

*Bibliothèque numérique*

**medic@**

**Costy, Pierre. Uréase et urée chez les champignons supérieurs**

*Paris : Presses universitaires de France, 1923.*

*Cote : BIU Santé Pharmacie Prix Gobley 1923-1*

19

Prix Golley 1923<sup>11</sup>  
Prix Golley  
1923

**Pierre COSTY**

DOCTEUR EN PHARMACIE  
EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS  
EX-PRÉPARATEUR DE CHIMIE

# URÉASE ET URÉE

Chez les Champignons Supérieurs



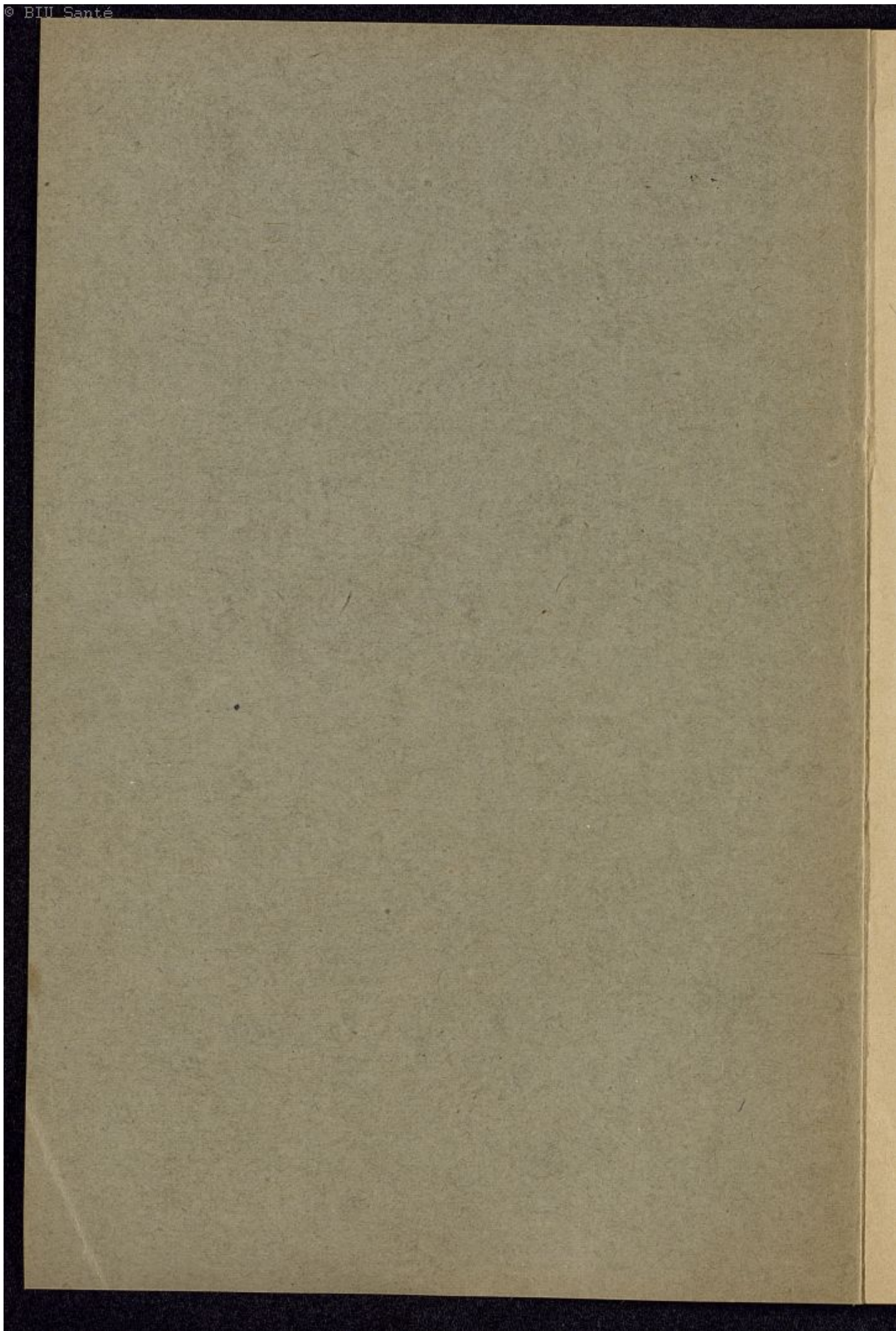
PARIS

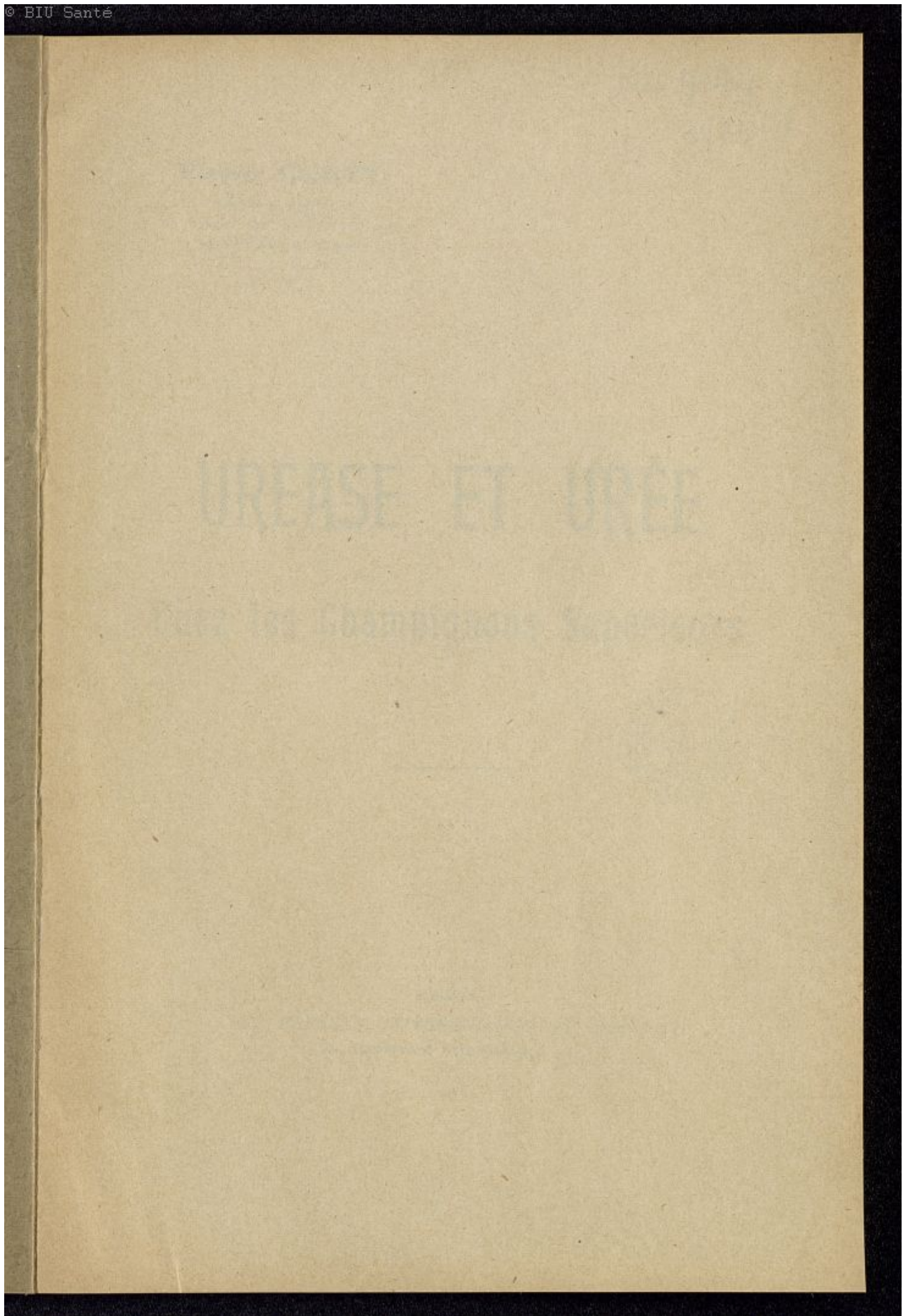
“ LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE ”

49, Boulevard Saint-Michel, 49

1923











Brix Golley  
1923 (!)

**Pierre COSTY**

DOCTEUR EN PHARMACIE  
EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS  
EX-PRÉPARATEUR DE CHIMIE

# URÉASE ET URÉE

Chez les Champignons Supérieurs



PARIS

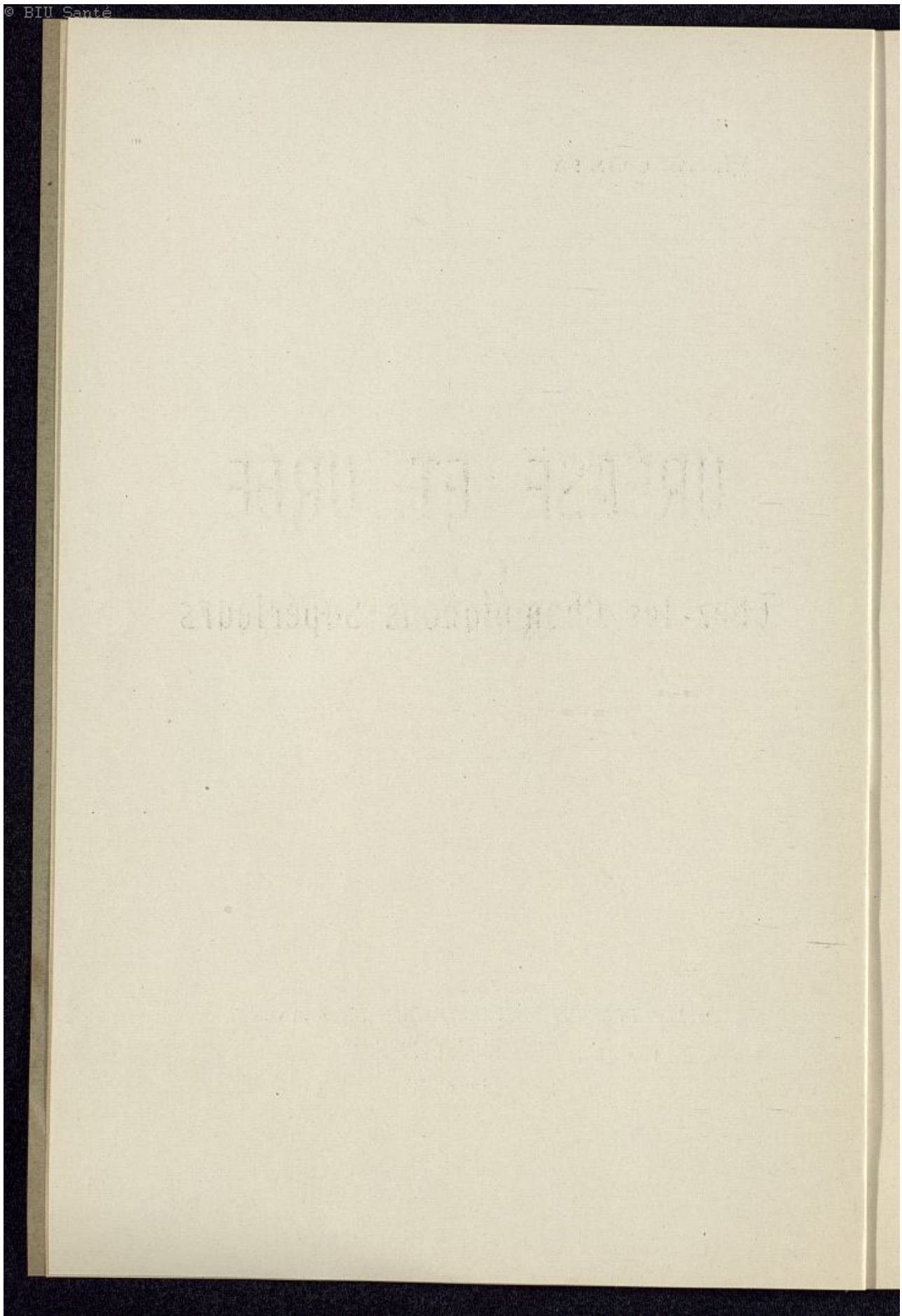
" LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE "

49, Boulevard Saint-Michel, 49

1923

(dm) 0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5





A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. GORIS,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur.

*En hommage de notre respectueux attachement  
et en reconnaissance de la bienveillance qu'il  
nous a toujours témoignée.*



A MES PARENTS.

*En témoignage de ma grande affection.*

## AVANT-PROPOS

---

Depuis les immortels travaux de PASTEUR sur les fermentations, de nombreux savants se sont attachés à l'étude des ferments solubles. Ils ont cherché à pénétrer davantage ces agents mystérieux qui agissent à doses infimes sur des quantités parfois considérables de matière et qui, selon les conditions du milieu, peuvent déterminer des réactions chimiques totalement opposées.

On sait aujourd'hui que si les fermentations provoquées par ces diastases sont de nature bien différente suivant le ferment envisagé, il n'en existe pas moins entre ces divers catalyseurs des propriétés communes. Ne nous illusionnons pas cependant ; il reste encore beaucoup à faire dans ce domaine.

Nous avons voulu apporter, dans la mesure de nos moyens, notre contribution à cette étude générale et nous nous sommes attachés plus particulièrement à celle de l'uréase. Nous pensons que l'examen de cette diastase prise chez les Champignons supérieurs et non encore signalée dans cette partie du règne végétal, peut être intéressante au point de vue biologique.

Ce travail est forcément incomplet. On ne peut songer, en effet, à envisager la répartition de



l'uréase chez tous les Basidiomycètes: les récoltes effectuées ont porté sur les trois années précédentes dont l'une, trop pluvieuse, ne nous a fourni qu'un nombre restreint d'espèces nouvelles.

Nous laissons à d'autres le soin de poursuivre un travail que le hasard des récoltes seul, permettra de rendre plus complet.

Le plan de cet ouvrage est le suivant :

La première partie est consacrée à l'historique de la question.

Dans la seconde partie, nous exposons la méthode de recherche de l'uréase chez les Champignons, la localisation de ce ferment et la liste des espèces étudiées.

La troisième partie envisage la recherche et le dosage de l'urée, la localisation de ce composé et sa répartition suivant l'âge de l'individu.

La quatrième partie enfin, est réservée à l'étude proprement dite de l'uréase.

Une brève conclusion termine ce travail.

Avant d'entrer dans le détail de cette étude, nous sommes heureux de pouvoir remercier nos amis d'internat M. MÉTIN et A. VINCENT, dont nous avons pu apprécier maintes fois, au cours de ces recherches, la bonne camaraderie et la grande complaisance. Nous garderons d'eux, pendant ces années de vie commune à la salle de garde, le plus amical souvenir.

Nous nous faisons un devoir également de remercier M. DUMÉE, qui s'est mis aimablement à notre disposition pour la détermination des espèces dou-

teuses et M. MANGIN, Directeur du Muséum d'Histoire Naturelle, pour les échantillons qu'il a bien voulu nous donner, à la suite de l'Exposition Mycologique.

Nous exprimons enfin toute notre reconnaissance à M. ARNOULD, Pharmacien Honoraire, que nous avons mis si souvent à contribution pour récolter des espèces nouvelles et faire sur place l'essai de celles qu'il ne pouvait envoyer.

M. le Professeur PERROT a bien voulu nous recevoir dans son laboratoire; nous le prions d'agréer l'expression de nos sentiments respectueux.

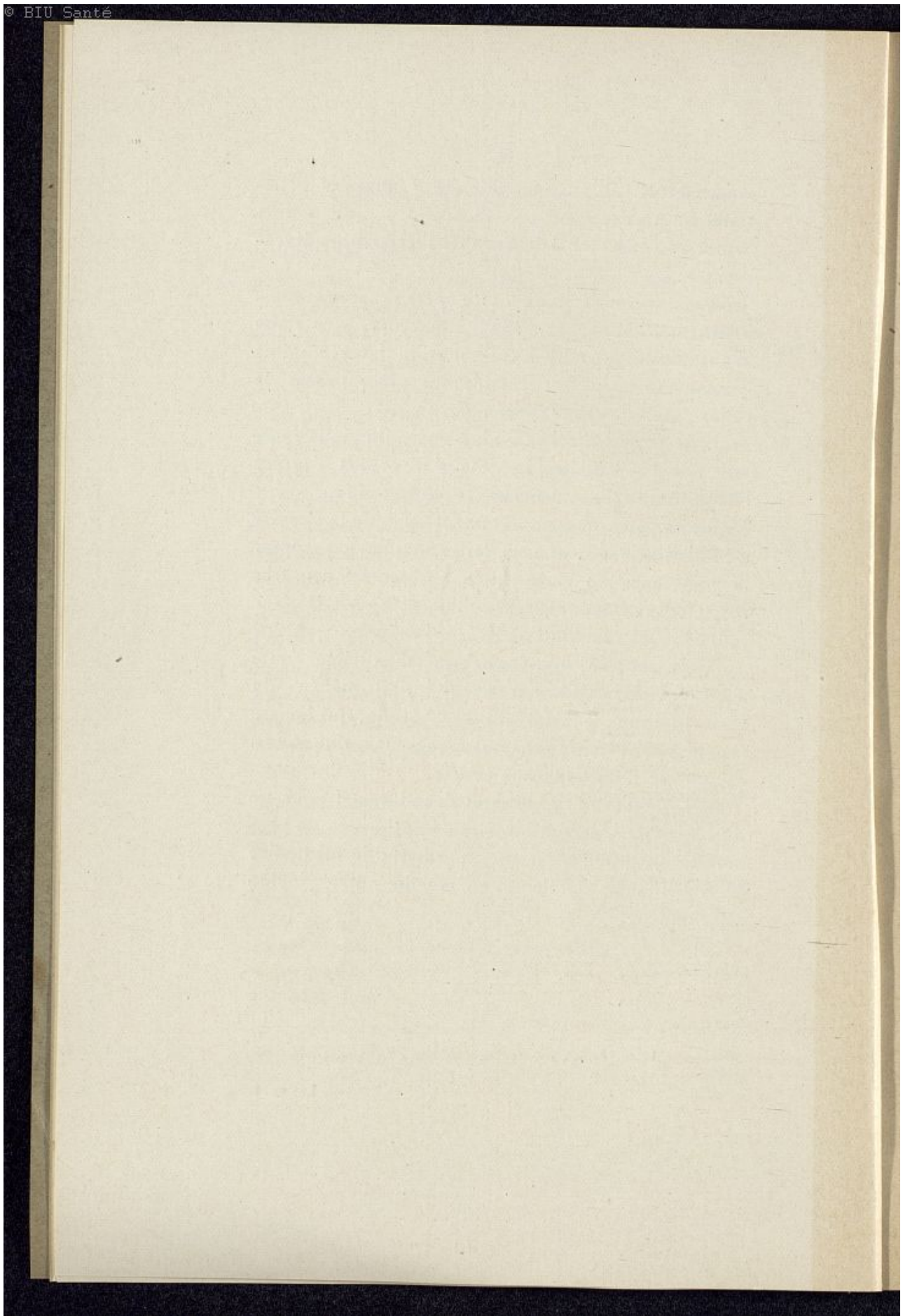
Que M. le Professeur RADAIS, Doyen de la Faculté de Pharmacie, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, reçoive ici nos très respectueux hommages.

Mais c'est surtout à M. le Professeur agrégé A. GORIS, que nous sommes heureux d'exprimer toute notre reconnaissance. C'est lui qui a bien voulu nous indiquer le sujet de cette étude, qui nous a constamment guidé dans nos recherches, qui nous a encouragé enfin dans nos efforts.

Nous serions le plus ingrat des élèves si nous ne lui adressions aujourd'hui nos sentiments de profonde gratitude; qu'il nous permette de lui dédier ce travail, bien faible hommage de notre sincère attachement.

---





## PREMIÈRE PARTIE

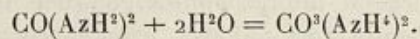
---

### CHAPITRE I

#### L'URÉASE

---

L'uréase, ferment soluble se rattachant au groupe des diastases dites hydrolysantes, a, chez les végétaux, une répartition très étendue : on la rencontre en effet chez les Bactéries, les Champignons et chez quelques familles de Phanérogames, les Légumineuses en particulier. Il n'y a donc pas à proprement parler une uréase, mais *des* uréases ; elles peuvent différer les unes des autres soit par leur façon de se comporter vis-à-vis des agents physiques et chimiques, soit par leur pouvoir hydratant, soit par leur sensibilité vis-à-vis des agents extérieurs, soit par d'autres particularités encore, mais elles ont toutes la même propriété biologique : faculté de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque, suivant la réaction :



Cette transformation, encore appelée *Fermentation ammoniacale* est la base des phénomènes qui s'accomplissent journellement dans la nature et par lesquels suivant les paroles de DUMAS, (1) « la vie végétale et la vie animale se prêtent une mutuelle assistance. C'est en effet en se convertissant en carbonate d'ammoniaque par la fermentation que l'azote de l'urée devient propre à servir d'aliment aux plantes ».

(1) DUMAS cité par VAN TIEGHEM. Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. Thèse Fac. des Sc., Paris, 1864.



L'uréase a été découverte en 1874 par MUSCULUS (1). Mais au XVII<sup>e</sup> siècle déjà, de nombreux auteurs avaient remarqué et étudié la fermentation ammoniacale, sans pouvoir en établir bien nettement les causes. Parmi eux, nous citerons les noms de BOERHAAVE, PROUST, ROUELLE, CRUSKANK, plus tard ceux de PRÉVOST et DUMAS, FOURCROY, et plus particulièrement celui de VAUQUELIN qui, faisant de ce phénomène une simple hydratation, établit nettement la formule de la réaction.

En 1843, JACQUEMART (2), constate la décomposition de l'urine abandonnée au contact de l'air et en attribue l'origine aux substances organiques formant le dépôt de l'urine altérée.

Plus tard, MULLER (3), en 1860, entrevoit le rôle des microorganismes dans la fermentation ammoniacale, mais il n'apporte aucune preuve à cette hypothèse, de sorte qu'à cette époque encore, la théorie de LIEBIG (4), sur l'ébranlement moléculaire conserve toute sa valeur et permet d'expliquer la réaction de la façon suivante : « L'urine renferme du mucus ; celui-ci se convertit en ferment sous l'influence de l'oxygène de l'air et provoque l'hydrolyse de l'urée ».

Il en est ainsi jusqu'au jour où PASTEUR en 1863, opposant à cette hypothèse sa théorie vitale, montre qu'il n'y a jamais transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque en dehors de la présence et du développement d'un petit végétal microscopique, auquel il donne le nom de « Torule ammoniacale » ou « *Torula ureae* ». Et PASTEUR ajoute : « C'est le ferment organisé que je regarde comme le ferment de l'urine, c'est-à-dire celui qui transforme l'urée en carbonate d'ammoniaque et qui,

(1) MUSCULUS. Sur un papier réactif de l'urée. *C. R.* 78, p. 132, 1874.

(2) JACQUEMART. Note sur la fermentation urinaire. *Ann. de Chimie et de Phys.* 7, p. 149, 1843.

(3) MULLER. Über Conservirung und Concentrirung des menschlich. Harns. *Journ. für praktische Chemie* 81, p. 452, 1860.

(4) LIEBIG cité par PASTEUR et JOUBERT. Sur la fermentation de l'urine. *C. R.* 83, p. 5, 1876.

(5) PASTEUR et JOUBERT. Sur la fermentation de l'urine. *C. R.* 83, p. 5, 1876.



ultérieurement, par le fait de l'alcalinité qui en résulte, amène le dépôt des urates alcalins et du phosphate ammoniaco-magnésien ».

L'année suivante, son élève VAN TIEGHEM, reprenant cette étude, montre que, contrairement à l'opinion de VAUQUELIN, l'urée ne se transforme pas directement dans l'eau en carbonate d'ammoniaque et que cette hydratation ne peut s'accomplir que sous des influences parfaitement définies qui sont :

- 1° Soit une température de 140° dans un tube fermé;
- 2° Soit l'ébullition avec les acides ou les alcalis;
- 3° Soit enfin l'action d'un ferment figuré spécial qu'il appelle « *Micrococcus ureae* ».

Dans les urines, l'auteur explique la fermentation ammoniacale par la présence dans celles-ci du *Micrococcus* et, confirmant les travaux précédents de PASTEUR, il conclut que toutes les fois que l'urée, dans un milieu quelconque, se convertit en carbonate d'ammoniaque, sans que cette transformation puisse être rapportée à l'action des acides, des alcalis, ou d'une température très élevée, c'est que dans ce milieu vit et se développe un petit organisme végétal formé de globules sphériques, rangés en chapelets. Après ce travail, il faut donc renoncer à la théorie de LIEBIG et admettre que le *Micrococcus ureae* est bien l'agent de la fermentation ammoniacale.

En 1876, MUSCULUS (2), retire des urines émises par des malades atteints de catarrhe de la vessie une matière précipitable par l'alcool, soluble dans l'eau et pouvant transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque.

Sa découverte confirme les doutes qu'il avait du pouvoir hydratant de la torule ammoniacale; elle le conduit d'autre part à admettre que le corps qui transforme l'urée en carbonate d'ammoniaque n'a aucune des propriétés caractérisant les ferments organisés et qu'il se rapproche tout à fait des autres ferments solubles.

(1) VAN TIEGHEM. Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. Thèse Fac. des Sc. Paris, 1864.

(2) MUSCULUS. Sur le ferment de l'urée. C. R. 82, p. 333, 1876.



Aussitôt parue, cette note est contrôlée par PASTEUR. Ce savant confirme la présence dans l'urine du ferment signalé par MUSCULUS, mais il montre en même temps que cette diastase est sécrétée par la « *Torula ureae* » et non par notre organisme.

La découverte dans l'urine d'un ferment pouvant transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque revient donc à MUSCULUS, mais c'est PASTEUR qui a montré la relation existant entre ce ferment et la torulacée qu'il avait décrite quelque temps auparavant. MUSCULUS n'avait pas pressenti que le ferment soluble était produit par le ferment organisé de l'urée. Toutes les fois en effet que l'urine devient ammoniacale, il y a présence et développement dans ce liquide, d'un organisme microscopique ; lorsque ce dernier fait défaut, l'urine conserve indéfiniment son acidité.

La *théorie vitale* et celle dite de l'*ébranlement moléculaire* se rejoignent donc ; il n'y a pas entre elles l'opposition absolue que l'on constatait à leur origine. Le ferment soluble agit bien par sa présence pour « ébranler » et détruire la molécule, comme une sorte de catalyseur à action puissante, mais il doit son origine à la vie d'un microorganisme particulier. Ce catalyseur spécial, provenant du *Micrococcus ureae* et pouvant provoquer la fermentation ammoniacale, fut d'abord décrit par MUSCULUS sous le nom d'*urase*, puis d'*uréase*.

En 1878, MIQUEL signale l'existence de nouveaux agents bactériens pouvant transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque et l'année suivante, il décrit un « *Bacillus ureae* » que LEUBE devait retrouver quelques années plus tard (1895) ; mais leurs recherches en vue de l'obtention du ferment soluble sécrété par ces microbes, restent sans résultat.

Plus tard, MIQUEL (3), dans sa thèse sur la fermenta-

(1) P. MIQUEL. Etude sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. Thèse Fac. des Sc., Paris, 1898.

(2) LEUBE. Über die ammoniakalische Horn. Virchow's Arch. 100, p. 540, 1895.

(3) P. MIQUEL, loc. cit., Thèse, Paris, 1898.



tion ammoniacale (1898), reprend l'étude des bactéries, agents de cette fermentation. Il donne une description détaillée des principaux urobacilles, en particulier des *Urobacillus Pasteurii*, *U. Duclauxii*, *U. Freudenreichii*, *U. Maddoxii*; il fait ressortir leurs propriétés physiologiques diverses, montre que par elles-mêmes, ces bactéries sont sans actions sur la carbamide, mais qu'elles agissent par l'intermédiaire du ferment soluble de MUSCULUS : l'uréase. Cette diastase, d'abord sécrétée par l'espèce, agit ensuite sur l'urée, de telle sorte que tout se passe comme si la fermentation avait lieu en deux temps :

Acte physiologique d'abord, acte purement chimique ensuite (1).

L'acte physiologique qui correspond au développement du microbe et à la sécrétion de l'uréase atteint son optimum de température vers 35°; la température la plus favorable à l'action du ferment est située vers 55°.

Etudiant l'action des antiseptiques sur les différentes bactéries urophages et en particulier, celle du biiodure de mercure, du nitrate d'argent, du sublimé corrosif, du sulfate de cuivre, de l'iode, de l'acide borique et de l'acide phénique, MIQUEL constate qu'ils paralysent, mais à différents degrés, l'action de ces microbes.

Ses essais pour l'obtention du ferment de l'urée restent tout d'abord sans succès. L'uréase en effet, est détruite en grande partie par toutes les substances qui la précipitent, de sorte que pour obtenir cette diastase, MIQUEL doit opérer entièrement à l'abri de l'air, dans un appareil spécialement conçu à cet effet.

La marche de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase n'est pas progressive; elle a lieu pour ainsi dire en trois phases : la décomposition, rapide au début, atteint un maximum dans la deuxième période de l'action, puis va

(1) En 1901, M. W. BEIJERINCK signalait l'existence de bactéries lumineuses de la mer, ne décomposant pas l'urée au moyen d'une enzyme, mais par le contact direct de leur protoplasme vivant, procédé classé comme « catabolisme ». (BEIJERINCK. Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. *Centralbl. für Bakt.* 7, 2 Abt., 33-61, 1901).



en déclinant jusqu'à la troisième ; pour expliquer ce fait, MIQUEL envisage les hypothèses suivantes :

« 1° L'uréase s'épuise et agit à doses moins massives sur l'urée.

2° Le carbonate d'ammoniaque en s'accumulant dans la liqueur devient toxique pour le ferment soluble.

3° La précipitation des sels insolubles peut être une cause d'appauvrissement de la solution en diastase ».

MIQUEL étudie enfin l'action de différents agents sur l'uréase : action de la chaleur dont l'effet maximum se fait sentir vers 50° ; du froid intense et prolongé auquel le ferment est très sensible ; de quelques gaz qui détruisent rapidement l'uréase, à l'exception toutefois du gaz carbonique ; de l'air et par suite de l'oxygène, qui diminuent l'énergie du ferment. Il envisage également l'action du sucre et de la glycérine, qui semblent exalter le pouvoir hydratant de la diastase ou du moins la protéger ; celle des antiseptiques enfin, qui agissent parfois à doses infinitésimales (sels de mercure par exemple).

Plus tard, DUCLAUX en 1899 (1), tirait des expériences de MIQUEL la conclusion que l'uréase suit dans son action les lois générales des diastases. Mais, critiquant ensuite les travaux de ce savant, DUCLAUX ajoute : « Il manque pourtant une vérification précise et même on peut croire parfois que ces lois ne sont pas vérifiées ».

C'est ainsi qu'il signale la décroissance irrégulière dans les quantités d'urée transformées dans l'unité de temps, l'action de l'eau sur le ferment, la moindre résistance de l'uréase jeune et d'autres anomalies encore. Aussi DUCLAUX, cherchant une explication à ces phénomènes, ne peut-il émettre que des hypothèses et tout en admettant que l'on doit retrouver pour l'uréase, les mêmes caractères que ceux déjà observés à propos des autres diastases, insiste cependant sur ces faits non encore signalés : fragilité de la diastase jeune, inaltérabilité relativement plus grande de la diastase vieille.

En 1909, l'existence de l'uréase chez les végétaux supé-

(1) DUCLAUX, *Traité de microbiologie*, 2, p. 29 et 544.



rieurs est signalée par TAKEUCHI (1), qui découvre ce ferment dans les graines de *Soja*. Pour préparer cette diastase, TAKEUCHI commence par moulinier les graines de *Soja*, puis traite la poudre obtenue à plusieurs reprises par l'éther de pétrole; il filtre après contact suffisant et abandonne la poudre lavée pendant une nuit sur des assiettes. Il reprend alors par l'eau toluénée et après 24 heures, sépare le liquide par filtration au Büchner. La solution ainsi obtenue est très active.

L'uréase de *Soja* possède une action énergique sur l'urée, faible sur le biuret, nulle sur la guanidine, l'arginine, la créatinine, l'acide urique, l'allantoïne, l'éthylurée, la méthylurée, la diméthylurée et la diéthylurée.

En 1911, A. KIESEL (2) montre que l'urée et l'uréase existent simultanément chez les végétaux, mais que ces deux substances sont contenues dans des cellules différentes, de sorte que l'absence de l'urée chez certaines plantes tiendrait surtout à sa destruction par mise en contact du ferment contenu dans le même végétal.

Une année plus tard, E. ARMSTRONG et E. HORTON (3) constatant la difficulté d'extraction de l'uréase des cultures de plusieurs espèces microbiennes, fait signalé déjà par MIQUEL, proposent de préparer ce ferment en partant des graines de *Soja* (*Glycine hispida* Sieb.), très riches en uréase et ils utilisent pour ce faire, une méthode analogue à celle indiquée précédemment par TAKEUCHI : Les graines préalablement broyées, dégraissées et séchées, sont mises à macérer dans de l'eau toluénée; après 24 heures, on essore et le liquide clair obtenu peut être utilisé comme source d'uréase.

D'après ces auteurs, l'uréase est rigoureusement spécifique de l'urée; elle n'agit ni sur les urées substituées, ni sur les acides aminés. La quantité d'urée transformée au

(1) TAKEUCHI. Einige Techn. Anwendung. der Urease. Chem. Zeit. 35, p. 408, 1911.

(2) A. KIESEL. Über den fermentativen Abbau des Arginins in Pflanzen. Zeit. für Physiolog. Chem. 75, p. 169-196, 1911.

(3) E. ARMSTRONG et E. HORTON. Studies on Enzyme Action Urease A selective Enzyme. Proc. Roy. Soc. Série B. 85, p. 109-127, 1912.



début de l'action est plus grande que pendant les heures suivantes, fait dû probablement à l'influence retardatrice des produits d'hydrolyse.

En 1914, un auteur anglais, E. K. MARSHALL (1) étudiant l'action d'un extrait aqueux de graines de *Soja* sur l'urée, tire de cette étude les conclusions suivantes :

« 1° La vitesse d'hydratation de l'urée est pratiquement proportionnelle à la concentration de l'extrait.

« 2° La vitesse d'hydratation augmente avec la dilution jusqu'à un maximum, pour diminuer ensuite légèrement quand cette dernière est poussée plus loin.

« 3° La vitesse d'hydratation est indépendante de la concentration en ions hydrogène.

« 4° L'acide chlorhydrique et la soude paralysent la diastase, quand ils atteignent une certaine concentration.

« 5° L'alcool éthylique exerce seulement une faible action inhibitrice et une légère action destructive. »

A partir de cette époque, peu de travaux ont pour objet l'uréase. Nous mentionnerons cependant une méthode de dosage de l'urée dans l'urine au moyen de ce ferment, proposée par R. H. A. PLIMMER et R. F. SKELTON (2) ; une communication de FALK (3) sur l'augmentation de l'activité diastasique de l'extrait de *Soja* par addition à ce dernier de sérum normal ; plus tard, en 1916, une étude de M. JACOBY (4) concernant l'action des antiseptiques sur l'uréase de *Soja* et surtout (4) les importants travaux de FOSSE, (5) concernant à la fois l'uréase et l'urée.

Cet auteur constate l'hydrolyse de l'urée par un certain nombre de plantes : le mélilot, le trèfle, le lupin, le

(1) E. K. MARSHALL. On soy bean Urease : the effect of dilution, acids, alkalies and ethyl-alcohol. *Journ. of. biolog. Chemistry*, 17, p. 352, 1914.

(2) R. H. A. PLIMMER et R. F. SKELTON. The quantitative estimation of Urea, and indirectly of Allantoïn, in Urine by means of Urease. *Bioch. Journ.*, 8, p. 70, 1914.

(3) M. FALK. Über das Schicksal der Soja-Urease im normalen und im vorbehandelten Organismus. *Biochem. Zeitschr.*, 59, p. 316-325, 1914.

(4) M. JACOBY. Über die Einwirkung von antiseptischen Substanzen auf Ureasen. *Biochem. Zeitschr.*, 74, p. 107-108, 1916.

(5) FOSSE. Origine et distribution de l'urée dans la nature. *Ann. Inst. Pasteur*, 30, n° 12, 1916.



poirier, l'abricotier, le tilleul, l'ortie, etc. Il remarque également que les pousses de blé, les semences de haricot et de trèfle renferment à la fois de l'urée et de l'uréase et il conclut que c'est grâce à ce ferment, que l'urée créée par la plante ou empruntée par elle-même au milieu ambiant, est transformée en ammoniacque et sert ainsi d'aliment azoté au végétal.

En 1918, l'uréase est signalée par ANTOINE NÉMEC (1) dans la paille et dans différentes graines de céréales.

En 1919, OTTO FOLIN (2) publie un nouveau dosage de l'urée dans l'urine et dans le sang au moyen de ce ferment.

En 1921 enfin, nous trouvons une étude approfondie de l'action de l'uréase de *Soja* sur l'organisme animal par P. CARNOT, P. GÉRARD et M<sup>lle</sup> S. MOISSONNIER (3).

En résumé, les travaux de MÜSCULUS, de PASTEUR et de VAN TIEGHEM ont mis en lumière le mécanisme de la fermentation ammoniacale et le rôle du bacille producteur d'uréase dans cette opération; les expériences de MIQUEL d'autre part nous ont fait connaître des propriétés intéressantes concernant l'uréase microbienne; on peut en déduire que l'uréase se rapproche par certains caractères des diastases, mais il semble cependant que certaines particularités donnent encore à son étude suivant l'expression de DUCLAUX « quelque chose de flottant ».

(1) A. NÉMEC. Über die Verbreitung der Urease in den Getreidesamen. *Biochem. Zeitschr.* 91, p. 126-130, 1918.

(2) OTTO FOLIN. A system of blood analysis. *Journ. of. biol. Chem.* 33, 89, 1919.

(3) P. CARNOT, P. GÉRARD et M<sup>lle</sup> MOISSONNIER. Action de l'uréase de *Soja* sur l'organisme animal. *Ann. Inst. Pasteur*, 35, p. 1. 1921.



## CHAPITRE II

### L'URÉASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

---

La présence de l'uréase chez les champignons est signalée pour la première fois en 1903 par SHIBATA (1), dans le mycelium de *Aspergillus niger*.

Cet auteur, émettant l'hypothèse d'une vaste répartition du ferment dans le domaine végétal, admet la présence de ce dernier toutes les fois qu'il est nécessaire de décomposer l'urée ou un « dérivé azoté » avec production d'ammoniaque ; celle-ci devenue libre serait alors employée comme élément de synthèse.

SHIBATA emploie pour ses expériences un mycelium d'*Aspergillus niger* préparé dans des conditions déterminées. Le liquide de culture contenant ce mycelium est passé à travers un tamis fin ; le mycelium soumis à un fort courant d'eau, pour enlever la majeure partie des conidies et les dernières traces de liquide, puis réduit finalement en poudre grossière.

Cette poudre fermentaire d'*Aspergillus niger* peut aussi être obtenue en traitant le mycelium par l'acétone pendant un temps déterminé ; après filtration, lavage à l'éther et pulvérisation, le produit obtenu est séché à basse température et mis en contact avec les solutions à essayer, en présence de toluène comme antiseptique.

Le dosage de la quantité d'ammoniaque formée est fait par distillation avec de la magnésie et titrage acidimétrique.

(1) SHIBATA. Über das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. Beitr. zur Chemisch. Physiolog 6, p. 384, 1903.



SHIBATA a fait agir cette uréase sur d'autres dérivés de l'urée : il a constaté son activité sur l'acétamide, l'oxamide et l'acide hippurique, ainsi qu'une décomposition, mais beaucoup plus faible, du biuret, de l'uréthane et de l'asparagine. Le ferment reste sans action sur la guanidine, l'allantoïne et l'acide urique.

Dans ces dernières expériences, la méthode précédente de caractérisation de l'ammoniaque ne pouvant être employée, Shibata utilise le procédé de SCHLOESING. La liqueur à doser mélangée d'un volume égal de lait de chaux est introduite aussitôt dans l'appareil d'Aubin ; le tout est abandonné pendant 3 jours à la température de + 15°. L'ammoniaque formée est absorbée par une solution N/10 d'acide sulfurique.

SHIBATA conclut en affirmant la présence dans le mycelium de *Aspergillus niger*, d'une enzyme ou d'un groupe d'enzymes ayant la propriété de décomposer l'urée, le biuret et d'autres combinaisons azotées, avec formation d'ammoniaque. Il rapproche cette diastase ou ce groupe de diastases de l'uréase, sans les confondre toutefois et il propose de les désigner sous le nom général d'amidases.

Ici s'affirme donc une différence très nette entre l'uréase bactérienne d'une part, l'uréase des Champignons d'autre part.

Quelques années plus tard, en 1912, ALEXANDER KOSSOWICZ (1) étudie la décomposition de l'urée, de l'acide hippurique et du glycocolle sous l'influence des moisissures.

La solution nutritive employée est à base de sucre, de phosphate de potasse et de sulfate de magnésie ; on ajoute au moment de l'expérience le composé azoté à étudier.

Les moisissures employées furent : *Bolrylis Bassiana*, *Penicillium crustaceum*, *Mucor Boidin*, *Cladosporium herbarum*, *Phytophthora infestans*, *Penicillium brevicaulis*, *Asper-*

(1) ALEXANDER KOSSOWICZ. Die Zersetzung von Harnstoff, Harnsäure und Glykokoll durch Schimmelpilze. Zeitschr. für Gärungsphysiol. 1, p. 60, 1912.



*gillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Isaria farinosa* et un *Fusisporium*.

La présence d'ammoniaque était révélée, soit par le réactif de Nessler, soit par le chlorure de platine. Le dosage était fait par distillation et titrage alcalimétrique.

Les moisissures précédentes se sont montrées actives vis-à-vis de l'urée et de l'acide urique. Vis-à-vis de l'acide hippurique, on a constaté une formation d'ammoniaque avec : *Phytophthora infestans*, *Mucor Boidin*, *Aspergillus niger*, *Isaria farinosa*, *Botrytis bassiana* et *Fusisporium*. Enfin, vis-à-vis du glycocolle, les moisissures actives furent : *Penicillium crustaceum*, *Aspergillus niger*, *Mucor Boidin*, *Phytophthora infestans*, *Isaria farinosa*, *Botrytis bassiana*, *Penicillium brevicaulis* et *Fusisporium*.

Telles sont, brièvement résumées, nos connaissances actuelles sur l'uréase des Champignons; elles concernent uniquement quelques espèces appartenant aux Phycomycètes et aux Ascomycètes.

---



## CHAPITRE III

## L'URÉE CHEZ LES CHAMPIGNONS

La présence de l'urée chez les Champignons est signalée pour la première fois par BAMBERGER et LANDSIEDL en 1903 (1); les auteurs isolent ce composé d'un extrait alcoolique préparé à partir de spores vieilles de *Lycoperdon Bovista* L. Ils caractérisent également cette diamide chez le *Lycoperdon gemmatum* B.

A cette époque, l'urée était considérée exclusivement comme un produit d'excrétion animal, aussi leur découverte ne laissa pas que d'étonner les auteurs, qui se demandent à juste titre si la matière première n'a pu être souillée accidentellement et si la terre d'origine ne peut elle-même être incriminée. BAMBERGER et LANDSIEDL reprennent donc cette étude, en opérant cette fois avec les plus minutieuses précautions, sur des champignons de provenance différente. Leurs expériences sont concluantes et en partant du *Lycoperdon Bovista* L., ils obtiennent de l'urée dans la proportion de 3 gr. 50 o/o.

Un peu plus tard, GAZE (2) reprenant les expériences de BAMBERGER et de LANDSIEDL, utilise comme matière première des spores jeunes et vieilles de *Lycoperdon Bovista* L.; dans les deux cas, il caractérise la présence de la diamide carbonique par formation d'azotate d'urée insoluble. La même méthode appliquée au *Lycoperdon cervinum*, ne lui permet pas d'isoler ce composé.

(1) BAMBERGER et LANDSIEDL. Vorläufige Mitteilung über ein Vorkommen von Harnstoff im Pflanzenreiche. *Monatshefte für Chemie*, 24, p. 218, 1903.

(2) GAZE. Notiz über den Harnstoff. *Archiv der Pharmacie*, 243, p. 78, 1905.



En 1909, GORIS et MASCRÉ (1) signalent la présence de l'urée chez le *Tricholoma Georgii* Fr. Pour isoler ce corps, ils emploient la méthode suivante : les champignons convenablement séchés et pulvérisés, sont épuisés par l'acétone ; la liqueur est évaporée, l'extrait repris par l'eau ; cette solution est précipitée par l'acide oxalique, le précipité obtenu dissous dans l'eau, la liqueur traitée par l'eau de baryte jusqu'à réaction alcaline, puis filtrée ; on élimine l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique et après filtration on abandonne la solution dans le vide sulfurique. On obtient ainsi des cristaux d'urée impurs, que l'on purifie par l'alcool à 95°.

Cette méthode permet aux auteurs de caractériser l'urée chez le *Tricholoma Georgii* Fr. et le *Psalliota campestris* L. Par contre, leurs résultats sont négatifs pour les espèces suivantes : *Tricholoma pessundatum* Fr., *Tricholoma album* Sch., *Lepiota procera* Scop., *Collybia maculata* A. et S., *Coprinus comatus* Fr., *Psalliota xanthoderma* Gen.

MM. GORIS et MASCRÉ font remarquer que la proportion d'urée est plus élevée chez une Psalliotte âgée que chez une jeune. Dans le premier cas, ils trouvent 4 gr. 50 d'urée pour 100 gr. de poudre sèche ; dans le second cas, ils n'en trouvent que 2 gr. 75 o/o.

L'urée existe-t-elle normalement dans le thallophyte ou s'y forme-t-elle pendant la dessiccation ? Les expériences entreprises dans ce but sur le champignon de couche ne permettent pas aux auteurs de conclure, n'ayant pu caractériser ce corps dans les champignons analysés. Ils envisagent donc les deux hypothèses suivantes :

« Ou bien l'urée existe normalement chez les Champignons et provient de l'exercice de leurs fonctions physiologiques, ou bien elle se forme pendant la dessiccation de ceux-ci et résulte d'actions indéterminées s'exerçant à ce moment. En tout cas, le végétal doit renfermer une substance azotée donnant de l'urée parmi ses produits de décomposition ».

(1) GORIS et MASCRÉ. Sur la présence de l'urée chez quelques champignons supérieurs. C. R. 147, p. 1488, 1908 Bull. Sc. Pharm., 16, p. 82, 1909.



En 1916, Fosse (1) en possession d'une méthode très précise et très sensible de caractérisation de l'urée, signale l'existence de cette dernière chez un certain nombre de plantes alimentaires : endive, chicorée, melon, potiron, choufleur, navet, épinard, carotte, pomme de terre. La méthode de recherche qu'il emploie est la suivante : le suc végétal traité par 1 o/o d'acide acétique, puis filtré, est repris par l'alcool. La liqueur alcoolique est évaporée sous pression réduite ; le résidu repris par l'acide acétique précipite par le xanthidrol. Ce précipité épuisé par la lessive de soude, puis lavé à l'alcool, est traité par de la pyridine bouillante qui laisse déposer par refroidissement des cristaux de dixanthylurée.

Plus tard Fosse émettant l'hypothèse et l'objection que dans la méthode précédente, en dehors des albuminoïdes, certains principes naturels peuvent, sous l'influence de la chaleur, engendrer des traces de carbamide, supprime du mode opératoire le chauffage nécessaire pour la concentration dans le vide. Ceci lui permet de confirmer ses résultats : le xanthidrol en effet précipite l'urée sous forme de combinaison xanthylée, directement à partir du suc de plantes n'ayant pas subi l'action de la chaleur.

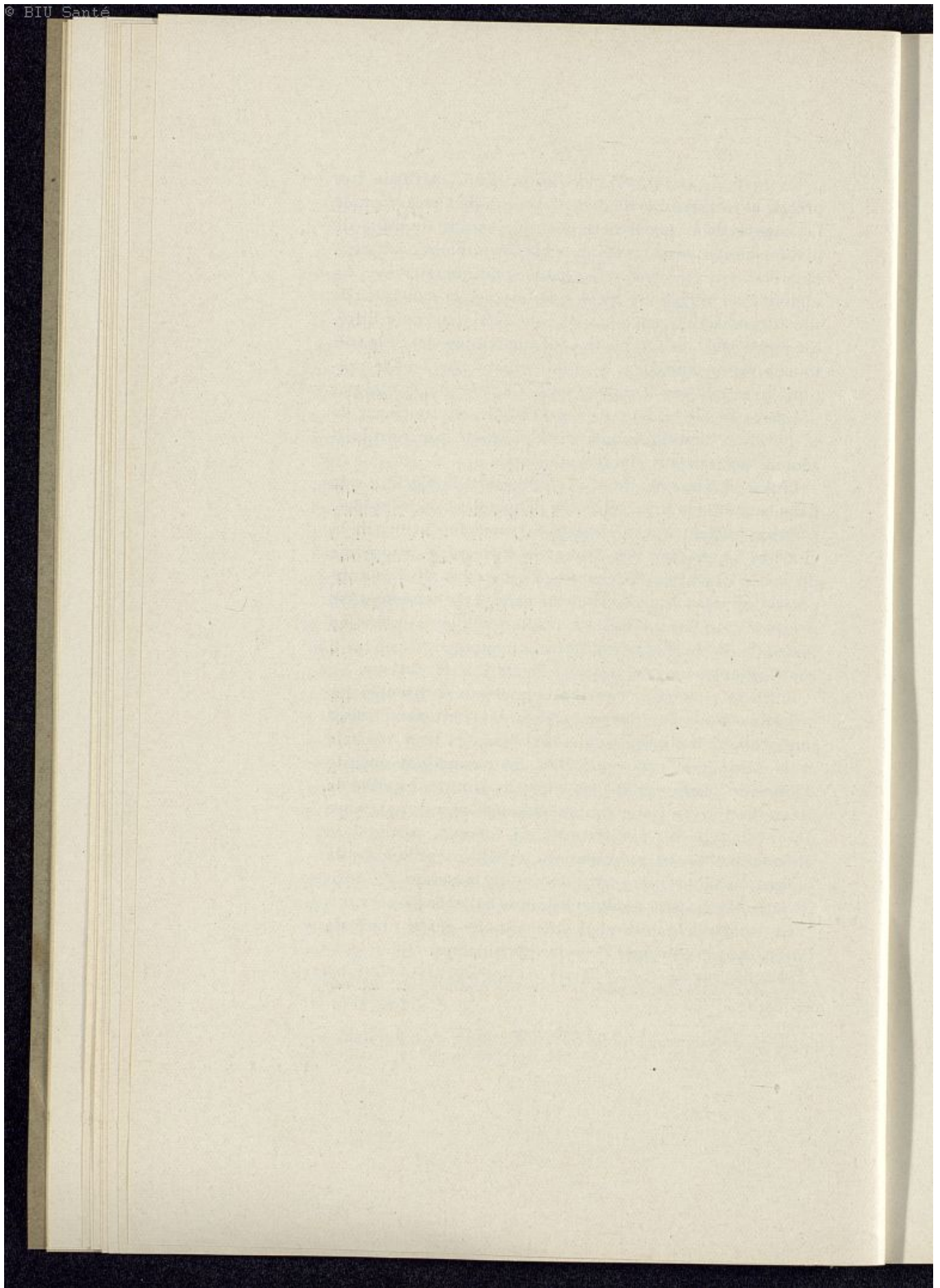
Enfin se pose pour l'auteur la question si discutée des origines de l'urée. Ses recherches lui font caractériser tout d'abord la diamide dans le terreau, la terre végétale et la terre non cultivée ; elles lui permettent ensuite d'affirmer que le végétal est comme l'animal, capable de créer de l'urée. Cette amide en effet prend naissance durant la vie des moisissures ou lorsque, pendant le phénomène de la germination, même aseptique de la graine, cette dernière consomme ses réserves de protéiques, de graisses et de substances hydrocarbonées.

La cellule végétale peut donc à elle seule créer de l'urée, sans le concours de microorganismes.

---

(1) FOSSE. Origine et distribution de l'urée dans la nature. *Ann. Inst. Pasteur*, 30, n° 12, 1916.





## DEUXIÈME PARTIE

---

### CHAPITRE I

#### RÉPARTITION DE L'URÉASE CHEZ LES CHAMPIGNONS

---

La recherche de l'uréase chez les Champignons concerne surtout le groupe des Basidiomycètes. La répartition de ce ferment chez les Ascomycètes et les Myxomycètes n'a pu être envisagée que chez un petit nombre d'espèces. Quant aux champignons du groupe des Phycomycètes, nous les avons laissés de côté volontairement, leur étude ayant été entreprise déjà par Kossowicz.

La méthode initiale employée pour la recherche de l'uréase consistait à exprimer le champignon préalablement divisé en petits morceaux au moyen d'une presse à main. Suivant la teneur plus ou moins élevée en suc de ce dernier, nous ajoutons ou non un liquide favorisant cette expression, composé de deux parties d'eau pour une partie de glycérine. Le suc ainsi obtenu était mis en présence de la solution d'urée à essayer.

Nous avons reconnu dans la suite, qu'il était inutile d'exprimer préalablement le champignon pour en retirer le suc. Il est plus avantageux de le diviser convenablement en petits morceaux et de mettre simplement ceux-ci en contact avec la solution d'urée. Cette méthode, plus pratique, permet en outre de vérifier séparément l'activité des différentes parties du végétal ; nous y reviendrons plus loin.

La solution d'urée employée, est une solution décimor-



male ; elle se prépare en dissolvant 6 gr. d'urée pure dans de l'eau toluénée à saturation ; on complète à 1000 cc. avec le même solvant. Cette liqueur se conserve bien ; nous verrons dans le chapitre consacré à l'examen du ferment, qu'elle constitue la solution de choix pour l'étude de la diastase ; c'est elle qui nous a servi pour tous nos essais.

*Technique.* — Dans de petites fioles d'Erlenmeyer de 60 cc. environ, préalablement stérilisées, on introduit 25 cc. de la solution décimale d'urée et un poids donné du champignon ou de la partie du champignon à essayer (environ 0 gr. 50). La fiole est fermée par un tampon de coton laissant passer un papier de tournesol préalablement humecté d'eau distillée. Le tout est porté à l'étuve à  $+ 37^{\circ}$  et l'on observe toutes les heures la marche de la réaction.

L'activité du champignon, c'est-à-dire la présence ou l'absence de ferment, est indiquée par le bleuissement plus ou moins rapide et plus ou moins intense du papier réactif, bleuissement dû comme on le sait, à l'action de l'ammoniaque du carbonate d'ammoniaque formé et en voie de dissociation.

Il est indispensable de vérifier dans la même opération par l'usage de flacons témoins, que la solution d'urée employée ne bleuit pas elle-même le papier de tournesol ; dans ce cas, le bleuissement serait dû à une hydrolyse de la liqueur, fait qui pratiquement ne se produit jamais. Quant à la vérification de la non activité du champignon seul en liqueur aqueuse toluénée, elle paraît inutile, certaines espèces en effet renfermant à la fois de l'urée et de l'uréase.

Nous avons entrepris ainsi la recherche de l'uréase chez près de 400 espèces ; nos travaux nous permettent de conclure que cette diastase existe chez un grand nombre de Basidiomycètes ; seule sa proportion est très variable ; elle diffère non seulement suivant les genres, mais encore suivant l'espèce même, qui peut suivant les cas être plus ou moins active.



Lorsqu'au début de nos essais, nous avons constaté qu'un même champignon produisait ou non l'hydrolyse de l'urée, nous avons pensé tout d'abord, soit à une erreur de manipulation, soit à une erreur de détermination. Nous avons donc recommencé nos expériences, avec la plus grande minutie : les résultats obtenus furent identiques. Dans la suite, ce même fait s'est renouvelé à différentes reprises (1) ; cette anomalie provient-elle de ce que l'on s'adresse à une espèce jeune ou à une espèce plus âgée ? L'uréase existait-elle à une époque donnée de la vie du thallophyte et a-t-elle disparu, ou au contraire, le ferment ne s'est-il pas encore formé et va-t-il apparaître dès que le végétal devra transformer en carbonate d'ammoniaque l'urée non utilisable pour lui ? Il est difficile de répondre à ce problème biologique et ce n'est qu'en multipliant les expériences, que l'on arrivera sans doute à se faire une opinion.

L'uréase existe donc chez presque tous les Basidiomycètes ; elle y est répartie très diversement et sa présence est loin d'être constante chez les différentes espèces d'un même genre. Cette uniformité existe cependant, mais elle constitue l'exception (Genres *Russula*, *Pholiota*, *Lactarius*, *Cortinarius*, *Boletus*). En somme, on ne peut établir une règle précise de répartition de cette diastase chez les Champignons.

Enfin, l'activité du champignon, autrement dit sa richesse en ferment, est, elle aussi, très variable. Certaines espèces en effet agissent à la température ordinaire au bout d'un temps relativement court (une demi-heure pour certaines). Tel est le cas du *Cortinarius impennis* Fr., du *Boletus erythropus* Pers., de *Inocybe corydalina* Quél. etc. D'autres au contraire n'agissent qu'à la température de l'étuve et au bout d'un temps plus ou moins long.

Aussi, pour permettre entre elles un classement approximatif, avons-nous établi le principe suivant : Nous considérons :

(1) Nous donnons le nom de ces espèces douteuses, à la suite de la liste de répartition de l'uréase chez les Champignons.



Comme *très actif*, un champignon donnant une réaction positive avec le papier de tournesol au bout d'une heure, soit à froid, soit à  $+ 37^{\circ}$ .

Comme *actif*, un champignon donnant cette même réaction en deux heures.

Comme *peu ou très peu actif* enfin, un champignon donnant la réaction au bout de quatre heures.

En dehors de ces limites, nous dirons que le champignon étudié est *inactif*.

#### Liste de répartition de l'uréase chez les champignons (1).

##### MYXOMYCÈTES

Genre LYCOGALA : actif : *epidendrum* Buxb.

Genre RETICULARIA : actif : *Lycoperdon* Bull.

##### ASCOMYCÈTES

##### Pyrénomycètes Fr.

FAM. 1. PÉRISPORIACÉES FR.

FAM. 2. SPHAERIACÉES FR.

Genre XYLARIA : inactif : *polymorpha* (Pers.) Grev.

actif : *Hypoxyton* (L.) Grev.

##### Discomycètes Fr.

FAM. 1. CYTTARIÉES LÉV.

FAM. 2. HELVELLÉES SWARTZ

Genre MORCHELLA : très actif : *esculenta* (Linn.) Pers.,  
*spongiola* Boud., *rotunda* Pers.

Genre HELVELLA : actif : *crispa* (Scop.) Fr., *lacunosa* Afz.,  
*sulcata* Afz., *fusca* Gill.

peu actif : *elastica* Bull.

inactif : *macropus* (Pers.) Karst.

(1) La classification adoptée est celle de SACCARDO.

## FAM. 3. PÉZIZÉES FR.

Genre PEZIZA : très actif : *aurantiaca* Pers.

actif : *succosa* Berk.

Genre OTIDEA : très actif : *cochleata* (L.) Fuck.

actif : *onotica* (Pers.) Fuck.

Genre SARCOSPHERA : peu actif : *coronaria* (Jacq.) Boud.

Genre **MACROPODIA** : actif : *macropus* (Pers.) Fuck.

Genre ALEURIA : très actif : *vesiculosa* (Bull.) Fr.

Genre VERPA : peu actif : *Krombholzi* Corda.

## FAM. 4. ASCOBOLÉES BOUD.

## FAM. 5. DERMATÉES

## FAM. 6. BULGARIÉES FR.

Genre LEOTIA : actif : *lubrica* (Scop.) Pers.

Genre BULGARIA : très peu actif : *inquinans* (Pers.) Fr.

Genre CORYNE : actif : *sarcoides* (Jacq.) Tul.

## BASIDIOMYCÈTES

**Hyménomycètes Fr.**

## FAM. 1. AGARICINÉES Fr.

**Sect. 1. Leucosporées Fr.**

## SÉR. 1. HAPLOPHYLLÉES SACC.

*Subsect.* 1. *Molles*. (Fr.) Sacc.

Genre AMANITA : actif : *virosa* (Fr.) Quél., *spissa* (Fr.) Quél.

très peu actif : *caesarea* (Scop.) Pers.,

*phalloïdes* (Fr.) Quél., *rubescens* Pers.,

*ampla* Pers.,

inactif : *mappa* Pers., *muscaria* (Linn.)

Pers., *pantherina* D.C., *solitaria* Bull.,

*citrina* Pers., *verna* Fr.

Genre AMANITOPSIS : actif : *livida*, *alba*.

peu actif : *vaginata* (Bull.) Roze.

Genre LEPIOTA : actif : *clypeolaria* (Bull.) Quél.

peu actif : *procera* (Scop.) Quél., *exco-*

*riata* (Schaeff.) Quél., *cristata* (Alb., et



Schw.) Quél., *gracilentia* (Krombh.) Quél.

inactif : *rhacodes* (Vittad.) Quél., *mastoidea* (Fr.) Quél.

Genre ARMILLARIA : actif : *mucida* (Schrad.) Quél.

peu actif : *melles* (Vahl.) Quél.

Genre TRICHOLOMA : très actif : *atro-squamosum* (Chev.) Sacc., *saponaceum* (Fr.) Quél., *album* (Schaeff.) Quél.

actif : *equestre* (Linn.) Quél., *sejunctum* (Sowerb.) Quél., *portentosum* (Fr.) Quél., *resplendens* (Fr.) Karst., *columbella* (Fr.) Quél., *terreum* (Schaeff.) Quél., *tigrinum* (Schaeff.) Quél., *acereum* (Bull.) Quél., *saponaceum* (Fr.) Quél.

peu actif : *flavo-brunneum* (Fr.) Quél., *Russula* (Schaeff.) Gill., *sulphureum* (Bull.) Quél.

inactif : *ustale* (Fr.) Quél., *pessundatum* (Fr.) Quél., *cartilagineum* (Fr.) Quél., *gambosum* (Fr.) Gill., *Georgii* (Fr.) Quél., *personatum* (Fr.) Quél., *nudum* (Bull.) Quél., *panaeolum* (Fr.) Quél., *grammopodium* (Bull.) Quél., *soevum* Fr.

Genre CLITOCYBE : très actif : *geotropa* (Bull.) Quél., *Cacabus* Fr., *paradoxa* Duf., *clitopus*.

actif : *inversa* (Scop.) Quél., *laccata* (Scop.) Quél., *gymnopodia*.

inactif : *nebularis* (Batsch.) Quél., *odora* (Bull.) Quél., *cerussata* (Fr.) Quél., *inversa* (Scop.) Quél., *orbiformis* (Fr.) Gill.

Genre COLLYBIA : actif : *radicata* (Relh.) Quél., *longipes* (Bull.) Quél., *platyphylla* (Fr.) Quél., *fusipes* (Bull.) Quél., *velutipes* (Curt.) Quél.

très peu actif : *gramocephala* Quél.  
 inactif : *maculata* (Alb. et Schw.) Quél.,  
*butyracea* (Bull.) Quél.

Genre MYCENA : actif : *galericulata* (Scop.) Quél.  
 peu actif : *atro-cyanea* (Batsch.) Gill.  
 inactif : *pura* (Pers.) Quél.

Genre OMPHALIA : actif : *umbilicata* (Schaeff.) Gill.

Genre PLEUROTUS : actif : *corticatus* (Fr.), Quél., *serotinus*  
 (Schrad.) Gill.

inactif : *Eryngii* (D.C.) Quél., *spodoleu-*  
*cus* (Fr.) Quél., *ostreatus* (Jacq.) Quél.

Genre HYGROPHORUS : très actif : *agathosmus* Fr., *cocci-*  
*neus* (Schaeff) Fr.

actif : *eburneus* (Bull.) Fr., *livido-*  
*albus* Fr., *chlorophanus* Fr.

peu actif : *olivaceo-albus* Fr., *vir-*  
*gineus* (Wulf) Fr., *ceraceus*  
 (Wulf.) Fr.

inactif : *eburneus* (Bull.) Fr.,  
*ovinus* (Bull.) Fr., *conicus* (Scop.)  
 Fr.

Genre LACTARIUS : très actif : *scrobiculatus* (Scop.) Fr.,  
*torminosus* (Schaeff.) Fr., *controversus*  
 (Pers.) Fr., *pubescens* Fr., *blennius*  
 Fr., *uvidus* Fr., *piperatus* (Scop.)  
 Fr., *deliciosus* (L.) Fr., *pallidus*  
 (Pers.) Fr., *quietus* Fr., *vietus* Fr.,  
*velutinus*, *pyrogalus* (Bull.) Fr.

actif : *turpis* Fr., *zonarius* (Bull.) Fr.,  
*rufus* (Scop.) Fr., *glyciosmus* Fr.,  
*volemus* Fr., *milissimus* Fr., *dulcis*,  
*umbrinus* (Pers.) Fr., *fuliginosus* Fr.,  
*chrysorrhoeus* Fr.

peu actif : *plumbeus* (Bull.) Fr., *rufus*  
 (Scop.) Fr.,

inactif : *turpis* Fr.

Genre RUSSULA : très actif : *nigricans* (Bull.) Fr., *lactea*  
 (Pers.) Fr., *rubra* Fr., *cyanoxantha*



(Schaeff.) Fr., *emetica* Fr., *pectinata* (Bull.) Fr.

actif : *densifolia* (Secr.) Gill., *delica* Fr., *furcata* (Pers.) Fr., *sardonis* Fr., *foetens* (Pers.) Fr., *Queletii* Fr., *integra* (Linn.) Fr., *aurata* (With.) Fr., *lepida* Fr., *pseudo-integra* Arn. et Goris, *rosea* Fr., *alutacea* (Pers.) Fr., *ochracea* (A. et S.) Fr., *incarnata* Quél.

Genre CANTHARELLUS : actif : *cinereus* (Pers.) Fr.  
peu actif : *cibarius* Fr., *aurantiacus* Fr., *sinuosus* Fr.

*Subsect. 2. Tenaces.*

Genre MARASMIUS : inactif : *urens* (Bull.) Fr., *oreades* (Bolt.) Fr.

Genre LENTINUS : actif : *tigrinus* (Bull.) Fr.

Genre PANUS : très actif : *stypticus* (Bull.) Fr.  
actif : *conchatus* Fr.

Genre LENZITES : actif : *variegata* Fr., *sepiaria* Fr.

SÉR. 2. SCHIZOPHYLLÉES.

Genre SCHIZOPHYLLUM : très actif : *commune* Fr.

**Sect. 2. Rhodosporées.**

Genre PLUTEUS : actif : *chrysophaeus* (Schaeff.) Quél.  
inactif : *cervinus* (Schaeff.) Quél.

Genre ENTOLOMA : très actif : *lividum* (Bull.) Quél., *sericellum* (Fr.) Quél., *rhodopolium* (Fr.) Quél.  
inactif : *clypeatum* (Linn.) Quél.

Genre CLITOPILUS : inactif : *Prunulus* (Scop.) Quél., *orcella* (Bull.) Quél.

Genre NOLANEA : actif : *nigripes* (Trog.) Gill.

Genre CLAUDOPUS : actif : *variabilis* (Pers.) Gill.

**Sect. 3. Ochrosporées.**

Genre PHOLIOTA : actif : *dura* (Bolt.) Quél., *praecox* (Pers.) Quél., *radicosa* (Bull.) Quél.

peu actif : *caperata* (Pers.) Gill., *destruens* (Brond.) Gill., *spectabilis* (Fr.)

Gill., *mutabilis* (Schaeff.) Quél., *squarrosa* (Müll.) Quél.

Genre INOCYBE : très actif : *corydalina* Quél., *geophylla* (Sowerb.) Quél.

actif : *geophylla* var. *violacea* Pat.

inactif : *piriodora* (Pers.) Quél.

Genre HEBELOMA : très actif : *senescens* (Batsch.) Sacc., *crustuliniforme* (Bull.) Quél.

actif : *sinapizans* (Fr.) Gill.

peu actif : *sacchariolens* Quél.

Genre TUBARIA : très actif : *inquilina* (Fr.) Gill.

actif : *furfuracea* (Pers.) Gill.

Genre CREPIDOTUS : très actif : *mollis* (Schaeff.) Quél.

Genre CORTINARIUS : très actif : *mittinus* Fr., *cinnamomeus* (Linn.) Fr., *torvus* Fr., *impennis* Fr.

actif : *caerulescens* (Schaeff.) Fr., *violaceus* (Linn.) Fr., *albo-violaceus*

(Pers.) Fr., *bolaris* (Pers.) Fr., *cinnabarinus* Fr., *orellanus* Fr., *castanellus*

Peck., *brunneus* (Pers.) Fr., *castaneus* (Bull.) Fr., *saginus* Fr., *armeniacus* (Schaeff.) Fr., *cumatilis* Fr.,

*hinnuleus* (Sow.) Fr., *albus*, *cyanus*, *pholideus* Fr., *collinitus* (Pers.) Fr.

inactif : *albus*.

Genre PSALLIOTA : actif : *pratensis* Schaeff.

peu actif : *campestris* Linn., *xanthoderma* Gen., *campestris* var. *sylvicola* Vitt.

Genre PAXILLUS : actif : *involutus* (Batsch.) Fr.

#### Sect. 4. Mélanosporées.

Genre STROPHARIA : actif : *aeruginosa* (Curt.) Quél., *cornilla* (Bull.) Quél., *squamosa* (Fr.)

Quél., *stercoraria* (Bull.) Quél.

Genre HYPHOLOMA : très actif : *sublateritium* (Schaeff.) Quél.

actif : *fasciculare* (Huds.) Quél., *lacrymabundus* (Fr.) Quél., *velutinum* (Pers.)



Quél., *Candolleum* (Fr.) Quél.,  
*appendiculatum* (Bull.) Quél., *epixan-*  
*thum* (Fr.) Quél.

peu actif : *sublateritium* (Schaeff.)

Quél., *lacrymabundus* (Fr.) Quél.

inactif : *fasciculare* (Huds.) Quél.

Genre *PSILOCYBE* : inactif : *foenisecii* (Pers.) Quél.

Genre *BOLBITUS* : très actif : *hydrophilus* Fr.

Genre *COPRINUS* : actif : *comatus* Fr., *stercorarius* (Schum.)  
Fr.

inactif : *comatus* Fr.

Genre *PSATHYRELLA* : actif : *disseminata* (Pers.) Quél.

Genre *GOMPHIDIUS* : inactif : *viscidus* (L.) Fr.

## FAM. 2. POLYPORÉES

Genre *BOLETUS* : très actif : *piperatus* Bull., *chrysenteron*  
Fr., *edulis* Bull., *aestivalis* (Paul) Fr.,  
*viridus* Schaeff., *erythropus* Pers.,  
*scaber* Fr., *felleus* Bull., *castaneus*  
Bull., *aurantiacus* Bull., *versipellis* Fr.

actif : *luteus* Linn., *bovinus* Linn., *appen-*  
*diculatus* Schaeff., *cyanescens* Bull.,  
*pinicola* Vent., *strobilaceus* Scop.,  
*sublanatus*, *badius* Fr.

peu actif : *rugosus* Fr.

Genre *FISTULINA* : actif : *hepatica* Fr.

Genre *POLYPORUS* : très actif : *squamosus* (Huds.) Fr.,  
*fumosus* (Pers.) Fr., *luridus* B. et C.

actif : *radicatus* (Schw.) Fr., *brumalis*  
(Pers.) Fr., *luridus* B. et C., *arcula-*  
*rius* (Batsch.) Fr., *intybaceus* (Bauh.)  
Fr., *caesius* (Schrad.) Fr., *adustus*  
(Willd.) Fr., *betulinus* (Bull.) Fr.,

*applanatus* Pers., *igniarius* L., *ver-*  
*sicolor* Fr., *incanus*, *caesius* (Schrad.)  
Fr., *melanopus* (Pers.) Fr.

peu actif : *mollis* (Pers.) Fr., *stipticus*

## — 27 —

(Pers.) Fr., *nigricans* Fr., *nidulans* Fr., *numalis*.

inactif : *lacteus* Fr., *chioneus* Fr., *betulinus* (Bull.) Fr., *caesius* (Schrad.) Fr.

Genre FOMES : très actif : *nigricans* (Fr.) Gill.

actif : *applanatus* (Pers.) Gill.

Genre MERISMA : très actif : *imbricatum* Fr.

inactif : *imbricatum* Fr.

Genre TRAMETES : très actif : *rubescens* (A. et S.) Fr.

actif : *gibbosa* (Pers.) Fr., *campestris* Quél.

Genre DAEDALEA : inactif : *quercina* (L.) Pers.

Genre MERULIUS : actif : *tremellosus* Schrad.

Genre CERIOMYCES : actif : *albus* (Cda.) Sacc.

## FAM. 3. HYDNÉES

Genre HYDNUM : très actif : *imbricatum* Linn.

actif : *amicum* Quél., *acre* Quél., *repandum* Linn.

peu actif : *velutinum* Fr.

Genre IMPEX : inactif : *lacteus* Fr.

## FAM. 4. THÉLÉPHORÉES

Genre CRATERELLUS : très actif : *cornucopioides* (L.) Pers.

peu actif : *terrestris* Ehrh.

Genre STEREUM : inactif : *hirsutum* (Willd.) Fr.

## FAM. 5. CLAVARIÉES

Genre SPARASSIS : très actif : *crispa* (Wulf.) Fr.

Genre CLAVARIA : très actif : *ericetorum* Pers.

actif : *cinerea* Bull., *aurea* Schaefl.,

*inaequalis* Müll., *pistillaris* Linn.,

*botrytis* Pers.

peu actif : *cristata* Pers., *formosa* Pers.,

*grisea* Pers., *similis* Boud. et Pat.,

*muscoides* L.

inactif : *stricta* Pers.

Genre CALOCERA : peu actif : *viscosa* (Pers.) Fr.



## FAM. 6. TRÉMELLINÉES

Genre TREMELLA : actif : *mesenterica* Retz.

peu actif : *foliosa*.

Genre GUEPINIA : peu actif : *helvelloides* Fr.

## Gastéromycètes Willd.

## FAM. 1. PHALLOIDÉES

Sect. 1. Phallées Fr.

Genre PHALLUS : peu actif : *impudicus* L., *caninus* Fr.

Sect. 2. Clathrées Fr.

## FAM. 2. NIDULARIACÉES

Sect. 1. Scutula Tul.

Sect. 2. Sorosia Tul.

Sect. 3. Granularia Tul.

Genre CYATHUS : très actif : *striatus* (Huds.) Hoffm.,

*hirsutus*. (Schaeff.) Duf.

## FAM. 3. LYCOPERDACÉES

Subfam. 1. Podaxinées Fr.

Subfam. 2. Diplodermées.

Genre GEASTER : actif : *fimbriatus* Fr.

inactif : *hygrometricus* Pers.

Subfam. 3. Lycoperdées Fr.

Genre BOVISTA : inactif : *plumbea* Pers.

Genre LYCOPERDON : peu actif : *echinulatum* B. et Br.

inactif : *gemmatum* Batsch., *excipuli-*  
*forme* Scop., *furfuraceum* Schaeff.,  
*piriforme* Schaeff., *velatum* Vitt.

Subfam. 4. Sclérodermées Fr.

Genre SCLERODERMA : peu actif : *vulgare* Horn., *corium*  
(Guers.) Grav.

## FAM. 4. HYMÉNOGASTRÉES

Genre RHIZOPOGON : très actif : *rubescens* Tul.

**Liste des espèces douteuses, donnant suivant les cas  
une réaction positive ou négative.**

*Clitocybe inversa* (Scop.) Quél., *Collybia maculata* (Alb. et Schw.) Quél., *Coprinus comatus* Fr., *Cortinarius albus*, *Helvella macropus* (Pers.) Karst., *Hygrophorus eburneus* (Bull.) Fr., *Hypholoma fasciculare* (Huds.) Quél., *Lactarius turpis*, Fr., *Leotia lubrica* (Scop.) Pers., *Paxillus involutus* (Batsch.) Fr., *Polyporus betulinus* (Bull.) Fr., *Polyporus caesius* (Schröd.) Fr., *Tricholoma sulphureum* (Bull.) Quél., *Tricholoma acerbum* (Bull.) Quél.

---



## CHAPITRE II

### LOCALISATION DE L'URÉASE

---

La méthode de recherche de l'uréase chez les Champignons, indiquée dans le chapitre précédent, nous a permis d'étudier la localisation de ce ferment et de montrer que sa répartition dans le même végétal était loin d'être uniforme.

Les différentes parties constituant du thallophyte, c'est-à-dire le pied, le chapeau et l'hyménium ont été successivement examinées chez un certain nombre d'espèces. La technique employée a été la suivante :

Un poids déterminé de champignons frais, rigoureusement pesé, est mis en contact avec un volume connu de solution décimale d'urée, dans des fioles coniques appropriées. On porte ces fioles à l'étuve à  $+37^{\circ}$  ; d'heure en heure, on prélève dans chacune d'elles 10 cc. de la solution et on titre le carbonate d'ammoniaque formé, au moyen d'une solution décimale d'acide chlorhydrique, en présence d'hélianthine comme indicateur.

*Evaluation des résultats.* — Nous savons qu'il faut deux molécules d'acide chlorhydrique pour saturer une molécule de carbonate d'ammoniaque ; l'expérience précédente sera donc terminée quand nous aurons employé 20 cc. de cet acide pour saturer les 10 cc. de solution d'urée, c'est-à-dire quand l'amide aura été transformée totalement en carbonate d'ammoniaque.

Nous ne saurions trop insister sur ce point, puisque c'est sous cette forme que nous donnerons constamment les résultats de nos dosages. Il eût été possible en effet,



d'exprimer en poids et non en volume les quantités d'urée transformées par hydrolyse : nous venons de dire qu'une molécule de carbonate d'ammoniaque N/10 sature deux molécules d'HCl N/10 et nous savons d'autre part qu'une solution décinormale d'urée correspond à une solution décinormale de carbonate d'ammoniaque. Il nous a paru préférable cependant d'exprimer volumétriquement nos résultats, qui, présentés de la sorte, accusent mieux les différences observées et évitent d'autre part la complication inutile des calculs.

Tous nos dosages volumétriques seront donc effectués avec une solution décinormale d'acide chlorhydrique, en opérant chaque fois sur une prise d'essai de 10 cc., quel que soit le volume de liqueur d'urée mise en expérience et nous dirons : Au bout d'un temps « X », la quantité d'urée transformée en carbonate d'ammoniaque est de N cc. par exemple, ce qui signifie qu'il faut N cc. de solution N/10 d'HCl, pour saturer 10 cc. de liqueur d'urée N/10 soumise à l'hydrolyse fermentaire pendant un temps déterminé, c'est-à-dire que  $\frac{Ncc.}{2}$  de solution décinormale d'urée ont été décomposés. Ces Ncc. correspondent à un poids d'urée égale à :  $\frac{N}{2} \times 0,006$ .

Les expériences de localisation de l'uréase chez les Champignons ont été faites avec un certain nombre d'espèces appartenant aux genres *Boletus*, *Clitocybe*, *Cortinarius*, *Entoloma*, *Hydnum*, *Lactarius*, *Polyporus*, *Russula*, *Thelephora*, *Trameles* et *Tricholoma*. Les résultats sont exprimés dans les tableaux suivants. Pour chaque espèce, le poids de substance fraîche mise en œuvre a été de 0 gr. 50; le volume de solution décinormale d'urée employée de 50 cc.; les dosages enfin ont été faits au bout de 3 et de 6 heures.



Genre *Boletus*.

Espèces.	Temps heures	Pied	Chapeau	Hyménium
<i>Boletus edulis</i> Bull. . . . .	{ 3 6	7,2 6,6	8,4 11	11 15
— <i>badius</i> Fr. . . . .	{ 3 6		3,8 5,2	9,2 19,6
— <i>castaneus</i> Bull. . . . .	{ 3 6	3,4 5	11,4 17,4	10 18
— <i>aurantiacus</i> Bull. . . . .	{ 3 6	0,8 1	0,6 0,8	1,8 3
— <i>scaber</i> Fr. . . . .	{ 3 6	0,4 0,4	0,6 0,8	3,4 3,9

Genre *Clitocybe*.

<i>Clitocybe geotropa</i> (Bull.) Quél.	{ 3 6	5,1 5,4	4,8 4,9	13,1 13,5
---	----------	------------	------------	--------------

Genre *Collybia*.

<i>Collybia maculata</i> (Alb. et Schw.) Quél.	{ 3 6	0,2 0,2	0,2 0,3	0,6 0,9
--	----------	------------	------------	------------

Genre *Cortinarius*.

<i>Cortinarius albo-violaceus</i> (Pers.) Fr. . . . .	{ 3 6	0,6 0,6	0,7 0,7	1,4 1,4
— <i>torvus</i> Fr. . . . .	{ 3 6	0,4 0,4	0,5 0,5	0,7 0,9
— <i>brunneus</i> (Pers.) Fr. . . . .	{ 3 6	0,2 0,2	0,3 0,3	0,3 0,4
— <i>orellanus</i> Fr. . . . .	{ 3 6	0,2 0,3	0,4 0,6	0,4 0,7
— <i>impennis</i> Fr. . . . .	{ 3 6	1,6 2,5	1,6 2,5	2,8 3,7

Genre *Entoloma*.

<i>Entoloma lividum</i> (Bull.) Quél.	{ 3 6	8,3 10,3	2,4 2,9	8 9
---------------------------------------	----------	-------------	------------	--------

Genre *Hydnum*.

<i>Hydnum imbricatum</i> Linn. . . . .	{ 3 6	3,8 5	3,6 5,2	17,2 20
--	----------	----------	------------	------------

Espèces.	Temps heures	Pied	Chapeau	Hyménium
<i>Hydnum amicum</i> QuéL. . . . .	{ 3 6	0,6 0,6	0,4 1,6	0,8 1,6
Genre <i>Lactarius</i> .				
<i>Lactarius torminosus</i> (Schaeff.)	{ 3 6	0,6 1,1	0,5 0,8	2,1 3,5
— <i>controversus</i> (Pers.)	{ 3 6	0,3 0,5	0,2 0,4	0,6 1,3
— <i>piperatus</i> (Scop.) Fr.	{ 3 6	0,6 0,8	0,4 0,7	1,1 2,1
— <i>chrysorrhoeus</i> Fr.	{ 3 6	0,7 1,4	0,4 0,5	1,8 3,8
Genre <i>Polyporus</i> .				
<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.)	{ 3 6	0,3 0,3	0,3 0,5	1,2 1,9
— <i>igniarius</i> L . . . . .	{ 3 6		0,2 0,8	0,2 1,8
Genre <i>Russula</i> .				
<i>Russula Queletii</i> Fr. . . . .	{ 3 6	0,2 0,2	0,3 0,3	0,5 0,9
— <i>nigricans</i> (Bull.) Fr.	{ 3 6	0,8 1,5	0,4 0,7	1 1,8
— <i>foetens</i> (Pers.) Fr.	{ 3 6	0,8 1,2	1,5 2,7	2,9 5
— <i>cyanoxantha</i> (Schaeff.)	{ 3 6	1 1,6	1 1,3	3 4,7
— <i>rosea</i> Fr. . . . .	{ 3 6	1 1,5	0,7 1,2	2,1 3,9
— <i>rubra</i> Fr. . . . .	{ 3 6	0,6 0,8	0,3 0,6	1,9 2,8
Genre <i>Thelephora</i> .				
<i>Thelephora pallida</i> (Pers.) Pers.	{ 3 6	0,6 0,8	0,3 0,6	1,9 2,8
Genre <i>Trametes</i> .				
<i>Trametes rubescens</i> (A. et S.) Fr.	{ 3 6		1,3 7	2 11,5

COSTY

3



Espèces.	Temps heures	Pied	Chapeau	Hyménium
<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	{ 3		0,1	0,4
	{ 6		0,1	0,6

Genre *Tricholoma*.

<i>Tricholoma album</i> (Schaeff.)	{ 3	1	1,4	2
Quél. . . . .	{ 6	1,6	2,5	3,4
— <i>atro-squamosum</i>	{ 3	0,2	0,2	0,8
(Chev.) Sacc.	{ 6	0,2	0,2	1
— <i>saponaceum</i> (Fr.)	{ 3	0,2	0,5	0,7
Quél.	{ 6	0,3	0,8	1,3
— <i>columbetta</i> (Fr.)	{ 3	0,4	0,5	1
Quél.	{ 6	0,6	0,8	1,6

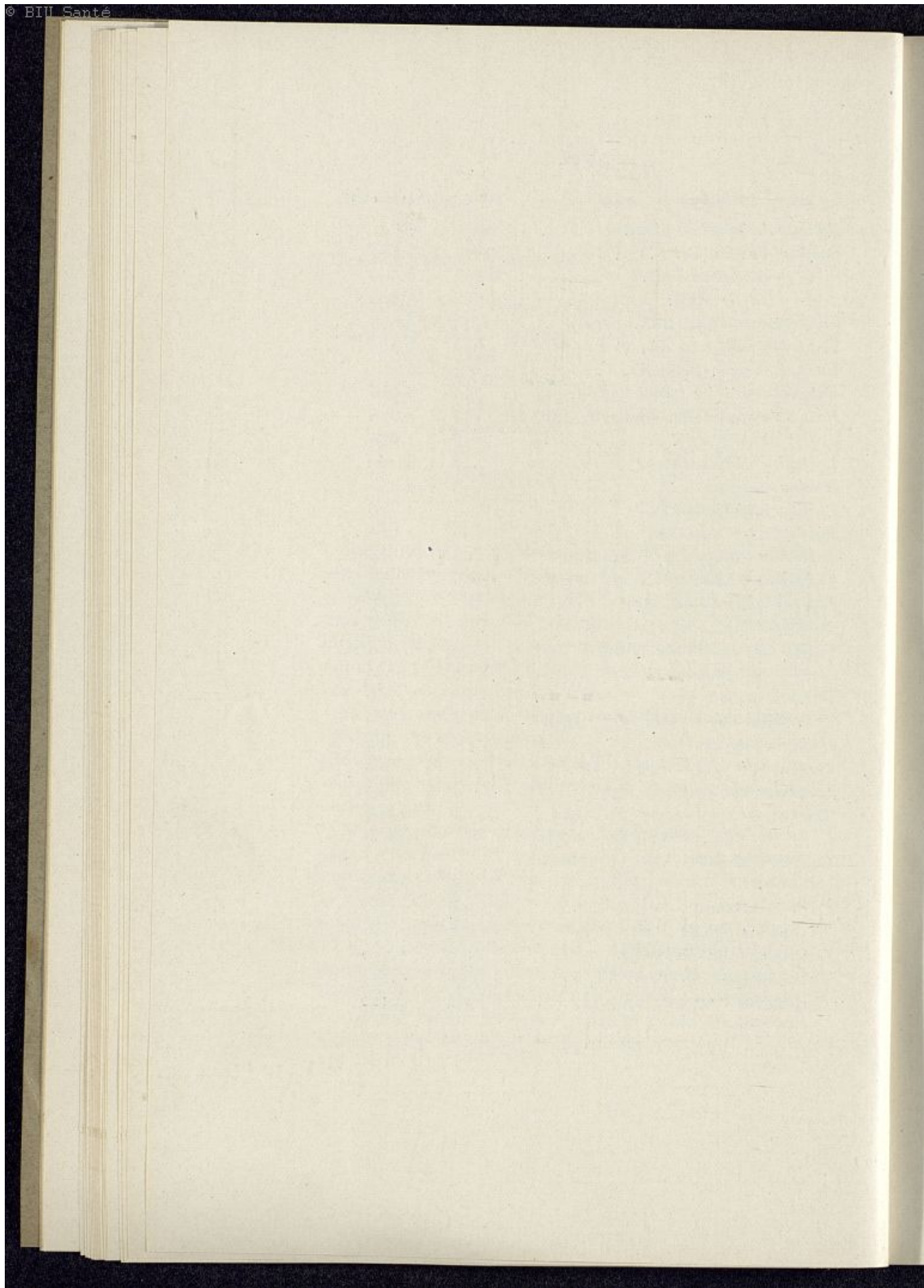
Il résulte de ces expériences que l'uréase est localisée essentiellement dans l'hyménium du champignon : c'est en effet et de beaucoup, la partie la plus active. Quand au pied et au chapeau, ils renferment aussi une certaine quantité de ferment, mais en proportion beaucoup plus faible. Le pied surtout a, dans la majorité des cas, une activité diastasique presque nulle.

Si nous essayons de classer les différents genres étudiés suivant leur richesse en uréase, nous n'y parviendrons pas. Les variations individuelles sont en effet trop marquées, pour qu'il soit possible d'établir une telle classification.

Nous ne pouvons donc nous adresser qu'aux différentes espèces envisagées et nous aurons alors parmi celles-ci, l'ordre décroissant suivant : le premier chiffre représente le nombre de cc., d'une solution d'HCl N/10 qu'il faut employer pour neutraliser au bout de 6 heures d'étuve, 10 cc. de solution d'urée soumise à l'influence d'un poids donné de partie du champignon frais, dans les proportions de 50 cc. d'urée pour 0 gr. 50 de tissu fermentaire. Le second chiffre indique le poids d'urée décomposée dans le même temps, dans 100 cc. de solution N/10 d'urée.

Espèces.	HCl N/10	Urée pour 0/0
<i>Hydnum imbricatum</i> Linn. . . . .	20 <sup>cc</sup>	6 <sup>gr</sup>
<i>Boletus badius</i> Fr. . . . .	18,6	5,580
— <i>castaneus</i> Bull. . . . .	18	5,400
— <i>edulis</i> Bull. . . . .	15	4,500
<i>Clitocybe geotropa</i> (Bull.) Quél. . . .	13,5	4,050
<i>Trametes rubescens</i> (A. et S.) Fr. . .	11,5	3,450
<i>Russula foetens</i> (Pers.) Fr. . . . .	10	3
<i>Entoloma lividum</i> (Bull.) Quél. . . .	9,5	2,850
<i>Russula cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr. . .	9,4	2,820
— <i>rubra</i> Fr. . . . .	5,6	1,680
<i>Lactarius chrysorrhoeus</i> Fr. . . . .	3,8	1,140
<i>Boletus scaber</i> Fr. . . . .	3,8	1,140
<i>Cortinarius impennis</i> Fr. . . . .	3,7	1,110
<i>Russula nigricans</i> (Bull.) Fr. . . . .	3,6	1,080
<i>Lactarius torminosus</i> (Schaeff.) Fr. . .	3,5	1,050
<i>Tricholoma album</i> (Schaeff.) Quél. . .	3,4	1,020
<i>Boletus aurantiacus</i> Bull. . . . .	3	0,900
<i>Lactarius piperatus</i> (Scop.) Fr. . . .	2,1	0,630
<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.) Fr. . . .	1,9	0,570
— <i>igniarius</i> L. . . . .	1,8	0,540
<i>Russula Queletii</i> Fr. . . . .	1,8	0,540
<i>Tricholoma columbetta</i> (Fr.) Quél. . .	1,6	0,480
<i>Hydnum amicum</i> Quél. . . . .	1,6	0,480
<i>Cortinarius albo-violaceus</i> (Pers.) Fr. .	1,4	0,420
<i>Lactarius controversus</i> (Pers.) Fr. . .	1,3	0,390
<i>Tricholoma saponaceum</i> (Fr.) Quél. . .	1,3	0,390
— <i>atro-squamosum</i> (Ch.) Sacc. . . . .	1	0,300
<i>Collybia maculata</i> (Alb. et Schwein). Quél. . . . .	0,9	0,270
<i>Cortinarius torvus</i> Fr. . . . .	0,8	0,240
<i>Thelephora pallida</i> (Pers.) Pers. . . .	0,8	0,240
<i>Cortinarius orellanus</i> Fr. . . . .	0,7	0,210
<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr. . . . .	0,6	0,180
<i>Cortinarius brunneus</i> (Pers.) Fr. . . .	0,4	0,120





## TROISIÈME PARTIE

---

### CHAPITRE I

#### RECHERCHE ET DOSAGE DE L'URÉE CHEZ LES CHAMPIGNONS

---

En commençant ce travail, nous pensions nous limiter à la recherche de l'uréase chez les Champignons supérieurs et à l'étude de cette diastase; dans la suite, au cours de nos essais, l'idée nous vint d'une corrélation possible entre la présence ou l'absence de ferment chez le même végétal et la présence ou l'absence d'urée. Nous avons donc entrepris un dosage systématique de ce composé chez la plupart des champignons récoltés, en nous adressant de préférence à ceux qui ne renfermaient pas de ferment; pour ce faire, nous avons appliqué la technique si précise indiquée par FOSSE et nous avons opéré de la manière suivante :

On pèse exactement 10 gr. de champignon frais ou de partie du champignon et on le coupe en petits morceaux; ceux-ci sont projetés dans l'alcool à 95° bouillant (100 cc. d'alcool environ) afin d'éviter l'action hydrolysante de l'uréase sur l'urée pouvant exister simultanément dans le végétal; le tout est maintenu au bain-marie bouillant pendant 1/4 d'heure; au bout de ce temps, la liqueur est passée sur une gaze hydrophile et exprimée aussi complètement que possible; l'alcool est chassé par distillation dans le vide, jusqu'à résidu de quelques centimètres cubes. Ce résidu, repris par 10 à 15 cc. d'eau et



quelques gouttes d'acide acétique pur, est filtré et la liqueur filtrée additionnée de 5 fois son volume d'acide acétique cristallisable et de 5 cc. de solution de xanthidrol au 1/10 dans l'alcool méthylique. Le précipité obtenu est recueilli au bout d'une heure, lavé à plusieurs reprises avec de l'alcool méthylique, séché à 100° et pesé. Par les calculs, il est facile de déduire le poids d'urée contenue dans 1000 gr. de champignon.

Nous donnons ci-après la liste des champignons étudiés renfermant de l'urée. La proportion y est indiquée en grammes pour 1000 gr. de matière première.

**Liste de répartition de l'Urée chez les Champignons.**

Espèces.	Urée en gr. p. 1000.
<i>Amanita caesarea</i> (Scop.) Pers. . . . .	0 P. A. (1)
— <i>phalloïdes</i> (Fr.) Quél. . . . .	1,70 T. P. A.
— <i>muscaria</i> (Linn.) Pers. . . . .	0 I.
	traces
— <i>pantherina</i> (D.C.) Krombh. } . . . . .	0,17 I.
	0,43
— <i>solitaria</i> (Bull.) Gill. . . . .	1,65 I.
— <i>rubescens</i> Pers. . . . .	0,72 T. P. A.
	0,04
— <i>spissa</i> (Fr.) Quél. . . . .	0 A.
— <i>ampla</i> Pers. . . . .	1,57 T. P. A.
	0,50 I.
— <i>citrina</i> Pers. . . . .	0,60
	0,37
— <i>verna</i> Fr. . . . .	0,96 I.
<i>Amanitopsis vaginata</i> (Bull.) Roze. . . . .	0 P. A.
	0,21
<i>Lepiota procera</i> (Scop.) Quél. . . . .	2,24 P. A.
— <i>rhacodes</i> (Vittad.) Quél. . . . .	0,87 I.
— <i>excoriata</i> (Schaeff.) Quél. . . . .	0 P. A.
	1,15

(1) Nous indiquons en face de chaque espèce, l'activité fermentaire du champignon : P. A. = peu actif. T. P. A. = très peu actif. I. = inactif. A. = actif.

Espèces.	Urée en gr. p. 0/00	
<i>Lepiota cinnabarina</i> (A. et S.) Karst.	1,78	I.
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl.) Quél.	0	P. A.
<i>Tricholoma resplendens</i> (Fr.) Karst.	0	A.
— <i>Russula</i> (Sch.) Gill.	0,09	A. P.
— <i>columbetta</i> (Fr.) Quél.	0	A.
— <i>cartilagineum</i> (Fr.) Quél.	0,54	I.
— <i>sulphureum</i> (Bull.) Quél.	0	T. A.
— <i>gambosum</i> (Fr.) Gill.	2,13	I.
— <i>album</i> (Sch.) Quél.	0	T. A.
— <i>acerbum</i> (Bull.) Quél.	0	T. A.
	faible	
— <i>nudum</i> (Bull.) Quél.	0,62	I.
— <i>panaeolum</i> (Fr.) Quél.	5,17	I.
— <i>cereum</i>	2,54	
<i>Clitocybe nebularis</i> (Bat.) Quél.	0,34	I.
— <i>odora</i> (Bull.) Quél.	1,03	I.
— <i>cerussata</i> (Fr.) Quél.	2,55	I.
— <i>orbiformis</i> (Fr.) Gill.	2,63	I.
— <i>inversa</i> (Scop.) Quél.	2,94	I.
<i>Tachardia laccata</i> (Scop.) Quél.	0	T. A.
<i>Collybia fusipes</i> (Bull.) Quél.	0	A.
— <i>maculata</i> (Alb. et Schw.) Quél.	0	T. A.
<i>Pleurotus corticatus</i> (Fr.) Quél.	0	A.
<i>Lactarius piperatus</i> (Scop.) Fr.	faible	A.
<i>Russula nigricans</i> (Bull.) Fr.	0	T. A.
— <i>delica</i> Fr.	0	A.
— <i>sardonis</i> Fr.	faible	A.
— <i>cyanozantha</i> (Sch.) Fr.	faible	T. A.
— <i>foetens</i> (Pers.) Fr.	faible	A.
<i>Marasmius oreades</i> (Bolt.) Fr.	3,87	I.
<i>Pluteus cervinus</i> (Sch.) Quél.	2,34	I.
<i>Clitopilus orcella</i> (Bull.) Quél.	3,93	I.
<i>Pholiota spectabilis</i> (Fr.) Gill.	0	P. A.
— <i>radicosa</i> (Bull.) Quél.	0,18	A.
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull.) Quél.	0	T. A.
<i>Psalliota campestris</i> Linn.	1,37	P. A.
	4,63	



Espèces.	Urée en gr. p. 100.	
<i>Psalliota xanthoderma</i> Gen. . . . .	2,07	P. A.
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch.) Fr. . . . .	{ faible 0,60	I.
<i>Coprinus comatus</i> Fr. . . . .	{ 1,77 2,14 1,35	I.
— jeune . . . . .		
— âgé . . . . .		
<i>Gomphidius viscidus</i> (L.) Fr. . . . .	faible	I.
<i>Boletus edulis</i> Bull. . . . .	0	T. A.
— <i>aurantiacus</i> Bull. . . . .	0	T. A.
<i>Fistulina hepatica</i> Fr. . . . .	0	A.
<i>Polyporus caesius</i> (Schröd.) Fr. . . . .	0	A.
— <i>lacteus</i> Fr. . . . .	0	I.
<i>Hydnum imbricatum</i> L. . . . .	faible	T. A.
— <i>repandum</i> L. . . . .	faible	A.
<i>Craterellus cornucopioides</i> (L.) Pers. . . . .	0	T. A.
<i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Fr. . . . .	0	I.
<i>Clavaria stricta</i> Pers. . . . .	0	I.
— <i>pistillaris</i> Linn. . . . .	0	A.
<i>Phallus impudicus</i> L. œuf développé. . . . .	{ 0 0,44	P. A.
— <i>caninus</i> Fr. . . . .	0,08	P. A.
<i>Bovista plumbea</i> Pers. . . . .	9,23	I.
<i>Lycoperdon gemmatum</i> B. . . . .	0,71	I.
— <i>excipuliforme</i> Scop. . . . .	1,36	I.
— <i>furfuraceum</i> Schaef. . . . .	8,03	I.
<i>Scleroderma vulgare</i> Horn. jeune. . . . .	{ 0 0,06	P. A.
— vieux. . . . .		
<i>Helvella lacunosa</i> Afz. . . . .	0	A.

Cette étude vérifie l'hypothèse que nous émettions précédemment : dans la grande majorité des cas, là où on caractérise l'uréase, il n'y a pas d'urée et inversement. Comme on peut le voir aussi, la proportion d'urée contenue dans les champignons varie non seulement d'une famille à une autre et d'une espèce à une autre dans des proportions souvent considérables, mais encore pour la même espèce, suivant l'époque et le lieu de récolte ; nous y reviendrons dans la suite.

## CHAPITRE II

 RÉPARTITION DE L'URÉE  
 DANS LES DIVERSES PARTIES DU CHAMPIGNON

L'uréase est localisée presque exclusivement dans la partie hyméniale des champignons ; l'urée au contraire, ne semble pas avoir de répartition bien nette. Elle est répandue un peu partout dans la plante, quoique le pied cependant, en renferme une proportion beaucoup plus faible. L'urée se rencontre donc de préférence dans le chapeau et la partie hyméniale du thallophyte.

Le dosage de ce composé, dans les trois parties du champignon, a été effectué chez un certain nombre d'espèces, en suivant la méthode précédemment indiquée. Nous en reproduisons les résultats dans le tableau suivant. La proportion d'urée y est indiquée en grammes pour 1000 gr. de matière première.

Espèces.	Pied	Chapeau	Hyménium
<i>Amanita citrina</i> Pers. . . . .	0	0,53	1,28
— <i>muscaria</i> (Linn.) Pers.	0	0	0
— <i>pantherina</i> (D.C.) Kr. {	0,43	0,07	0
	0,07	0,09	0,11
— <i>phalloides</i> (Fr.) Quél. .	0	0,74	1,37
— <i>rubescens</i> Pers. . . . .	0	0	0,11
— <i>solitaria</i> (Bull.) Gill. .	0,07	1,54	1,67
<i>Clitopilus orcella</i> (Bull.) Quél. .		4,07	3,80
<i>Coprinus comatus</i> Fr. . . . .	0,34	1,83	1,90
<i>Lepiota rhacodes</i> (Vittad.) Quél.	0,70	1,23	0,67
<i>Psalliota campestris</i> Linn. . .	4,71	4,74	4,43
<i>Tricholoma nudum</i> (Bull.) Quél.	0,28	0,74	0,93



### CHAPITRE III

#### RÉPARTITION DE L'URÉE SUIVANT L'ÂGE DU CHAMPIGNON

---

La présence et l'absence d'urée chez le même individu (*Amanita phalloides* (Fr.) Quél., *Lepiota excoriata* (Schaeff.) Quél., *Phallus impudicus* L., *Scleroderma vulgare* Horn.), nous a conduit à envisager l'influence de l'âge du champignon sur la teneur en urée et sa répartition. Il semble assez difficile assurément, de définir à première vue, ce qu'est au juste l'âge d'un champignon et telle espèce de petite taille, isolée, peut être plus âgée qu'une même espèce, de taille plus grande, rencontrée un peu plus loin. Quoi qu'il en soit, nous avons tourné la difficulté, en ne recueillant que les champignons rencontrés sur une même plage, formant l'ensemble vulgairement connu sous le nom de « Ronds de Sorcière » et paraissant bien correspondre à des stades successifs de la croissance du végétal.

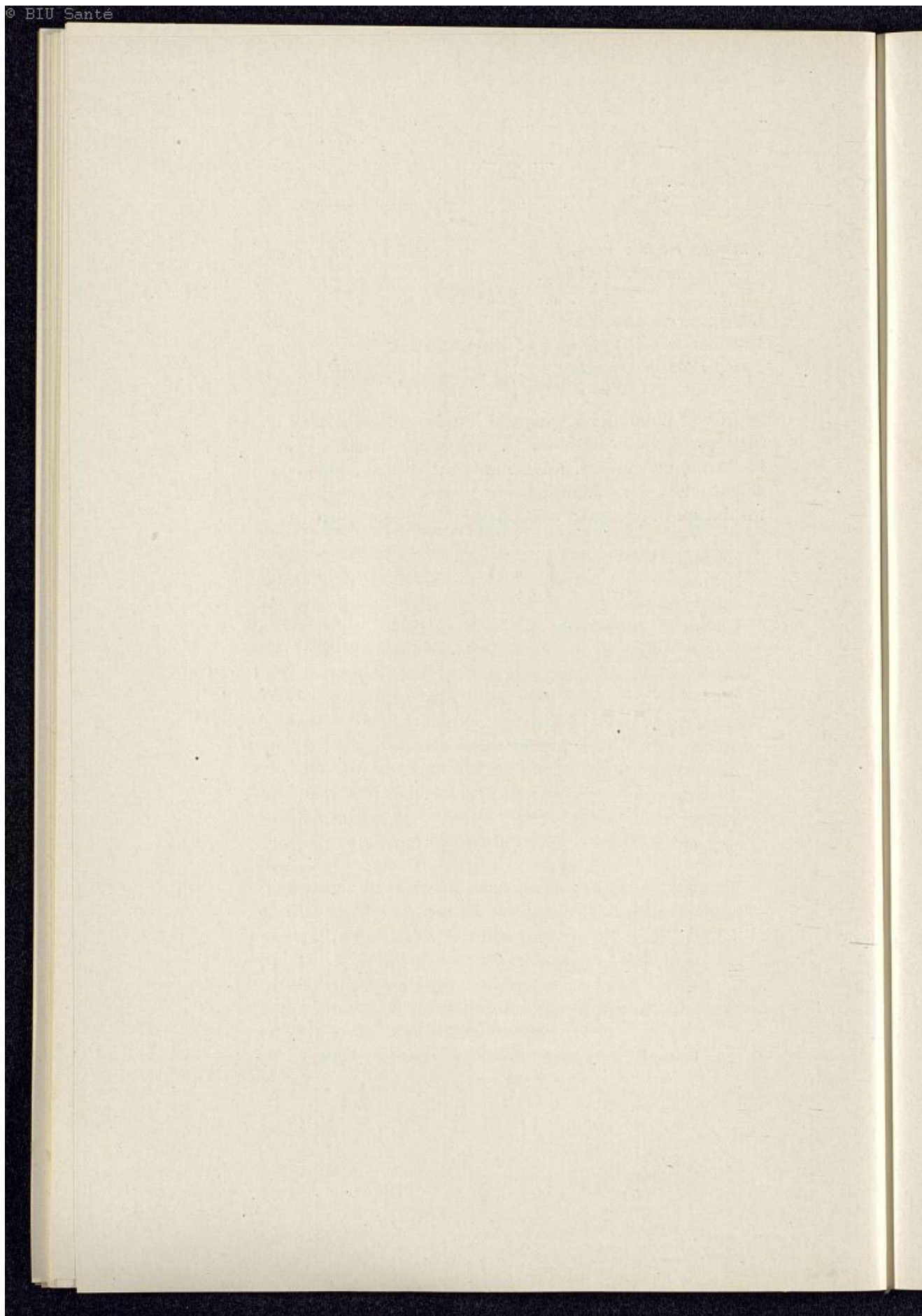
Nous avons ainsi récolté pour quelques espèces, 4 stades végétatifs différents, que nous désignons sous les indices 1, 2, 3, 4 et nous avons fait pour chacun d'eux un dosage d'urée par la méthode de Fosse. Le stade 1 représente le champignon tout jeune, quelquefois à l'état « d'œuf ». Le stade 4 indique un individu complètement développé. Les stades 2 et 3 sont intermédiaires.

Les résultats sont exprimés dans le tableau qui suit :

Espèces	STADES DE DÉVELOPPEMENT.			
	1	2	3	4
<i>Amanita citrina</i> Pers. . . .	0	0,14	0,43	0,92
— <i>muscaria</i> (Linn.)				
Pers. . . . .	0	0	0	0
<i>Coprinus comatus</i> Fr. . . .	1,77			2,14
<i>Psalliota xanthoderma</i> Gen.	0,78	1,60	2,07	6,07
<i>Lycoperdon gemmatum</i> B. . .	0,17	0,52	0,48	2,14

On voit donc que la quantité d'urée contenue dans le thallophyte va en croissant, à mesure que le stade végétatif est plus avancé. L'urée, semble-t-il, fait généralement défaut chez les champignons jeunes; la proportion maximum se rencontre surtout chez la plante adulte.





## QUATRIÈME PARTIE

---

### CHAPITRE I

#### PRÉPARATION DE L'URÉASE

---

La méthode de préparation du ferment, telle que nous l'indiquons à la fin de ce chapitre, n'a pas été notre mode opératoire primitif ; ce n'est en effet que petit à petit, en prenant pour ainsi dire contact avec la diastase et en étudiant ses propriétés, que nous nous sommes rendu compte des imperfections de nos préparations successives et que nous les avons modifiées, de manière à obtenir facilement une uréase active et de conservation certaine.

Nous avons employé comme matière première le bolet comestible, *Boletus edulis* Bull. Ce n'est pas, comme on l'a vu, le plus actif parmi les Bolets, mais nous l'avons cependant préféré aux autres, à cause de son abondance dans les bois, de sa récolte facile et de l'absence de coloration de ses tubes. La partie hyméniale étant la plus riche en ferment, c'est donc à cette dernière que nous nous sommes adressés pour préparer l'uréase. Les tubes peuvent se séparer aisément du chapeau auquel ils adhèrent, soit avec un couteau peu tranchant, soit même simplement avec la main.

Nous avons essayé successivement comme véhicule extractif : l'eau toluénée à saturation, l'eau additionnée de chlorure de sodium, la glycérine seule, enfin la glycérine additionnée de carbonate de chaux.

1° *Eau toluénée à saturation*. — Ce solvant ne permet pas la conservation de la diastase ; le liquide fermentaire



obtenu est actif, mais au bout de 24 heures déjà, la solution se couvre de moisissures et par suite devient inutilisable.

2° *Eau en présence de chlorure de sodium.* — Les essais entrepris pour obtenir un liquide fermentaire en prenant comme véhicule une solution chlorurée, (le chlorure de sodium, pour une concentration donnée, jouant ici le même rôle qu'un antiseptique) ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants. Si l'on emploie en effet une solution contenant 20 o/o de ce sel, on obtient un liquide beaucoup moins actif que la macération glycinée; une proportion supérieure de chlorure de sodium réduit à néant l'activité de la diastase; une proportion plus faible, ne permet pas la conservation de la liqueur.

3° *Glycérine seule.* — Un poids donné de tubes de Bolets est traité par un volume double de glycérine; on laisse macérer pendant 12 heures; on filtre.

La macération obtenue est active et de conservation facile; mais elle présente un certain nombre d'inconvénients dont nous nous sommes aperçus dans la suite de nos essais :

1° Elle est acide et cette acidité, bien que légère, diminue l'énergie du ferment.

2° La durée de la macération est insuffisante: nous avons constaté en effet que les dernières parties filtrées (la filtration étant très longue), étaient plus actives que les premières. Il y a donc lieu de procéder à une macération assez prolongée.

3° Les expériences ont montré que les tubes de Bolets jeunes étaient plus actifs que les vieux.

4° *Glycérine additionnée de carbonate de chaux.* — Nous aidant des directives précédentes, nous avons alors préparé un liquide fermentaire, qui constitue notre uréase, en opérant de la façon suivante :

On commence par séparer les Bolets âgés où les tubes ont une couleur jaunâtre, des jeunes où l'hyménium est au contraire parfaitement blanc; on obtient en effet dans ce dernier cas, un suc doué d'une activité diastasique



beaucoup plus grande. Quand au pied et au chapeau, nous avons vu qu'ils devaient être éliminés de la préparation, étant donné leur faible teneur en uréase; 1000 gr. de champignons frais fournissent ainsi sensiblement 400 gr. de tubes.

Ces tubes sont écrasés au mortier en présence de carbonate de chaux (10 o/o environ). On ajoute peu à peu un poids de glycérine égal à celui de la matière première; on triture le tout pendant quelques instants et on laisse en contact pendant 48 heures. Au bout de ce temps, on filtre au papier mouillé. La filtration étant très longue, il y a lieu de l'opérer dans un endroit frais.

Le liquide fermentaire obtenu possède une couleur ambrée si l'on a employé des tubes jeunes pour sa préparation. Il est plus foncé avec les tubes âgés.

*Trois cc. de ferment préparé avec des Bolets jeunes, mis dans une solution d'urée portée préalablement à la température de + 37°, doivent décomposer celle-ci en une heure; ces 3 cc. représentent sensiblement 1 gr. de tissus frais de champignon. C'est ce que nous considérons comme une uréase active.*

L'uréase s'altère sous l'influence du temps; à mesure qu'elle vieillit, son pouvoir diastasique va en diminuant; l'altération est moins rapide toutefois avec un ferment qui a été neutralisé par le carbonate de chaux.

Pour s'en rendre compte, on fait agir respectivement 3 cc. de ferment neutralisé et 3 cc. de ferment non neutralisé sur 100 cc. d'urée N/10 et on mesure l'activité diastasique de ces deux ferments à des époques déterminées.

Les chiffres indiqués dans le tableau suivant, représentent le nombre de cc. d'HCl N/10 qu'il faut employer pour saturer 10 cc. de la liqueur, après 6 heures de séjour à l'étuve à + 37°.



Temps	Ferment neutralisé	Ferment non neutralisé
Dosage après préparation. . . .	20 cc.	20 cc.
— après 8 jours . . . .	18,7	17,8
— après 14 jours. . . .	17,8	16,9
— après 52 jours . . . .	17,7	16,6
— après 77 jours. . . .	16,3	14,7
— après 137 jours. . . .	11,7	11,1
— après 176 jours. . . .	6,8	5,8

On voit donc qu'après 6 mois de préparation, le pouvoir diastasique du ferment est presque réduit au quart de sa valeur primitive.

Pour la facilité de notre exposé, nous désignerons sous le nom de *ferment actif*, une uréase préparée à partir de tubes jeunes de Bolets ; sous le nom de *ferment d'activité moyenne*, une uréase préparée à partir de tubes âgés ; (ces deux ferments ont été neutralisés ou non par le carbonate de chaux et ont permis ainsi des expériences comparatives) ; sous le nom de *ferment peu actif*, enfin, une uréase préparée avec un mélange de tubes jeunes et âgés, non neutralisée par le carbonate de chaux et utilisée seulement deux mois après sa préparation.

## CHAPITRE II

## ÉTUDE DE L'ACTION DE L'URÉASE

Dans ce chapitre, nous envisagerons successivement les points suivants :

A. Différence d'action de l'uréase préparée à partir de tubes jeunes de Bolets et de tubes âgés.

B. Différence d'action de la macération aqueuse, de la macération glycinée simple, de la macération glycinée neutralisée par le carbonate de chaux.

C. Marche de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase.

A. *Différence d'action de l'uréase préparée à partir de tubes jeunes de Bolets et de tubes âgés.*

Si l'on fait agir sur 100 cc. de solution d'urée décimale, respectivement 3 cc. de *ferment actif* et 3 cc. de *ferment d'activité moyenne* et qu'au bout de 2 heures, on effectue le dosage du carbonate d'ammoniaque formé, suivant la technique habituelle, on constate que la solution d'urée a été complètement hydrolysée par le *ferment actif*; il faut employer en effet pour neutraliser 10 cc. de la liqueur, 20 cc. d'acide chlorhydrique décimormal et, l'expérience terminée, le xanthidrol ne détermine dans cette même liqueur aucun précipité de xanthylurée; dans le cas du *ferment d'activité moyenne* au contraire, il faut employer 15 cc. seulement du même acide; il reste donc  $\frac{1}{4}$  de la solution d'urée qui n'a pas subi l'hydrolyse.

Il y a plus : *ce ferment, quel que soit le temps de contact, est incapable de poursuivre son action.*

L'uréase préparée à partir de tubes jeunes et blancs de Bolets est donc plus active que l'uréase préparée à partir



de tubes âgés. Dans des conditions égales et bien déterminées, on arrivera avec le premier ferment à une hydrolyse totale de l'urée; avec le deuxième, la transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque sera toujours incomplète.

B. *Différence d'action de la macération aqueuse, de la macération glycinée simple, de la macération glycinée neutralisée par le carbonate de chaux.*

On fait macérer respectivement 100 gr. de tubes de *Boletus edulis* pendant 12 heures dans :

100 cc. d'eau toluénée à saturation,  
100 cc. de glycérine,  
et 100 cc. de glycérine en présence du 1/10 de leur poids de carbonate de chaux.

Au bout de ce temps, on exprime la solution obtenue sur une toile serrée et on filtre au papier mouillé. On prend 3 cc. de chacune de ces liqueurs et on les fait agir respectivement sur 100 cc. d'urée décinormale.

Au bout de 5 heures, la solution aqueuse toluénée a formé 20 cc. de carbonate d'ammoniaque N/10, aux dépens de 10 cc., de liqueur d'urée N/10, la solution glycinée neutralisée, 20 cc., la solution glycinée simple, 19 cc.7.

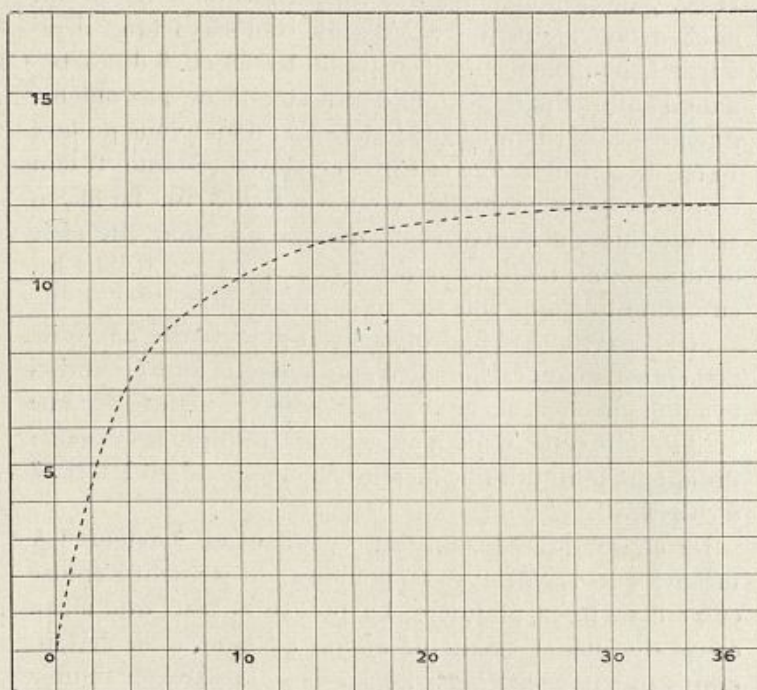
L'eau toluénée n'étant pas un antiseptique assez puissant pour assurer la conservation de l'uréase, la solution de choix qu'il convient par conséquent d'employer, est la solution glycinée neutralisée par le carbonate de chaux.

C. *Marche de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase.* — Pour étudier la marche de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase, nous avons conduit l'expérience de la façon suivante :

On prend 3 flacons contenant chacun 250 cc. de solution décinormale d'urée. On introduit dans chacun d'eux 10 cc. de *ferment peu actif*; on porte ces 3 flacons à l'étuve réglée à  $+37^{\circ}$  et toutes les 2 heures, on titre le carbonate d'ammoniaque formé. (L'emploi d'un *ferment peu actif* est justifié par ce fait, qu'un *ferment actif* aurait décomposé trop rapidement la solution N/10 d'urée mise

en expérience et n'aurait permis de suivre que difficilement la marche de l'hydrolyse).

La courbe indiquée sur la figure 1, nous montre que l'uréase agit énergiquement pendant les premiers moments de l'action ; puis au fur et à mesure que l'hydrolyse se poursuit, l'activité du ferment diminue ; ce



Vincent, del.

Figure 1 — MARCHÉ DE L'HYDROLYSE DE L'URÉE PAR L'URÉASE.

En abscisse : Temps exprimé en heures.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé

dernier au bout d'un certain temps cesse même complètement d'agir et la courbe se rapproche alors de l'horizontale. Lorsque l'alcalinité correspond à 12 cc. de solution N/10 de carbonate d'ammoniaque, l'hydrolyse s'arrête. A ce moment, l'uréase a transformé en carbonate d'ammoniaque un peu plus de la moitié de la solution d'urée.



Pensant alors que le carbonate d'ammoniaque formé dans la réaction était la cause de l'affaiblissement de la diastase et que cette dernière était entravée dans son activité par suite de l'alcalinité produite, nous avons prélevé dans un des 3 flacons mis en expérience 50 cc. de solution, au moment précis où le dosage nous indique qu'il y a 11 cc. 7 de carbonate d'ammoniaque formé. A ces 50 cc., nous avons ajouté 50 cc. d'acide chlorhydrique décimormal, pour neutraliser en partie les 58 cc. 5 de carbonate d'ammoniaque formé, de manière à ne pas obtenir une neutralité complète de la liqueur; nous avons prélevé 10 cc. de cette dernière et titré l'alcalinité restante. Il faut employer pour ce dosage 1 cc. 3 d'HCl N/10. Le flacon est mis alors à l'étuve et on effectue une nouvelle série de dosages au bout d'une demi-heure, 1 h., 2 h. et 3 h., en opérant chaque fois sur 10 cc. de solution.

Si la marche de l'hydrolyse avait été retardée par suite de la présence du carbonate d'ammoniaque formé, celui-ci ayant été neutralisé, le ferment aurait dû manifester une activité nouvelle. Or il n'en est rien, puisque les dosages indiquent toujours une alcalinité correspondant à 1 cc. 3 d'HCl N/10.

De ce qui précède, un fait cependant est à retenir : A mesure que l'hydrolyse se poursuit, le ferment s'épuise et perd sa force première. La preuve en est, que si au cours du même essai, on ajoute au bout d'un certain temps une nouvelle quantité d'uréase, l'hydrolyse semble reprendre sa marche initiale :

Dans une des fioles mises en expérience, nous avons prélevé au moment où le dosage indique qu'il y a 11 cc. 7 de carbonate d'ammoniaque formé, 100 cc. de la liqueur et nous y avons ajouté 3 cc. de ferment neuf; au bout de 8 heures, un nouveau dosage effectué indiquait une nouvelle formation de carbonate d'ammoniaque correspondant à 2 cc. 6 de liqueur N/10.

---



## CHAPITRE III

## ACTION DE LA CHALEUR SUR L'URÉASE

Nous examinerons l'influence de la dessiccation sur les tubes frais de Bolets, la marche de l'hydrolyse de l'uréase aux différentes températures, enfin la détermination de la température exacte de destruction du ferment.

1° *Influence de la dessiccation.* — L'uréase s'altère peu sous l'influence de la chaleur; il faut arriver déjà à des températures élevées pour annihiler l'action de cette diastase. Le ferment frais, tel qu'il se trouve dans les tubes du *Boletus edulis* n'est pas altéré par une dessiccation à  $+ 37^{\circ}$ . Nous avons effectué en effet l'expérience suivante :

1000 gr. de Bolets comestibles frais sont décortiqués et séparés en 3 parties correspondant au pied, au chapeau et aux tubes. Les organes séparés sont divisés en petits morceaux, mis à sécher à l'étuve, puis pulvérisés : L'opération donne 20 gr. de chapeau, 13 gr. de tubes et 33 gr. de pied. On prend alors 0 gr. 10 de poudre correspondant à chacune de ces parties et on les introduit dans de petites fioles d'Erlenmeyer, avec 50 cc. de solution d'urée décinormale; puis on met à l'étuve à  $+ 37^{\circ}$ . Au bout de 3 heures, on titre le carbonate d'ammoniaque formé.

L'hydrolyse de la solution d'urée sous l'influence du ferment contenu dans le pied et le chapeau est pour ainsi dire nulle, mais la transformation est complète dans la liqueur contenant les tubes. Il faut en effet 20 cc. d'acide chlorhydrique décinormal pour neutraliser en présence d'hélianthine les 10 cc. de la prise d'essai.

Ceci nous montre que la dessiccation à  $+ 37^{\circ}$  atténue à



peine le pouvoir fermentaire de l'uréase et que 0 gr. 10 de poudre de *Boletus edulis* desséché suffisent pour transformer en carbonate d'ammoniaque en moins de 3 heures 0 gr. 30 d'urée. Il faut toutefois remarquer que l'hydrolyse est un peu plus rapide avec les organes frais qu'avec les organes desséchés.

2° *Marche de l'hydrolyse de l'uréase aux différentes températures.* — Ne disposant pas d'étuves réglées aux différentes températures, nous avons employé le mode opératoire suivant :

On prépare de petites fioles de 125 cc. contenant chacune 100 cc. de solution N/10 d'urée. On porte chaque fiole tour à tour, dans une bassine de grande capacité (10 litres environ) contenant de l'eau maintenue constamment à la température désirée; un thermomètre permet de régler convenablement la chaleur. La fiole est fermée elle-même par un tampon de coton laissant passer un second thermomètre plongeant dans la solution d'urée et indiquant exactement la température obtenue. Quand cette dernière est atteinte, on ajoute dans la solution 3 cc. de ferment d'activité moyenne et on laisse exactement en contact pendant 1/4 d'heure, en ayant soin de vérifier continuellement la température. Au bout de ce temps, on prélève immédiatement 10 cc. de la liqueur sur lesquels on effectue un dosage acidimétrique et 10 autres cc. qu'on traite aussitôt par 50 cc. d'acide acétique pur, afin d'arrêter l'hydrolyse de l'urée par le ferment et de permettre ainsi un dosage pondéral de l'urée non décomposée, par la méthode de Fosse.

Les dosages acidimétriques ont été faits pour toutes les expériences de 30° à 100° et de deux en deux degrés. Les dosages au xanthidrol ont été faits aux températures de 40°, 50°, 60°, 70° et 80°.

Les résultats des dosages volumétriques sont exprimés dans le tableau suivant : le nombre de cc. indiqués représente le volume d'HCl N/10 employé pour neutraliser les 10 cc. de solution N/10 d'urée.



Température	HCl N/10	Température	HCl N/10
30°	4,5	66°	2 <sup>cc</sup>
32°	5,2	68°	1,8
34°	5,4	70°	1,5
36°	5,5	72°	1,4
38°	5,8	74°	1,2
40°	5,4	76°	1
42°	5,1	78°	0,8
44°	4,4	80°	0,6
46°	3,9	82°	0,5
48°	3,8	84°	0,4
50°	3,7	86°	0,3
52°	3,6	88°	0,3
54°	3,4	90°	0,3
56°	3,3	92°	0,3
58°	3	94°	0,3
60°	2,8	96°	0,3
62°	2,6	98°	0,3
64°	2,4	100°	0,3

En examinant ce tableau, on se rend compte facilement que la température optimum d'action du ferment est située à + 38°. L'action hydrolytique va en augmentant à mesure qu'on se rapproche de cette température, pour diminuer ensuite progressivement jusqu'à + 84°.

3° *Détermination de la température exacte de destruction du ferment.* — L'expérience précédente ne pouvait nous donner la température de destruction de l'urée; il s'écoule en effet un certain laps de temps entre le moment précis où le ferment est introduit dans la solution d'urée et l'instant où, tué par la chaleur, il cesse complètement d'agir. Ce temps est évidemment de plus en plus court pour des températures de plus en plus élevées, mais, si court soit-il, il permet tout de même l'action de la diastase; (c'est ce qui explique le chiffre de 0 cc. 3 trouvé dans l'expérience précédente à partir de 84°). Nous avons donc modifié le mode opératoire de la façon suivante :

On introduit dans des tubes à essai 1 cc. de ferment



*d'activité moyenne* et 4 cc. d'eau distillée. Ces tubes sont fermés par un tampon de coton laissant passer un thermomètre, dont l'extrémité inférieure plonge dans le liquide fermentaire. Le tube est immergé lui-même dans une bassine de grande capacité remplie d'eau, dont la température est indiquée par un second thermomètre. Les tubes sont portés pendant 10 minutes aux températures de 50°, 60°, 70°, 80°, et 90°. On verse alors leur contenu dans des fioles préparées à l'avance, contenant 50 cc. de solution d'urée N/10, puis on les porte à l'étuve à + 37° pendant 12 heures. Au bout de ce temps, on mesure l'activité du ferment par la méthode volumétrique habituelle. On constate ainsi :

qu'à 50°, le ferment agit encore très nettement, puisqu'il accuse une transformation en carbonate d'ammoniaque correspondant à 12 cc. 8 d'HCl N/10,

qu'à 60°, l'activité de la diastase mesurée en HCl N/10 est de 8 cc. 7,

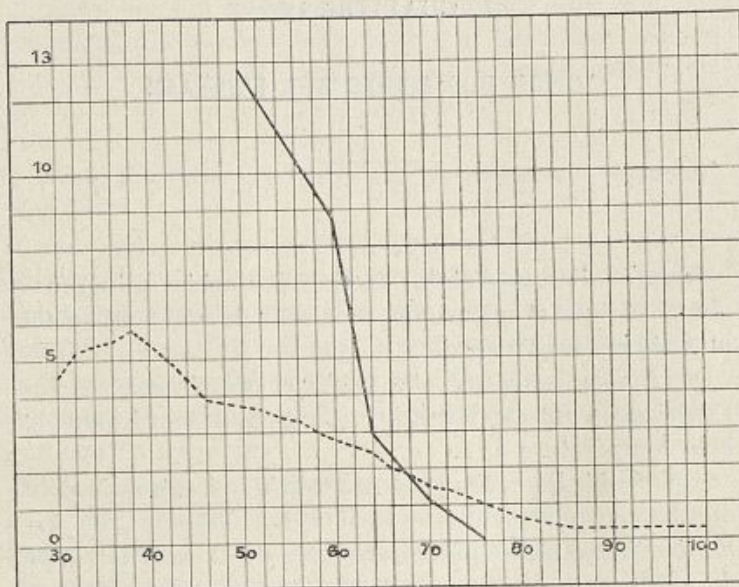
qu'à 80° enfin, l'uréase n'agit plus.

Nous avons recommencé alors cette expérience, en employant cette fois 3 cc. de *ferment d'activité moyenne*, que nous avons chauffé en présence de 2 cc. d'eau, successivement aux températures de 66°, 68°, 70°, 72°, 74°, 76°, 78°, et 80°, au B. M. pendant 1/4 d'heure, en opérant de la même façon que précédemment. Les résultats des dosages effectués sont exprimés dans le tableau suivant, où les chiffres indiqués représentent le nombre de cc. d'HCl N/10 qu'il faut employer pour saturer 10 cc. de la liqueur :

Température	HCl. N/10	Température	HCl. N/10
66°	3,5	74°	1,3
68°	3,4	76°	0,5
70°	2,8	78°	0,2
72°	1,9	80°	0,2

L'uréase est tuée par conséquent vers 76° — 78°. Nous exprimons dans le graphique ci-joint (*fig. 2*), la marche

de ce ferment envisagée aux différentes températures, ainsi que la courbe de destruction de cette diastase.



Vincent, del.

Figure 2. — ACTION DE LA CHALEUR SUR L'URÉASE.

----- Courbe de l'action de l'urée aux différentes températures.

————— Courbe de destruction du ferment.

En abscisse : Températures indiquées de 2 en 2 degrés.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.



## CHAPITRE IV

## ACTION DES ACIDES SUR L'URÉASE

Nous étudierons d'abord l'action des acides minéraux, chlorhydrique et sulfurique, puis celle de quelques acides organiques sur l'uréase.

1° ACIDES MINÉRAUX. A. *Acide chlorhydrique*. — Les expériences ont été faites à la température ordinaire et à la température de + 37°.

a) à froid. Dans 300 cc. d'eau toluénée à saturation, on ajoute 3 cc. d'acide chlorhydrique N/10 et 9 cc. de *ferment actif* neutralisé par le carbonate de chaux ; on opère de même avec un *ferment d'activité moyenne* non neutralisé. Au bout de 2 jours, on prend 50 cc. de chacune de ces liqueurs et on y ajoute 5 cc. d'une solution contenant 0 gr. 15 d'urée, puis on porte à l'étuve. Une heure après, on prélève dans chaque flacon 10 cc. de liquide et on titre le carbonate d'ammoniaque formé ; le même prélèvement est renouvelé au bout de 4 et 8 jours.

Les résultats obtenus montrent qu'à la dose de 1 cc. d'HCl N/10 pour 100 cc. de solution, l'uréase est tuée en 48 heures, s'il s'agit d'un *ferment d'activité moyenne*. Le pouvoir diastasique d'un *ferment actif*, est dans ces conditions très atténué, mais au bout de 8 jours cependant, l'hydrolyse n'est pas encore terminée. L'expérience n'a pu être poursuivie plus longtemps, le toluène n'étant pas un antiseptique suffisant pour assurer la conservation des liqueurs. Nous verrons plus loin que même à + 37°, cette proportion de 1 0/0 en HCl N/10 est insuffisante pour tuer une uréase active.



b) à  $+ 37^{\circ}$ . Nous avons opéré dans ce cas simultanément :

- 1° avec un *ferment peu actif* préparé depuis 4 mois,
- 2° avec un *ferment actif* préparé sans carbonate de chaux,
- 3° enfin avec un *ferment actif* neutralisé.

De petites fioles de 125 cc. reçoivent des doses croissantes de solution décinormale d'HCl correspondant à : 0 cc. 25, 0,50, 0,75, 1, 1,50, 1,75, 2, 2,25, 2,50, 2,75 et 3 cc.

On complète à 100 cc. avec une solution décinormale d'urée.

Pour l'*uréase peu active*, on ajoute alors dans chaque fiole, de 2 en 2 minutes (1), 3 cc. de ferment et on porte aussitôt ces fioles à l'étuve à  $+ 37^{\circ}$ . Pour les deux autres ferments, on a d'abord fait prendre aux solutions la température de  $+ 37^{\circ}$  et l'on a ajouté ensuite, toutes les deux minutes, comme précédemment, 3 cc. des liquides fermentaires respectifs.

Toutes les heures, on prélève alors, de 2 en 2 minutes, 10 cc. de chaque solution et on titre le carbonate d'ammoniaque formé, avec une solution d'HCl N/10, en présence d'hélianthine comme indicateur.

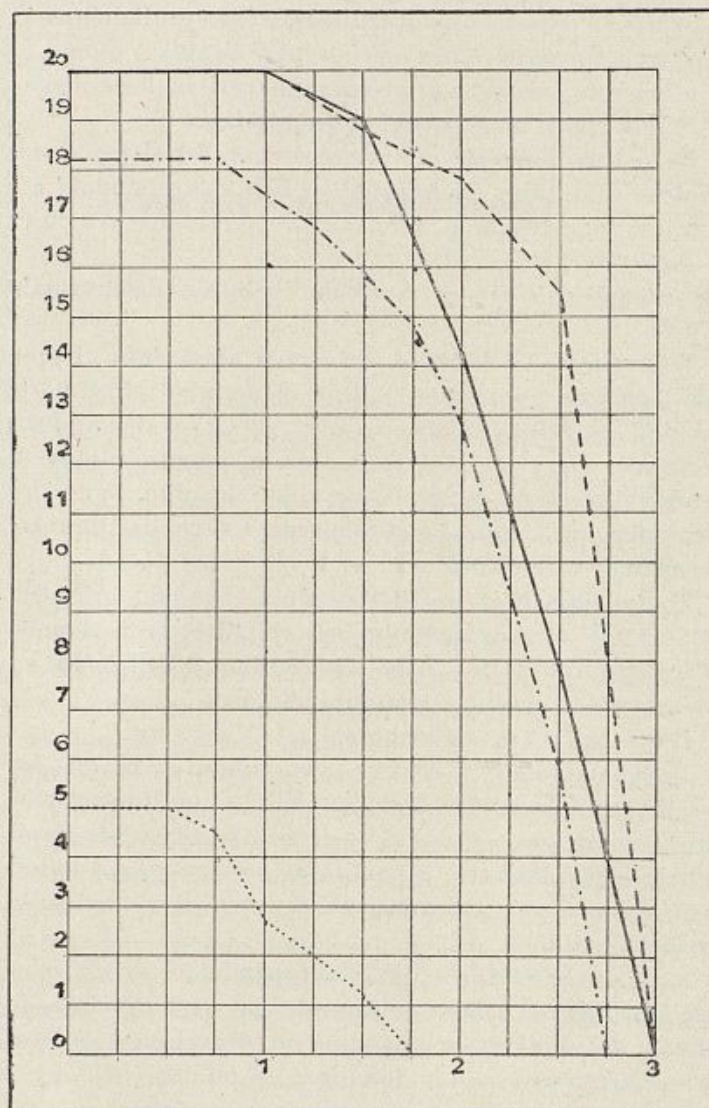
Il résulte de ces expériences :

1° Qu'une dose d'HCl N/10 correspondant à 1 cc. 75 o/o, suffit pour tuer une *uréase peu active*. Une liqueur renfermant 0 cc. 50 o/o de cet acide est hydrolysée de façon normale par l'uréase ; à partir de 0 cc. 75 o/o, l'action hydrolytique va en diminuant ; à 1 cc. 75 o/o enfin, le ferment est tué.

2° Qu'une dose d'HCl N/10 correspondant à 2 cc. 75 o/o, tue une *uréase active*, neutralisée par le carbonate de chaux. Ici, l'influence de l'acide ne commence à se faire sentir nettement qu'à la dose de 1 cc. 50 o/o.

(1) Nos expériences nécessitant de nombreux dosages en série, il était nécessaire d'adopter à chaque fois la même technique pour opérer dans des conditions toujours identiques et avoir ainsi des résultats comparables entre eux. C'est la raison pour laquelle au début de chaque expérience, nous n'ajoutons le ferment dans chaque flacon que toutes les deux minutes, temps nécessaire pour accomplir dans la suite et sans interruption la série des dosages envisagés.





Vincent, del.

Figure 3. — ACTION DES ACIDES MINÉRAUX SUR L'URÉASE.

----- Acide chlorhydrique N/10 sur ferment peu actif.  
 ..... Acide chlorhydrique N/10 sur ferment actif neutralisé par le carbonate de chaux.  
 ———— Acide chlorhydrique N/10 sur ferment actif non neutralisé.  
 - · - · - Acide sulfurique N/10.  
 En abscisse : Nombre de cc. de solutions acides N/10 ajoutés à 100 cc. de la solution d'urée N/10.  
 En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.



3° Enfin qu'une dose d'HCl N/10 correspondant à 3 cc. 0/0, annihile complètement une *uréase active*, neutralisée par le carbonate de chaux. L'influence de l'acide dans ce cas, est nulle jusqu'à 1 cc. 0/0; l'hydrolyse diminue légèrement quand la proportion d'acide atteint 1 cc. 50 0/0, puis elle tombe presque brusquement à 0.

B. *Acide sulfurique*. — La solution décimale de cet acide a sur l'uréase, une action sensiblement identique à celle de l'acide chlorhydrique. Nous avons employé pour cette expérience un *ferment actif* neutralisé par le carbonate de chaux. Le mode opératoire a été le même que précédemment. Les résultats sont les suivants :

Une concentration en acide sulfurique correspondant à 3. cc 0/0, tue un *ferment actif*; une solution renfermant 1 cc. 0/0 de cet acide est hydrolysée de façon normale par l'uréase; entre 1 cc. et 2 cc. 0/0, le retard dans l'hydrolyse est déjà plus sensible; à partir de cette limite, cette dernière va très rapidement en décroissant.

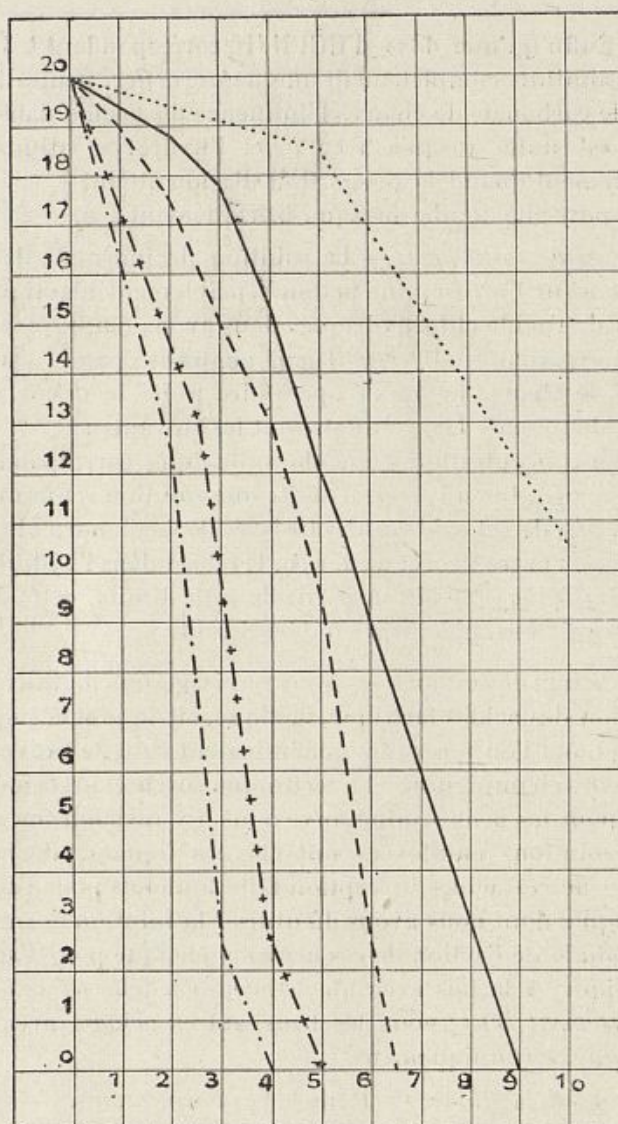
2° ACIDES ORGANIQUES. — Nous envisagerons maintenant l'action des acides tartrique, lactique, citrique et acétique, acides que l'on rencontre généralement dans le suc cellulaire des champignons. La technique suivie étant la même que pour les acides minéraux, nous n'y reviendrons pas. Les solutions employées ont été des liqueurs décimales de ces acides, exception faite toutefois pour l'acide acétique, dont nous avons dû utiliser la solution normale.

L'étude de l'action de ces acides a été faite pour l'acide tartrique, à la fois avec un *ferment d'activité moyenne* et un *ferment actif*; pour les trois autres acides, avec un *ferment actif* uniquement.

a) *Acide tartrique*. — Dans le cas d'un *ferment d'activité moyenne*, 4 cc. de solution N/10 acide dans 100 cc. de solution N/10 d'urée, annihilent l'action de la diastase. Le retard dans l'hydrolyse commence à se faire sentir pour des solutions renfermant de 1 cc. à 2 cc. 0/0 d'acide; il s'accroît de 2 cc. à 3 cc. 0/0.

Dans le cas d'un *ferment actif*, il faut employer 5 cc.





Vincent, del.

Figure 4. — ACTION DES ACIDES ORGANIQUES SUR L'URÉASE.

- ..... Acide acétique N/10.
  - Acide lactique N/10.
  - Acide citrique N/10.
  - Acide tartrique N/10 sur ferment d'activité moyenne.
  - + + + + + Acide tartrique N/10 sur ferment actif.
- En abscisse : Nombre de cc. d'acides N/10 ajoutés à 100 cc. de la solution d'urée N/10
- En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé

de cet acide dans 100 cc. de solution d'urée N/10, pour détruire l'activité du ferment.

b) *Acide lactique*. — L'influence de cet acide se manifeste entre 2 cc. et 3 cc. 0/0 ; elle semble plus faible entre 3 cc. et 4 cc. 0/0, mais reprend de nouveau après cette limite et très énergiquement cette fois. Une solution d'urée renfermant 6 cc., 5 0/0 de cet acide, ne peut plus être hydrolysée par l'uréase.

c) *Acide citrique*. — L'action de cet acide est plus faible encore que celle de l'acide lactique. L'hydrolyse décroît progressivement de 2 cc. à 5 cc. 0/0, pour tomber rapidement entre 5 cc. et 6 cc. 0/0. A 9 cc. 0/0, le ferment est tué.

d) *Acide acétique*. — La première étude concernant cet acide fut faite avec une solution décimale, mais il nous fallut employer un volume beaucoup trop considérable de cette dernière pour obtenir une action efficace. Nous avons donc recommencé l'expérience en faisant agir, cette fois, la solution normale. Dans ces conditions, il faut employer 3 cc. 5 0/0 de la liqueur pour détruire l'action de la diastase. Autrement dit, 35 cc. d'une solution décimale d'acide acétique dans 100 cc. de solution d'urée, sont nécessaires pour détruire l'action hydrolysante de l'uréase.

En somme, si nous envisageons une classification des acides, étudiée au point de vue de leur action sur l'uréase, nous aurons en suivant un ordre décroissant, les acides sulfurique, chlorhydrique, tartrique, lactique, citrique et acétique.

Les doses d'action maxima de ces acides sont indiquées dans le tableau suivant :



Acides.	Nombre limite de cc. d'acide N/10 p. 10.		Poids d'acide p. 100 détruisant l'action de l'urée.
	permettant l'action du ferment à + 37°	annihilant l'action du ferment à + 37°	
	cc.	cc.	gr.
A. chlorhydrique (F.A.) (1)	2,5	3	0,1095
— sulfurique (F. A.) . .	2,5	3	0,1470
— tartrique (F. A.) . . .	5	5,5	0,4125
— — (F. A. M.) . .	4	4,5	0,3370
— lactique (F. A.) . . .	6,5	7	0,630
— citrique (F. A.) . . .	8,5	9	0,630
— acétique (F. A.) . . .	30	35	2,10

Nous reproduisons dans la figure 3, le graphique de l'action des acides minéraux et dans la figure 4, celui des acides organiques envisagés.

On voit dans la première, qu'une dose d'HCl N/10 correspondant à 1 cc. 75 pour 100 cc. de solution suffit pour annihiler l'action d'un *ferment peu actif*, alors que 3 cc. sont nécessaires pour un *ferment actif*. On constate aussi une légère différence entre le ferment actif neutralisé par le carbonate de chaux et le ferment non neutralisé.

Dans la figure 4, on voit que l'acide tartrique tue le ferment à la dose de 4 cc. pour 100 cc. de solution, lorsqu'il s'agit d'un *ferment d'activité moyenne* ; pour un *ferment actif*, la quantité d'acide nécessaire est de 5 cc. 0/0, comme l'indiquent notre tableau et la figure 4.

(1) F. A. = Ferment actif. F. A. M. = Ferment d'activité moyenne.

## CHAPITRE V

### ACTION DES ALCALIS SUR L'URÉASE

Dans ce chapitre, nous examinerons successivement :

- 1° L'action du carbonate d'ammoniaque.
- 2° L'action du carbonate de soude.
- 3° L'action de la soude.

1° *Carbonate d'ammoniaque.* — Nous avons déjà vu, à propos de l'étude de l'action de l'uréase, que le carbonate d'ammoniaque formé dans l'hydrolyse de l'urée, n'avait qu'une faible influence sur la marche de la réaction et que l'activité du ferment ne se trouvait de ce fait que très faiblement réduite.

Nous allons étudier maintenant ce qui se passe, quand, dans une liqueur soumise à l'hydrolyse, on ajoute des doses croissantes de carbonate d'ammoniaque ; (le sel employé a été le sesquicarbonate d'ammoniaque). Le même mode opératoire se répétant pour le carbonate de soude et pour la soude, nous l'indiquerons une fois pour toutes :

Des fioles de 125 cc. reçoivent des doses croissantes de la solution à essayer qui est dans ce cas une solution normale de carbonate d'ammoniaque. Ces doses sont respectivement de 1, 2, 4, 6, 8, et 10 cc. On complète à 10 cc. avec de l'eau distillée, c'est-à-dire que :

la fiole 1 contient 1 cc. de carbonate d'ammoniaque + 9 cc. d'eau distillée.

—	2	—	2	—	—	8	—
—	3	—	4	—	—	6	—
—	4	—	6	—	—	4	—
—	5	—	8	—	—	2	—
—	6	—	10	—	—	0	—

COSTY

5



Chaque fiole reçoit en outre 90 cc. de solution décinormale d'urée ; un flacon témoin permet de comparer les résultats obtenus.

On ajoute alors, toutes les deux minutes, dans les flacons ainsi préparés, 3 cc. de *ferment actif*, puis on porte à l'étuve à  $+ 37^{\circ}$ . Toutes les heures, on prélève de deux en deux minutes, 10 cc. de chaque liqueur et on titre le carbonate d'ammoniaque formé avec une solution décinormale d'acide chlorhydrique, en présence d'hélianthine comme indicateur (1).

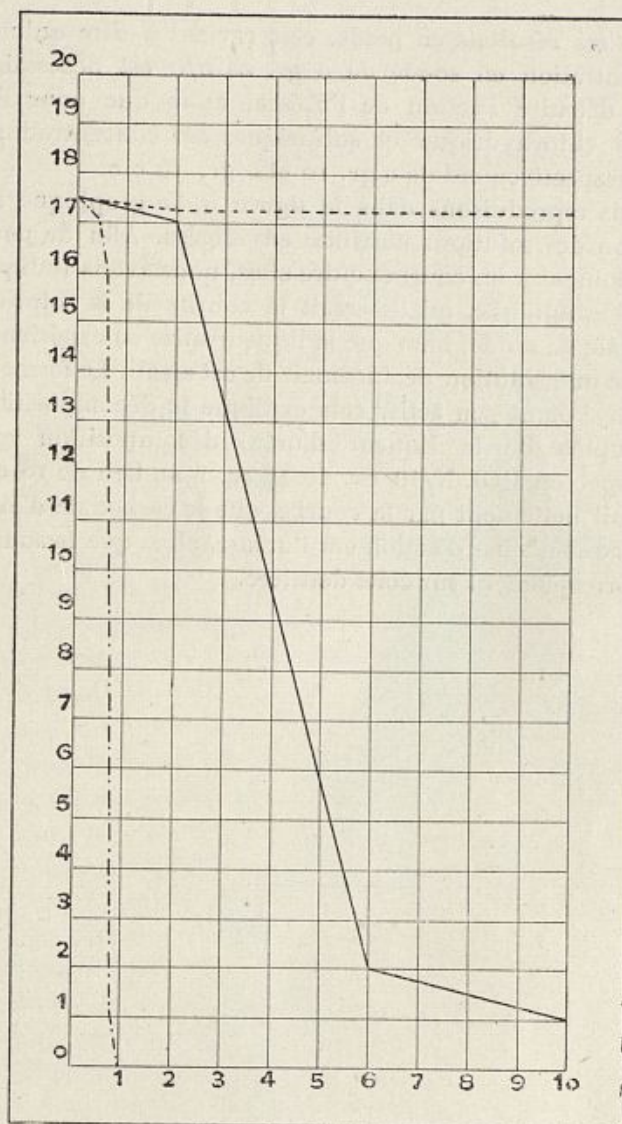
Si l'on examine sur la figure, la courbe représentant la marche de la réaction, on voit que l'influence de ce sel sur l'hydrolyse de l'urée est pratiquement nulle. Il faut arriver en effet à la proportion de 6 cc. 0/0 pour constater une légère action ; encore cette influence ne persiste-t-elle que pendant la première période de l'hydrolyse. Au bout de 3 heures en effet, le ferment a retrouvé son activité première et la courbe se transforme bientôt en une ligne droite.

2° *Carbonate de soude*. — Le sel employé est le carbonate de soude officinal ; la solution est une liqueur normale de ce sel ; enfin les proportions de cette dernière sont identiques aux précédentes.

On voit par le graphique ci-joint, que l'influence de cette liqueur sur la marche de l'hydrolyse est considérable, surtout quand la concentration de la solution atteint 2 0/0 ; toutefois même jusqu'à la dose de 10 0/0, le ferment conserve encore une certaine activité diastasique.

3° *Soude*. — La solution normale de soude étant trop concentrée, nous avons employé une solution décinormale de cet alcali. Une telle liqueur influence énergiquement la marche de l'hydrolyse ; si l'on compare l'action obtenue à celle des acides minéraux envisagés, on voit qu'elle est plus active encore. Une dose trois fois moins forte de soude en effet (1 cc. 0/0), suffit pour annihiler complètement le pouvoir fermentaire de l'uréase. Si nous expri-

(1) Il y a lieu de tenir compte dans les résultats obtenus, du volume de solution de carbonate d'ammoniaque normal ajouté dans chaque flacon.



Vincent, del.

Figure 5. — ACTION DES ALCALIS SUR L'UREASE.

----- Carbonate d'ammoniaque normal.

———— Carbonate de soude normal.

- · - · - · Soude normale.

En abscisse : Nombre de cc. de solutions alcalines normales ajoutées à 100 cc. de la solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.



mons ces résultats en poids, cela revient à dire qu'une concentration en soude de 0 gr. 04 0/0 est nécessaire pour détruire l'action de l'uréase, alors que pour les acides chlorhydrique et sulfurique, ces concentrations sont respectivement de 0 gr. 10 et 0 gr. 14 0/0.

Nous reproduisons dans la figure 5, le graphique de l'action des solutions alcalines envisagées. Afin de pouvoir comparer les courbes entre elles, nous avons indiqué sur ce graphique, quelle serait la courbe de la solution normale de soude, bien que la liqueur mise en expérience ait été une solution décinormale de cet alcali. Le ferment employé étant peu actif, cela explique la décomposition incomplète de la liqueur d'urée, décomposition qui exprimée en HCl. N/10 est de 17 cc. 5 au lieu de 18 cc. On voit nettement par la courbe, que le carbonate d'ammoniaque n'a pas d'action sur l'uréase, alors que la soude agit brusquement sur cette dernière.

---

## CHAPITRE VI

## ACTION DES SELS SUR L'URÉASE

Nous étudierons dans ce chapitre :

- 1° L'action des chlorures.
- 2° L'action des sulfates.
- 3° L'action des azotates.

La technique suivie pour l'étude des différents sels envisagés a été la suivante :

On introduit dans un ballon jaugé de 100 cc. un poids donné du sel à étudier, préalablement dissous dans une partie de la solution d'urée N/10 et on complète à 100 cc. avec cette dernière. On prépare ainsi un nombre déterminé de liqueurs, correspondant à des doses croissantes de sel et on dira que ces solutions sont à 1 gr., 2 gr., 3 gr., etc. p. 100 cc. de solution.

On ajoute alors de deux en deux minutes, dans chaque flacon, 3 cc. de *ferment actif*, puis on porte ces fioles à l'étuve à + 37°. Toutes les heures, on prélève de deux en deux minutes 10 cc. de chaque liqueur et on fait le dosage du carbonate d'ammoniaque formé au moyen d'une solution décimale d'acide chlorhydrique, en présence d'hélianthine comme indicateur.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

1° CHLORURES.

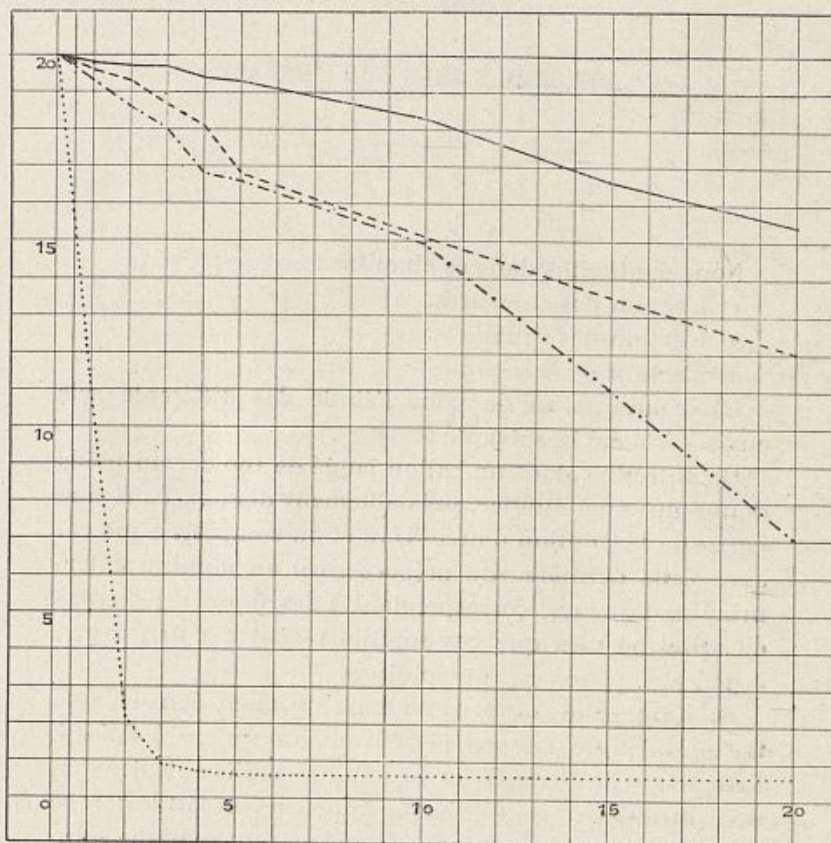
a) *Chlorure d'ammonium*. — Les doses employées ont été de :

0 gr. 50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

Une solution d'urée renfermant 5 o/o de ce sel, est hydrolysée sensiblement de façon normale par l'uréase.



Entre 5 et 15 o/o, on constate un léger retard dans l'hydrolyse, retard qui s'accroît quand cette proportion atteint 20 o/o.



Vincent, del.

Figure 6. — ACTION DES CHLORURES SUR L'URÉASE.

- Chlorure d'ammonium.
- - - Chlorure de potassium.
- ..... Chlorure de sodium.
- . - . - Chlorure de calcium.

En abscisse : Poids des sels contenus dans 100 cc. de solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.

b) *Chlorure de potassium.* — Les doses employées ont été de :

1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 et 30 gr.

Plus énergique que le chlorhydrate d'ammoniaque, le chlorure de potassium fait décroître l'action hydrolytique presque régulièrement jusqu'à 30 o/o. A cette dose, la proportion d'urée transformée en carbonate d'ammoniaque est réduite presque de moitié.

c) *Chlorure de sodium*. — Les doses employées ont été de :  
1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

L'action de ce sel est plus intense encore que celle du précédent. A 20 o/o, l'action hydrolytique n'atteint plus que le tiers de sa valeur primitive.

d) *Chlorure de calcium*. — Les doses employées ont été de :  
0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 et 50 gr.

De tous les chlorures employés, c'est de beaucoup le plus énergique. Dès 0 gr. 50 o/o en effet, l'action hydrolytique n'a plus que le quart de sa valeur totale ; à 1 o/o, la moitié de la solution d'urée seulement est hydrolysée. A 3 o/o enfin, le ferment n'agit plus.

Nous exprimons dans la figure 6, le graphique de l'action des chlorures sur l'uréase, obtenu après 5 heures d'étuve à + 37°.

## 2° SULFATES.

a) *Sulfate de magnésium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 et 50 gr.

Une liqueur renfermant 20 o/o de ce sel est hydrolysée de façon presque normale par l'uréase. Il faut arriver à 50 o/o pour voir diminuer la transformation en carbonate d'ammoniaque ; les trois quarts de la liqueur sont alors seulement hydrolysés.

b) *Sulfate d'ammonium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20

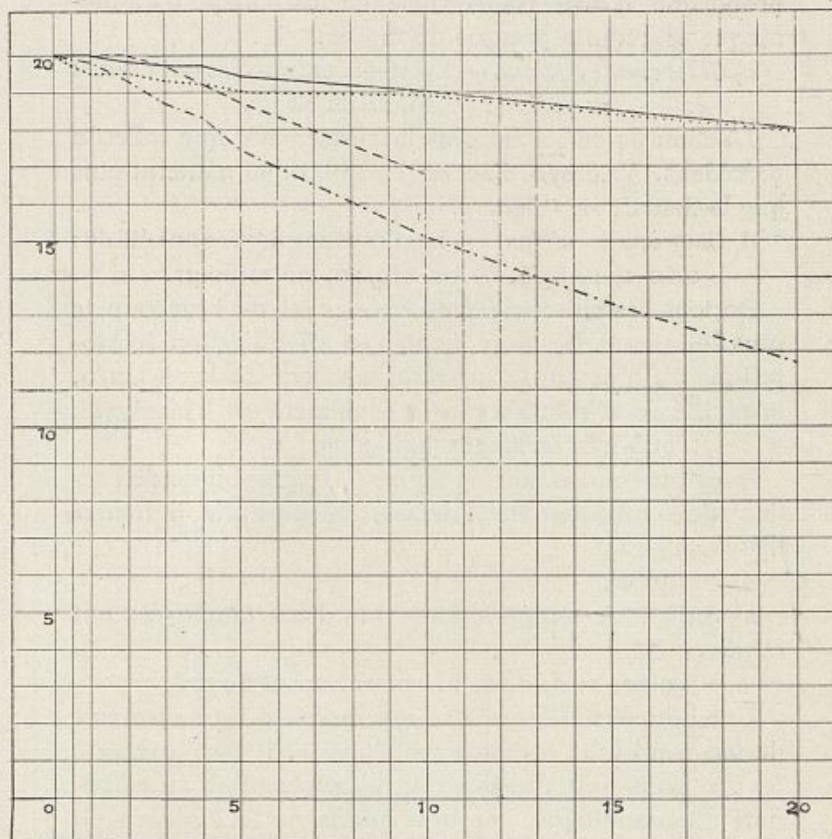
Ce sel agit peu sur l'uréase ; la marche de l'hydrolyse n'est retardée que faiblement quand la concentration de la solution atteint 10 o/o.

c) *Sulfate de potassium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5 et 10 gr.



L'action de ce sel est peu marquée; la transformation en carbonate d'ammoniaque ne diminue légèrement qu'à partir d'une concentration de 10 o/o.



Vincent, del.

Figure 7. — ACTION DES SULFATES SUR L'URÉASE.

- Sulfate d'ammonium.
- ..... Sulfate de magnésium.
- - - Sulfate de potassium.
- . - Sulfate de sodium.

En abscisse : Poids des sels contenus dans 100 cc. de solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.

d) *Sulfate de sodium*. — Les doses employées ont été de : 0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

Une solution renfermant 1 o/o de ce sel est hydrolysée de façon normale. Une concentration de 10 o/o, diminue

la transformation en carbonate d'ammoniaque du quart de sa valeur. A 20 o/o, la moitié de la solution d'urée seulement est hydrolysée.

e) *Sulfate de chaux*. — Etant donné la faible solubilité de ce sel dans l'eau, nous n'avons pu préparer que deux solutions : l'une à saturation, l'autre par dilution à demi-saturation. Cette dernière n'agit que peu sur l'urée ; la première retarde assez fortement l'action hydrolytique et réduit la transformation en carbonate d'ammoniaque aux trois quarts de sa valeur.

Nous exprimons sur la figure 7 le graphique d'action des sulfates sur l'urée, envisagé après 5 heures d'étuve à + 37°.

### 3° AZOTATES.

a) *Azotate d'ammonium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

Une solution renfermant 2 o/o de ce sel est hydrolysée de façon normale. Entre 3 et 15 o/o, la transformation en carbonate d'ammoniaque diminue légèrement ; à 20 o/o, elle atteint un peu plus des trois quarts de la liqueur.

b) *Azotate de sodium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 et 40 gr.

Ce sel agit très énergiquement sur l'urée ; une concentration de 0,50 o/o retarde déjà sensiblement l'action hydrolytique. A 3 o/o, la transformation en carbonate d'ammoniaque a perdu le quart de sa valeur totale ; à 5 o/o elle est réduite sensiblement de moitié ; à 20 o/o, l'action hydrolytique n'atteint plus qu'un quart de la liqueur ; à 40 o/o enfin, on peut dire que pratiquement le ferment n'agit plus.

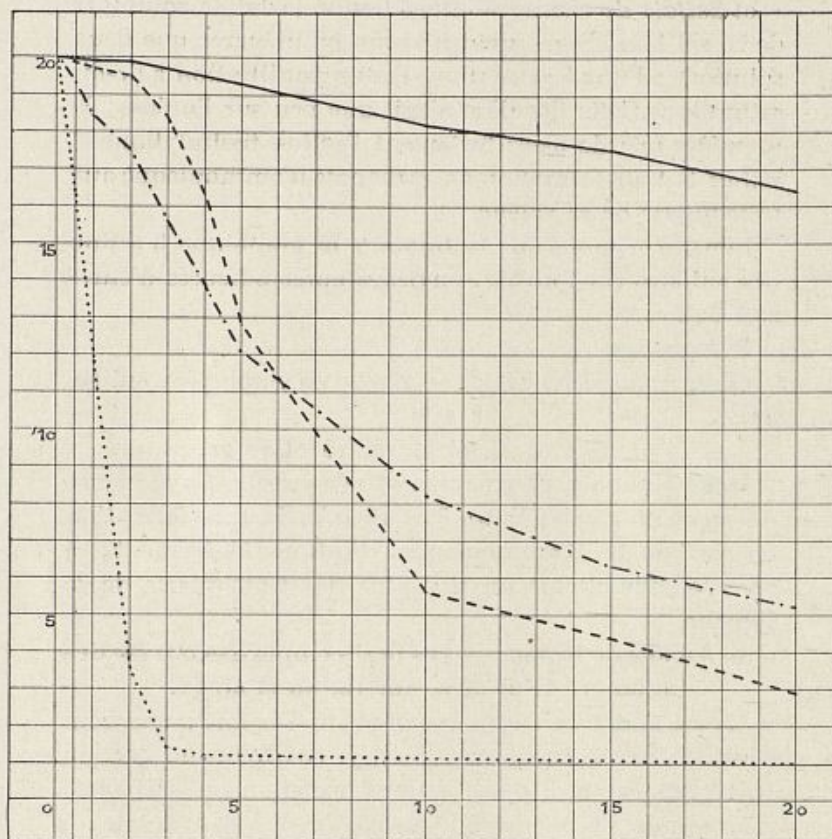
c) *Azotate de potassium*. — Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

L'action de ce sel est plus intense encore que celle du précédent. Comme tout à l'heure, l'action hydrolytique a perdu sensiblement la moitié de sa valeur dès la pro



portion de 5 o/o ; mais à 10 o/o, dose moitié moins forte que précédemment, la transformation en carbonate d'ammoniaque n'atteint plus que le quart de sa valeur



Vincent, del.

Figure 8. — ACTION DES AZOTATES SUR L'URÉASE.

- Azotate d'ammonium.
- - - Azotate de potassium.
- . - Azotate de sodium.
- ..... Azotate de calcium.

En abscisse : Poids des sels contenus dans 100 cc. de solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.

totale ; elle est nulle enfin, quand la proportion d'azotate de potassium atteint 20 o/o.

d) *Azotate de chaux*. — C'est un sel très actif et dont l'action est en tous points comparable à celle du chlorure

de calcium. Si l'on compare d'ailleurs le graphique d'action de ces deux sels, on voit qu'ils coïncident presque point pour point. Les doses employées ont été de :

0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 et 20 gr.

Dès 0,50 o/o, l'action hydrolytique a perdu environ le quart de sa valeur totale ; à 1 o/o, la transformation en carbonate d'ammoniaque est réduite de moitié ; à 3 o/o, le pouvoir diastasique de l'uréase est pratiquement détruit.

Nous exprimons sur la figure 8, le graphique de l'action des azotates sur l'uréase, envisagé après 5 heures d'étuve à + 37°.

Dans le tableau suivant, nous avons classé par ordre d'action décroissante, les différents sels envisagés. Les chiffres indiqués représentent le nombre de cc. d'HCl N/10 qu'il faut employer pour saturer au bout de 5 heures d'étuve, 10 cc. de liqueur N/10 d'urée, soumise à l'influence de 3 cc. de *ferment actif*, à la température de + 37°.

Sels	Concentration pour 100 des solutions.										
	Témoin	0,50	1	2	3	4	5	10	15	20	
Chlorure d'ammonium.	20	19,9	19,8	19,7	19,4	19,3	19,3	18,3	16,6	15,4	
— de potassium.	20		19,6	19,3	18,7	18,1	16,8	15,1	13,5	12	
— de sodium.	20		19,3	18,6	18	16,8	16,8	15,1	11	7	
— de calcium.	20	15,6	10,9	2,2	0,9	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	
Sulfate de magnésium.	20	19,7	19,5	19,5	19,3	19,2	19	18,9	18,5	18	
— d'ammonium.	20	20	20	19,8	19,7	19,7	19,4	19	18,4	17,8	
— de potassium.	20	20	20	20	19,7	19,2	18,7	17,8			
— de sodium.	20	19,8	19,8	19,3	18,7	18,3	17,4	15,1	13,3	11,7	
Azotate d'ammonium.	20	19,9	19,9	19,9	19,7	19,5	19,3	18,2	17,5	16,4	
— de sodium.	20	19,3	18,4	17,5	15,6	13,9	12,1	8,2	6,3	5,2	
— de potassium.	20	20	19,8	19,5	18,4	16,3	12,8	5,6	4,4	2,9	
— de calcium.	20	16,3	11,8	3,5	1,4	1,2	1,2	1	1	0,9	

Pour la clarté de l'exposition, nous avons présenté l'influence des sels sur l'uréase, en classant ces derniers d'après leur fonction acide ; mais si l'acide du sel intervient dans la marche de l'hydrolyse de l'urée par ce ferment, l'élément important qui agit est la base, autrement dit et suivant le sel considéré, l'ion ammonium, potassium, sodium, ou magnésium.

L'ion magnésium et l'ion ammonium n'ont que peu



d'influence sur l'hydrolyse de l'urée par le ferment ; ce sont de beaucoup les moins actifs.

L'ion potassium et l'ion sodium sont déjà plus énergiques. Leur activité varie chez l'un ou chez l'autre, suivant l'acide qui leur est combiné.

Enfin l'ion calcium, le plus actif de tous, agit non seulement en retardant très fortement la marche de l'hydrolyse, mais encore comme destructeur du pouvoir fermentaire de l'uréase.

---

## CHAPITRE VII

ACTION DES ANTISEPTIQUES ET DE QUELQUES  
SUBSTANCES INHIBITRICES SUR L'URÉASE

Nous nous proposons d'étudier dans ce chapitre, d'une part, l'action du toluène, des acides benzoïque et salicylique et du bichlorure de mercure sur l'uréase, d'autre part, l'action du saccharose et de l'alcool, que nous appellerons « substances inhibitrices » sur ce même ferment.

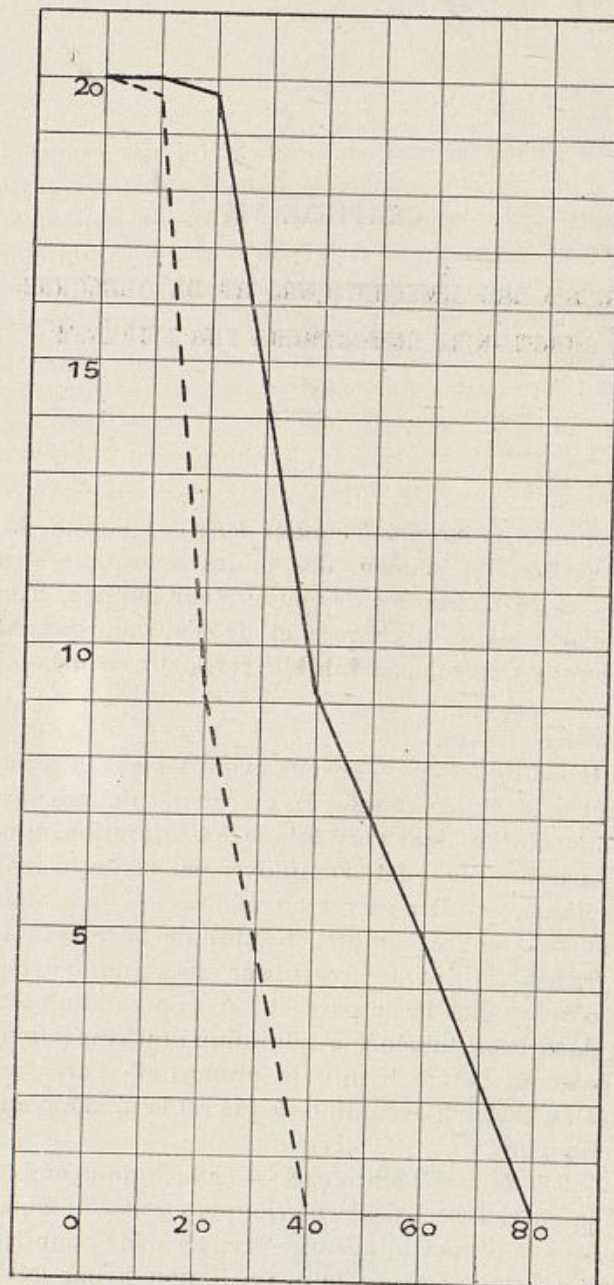
## 1° ANTISEPTIQUES.

A. *Action du toluène.* — Nous avons vu que la solution décinormale d'urée employée au cours de nos essais, était une solution dans l'eau toluénée à saturation. Il nous a été possible en effet d'employer ce carbure comme antiseptique, car il n'exerce aucune action sur l'uréase.

Pour s'en rendre compte, il suffit de faire agir 3 cc. d'un *ferment actif* parallèlement sur une solution décinormale d'urée dans l'eau pure et sur une solution d'urée N/10 dans l'eau toluénée à saturation ; on constate ainsi que dans un même temps, la proportion d'urée transformée en carbonate d'ammoniaque est la même pour les deux liqueurs.

B. *Action de l'acide benzoïque.* — La technique employée a été la suivante : L'acide benzoïque étant soluble dans l'eau dans la proportion de une partie d'acide pour 373 de solvant, à la température de  $+17^{\circ},5$ , nous avons fait une solution de cet acide dans l'eau distillée à la dose de 2 pour 1000. Cette eau benzoïquée nous a servi à préparer ensuite la solution décinormale d'urée.





Vincent, del.

Figure 9. — ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR L'URÉASE.

— Acide benzoïque.

- - - Acide salicylique.

En abscisse : Volumes de solutions acides à 2 p. 1000 contenus dans 100 cc. de solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.

On mesure alors dans des flacons de 125 cc. : 5 cc., 10, 20, 40, 80, et 100 cc. de cette liqueur et on complète à 100 cc. avec une solution décimale d'urée dans l'eau pure. On obtient ainsi une concentration en acide benzoïque correspondant respectivement pour chaque flacon à : 0 gr. 02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, et 0,20 pour 100 cc. de solution. Un flacon témoin permet de comparer les résultats obtenus.

Ceux-ci montrent qu'à la dose de 0 gr. 08 0/0, l'acide benzoïque n'agit pas sur l'uréase ; à 0 gr. 12 0/0, la moitié seulement de la solution d'urée est transformée en carbonate d'ammoniaque ; à 0 gr. 20 0/0 enfin, l'uréase est détruite.

C. *Action de l'acide salicylique.* — Cet acide est plus actif encore. On prépare de la même façon que précédemment des solutions renfermant 0 gr. 02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, et 0 gr. 20 d'acide pour 100 cc. de solution ; on constate ainsi, qu'entre 0 gr. 04 et 0 gr. 08 pour 100, l'hydrolyse perd la moitié de sa valeur primitive ; à 0 gr. 12 0/0, le ferment n'agit plus.

D. *Action du bichlorure de mercure.* — Ce sel agit à doses infinitésimales. Il suffit en effet de un milligramme de bichlorure dans 100 cc. d'urée décimale, pour arrêter le pouvoir fermentaire de l'uréase.

Nous reproduisons dans la figure 9, le graphique d'action des acides benzoïque et salicylique.

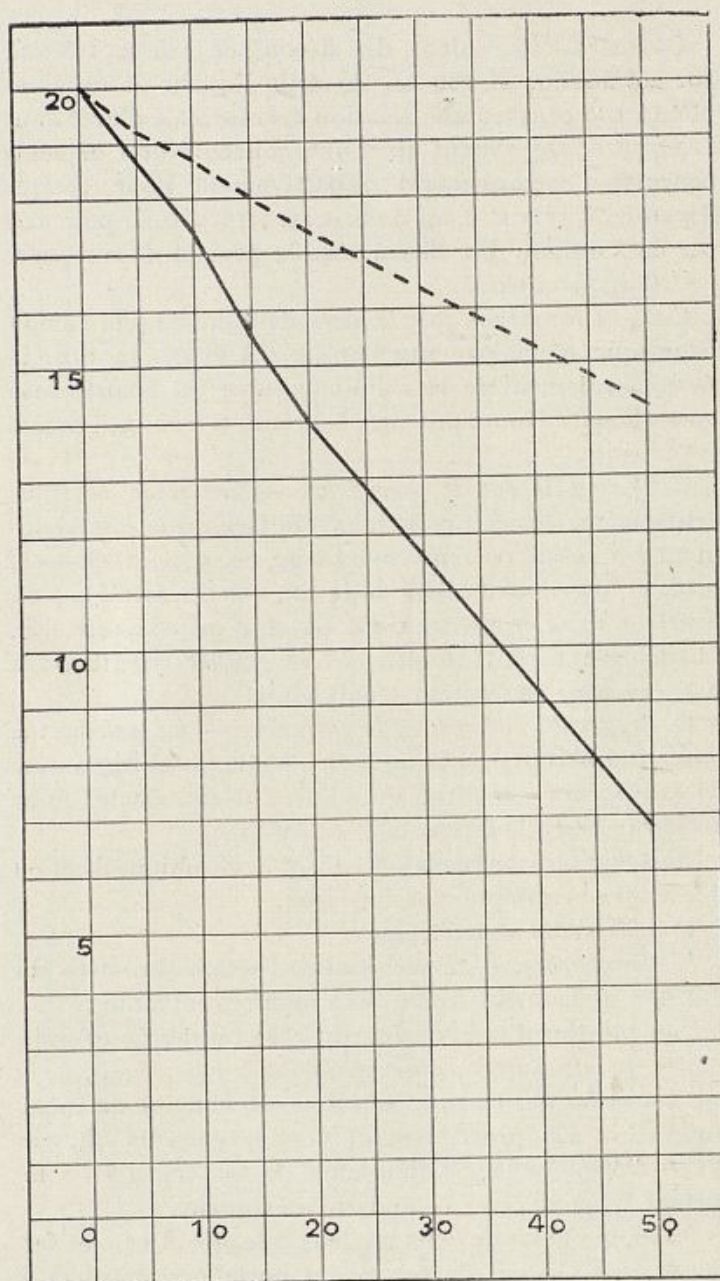
## 2° SUBSTANCES INHIBITRICES.

A. *Saccharose.* — Pour étudier l'action du sucre sur l'uréase, nous avons opéré de la manière suivante :

Une solution d'urée décimale reçoit des doses croissantes de saccharose, correspondant à 1 gr., 2, 3, 4, 5, 10, 20, et 50 gr. Chaque solution est obtenue en introduisant le sel préalablement dissous dans la liqueur d'urée N/10, dans un ballon jaugé de 100 cc. et en complétant à 100 cc. avec cette dernière liqueur.

On ajoute alors de deux en deux minutes 3 cc. de ferment dans chaque flacon et on porte ces derniers à l'étuve. Toutes les heures on effectue pour chaque liqueur





Vincent, del.

Figure 10. — ACTION DU SACCHAROSE ET DE L'ALCOOL SUR L'URÉASE.

— Alcool éthylique.  
 - - - - - Saccharose.

En abscisse : Poids de saccharose et volume d'alcool à 95° contenus dans 100 cc. de solution d'urée N/10.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.

le dosage du carbonate d'ammoniaque formé. On voit ainsi que le saccharose n'a qu'une influence très faible sur la marche de l'hydrolyse ; son action ne commence à se faire sentir qu'à partir d'une concentration de 15 o/o ; mais à 50 o/o, l'uréase agit encore très nettement sans pouvoir toutefois arriver à une décomposition totale de l'urée.

B. *Alcool éthylique*. — L'alcool employé a été l'alcool à 95° ; les doses correspondent à : 1 cc., 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 et 50 cc., complétées à 100 cc. avec la liqueur N/10 d'urée. La technique adoptée a été la même que pour la saccharose.

L'action de l'alcool éthylique sur l'uréase est plus énergique que celle du sucre, mais pas aussi intense cependant qu'on aurait pu s'y attendre.

Une liqueur renfermant en effet une concentration en alcool de 2 o/o, est hydrolysée de façon normale par l'uréase. Entre 3 et 20 o/o, le ferment bien que retardé dans son action agit encore très nettement ; à 50 o/o, enfin, les trois quarts de la solution d'urée restent non décomposés (1).

(1) Il faut remarquer que, dans ce cas, la liqueur soumise à l'hydrolyse renferme moitié moins d'urée ; autrement dit, qu'elle devient solution demi-décinormale ; les résultats obtenus doivent donc être multipliés par 2, c'est-à-dire que le poids d'urée décomposée n'est plus de 0 gr. 20 o/o mais de 0 gr. 40 o/o. L'action paralysante de l'alcool éthylique est donc en réalité très faible.



## CHAPITRE VIII

ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'URÉASE  
SUR UNE SOLUTION D'URÉE ET INVERSEMENT

Nous nous proposons d'étudier dans ce chapitre :

1° L'influence d'un même volume de ferment sur des quantités croissantes d'urée.

2° L'influence de quantités croissantes d'uréase sur un même volume de solution d'urée.

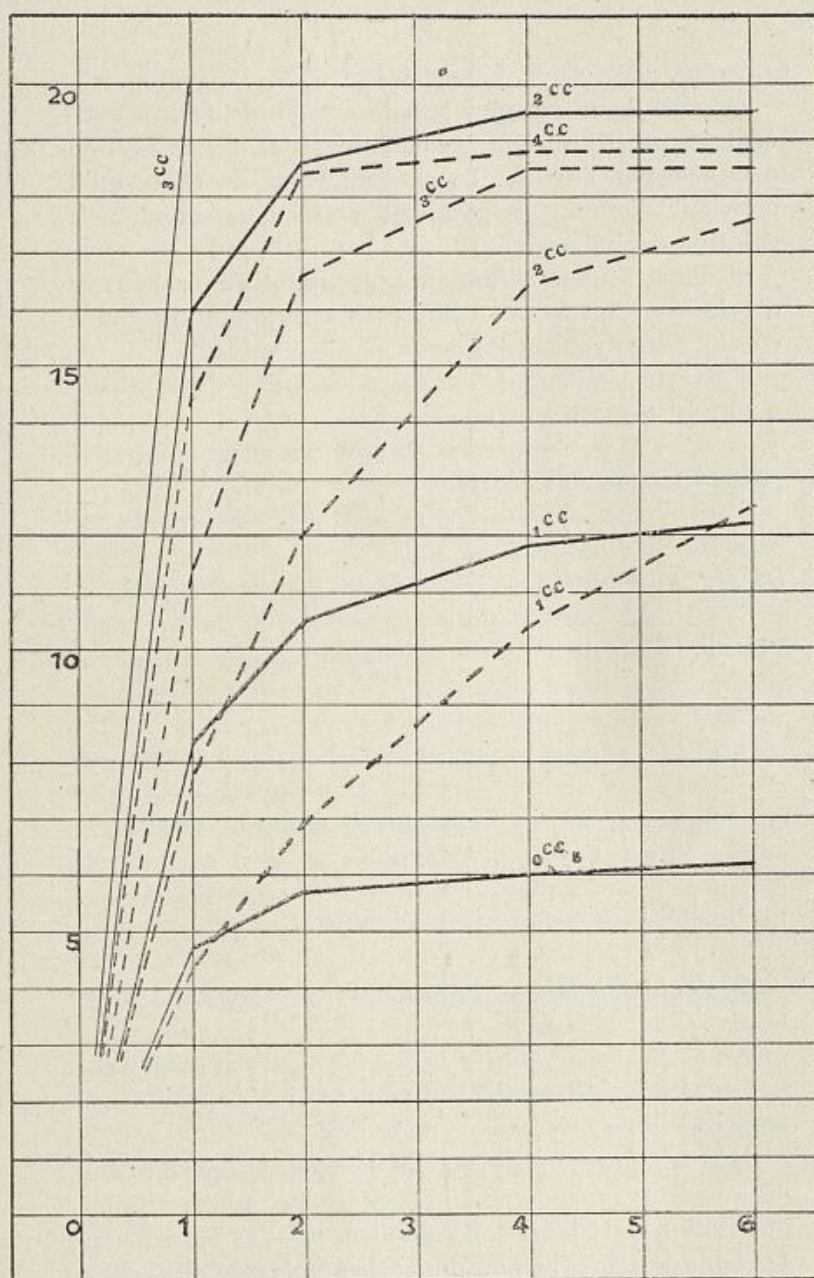
1° On prépare 8 flacons de 125 cc. contenant respectivement :

0 gr. 30, 0, 60, 0, 90, 1, 20, 1, 50, 1, 80, 2, 10 et 2 gr. 40, d'urée pure et desséchée, pesée à la balance de précision et dissoute dans 100 cc. d'eau distillée toluénée à saturation. On porte ces flacons à l'étuve de manière à leur faire atteindre la température de  $+37^{\circ}$ . Au bout d'une heure, cette dernière étant obtenue, on ajoute dans chaque flacon de deux en deux minutes, 4 cc. de *ferment actif* neutralisé par le carbonate de chaux.

Toutes les heures, on prélève alors 10 cc. de chaque liqueur et on dose le carbonate d'ammoniaque formé en suivant la méthode acidimétrique habituelle; on déduit facilement par les calculs la proportion en poids d'urée hydrolysée.

Par les résultats obtenus, on voit que les solutions demi-décinormales et décinormales d'urée sont décomposées totalement en une heure de temps; enfin que pour les solutions renfermant :

0 gr. 90, 1, 20, 1, 50, 1, 80, 2, 10, et 2 gr. 40 d'urée pour 100 cc. de solution, les quantités de cette amide hydrolysées sont respectivement de :



Vincent, del.

Fig. 11. — ACTION DE QUANTITÉS CROISSANTES D'URÉASE SUR UN MEME VOLUME DE SOLUTION N/10 D'URÉE.

———— Ferment actif.

----- Ferment d'activité moyenne.

En abscisse : Temps exprimé en heures.

En ordonnée : Nombre de cc. d'HCl N/10 nécessaires pour neutraliser le carbonate d'ammoniaque formé.



0 gr. 786, 0,978, 1,107, 1,181, 1,259, 1 gr. 290.

On voit donc que plus la solution d'urée devient concentrée, plus il est difficile d'en obtenir la décomposition complète par l'uréase. La concentration de choix qu'il convient d'employer pour les essais correspond à la solution décinormale.

2° Pour étudier l'influence de quantités croissantes d'uréase sur un même volume de solution décinormale d'urée, nous avons opéré de la manière suivante :

4 flacons contenant 100 cc. de solution N/10 d'urée reçoivent respectivement :

1, 2, 3, et 4 cc. de *ferment d'activité moyenne*, neutralisé par le carbonate de chaux.

D'autre part, 4 flacons contenant le même volume de solution N/10 d'urée reçoivent :

0 cc. 05, 1, 2, et 3 cc. de *ferment actif* également neutralisé.

Ces flacons ont été portés à l'étuve une heure avant l'introduction du ferment, de manière à obtenir la température de + 37°. D'heure en heure, on suit par la méthode habituelle la marche de l'hydrolyse.

Il résulte de ces expériences, que pour un *ferment d'activité moyenne*, la proportion d'urée hydrolysée va en croissant, à mesure qu'augmente la quantité de ferment employé ; mais qu'à la dose de 4 cc 0/0, au bout de 6 heures et même de 12 heures de temps, l'uréase est incapable de décomposer la totalité de l'urée mise en œuvre.

En ce qui concerne le *ferment actif*, la proportion d'urée transformée va également en augmentant, suivant la quantité de ferment mise en œuvre ; mais il suffit dans ce cas de 3 cc. de ce dernier, pour assurer en 1 heure de temps, une hydrolyse totale de la liqueur.

Dans la figure 11 nous exprimons le graphique d'action de quantités croissantes d'uréase sur un même volume de solution N/10 d'urée. En abscisse, nous avons exprimé le temps en heures ; en ordonnée, le nombre de cc. d'acide chlorhydrique N/10 employé pour saturer 10 cc. de la liqueur.

## CONCLUSIONS

---

Nos recherches nous permettent d'affirmer la présence non encore signalée de l'uréase chez les Champignons supérieurs. Elles confirment d'autre part les travaux de BAMBERGER et LANDSIEDL, GAZE, GORIS et MASCRÉ, sur la présence de l'urée chez ces mêmes végétaux.

I. L'urée existe chez les Champignons supérieurs ; les proportions observées sont très variables : elles diffèrent en effet non seulement d'une famille à une autre et d'une espèce à une autre dans des limites souvent considérables, mais encore, pour la même espèce, suivant l'époque, le lieu de récolte et l'âge des individus. A ce dernier point de vue, il semble que la teneur en urée augmente au cours du développement, pour atteindre son maximum chez la plante adulte. Sa répartition dans le végétal ne semble pas très nette ; on la trouve toutefois de préférence dans le chapeau et la partie hyméniale du thallophyte.

D'une manière générale, on constate l'absence de l'urée chez les champignons riches en uréase et inversement la présence de ce composé chez les espèces dépourvues ou presque d'activité diastasique.

II. L'uréase existe chez un grand nombre de Champignons supérieurs : c'est du moins ce que nous sommes en droit de conclure, puisque sur les 400 espèces examinées, une cinquantaine environ, nous ont donné des



réactions douteuses ou négatives. Contrairement à l'urée, la localisation de cette diastase est très précise : on la trouve presque exclusivement dans la partie hyméniale du thallophyte.

Les essais entrepris dans le but d'obtenir ce ferment à l'état pulvérulent, n'ont pas été couronnés de succès. On obtient bien, en employant les méthodes générales de précipitation des diastases une poudre fermentaire, mais cette poudre est dénuée ou presque de toute activité diastatique.

Cependant, on peut obtenir facilement à partir des tubes hyméniaux d'un champignon très actif, le *Boletus edulis* Bull. par exemple, une liqueur fermentaire capable d'hydrolyser l'urée, à condition de choisir des organes jeunes. La glycérine nous semble le véhicule de choix pour la préparation de cette liqueur.

III. L'uréase que nous avons étudiée chez les Champignons supérieurs, présente les caractères suivants :

a) Elle transforme intégralement en carbonate d'ammoniaque une solution d'urée, si l'on opère dans les conditions de concentration que nous avons définies. L'hydrolyse est rapide dans les premiers moments de l'action ; elle diminue ensuite progressivement pour rester stationnaire.

b) L'uréase des Champignons supérieurs s'altère sous l'influence du temps. Son pouvoir diastatique diminue graduellement au point de n'être plus pratiquement utilisable, 4 mois environ après sa préparation.

c) L'uréase des Champignons résiste facilement à l'action de la chaleur ; elle n'est tuée en effet qu'à  $+ 76^{\circ}$ - $78^{\circ}$  ; sa température optimum d'action est située à  $+ 38^{\circ}$ .

d) Les acides agissent énergiquement sur elle. A doses très faibles, ils paralysent son action ; à doses moyennes, ils la tuent. Il faut remarquer toutefois, que parmi les acides organiques envisagés, l'acide acétique est, comparativement aux autres, de beaucoup le moins actif (sept fois moins actif que l'acide tartrique).



e) Les alcalis caustiques ont également une action paralysante très intense; toutefois parmi les solutions alcalines étudiées, celle de carbonate d'ammoniaque n'a aucune influence sensible sur la marche de l'hydrolyse.

f) Les sels neutres agissent sur l'uréase, mais il faut employer déjà des liqueurs fortement concentrées, pour obtenir de leur part une action paralysante. Ils ont surtout une action inhibitrice. Les sels de calcium cependant (azotate et chlorure) ont, même à faible dose, une influence excessivement énergique. Si l'on envisage les sels d'après leur fonction acide, les sulfates semblent moins actifs que les azotates, qui ont eux-mêmes une action moins grande que les chlorures.

g) L'uréase est très sensible à l'influence des antiseptiques; la dose d'action de ces derniers (généralement infime), est corrélative de leur puissance.

Le saccharose et surtout l'alcool éthylique retardent également l'action hydrolytique, mais pas aussi fortement cependant qu'on aurait pu s'y attendre.

IV. En somme, l'action de la température permettrait plutôt de rapprocher l'uréase des Champignons, de l'uréase des Phanérogames (*Soja*), que de l'uréase bactérienne. D'après MIQUEL en effet, le ferment retiré des Bactéries est détruit à  $+50^{\circ}$ ; l'uréase de *Soja* au contraire résiste jusqu'à  $+80^{\circ}$ - $85^{\circ}$ , comme nous avons pu le déterminer expérimentalement.

L'uréase des Moisissures aurait, d'après SHIBATA, une action hydrolysante sur des amides autres que l'urée; (acétamide, oxamide, acide hippurique etc.). MIQUEL, en ce qui concerne l'uréase des Bactéries, TAKEUCHI, ARMS-TRONG et HORTON, en ce qui concerne l'uréase de *Soja*, n'ont pu constater une action semblable.

Les quelques essais que nous avons entrepris concernant l'action de l'uréase des Champignons sur des corps à fonction amide autres que l'urée, nous ont paru négatifs. Si nous n'avons pas mentionné ces recherches, c'est que nous considérons qu'il est nécessaire de reprendre



ces expériences, avant d'en affirmer les résultats; mais peut-être trouverait-on dans l'étude de l'action de l'uréase sur ces différents composés, un moyen de séparer les trois diastases.



## TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS . . . . .	V
------------------------	---

### PREMIÈRE PARTIE

#### *Historique.*

CHAPITRE I. — L'uréase . . . . .	1
CHAPITRE II. — L'uréase chez les Champignons. . . . .	10
CHAPITRE III. — L'urée chez les Champignons . . . . .	13

### DEUXIÈME PARTIE

#### *L'urée chez les Champignons supérieurs.*

CHAPITRE I. — Répartition de l'urée chez les Champignons. . . . .	17
CHAPITRE II. — Localisation de l'urée . . . . .	30

### TROISIÈME PARTIE

#### *L'urée chez les Champignons.*

CHAPITRE I. — Recherche et dosage de l'urée chez les Champignons . . . . .	37
CHAPITRE II. — Répartition de l'urée dans les diverses parties du champignon. . . . .	41
CHAPITRE III. — Répartition de l'urée suivant l'âge du champignon . . . . .	42

### QUATRIÈME PARTIE

#### *Etude du ferment.*

CHAPITRE I. — Préparation de l'urée . . . . .	43
CHAPITRE II. — Etude de l'action de l'urée . . . . .	49
CHAPITRE III. — Action de la chaleur sur l'urée . . . . .	53
CHAPITRE IV. — Action des acides sur l'urée . . . . .	58
CHAPITRE V. — Action des alcalis sur l'urée. . . . .	65
CHAPITRE VI. — Action des sels sur l'urée . . . . .	69
CHAPITRE VII. — Action des antiseptiques et de quelques substances inhibitrices sur l'urée. . . . .	77
CHAPITRE VIII. — Action de quantités croissantes d'urée sur une solution d'urée et inversement. . . . .	82
CONCLUSIONS. . . . .	85

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE. IMP. PARIS. . .





