbienne est enregistrée au biophotomètre de Bonet-Maury : elle ne démarre qu'après une phase de latence, suivie d'une phase exponentielle qui correspond à la capacité maximale de synthèse de la bactérie dans les conditions de milieu où elle se trouve.

• Action antiseptique de l'acide borique

Un retard de la croissance microbienne est déjà très net pour une concentration finale en acide borique de 15 mM : la phase de latence, en particulier, est nettement augmentée (*Figure 9*), tandis que la pigmentogénèse est réduite : après 64 heures d'incubation à 37°C, la quantité de pyocyanine formée ne correspond qu'à 25% de celle de la culture témoin. Nous confirmons ainsi les résultats de Litovchenko *et coll.* [14, 15]. Pour une concentration plus faible (5 mM), la courbe de croissance se confond pratiquement avec celle du témoin.

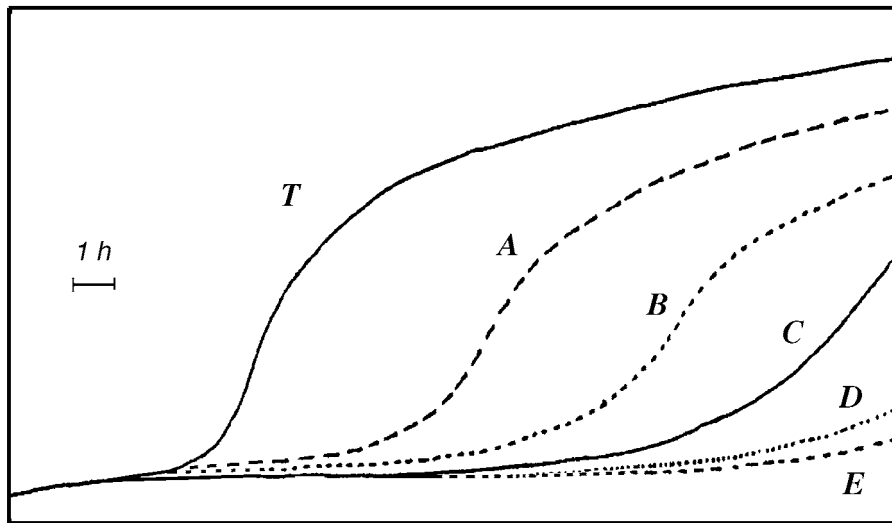


Fig. 9 : Croissance de *Ps. aeruginosa*
en présence de borates à différentes concentrations

T = témoin A = 15 mM B = 25 mM
C = 33 mM D = 41 mM E = 50 mM

• Action antimicrobienne de la ninhydrine

Pseudomonas aeruginosa se montre beaucoup plus sensible à la ninhydrine qu'à l'acide borique : l'adjonction de la tricétone indanique au milieu T supprime complètement la croissance microbienne dès la concentration de 2 mM. Avec des concentrations plus faibles (0,5 et 1 mM), la phase de latence est très prolongée mais, lorsque la croissance démarre, la courbe de la phase exponentielle est assez voisine de celle du milieu témoin (Figure 10). Parallèlement, la pyocyaninogénèse est très réduite. L'effet antimicrobien n'est plus sensible pour une concentration finale en ninhydrine de 0,25 M.

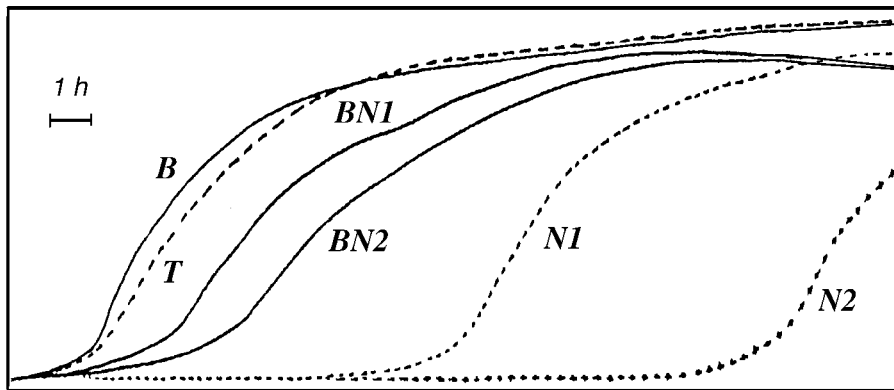


Fig. 10 : Croissance de Ps. aeruginosa dans différentes conditions expérimentales

T = milieu témoin

B = *T* + acide borique 5 mM

NI = *T* + ninhydrine 0,5 mM

N2 = *T* + ninhydrine 1 mM

BN1 = *B* + ninhydrine 0,5 mM

BN2 = *B* + ninhydrine 1 mM

• Inhibition par les borates des propriétés antimicrobiennes de la ninhydrine

Nous avons sélectionné les deux concentrations de 0,5 et de 1 mM en ninhydrine pour effectuer nos essais ; ces milieux ont été étudiés sans ou avec adjonction d'acide borique à la concentration finale de 5 mM. La formation des complexes boriques s'accompagnant d'une importante baisse de pH (*Figure 5*), nous avons pris soin d'effectuer une neutralisation minutieuse de ces différents milieux avant leur stérilisation et leur ensemencement.

Nos résultats sont groupés dans la *Figure 10*. L'adjonction de borate, au milieu *NI* comme au milieu *N2*, décale les courbes de croissance vers la gauche. Deux explications peuvent être avancées :

- En raison du rapport acide borique/ninhydrine élevé, la totalité des molécules de la tricétone indanique sont présentes sous forme de complexes boriques de *toxicité réduite* ;

- Les complexes boriques de la ninhydrine sont *totalelement atoxiques* pour *Ps. aeruginosa* ; le retard à la croissance observé serait alors la traduction de leur dissociation partielle, qui libérerait quelques molécules de tricétone toxique.

*

* *

La ninhydrine, petite molécule possédant trois groupements fonctionnels très réactifs, n'a cessé depuis 1910 et tout au long du XXème siècle de retenir l'attention des chimistes, organiciens, analystes, biochimistes ou théoriciens. Elle intéresse les biologistes par son squelette carboné, le noyau indanique, que l'on retrouve dans les stéroïdes, dans quelques alcaloïdes et dans certains médicaments anticoagulants. A l'orée du nouveau siècle, on peut légitimement penser que les travaux des chercheurs dans le domaine de la ninhydrine ne sont pas près de s'éteindre.

BIBLIOGRAPHIE

- 1.- Alaoui (I. M.), Menzel (E. R.). Substituents effects on luminescence enhancement in europium and terbium Ruhemann's purple complexes, *Forensic Sci. Int.*, 1996, **77**, 3-11.
- 2.- Böeseken (J.). Über die Lagerung der Hydroxyl-Gruppen von Polyoxyverbindungen im Raum. Die Konfiguration der gesättigten Glykole und der α - and β -Glykose, *Ber.*, 1913, **46**, 2612-2628.

- 3.- Böeseken (J.). Configuration des polyalcools déduite de leur influence sur le pouvoir conducteur de l'acide borique, *Bull. Soc. chim. France*, 1933, 4ème sér., **53**, 1332-1357.
- 4.- Böeseken (J.). The use of boric acid for the determination of the configuration of carbohydrates, *Adv. Carbohydrate Chem.*, 1949, **4**, 189-210.
- 5.- Bouchardat (G.). Sur le pouvoir rotatoire spécifique de la mannite, *C. R. Acad. Sc.*, 1875, **80**, 120-123.
- 6.- Breton (J.-C.). Etudes chimiques et biologiques sur la ninhydrine, réactif des aminoacides. Thèse Doct. Méd., n° 53, Bordeaux, 1957; 1 vol., 285 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1958.
- 7.- Cuckler (A.C.), Frost (B.M.), McClelland (L.), Solotorovsky (M.). The antimicrobial evaluation of oxamycin (D-4-amino-3-isoxazolidinone), a new broad-spectrum antibiotic, *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 191-197.
- 8.- Epstein (I.G.), Nair (K.G. S.), Boyd (L.J.). Cycloserine, a new antibiotic in the treatment of human pulmonary tuberculosis : a preliminary report, *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 198-203.
- 9.- Hark (R. R.), Hauze (D. B.), Petrovskaia (O.), Joulié (M. M.), Jahouari (R.), McCominsky (P.). Novel approaches toward ninhydrin analogs, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 7719-7722.
- 10.- Isbell (H.S.), Brewster (J.F.), Holt (N.B.), Frush (H.L.). Behavior of certain sugars and sugar alcohols in the presence of tetraborates. Correlation of optical rotation and compound formation, *J. Research Natl. Bur. Stands.*, 1945, **40**, 129-149.
- 11.- Job (P.). Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité, *Ann. Chimie*, 1926, 1ère sér., **9**, 113-203.
- 12.- Joly-Didavi (R.D.). Complexes boriques de l'hydrate du tricétoindane (ninhydrine). Thèse diplôme Etat Doct. Pharm.Univ. Bordeaux II, n° 78, 1987 ; 1 vol., 79 p., dactyl.
- 13.- Klein (D.). Sur une réaction particulière à certains alcools polyatomiques, *C.R. Acad. Sc.*, 1878, **86**, 826-828.

- 14.- Litovchenko (P.P.), Chernobrovyi (N.P.), Shataliuk (B.P.), Zavialets (I.T.). Chuvstvitel'nost' *Pseudomonas aeruginosa* k bornoj kisloti, karbenitsillinu, deposulu i vozmozhnost' ispol' zovaniia ikh pri lechenii sinegnoinoi infektisii, *Mikrobiol. Zh.* (Kiev), 1981, **43**, 369-372.
[Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* à l'acide borique et à la carbénicilline ; utilisation possible dans le traitement des infections par *Pseudomonas aeruginosa*]
- 15.- Litovchenko (P.P.), Chernobrovyi (N.P.). Podavlenie pigmento-obrazovaniia u sinegnoinykh bakterii rastvorami bornoj kisloty, *Vestn. Khir.* (Leningrad), 1982, **126**, 67-70.
[Inhibition de la pigmentogenèse chez les bactéries pyocyaniques par l'acide borique]
- 16.- Neuzil (E.), Breton (J.-C.). Propriétés chimiques de la D-cyclosérine ; la réactivité de son groupement amine primaire avec quelques composés carbonylés, *Bull. Mém. École nat. Méd. Pharm. Dakar*, 1957, **5**, 240-250.
- 17.- Neuzil (E.), Breton (J.-C.). Réactivité de la ninhydrine en présence d'alcools aliphatiques ; étude particulière de la réaction ninhydrine-aminoacides en présence d'alcool butylique tertiaire, *Bull. Mém. École nat. Méd. Pharm. Dakar*, 1957, **5**, 251-265.
- 18.- Neuzil (E.), Breton (J.-C.). Réaction colorée de quelques amino-4-isoxazolidinones-3 avec la ninhydrine, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1960, **99**, 91-107.
- 19.- Neuzil (E.), Breton (J.-C.), Plagnol (H.). La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire ; essais d'interprétation, *Bull. Mém. École nat. Méd. Pharm. Dakar*, 1959, **7**, 195-211.
- 20.- Neuzil (E.), Breton (J.-C.), Plagnol (H.). Facteurs structuraux et réaction colorée des composés aminés avec la ninhydrine, *Rev. esp. Fisiol.*, 1960, **16**, suppl. III, 47-65.
(communication présentée aux Vèmes Journées biochimiques latines, Barcelone, 21-24 mai 1959)
- 21 - Neuzil (E.), Breton (J.-C.), Plagnol (H.). Complexes boriques de la ninhydrine, *Bull. Soc. chim. France*, **1965**, 575.
(communication présentée à Bordeaux le 16 octobre 1964, lors de la réunion annuelle des sections de Bordeaux, de Montpellier et de Toulouse de la Société chimique de France).

- 22.- Neuzil (E.), Josselin (J.), Breton (J.-C.). Action favorisante de la lumière sur la réaction de certaines amines avec la ninhydrine, *C. R. Acad. Sc.*, 1961, **252**, 119-121.
- 23.- Neuzil (E.), Josselin (J.), Breton (J.-C.). Hémicétals du tricétoindane, *Bull. Soc. chim. France*, **1964**, p. 9
(communication présentée à la séance du 6 novembre 1963 de la Section de Bordeaux de la Société chimique de France).
- 24 - Neuzil (E.), Josselin (J.), Breton (J.-C.), Gaumet (J.-L.), Lemanceau (B.). Réactivité de la ninhydrine en présence d'alcools : hémicétals du tricétoindane, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1979, **119**, 82-94.
- 25.- Neuzil (E.), Sylla (O.), Pauc (A.), Breton (J.-C.). Réaction de la ninhydrine avec quelques alcools primaires- α -aminés, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1965, **104**, 227-232.
- 26.- Plagnol.(H.). Influence de la structure des composés aminés dans leur réaction avec la ninhydrine. Thèse Doct. Université de Bordeaux (mention Pharmacie), 1960 ; 1 vol., 156 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1962.
- 27.- Ruhemann (S.). Cyclic di- and tri-ketones, *J. chem. Soc.*, 1910, **97**, 1438-1449.
- 28.- Ruhemann (S.). Triketohydrindene hydrate, *J. chem. Soc.*, 1910, **97**, 2025-2031.
- 29.- Sprinson (D.B.), Chargaff (E.). On oxydative decarboxylation with periodic acid, *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 433-449.
- 30.- Vidal (Y.). Action de la lumière sur le système Amines (R,R')CH-NH₂ —Ninhydrine. Thèse Doct. de l'Université de Bordeaux I (mention Sciences), 3 juillet 1970 ; 1 vol., 106 p., dactyl.
- 31.- Vignon (L.). De l'action de systèmes ternaires définis, formés de mannite, de borax et d'eau sur la lumière polarisée. Du pouvoir rotatoire de la mannite, *C. R. Acad. Sc.*, 1874, **78**, 148-149.
- 32.- Vlček (A.K.), Špalek (E.), Krátk (L.). The polarography of ninhydrin, *Coll. Trav. chim. Tchéc.*, 1950, **15**, 340-355.

ABSTRACT

Boric complexes of ninhydrin (Triketoindane hydrate)

The intense colour reaction occurring when ninhydrin reacts with cycloserine, a primary heterocyclic amine, is inhibited by borate ions. The formation of type **2:1** complexes between ninhydrin and borate ions was studied using conductimetric (Böeseken), potentiometric and spectrophotometric techniques. In aqueous solutions, the three carbonyl groups of the indanic triketone undergo hydration; the *gem*-dihydroxylated groups thus formed then react with borate ions to give the complexes, which cannot lead to Ruhemann purple, the well-known coloured product of the ninhydrin reaction. Toward boric acid, ninhydrin in aqueous solutions behaves as *cis*- α -diols, furthermore showing a higher reactivity than the latter. The formation of ninhydrin-boric acid complexes also explains the inhibition by borate ions of the antimicrobial properties of the indanic triketone toward *Pseudomonas aeruginosa*.

Key-words : ninhydrin colour reaction, triketoindane hydrate, boric acid complexes, *Pseudomonas aeruginosa*.
