

Chaire de Chimie appliquée aux corps organiques

Professeur : Monsieur R. FOSSE



GAY LUSSAC

Sur quelques principes découverts chez les végétaux grâce à de nouvelles méthodes d'analyse

*L'URÉE, L'ACIDE ALLANTOÏQUE, L'ALLANTOÏNE LÉVOGYRE
ET DEXTROGYRE, L'ACIDE URIQUE*

Par M. RICHARD FOSSE
Professeur au Muséum, Membre de l'Institut.

L'exposé résumé de ces acquisitions comprend :

Première partie. — Analyse immédiate et quantitative de l'urée.

Deuxième partie. — L'urée chez les végétaux supérieurs.

Troisième partie. — L'acide allantoïque et l'allantoïnase dans le règne végétal.

Quatrième partie. — Nature racémique de l'allantoïne prétendue indédoubleable. Découverte de ses composants actifs : le lévogyre, par fermentation ; le dextrogyre chez les êtres vivants.

Cinquième partie. — Analyse quantitative spectrophotométrique de très petites quantités d'acide allantoïque et d'allantoïne à de très grandes dilutions.

Sixième partie. — L'acide urique chez les végétaux supérieurs.

Septième partie. — Conclusions : L'acide urique est la source d'où dérivent : l'allantoïne racémique, ses deux composants actifs, l'acide allantoïque ainsi qu'une partie de l'urée et de l'ammoniaque formées par les plantes.

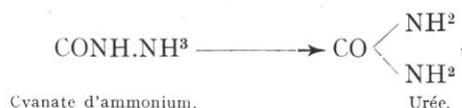
PREMIÈRE PARTIE

ANALYSE IMMÉDIATE ET QUANTITATIVE DE L'URÉE

DÉCOUVERTE DE L'URÉE. — Déjà signalée, en 1709, comme « substance azotée particulière de l'urine », entrevue par SCHEELÉ, l'urée fut isolée, en 1773, au Jardin du Roi, par ROUELLE le jeune (1) et nommée « Extrait savonneux de l'urine ».

En 1798, au Muséum, FOURCROY et VAUQUELIN (2) transformèrent le corps de ROUELLE en nitrate cristallisé, le nommèrent « urée », mais ne purent l'obtenir pur et déterminer sa formule.

Ce n'est qu'en 1819, cent dix ans après avoir été aperçue dans l'urine et quarante-six ans après en avoir été retirée, que l'urée, obtenue parfaitement pure, sa formule exacte fut enfin connue grâce au chimiste anglais William PROUT (3). La célèbre Synthèse de l'urée, que réalisa, en 1828, WÈHLER (4) en isomérisant par la chaleur le cyanate d'ammonium, formé à partir des éléments :



vint apporter une éclatante confirmation à la formule révélée par W. PROUT.

Les méthodes d'analyse immédiate de l'urée, connues avant nos recherches, utilisent la formation du nitrate de FOURCROY et VAUQUELIN (2), de la combinaison mercurique de LIEBIG (5) ou de l'oxalate de BERZÉLIUS. Toutes mettent en œuvre un grand nombre d'opérations et de cristallisations, entraînant la perte d'importantes quantités d'urée.

TECHNIQUE DE PROUT. — Évaporer avec précaution l'urine fraîchement émise ; transformer le produit sirupeux en cristaux de nitrate d'urée par addition ménagée d'acide nitrique pur et concentré ; essorer et laver les cristaux avec un peu d'eau froide ; les traiter par une solution concentrée de carbonate alcalin jusqu'à neutralisation complète ; triturer avec du noir animal et laisser en contact plusieurs heures ; reprendre par l'eau, filtrer et évaporer lentement à siccité ; dissoudre dans l'alcool concentré et bouillant ; concentrer :

(1) ROUELLE le jeune, *Journal de médecine*, 1773, t. I, p. 118.

(2) FOURCROY et VAUQUELIN, *Ann. Muséum Hist. nat.* Cahier LXIII ; *Ann. de chimie*, t. XXXII, An VIII, p. 86.

(3) WILLIAM PROUT, *Ann. de physique et de chimie*, t. X, 1819, p. 367.

(4) WÈHLER, *Ann. d. Phys.*, Bd. XIII, 1828, p. 253.

(5) LIEBIG, *Annalen*, Bd. LXXXV, 1853, p. 289.

l'urée cristallise; procéder à deux ou trois nouvelles cristallisations semblables dans l'alcool pour obtenir l'urée pure à l'analyse.

SCHRÖDER, SALKOWSKI (1), LIPPICHS (2) ont décrit des méthodes aussi longues et aussi peu sensibles, qu'on trouvera dans notre livre. *L'Urée*, pages 1 à 5.

CHAPITRE PREMIER

Analyse immédiate de l'urée basée sur la formation de son dérivé dixanthylé.

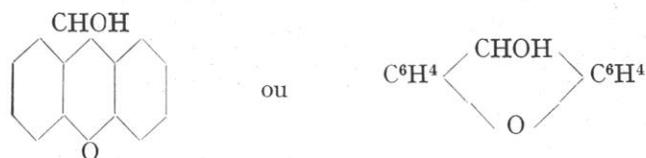


Au lieu de chercher à retirer péniblement une fraction plus ou moins réduite de l'urée incluse dans un mélange, à la suite d'une longue série de manipulations, nous la précipitons directement, même de solutions très diluées (1 mg. par litre), sous la forme d'une combinaison définie, cristallisée, spécifique, découverte au cours de précédents travaux de chimie pure sur « les fonctions : dinaphtopyranol, xanthidrol et sel de pyryle » (3).

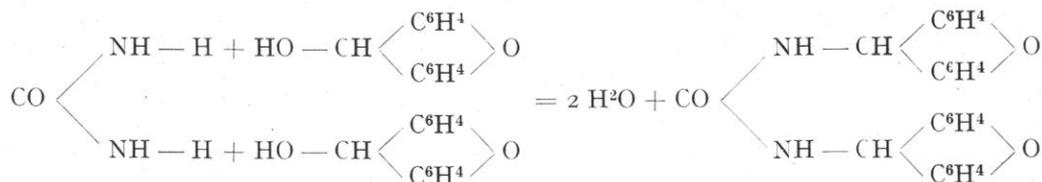
Place-t-on un fragment de cristal d'urée, aussi petit que possible, dans une goutte d'acide acétique à 50 p. 100, contenant 0^{gr},25 p. 100 de Xanthidrol, on voit bientôt un volumineux précipité apparaître.

Si à un centième de milligramme d'urée (0^{mg},01), contenu dans 0^{cc},1 de liqueur titrée à 10 milligrammes par litre, on ajoute son volume d'acide acétique contenant 0^{gr},5 p. 100 de xanthidrol, on constate l'apparition, après quelques minutes, de légers flocons, formés de petites aiguilles groupées, au plus fort grossissement du microscope.

Deux molécules de xanthidrol, alcool secondaire de la série hétérocyclique, se sont



unies à une molécule d'urée pour former, avec élimination de deux molécules d'eau, un dérivé de l'urée dont deux atomes d'hydrogène sont symétriquement remplacés par le radical xanthyle :



(1) SALKOWSKI, *Praktikum. d. Phys. u. Path. Chemie*, 1900.

(2) LIPPICHS, *Zeitschr. f. Phys. Chem.*, Bd. XI, 1906, p. 60.

(3) R. FOSSE, *L'Urée*, Paris, 1927, p. 229-288 ; Action de l'urée, de la thiourée, de l'uréthane et de quelques amides sur le xanthidrol (*Comptes Rendus*, t. CXLV, 1907, p. 813) ; Sur l'identification de l'urée et sa précipitation de solutions extrêmement diluées (*Comptes Rendus*, t. CLVII, 1913, p. 948).

Identification de l'urée. — Dans une foule de circonstances, la dixanthylurée brute est sensiblement pure à l'analyse. Est-elle souillée d'impuretés, il est facile de l'en débarrasser par la pyridine, qui, après en avoir dissous environ 1 p. 100 à l'ébullition, l'abandonne en majeure partie par refroidissement à l'état de longs filaments isolés.

Microcristallisation. — La solution obtenue en chauffant quinze minutes à l'ébullition au reflux, 0^{mg},1 de xanthylurée dans 2 centimètres cubes d'alcool, reçue dans un petit

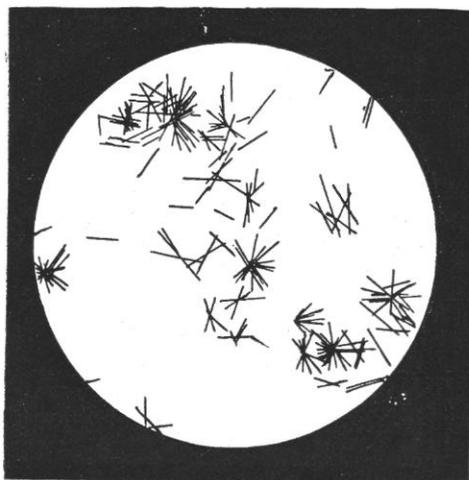


Fig. 1.

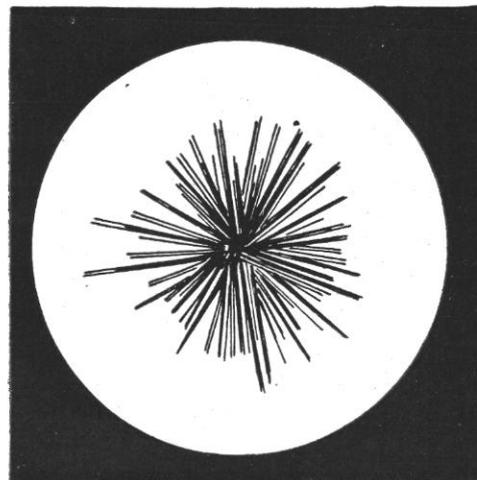


Fig. 2.

crystalliseur préalablement chauffé, abandonne, après quelque temps, des bâtonnets groupés (faible grossissement) ou de longs filaments rectangulaires issus d'un même point, ainsi qu'en témoignent les photographies 1 et 2.

CHAPITRE II

Analyse quantitative gravimétrique.

Cette méthode diffère essentiellement de celles qui sont en usage par son principe et le contrôle dont elle est susceptible.

Au lieu de détruire la carbamide pour ramener son dosage à la mesure de ses produits de décomposition, nous la transformons en son dérivé xanthylé, que nous pesons.

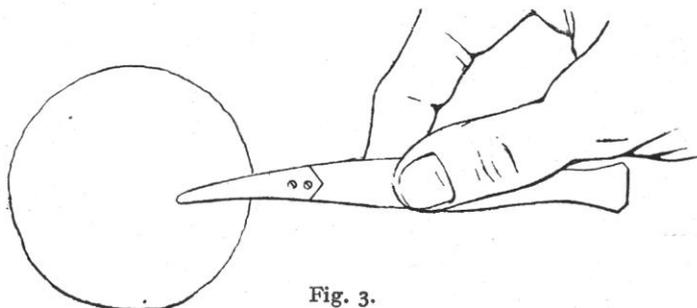
Tandis qu'on ne peut vérifier si l'azote ou l'ammoniaque, recueillis dans les procédés volumétriques, proviennent de l'urée ou d'une autre substance azotée, il est, au contraire, facile de contrôler par l'analyse aussi bien l'identité que la pureté du précipité.

Deux milieux de dosage ont été institués : l'un, en vue de l'urine, pour des titres en urée supérieurs à 1 gramme et inférieurs à 5 grammes ; l'autre, en vue du sang, pour des concentrations comprises entre 0^{gr},1 et 1 gramme.

DOSAGE DE L'URÉE DANS DES LIQUEURS DE TITRE COMPRIS ENTRE 1 ET 5 GRAMMES
ET DANS L'URINE DILUÉE A 1/10.

Mode opératoire. — Un volume de liqueur titrée ou d'urine à 1/10 reçoit trois fois et demie son volume d'acide acétique, puis son demi-volume de solution méthylique de xanthhydrol à 1/10, introduit en cinq fractions égales et à dix minutes d'intervalle.

Une heure après la dernière addition du réactif, la xanthylurée est essorée sur un disque de papier à surface rendue concave. Après lavage à l'alcool, on porte à 100° filtre et préci-



pité. Celui-ci s'en détache spontanément sous la forme d'un feuillet, transportable sans perte à la pince sur le plateau de la balance (fig. 3). Son poids, divisé par 7, représente, à moins de 2 p. 100 près, l'urée contenue dans le volume de liquide soumis au dosage.

DOSAGE DE L'URÉE DANS DES LIQUEURS TITRÉES DE CONCENTRATION
COMPRISE ENTRE 0^{gr},1 ET 1 GRAMME PAR LITRE.

Si on soumet à l'analyse gravimétrique 2 milligrammes à 2^{mg},5 d'urée, pris à des liqueurs ayant cette concentration, on constate que l'erreur commise, par excès ou par défaut, affecte généralement la troisième décimale du titre, plus rarement la seconde.

Mode opératoire. — A 1 volume de la liqueur titrée d'urée ajouter 2 volumes d'acide acétique cristallisable et du xanthhydrol méthylique à 1/10 à un vingtième du volume total.

DOSAGE DE L'URÉE DANS LE SANG.
(En collaboration avec A. ROBYN et F. FRANÇOIS.)

Mode opératoire. — Centrifuger, après les avoir mélangés, volumes égaux de sérum et d'iodomercurate de potassium contenant 66 p. 100 de son volume d'acide acétique. Au liquide limpide exactement mesuré ajouter son volume d'acide acétique et du xanthhydrol méthylique, 1/20 du volume total. Après une heure, recueillir le dépôt sur filtre concave. Si n est le nombre de centimètres cubes du mélange déféqué, ayant donné un poids p de xanthylurée, le titre en urée du sérum sera par litre :

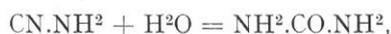
$$\frac{p}{7} \times \frac{2}{n} \cdot 1000.$$

CETTE MÉTHODE EST APPLICABLE AU DOSAGE DE L'URÉE DANS LE LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN, LE LAIT ET LES TISSUS (1).

CHAPITRE III

Application à la chimie agricole.

I. ANALYSE DE LA CYANAMIDE CALCIQUE. — Son principe repose sur la transformation totale, non réalisée jusque-là, de la cyanamide en urée, par chauffage, trois heures à 50°-55°, en milieu chlorhydrique ou nitrique 2 N :



puis sur le dosage pondéral de l'urée ainsi formée (R. FOSSE, Ph. HAGÈNE et DUBOIS) (2).

2. ANALYSE QUANTITATIVE DE L'URÉE CONTENUE DANS LES ENGRAIS AZOTÉS. — Ce « produit physiologique des végétaux » (R. FOSSE, 1912), considéré déjà par George VILLE en 1862 comme « puissant auxiliaire pour la végétation », qualifié souvent aujourd'hui d' « Engrais azoté idéal », est spécialement préparé pour l'agriculture aux dépens soit de l'anhydride carbonique et de l'ammoniaque liquides, soit de la cyanamide calcique par l'action des acides minéraux.

Quoique notre méthode d'analyse précédente démontre que tout l'azote de la cyanamide de chaux est intégralement transformable en urée, ce résultat est bien loin d'avoir été atteint dans les nombreux produits d'hydrolyse, offerts comme engrais à l'agriculture, protégés par une multitude de brevets.

L'azote s'y présente, en effet, à l'état non seulement d'urée et de sels ammoniacaux éminemment fertilisants, mais aussi d'autres corps, considérés comme non assimilables ou toxiques même pour les végétaux.

Le dosage de l'azote total, un simple *Kjehldahl*, ne suffit plus maintenant pour déterminer la valeur d'un engrais ; il faut aussi connaître, qualitativement et quantitativement, ses divers composants azotés : urée, ammoniacque, cyanamide, dicyanodiamide, dicyanodiamidine.

L'analyse exacte d'un tel mélange de substances azotées présente des difficultés techniques considérables. Ce problème serait peut-être insoluble, si l'on ne possédait pas la méthode de dosage pondéral de l'urée à l'aide du xanthidrol, qui ne précipite et ne dose que l'urée (3).

(1) R. FOSSE, Analyse quantitative gravimétrique de l'urée (*Comptes Rendus*, t. CLVIII, 1914, p. 1076) ; L'Urée, Paris, 1927, p. 27-41). — S.-R. FOSSE, A. ROBYN et F. FRANÇOIS, Analyse quantitative gravimétrique de l'urée dans le sang (*Comptes Rendus*, t. CLIX, 1914, p. 367).

(2) R. FOSSE, Ph. HAGÈNE et DUBOIS, *Comptes Rendus*, t. CLXXIX, 1924, p. 214 et 408 ; L'Urée, Paris, 1927, p. 42-44.

(3) A. GRAMONT, *Bull. Soc. chim. de France*, t. XXIII, 1923, p. 125. — FRÄNKEL, *Ann. chim. anal.*, 26 juin 1920.

DEUXIÈME PARTIE

L'URÉE CHEZ LES VÉGÉTAUX

I. PRÉSENCE DE L'URÉE CHEZ LES VÉGÉTAUX COMMUNS ALIMENTAIRES. — Nous avons d'abord constaté que l'urée, dont la présence dans le monde végétal n'était connue que pour quelques Champignons [BAMBERGER et LANDSIEDL (1), GAZE (2), GORIS et MASCRÉ (3)], existe aussi dans nombre de plantes alimentaires : Endive, Chicorée, Melon, Potiron, Chou-fleur, Navet, Épinard, Carotte, Pomme de terre (4).

Peut-on considérer ce corps comme un produit physiologique de la cellule végétale ?

De nombreuses investigations nous ont toujours conduit à constater sa présence dans les divers milieux où vivent les végétaux : terre cultivée ou non, terreau de feuilles et de bois, prélevé dans les forêts (4).

Il n'est donc pas possible de savoir, après ces expériences, si la carbamide, incluse dans les Champignons et les végétaux précités, est créée par eux ou puisée dans le sol.

Est-elle d'origine végétale, animale ou même minérale ?

Rien ne permettait de le savoir.

La germination de la graine des végétaux supérieurs et de la spore des moisissures nous a donné la solution de ce problème.

2. L'URÉE EST UN PRODUIT PHYSIOLOGIQUE DE LA CELLULE VÉGÉTALE. — Cette amide se forme à l'abri de toute contingence dans les plantes qui suivent, cultivées sur milieu absolument exempt d'urée :

Plantules développées sur l'eau de la ville : Blé, Gazon, Seigle, Soleil, Betterave, Fève des marais, Trèfle, Luzerne, Lentille, Haricot, Gesse, Pois, Potiron; *graine à l'état de repos* : Blé, Maïs, Pois (5); *plantule et plante adulte, cultivées aseptiquement sur milieu nutritif Mazé* : Maïs; *moisissure ensemencée spontanément sur milieu Raulin* : « *Aspergillus niger* »; *moisissures cultivées aseptiquement sur milieu Raulin* : « *Penicillium glaucum* », « *Aspergillus niger* » (6).

Pour établir que la formation de l'urée est bien un phénomène commun aux végétaux

(1) BAMBERGER et LANDSIEDL, *Monatshefte f. Chemie*, 1903, t. XXIV, p. 218; t. XXVI, 1905, p. 1109.

(2) GAZE, *Arch. de pharmacie*, 1905, t. CCXLIII, p. 78.

(3) GORIS et MASCRÉ, *C. R. Acad. Sc.*, 1908, t. CXLXII, p. 1488; *Bull. des Sciences pharmacologiques*, 1909, t. XVI, p. 82.

(4) R. FOSSE, Recherches sur l'urée (*Comptes Rendus*, t. CLV, 1912, p. 851).

(5) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, t. CLVI, 1913, p. 567.

(6) R. FOSSE, Formation de l'urée par deux moisissures (*Comptes Rendus*, t. CLVI, 1913, p. 263).

et aux animaux, des précautions particulières nouvelles ont été prises dans l'emploi de la technique d'analyse.

La méthode que nous avons suivie jusque-là comportait la distillation au bain-marie, sous pression réduite, du suc d'expression des plantes, broyées avec de l'acide acétique.

Le danger de scinder les protéines en urée en vertu d'une réaction que nous avons décrite (1) (hydrolyse alcaline des albuminoïdes) était rigoureusement exclu, grâce à la nature acide du liquide soumis à la chaleur. Mais, même dans ces circonstances, d'autres principes connus ou encore inconnus n'étaient-ils pas capables d'engendrer des traces de carbamide ?

Si peu vraisemblable que puisse paraître une telle hypothèse, nous avons tenu à l'écart, en retranchant du mode opératoire des précédentes expériences le chauffage, même à la température peu élevée, nécessaire pour la distillation sous pression réduite des suc végétaux.

Le xanthidrol nous a permis de précipiter l'urée directement à partir des suc ou des macérations acétiés, n'ayant pas subi l'action de la chaleur, non concentrés et refroidis (2), appartenant aux plantes qui suivent :

| MOISSISSURES. | |
|---|--|
| <i>Aspergillus niger.</i> | <i>Penicillium glaucum.</i> |
| VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS ADULTES. | |
| Carotte. Endive. Haricot vert. Laitue vireuse. Épinard. Pourpier. | Pomme de terre. Chicorée. Petit pois. Potiron. Navet. |
| GRAINE A L'ÉTAT DE REPOS. | |
| Maïs. | |
| PLANTULES. | |
| Maïs. Blé. Seigle. Sofeil de Russie. Fève des marais. Fève naine. Féverole. | Trèfle. Luzerne. Lentille. Haricot. Gesse. Gazon. Potiron. |

3. L'URÉE EST UN PRODUIT D'EXCRÉTION DES VÉGÉTAUX COMME DES ANIMAUX. — Le rôle et l'utilité de l'uréase dans les plantes, insoupçonnés avant nos recherches, parce que l'on ignorait la formation de l'urée par leurs cellules, consiste précisément à détruire ce corps non assimilable pour le transformer en deux aliments par excellence : l'acide carbonique et l'ammoniaque.

(1) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, 1912, t. CLIV, p. 1819.

(2) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, 1913, t. CLVI, p. 1938.

C'est pourquoi, comme nous l'avons constaté, le même végétal peut contenir simultanément urée et uréase et être ainsi le siège de deux phénomènes inverses de formation et de destruction de ce corps (1).

La présence si fréquente de l'uréase chez les végétaux (SHIBATA, TAKEUCHI, KIESEL, ZEMPLEN, FALK, LI-YU-YING et GRANDOVINET, KAN KATO, FOSSE) (2) démontre que l'urée intacte est aussi impropre à la nutrition des plantes qu'à celle des animaux.

C'est grâce à l'uréase que l'urée peut servir d'aliment azoté exclusif des végétaux, comme dans les belles expériences de George VILLE, professeur au Muséum (3).

Ce savant a le premier formulé la possibilité de nourrir des plantes aux dépens de l'azote exclusivement fourni par les *sels d'ammonium*, par des *amines* (méthyl, éthylamine à l'état de sel) et par une *amide*, l'urée.

G. VILLE observe un curieux phénomène. Tandis que les plantes se développent normalement sur des sols artificiels, pourvus d'azote à l'état d'*ammoniaque*, de *méthylamine*, d'*éthylamine*, ou d'*urée*, elles périssent généralement, au contraire, si elles n'ont à leur disposition d'autre matière azotée que l'*éthylurée*.

C'est peut-être à l'absence d'une diastase capable de dédoubler l'éthylurée qu'il faut attribuer les tentatives infructueuses de ce savant, pour cultiver jusqu'à leur développement complet des grains de froment, ensemencés dans un sol de sable calciné, pourvu de phosphate de chaux, de magnésie, de silicate de potasse et d'azote, exclusivement offert sous la forme d'éthylurée.

Voici quelques passages du travail de G. VILLE :

« L'urée est un puissant auxiliaire pour la végétation ; elle s'est toujours montrée plus efficace que le carbonate d'ammoniaque. Dans un sol de sable, son influence favorable se manifeste immédiatement.

« Si l'urée exerce une influence des plus actives sur la végétation, il n'en est pas de même de l'éthylurée, employée à proportion égale d'azote, qui ne produit pas le moindre effet.

« Avec l'éthylurée, la végétation est chétive, languissante et rabougrie, absolument comme si le sable n'avait pas reçu l'addition d'une matière azotée.

« Depuis deux ans, j'ai répété l'expérience un grand nombre de fois. Le résultat n'a pas varié. Lorsque le sol a reçu une addition d'éthylurée, les plantes prospèrent beaucoup moins et accusent sa présence par un symptôme particulier.

« La germination se fait comme à l'ordinaire, ni plus vite, ni plus lentement ; mais, lorsque les jeunes plantes commencent à pousser leurs premières feuilles, l'extrémité devient tout à fait blanche et se dessèche. La résorption de la matière verte s'étend au reste de la feuille et continue de se produire sur une partie des feuilles suivantes.

« Sur plus de vingt cultures que j'ai été à même d'instituer, il est arrivé deux fois où le phénomène s'est manifesté d'une manière un peu différente. Au début, les choses se sont passées comme je viens de le dire ; l'état souffreteux des cultures s'est prolongé pendant un mois à six semaines ; puis, sans que rien d'apparent pût m'expliquer ce changement, les plantes ont reverdi, et la végétation s'est ranimée. J'incline à penser que, dans ces deux cas, l'éthylurée a changé d'état et que le réveil de la végétation doit être rapporté aux produits de sa décomposition. »

Les conclusions des expériences de G. VILLE, instituées sans précautions spéciales

(1) R. FOSSE, Présence simultanée de l'urée et de l'uréase dans le même végétal (*Comptes Rendus*, 1914, t. CLVIII, p. 1374).

(2) R. FOSSE, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1916, t. XXX, p. 750.

(3) G. VILLE, L'urée et la végétation. De l'importance comparée des agents de la production végétale. L'urée ayant une influence favorable sur la végétation, pourquoi l'éthylurée se montre-t-elle inactive ? (*C. R. Acad. Sc.*, 1862, t. LV, p. 32.)

contre l'intervention des microbes, à une époque où l'on se préoccupait peu de leur influence, ont été, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, confirmées en ce qui concerne la nutrition de la plante aux dépens de l'azote de l'*ammoniaque*, des *amines* grasses, de l'*urée* et des *amides* en général.

C'est d'abord MÜNTZ (1) qui démontre que, sur un sol privé de nitrates et d'organismes nitrifiants, la cellule végétale peut se nourrir exclusivement de l'azote du sulfate d'ammonium.

C'est MAZÉ (2) qui obtient le même résultat en cultivant le Maïs sur solutions nutritives stériles, contenant l'azote à l'état de sulfate d'ammonium.

LUTZ (3) établit enfin, toujours en milieu aseptique, que des Phanérogames, des Algues, des Champignons assimilent l'azote des *amines* grasses, sans que celui-ci ait été préalablement transformé en ammoniaque ou acide azotique. Les Champignons assimilent les *amides* qui suivent : formiamide, acétamide, propionamide, butyramide, asparagine, *urée*, succinamide et oxamide. LUTZ pense que l'assimilation des amides a lieu sans hydrolyse préalable. La présence de l'*uréase* dans les végétaux et celle de l'*amidase* d'EFFRONT dans la levure de bière sont peu favorables à cette interprétation.

(1) MÜNTZ, Sur le rôle de l'ammoniaque dans la nutrition des végétaux supérieurs (*C. R. Acad. Sc.*, 1889, t. CIX, p. 646).

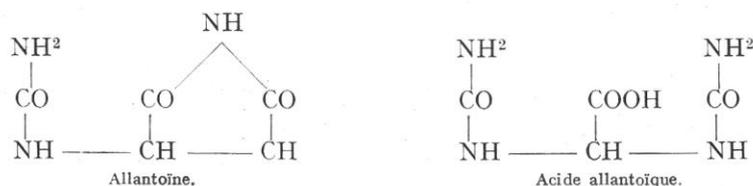
(2) MAZÉ, *C. R. Acad. Sc.*, 1898, t. CXXVII, p. 1031 ; *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1900, p. 26-45.

(3) LUTZ, *Thèse de la Faculté des Sciences de Paris*, 1898. — Recherches sur la nutrition des thallophytes à l'aide des amides (*Bull. Soc. Botanique*, 1901, t. XLVIII, p. 325-334).

TROISIÈME PARTIE

L'ACIDE ALLANTOÏQUE ET L'ALLANTOINASE DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL

Tandis que la découverte de l'allantoïne chez les êtres vivants (animaux) par VAUQUELIN et BUNIVA, au Muséum, remonte à 1799, celle, en tant que principe naturel, de son produit d'hydratation, l'acide allantoïque, ne date que de ces dernières années (R. FOSSE 1927) (1).



C'est à l'emploi de nouvelles techniques très sensibles que nous devons d'avoir pu déceler, puis isoler, identifier par l'analyse et doser ce principe qui, glissant invisible entre les mains de nombreux chercheurs, avait produit chez d'autres l'illusion de la présence du formol dans les feuilles.

La démonstration, par l'analyse élémentaire, de l'existence réelle dans la plante de ce corps *lui-même*, l'acquisition de la certitude qu'il ne provenait pas, au cours de nos opérations, de la décomposition d'une autre substance instable, très voisine, qui lui aurait donné naissance, ont nécessité de longues et délicates recherches. La découverte, avec A. BRUNEL, d'un ferment producteur d'acide allantoïque aux dépens de l'allantoïne, très répandu chez les végétaux et certains animaux, est venue très heureusement et complètement confirmer ces résultats.

CHAPITRE PREMIER

Identification, par l'analyse quantitative élémentaire, de l'acide allantoïque chez les végétaux.

I. FORMATION DE L'URÉE ET D'UN CORPS DONNANT LA MÊME RÉACTION COLORÉE PHÉNYLHYDRAZINIQUE QUE LE FORMOL ET L'ACIDE GLYOXYLIQUE PAR SIMPLE CHAUFFAGE

(1) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXII, 1926, p. 175, 869 ; t. CLXXXIII, p. 1114.

DE SUCS VÉGÉTAUX. — Des extraits alcooliques de feuilles vertes, concentrés à la chaleur du bain-marie, ayant provoqué dans le milieu de SCHRYVER (chlorhydrate de phénylhydrazine, ferricyanure de sodium, acide chlorhydrique) la coloration que développe ce réactif avec le formol (1), on avait cru avoir, enfin, démontré avec la présence, si souvent cherchée et discutée de l'aldéhyde formique dans les plantes, l'exactitude de la célèbre hypothèse de BOUSSINGAULT et BAEYER sur l'assimilation chlorophyllienne du carbone.

L'existence du formol dans les feuilles ne saurait être ainsi établie : la réaction de SCHRYVER n'est pas spécifique de cet aldéhyde : elle appartient aussi à l'acide glyoxylique (R. FOSSE et A. HIEULLE) (2) et à d'autres corps.

Afin d'éviter d'introduire des causes possibles d'erreur dans l'étude des composants chimiques de la feuille, nous avons institué des expériences sur des sucres d'expression, simplement centrifugés, n'ayant subi l'action ni de réactifs ou de dissolvants quelconques, ni celle de la chaleur.

Les résultats suivants ont été acquis :

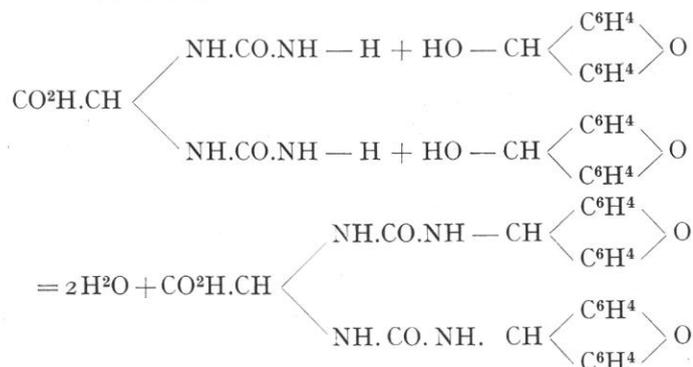
a. Une substance, produisant la même réaction colorée hydrazinique que le formol et l'acide glyoxylique, apparaît par court chauffage du suc foliaire de plusieurs végétaux.

Les produits d'expression de jeunes feuilles d'*Acer pseudoplatanus* et du légume vert de *Phaseolus vulgaris*, centrifugés et traités par le réactif de SCHRYVER, n'accusent qu'une coloration faible ou nulle.

Celle-ci se déclare, au contraire, avec intensité, si le suc a été préalablement chauffé.

b. Le contenu cellulaire des feuilles donne simultanément naissance à l'urée sous l'influence de la chaleur.

II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE L'ACIDE ALLANTOÏQUE ET DE L'ALLANTOÏNE DANS LE LÉGUME VERT DE *Phaseolus vulgaris*, SOUS LA FORME DE LEURS DÉRIVÉS XANTHYLÉS. — Le précipité obtenu par l'action du xanthidrol acétique sur le suc de cette plante, lavé, épuisé par l'alcool, puis par la pyridine froide, cède à ce solvant bouillant une matière, qui se dépose à l'état volumineux après filtration et refroidissement. L'analyse démontre que ce nouveau corps est un dérivé dixanthylé de l'acide allantoïque, résultant de la condensation de 1 molécule d'acide allantoïque et de 2 molécules de xanthidrol avec élimination de 2 molécules d'eau :



(1) GABRIEL BERTRAND et P. THOMAS, Manipulations de chimie biologique, 2^e édition, 1913, p. 441.

(2) R. FOSSE et A. HIEULLE, *Comptes Rendus*, t. CLXXIX, 1924, p. 637.

Le résidu de l'évaporation des liqueurs alcooliques, provenant de l'épuisement du précipité xanthylé brut, donne des cristaux brillants, possédant la teneur en azote et les propriétés de l'allantoïne xanthylée, décrite avec A. HIEULLE (1) :



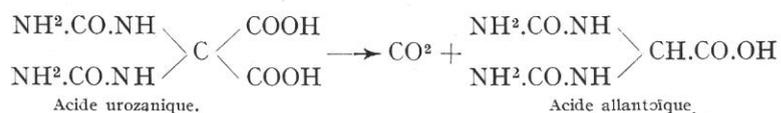
CHAPITRE II

L'acide allantoïque, ainsi identifié par l'analyse, existe-t-il réellement tout formé dans la plante ?

Ne dérive-t-il pas, en partie ou en totalité, d'un autre principe, encore inconnu chez les êtres vivants ?

Les faits qui suivent expliquent et justifient cette réserve.

a. L'acide allantoïque se forme aisément *in vitro* aux dépens d'un autre uréide, l'acide uroxanique (BEHREND et SCHULTZ) (2) :

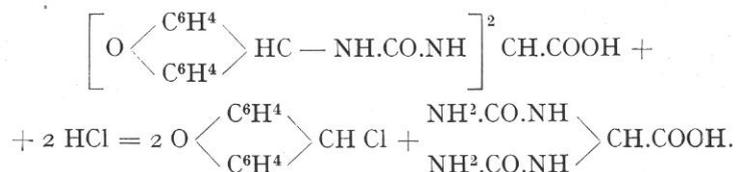


b. Comme l'acide allantoïque et les suc de plusieurs végétaux, l'acide uroxanique dissous donne, sous l'influence de la chaleur, de l'urée et de l'acide glyoxylique colorant en rouge-cerise le milieu phénylhydrazine-ferricyanure-acide chlorhydrique.

c. Comme l'acide allantoïque, l'acide uroxanique est précipité par le xanthidrol acétique. Le composé xanthyl-uroxanique, ainsi formé, se transforme en acide dixanthyl-allantoïque par simple cristallisation dans la pyridine.

Les expériences qui suivent établissent que l'acide allantoïque existe réellement dans le suc de Haricot vert.

DIFFÉRENCIATION DES ACIDES ALLANTOÏQUE ET UROXANIQUE XANTHYLÉS. — Comme la xanthylurée et nombre d'autres composés semblables, décrits par nous, ces deux substances se scindent au contact des acides minéraux en produisant un sel de pyryle (R. FOSSE, 1902) et l'uréide correspondant :



(1) R. FOSSE et A. HIEULLE, *Comptes Rendus*, t. CLXXVI, p. 1719 ; t. CLXXVII, 1923, p. 199.

(2) BEHREND et SCHULTZE, *Liebigs Annalen*, t. CCCLXV, 1909, p. 24.

Malgré leur très grande instabilité, en milieu aqueux à l'état libre, les acides allantoïque et uroxanique peuvent être aisément isolés, si l'on opère à basse température.

Introduit-on quelques gouttes d'acétate de plomb dans la solution de l'uréide ainsi libéré, privé d'acide minéral et du composant pyranique, on voit apparaître des cristaux brillants argentés, caractéristiques, dans le cas de l'acide uroxanique. La solution allantoïque demeure, au contraire, absolument limpide dans ces conditions.

ABSENCE DE L'ACIDE UROXANIQUE DANS LA LÉGUME VERT DE « PHASEOLUS VULGARIS ». — Tandis que 2 centigrammes de précipité xanthyl-uroxanique hydrolysé permettent d'obtenir, en quantité notable, des cristaux d'uroxanate de plomb, 20 centigrammes de produit xanthylé brut, provenant du Haricot, ne donnent pas trace de ce sel caractéristique, dans les mêmes conditions.

La liqueur d'hydrolyse de la combinaison xanthylée provenant du Haricot produit avec intensité toutes les réactions de l'acide allantoïque :

Réaction colorée glyoxylique et formation d'urée par chauffage ;

Précipitation d'acide dixanthyl-allantoïque par le xanthidrol ;

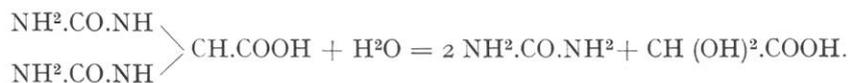
Précipitation de flocons volumineux par l'acétate mercurique.

La même méthode nous a permis, avec A. HIEULLE, de démontrer la présence réelle de l'acide allantoïque dans les feuilles de l'*Acer pseudoplatanus*.

CHAPITRE III

Un nouveau mode de formation biochimique de l'urée.

La formation, par des sucs végétaux, de l'urée et d'un corps, donnant la même réaction colorée hydrazinique que le formol et l'acide glyoxylique, résulte donc de l'hydrolyse de l'acide allantoïque.



Son mécanisme diffère de celui des divers modes de production de l'urée, actuellement connus en partant des substances biochimiques :

a. *Par hydrolyse de l'arginine pure* (KOSSEL et DAKIN, 1904) (1), sous l'influence de l'arginase ou de l'eau de baryte (SCHULTZE et WINTERSTEIN, 1897) (2) ;

Par hydrolyse de l'arginine, incluse dans les protéides : autolyse du foie [Ch. RICHEL (3) ;

(1) KOSSEL et DAKIN, *Hoppe-Seylers Zeitschrift*, t. XLI, 1904, p. 321.

(2) SCHULTZE et WINTERSTEIN, *Berichte*, t. XXX, 1897, p. 2879.

(3) CH. RICHEL, *Dictionnaire de physiologie*, article Foie, t. I, 1894, p. 686.

R. FOSSE et N. ROUCHELMANN (1)] ; action directe des alcalis sur les protides (R. FOSSE (2) ; culture de nombreux Champignons sur milieu riche en protide (N. IWANOFF) (3) ;

b. *Aux dépens de la cyanamide* : par l'action des microbes du sol (MAZE, VILA et LEMOIGNE) (4) ;

c. *Par isomérisation, comme dans la synthèse de Wæhler, du cyanate d'ammonium, formé par oxydation des principes carbonés naturels et des corps qui en dérivent ou qui les produisent : protides, acides aminés, glucides, glycérine et formaldéhyde, en milieu ammoniacal* (R. FOSSE) (5).

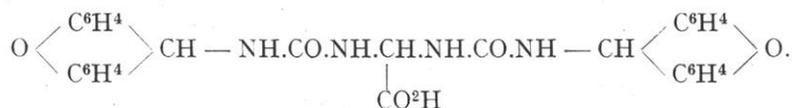
CHAPITRE IV

Dosage de l'acide allantoïque à l'état de xanthyl-urée.

(En collaboration avec M^{lle} V. BOSSUYT) (6).

1. Pour poursuivre l'étude biochimique de cet uréide, une méthode d'analyse quantitative a dû être instituée.

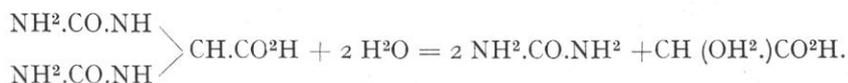
Même à de fortes dilutions, l'acide allantoïque est précipitable de ses solutions par le xanthidrol, sous la forme de son dérivé dixanthylé.



De nombreuses expériences nous ayant révélé que le corps brut, ainsi formé, renfermait 1 à 2 p. 100 d'azote de moins que l'acide xanthyl-allantoïque pur, recristallisé, nous n'avons pas cru pouvoir baser ce dosage sur la pesée d'une combinaison impure, non identifiable par le plus sûr des critères, l'analyse quantitative élémentaire.

2. En attendant que soient trouvées, comme pour l'urée, les conditions permettant, à la fois, de mesurer et d'identifier cet uréide, nous avons ramené son dosage à un dosage pondéral d'urée.

La méthode repose sur la formation de 2 molécules d'urée par hydrolyse de 1 molécule d'acide allantoïque :



(1) R. FOSSE et N. ROUCHELMANN, *Comptes Rendus*, t. CLXXII, 1921, p. 771.

(2) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, t. CLIV, 1912, p. 1819.

(3) N. IWANOFF, *Biochemische Zeitschrift*, t. CLXII, 1925, p. 425-440.

(4) MAZE, VILA et LEMOIGNE, *Comptes Rendus*, t. CLXIX, 1919, p. 921.

(5) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, t. CLXVIII, 1922, p. 320, 908, 1164 ; t. CLXIX, 1919, p. 91 ; t. CLXXI, 1920, p. 7211, 635 ; *Annales Institut Pasteur*, t. XXXIV, 1920, p. 715-762 ; *Bull. Soc. chim. France*, t. XXIX, 1920, p. 158-203 ; *Comptes Rendus*, t. CLXXII, 1921, p. 160.

(6) R. FOSSE et V. BOSSUYT, *Comptes Rendus*, t. CLXXXV, 1927, p. 308.

Hydrolyse de l'acide allantoïque. — On maintient trente minutes, à 60°, une solution d'allantoate de potassium pur, additionné d'acide minéral dilué, chlorhydrique ou sulfurique, en quantité telle que le titre acidimétrique soit compris entre $\frac{N}{50}$ et $\frac{N}{10}$

Dosages. — La liqueur d'hydrolyse, légèrement alcalinisée par la potasse, reçoit deux fois son volume d'acide acétique et du xanthidrol méthylique à 1/10, à raison de 1/20 du volume total. Le poids de xanthylurée, recueillie après deux heures, au moins, divisé par 7, donne, à — 0,3 p. 100 près, l'urée d'hydrolyse. En multipliant cette quantité par le rapport d'une molécule-gramme d'acide allantoïque à deux molécules-gramme d'urée on obtient, à — 1 p. 100 près, environ, l'acide allantoïque contenu dans le volume soumis au dosage.

En appliquant cette méthode aux feuilles d'*Acer pseudoplatanus*, nous avons trouvé que ce végétal contenait 2^{gr},7 d'acide allantoïque par kilogramme de feuilles sèches.

DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ACIDE ALLANTOÏQUE. — Cette méthode, qui sera décrite plus loin, instituée avec A. BRUNEL et P.-E. THOMAS, est basée sur la détermination de la densité d'absorption de la réaction colorée phénylhydrazinique de l'acide glyoxylique, provenant de l'hydrolyse de l'acide allantoïque.

CHAPITRE V

Présence de l'acide allantoïque chez les Champignons. (Avec A. Brunel) (1).

L'acide allantoïque existe non seulement chez les Phanérogames (2), mais aussi chez les Champignons, où il n'avait pas encore été signalé. Le suc d'expression de nombreux Basidiomycètes développe, après défécation et chauffage, la réaction colorée phénylhydrazinique de l'acide glyoxylique résultant de l'hydrolyse de l'acide allantoïque.

Après avoir identifié par l'analyse élémentaire, sous la forme de son dérivé dixanthylé, l'acide allantoïque dans *Coprinus micaceus* et *Collybia dryophila*, cet uréide a été dosé par la méthode spectrophotométrique (3) dans les Champignons qui suivent, déterminés par M. Roger HEIM.

(1) R. FOSSE et A. BRUNEL, *Comptes Rendus*, t. CXCVII, 1933, p. 288.

(2) *Comptes Rendus*, t. CLXXXII, 1926, p. 175 et 869; t. CLXXXIII, 1926, p. 175; t. CLXXXIV, 1927, p. 1596; t. CLXXXV, 1927, p. 308; t. CLXXXVIII, 1929, p. 426, 1067, 1418, 1632; t. CLXXXIX, 1929, p. 716; t. CXC, 1930, p. 1153, 1388; t. CXCII, 1931, p. 442, 1615; t. CXCIII, 1931, p. 7; t. CXCVI, 1933, p. 883 et 1264.

(3) R. FOSSE, A. BRUNEL et P.-E. THOMAS, *Comptes Rendus*.

| Noms. | Partie du végétal. | Acide allantoïque en grammes pour 1 000 gr. de plante sèche. |
|--|-----------------------|--|
| <i>Amanita rubescens</i> (Pers.)..... | (Total) | 0,4 |
| <i>Leucocoprinus cæpestipes</i> (Fr. ex Sow.) Pat..... | — | 6,09 |
| <i>Pluteus patricius</i> (Schul.)..... | — | 0,60 |
| <i>Pluteus cervinus</i> (Schoef.)..... | — | 1,22 |
| <i>Agaricus campester</i> (Fr.)..... | (Chapeau) | 0,14 |
| | (Stipe) | 0,24 |
| <i>Agaricus exquisitus</i> (Vitt. sensu Pat.)..... | (Chapeau) | 0,13 |
| <i>Coprinus micaceus</i> (Bull.)..... | (Total) | 4,69 |
| <i>Coprinus lagopus</i> (Fr.)..... | — | 4,79 |
| <i>Coprinus stercorarius</i> (Fr.)..... | — | 0,55 |
| <i>Hypholoma appendiculatum</i> (Bull.)..... | — | 1,25 |
| <i>Panæolus papilionaceus</i> (Bull.)..... | — | 1,09 |
| <i>Nematoloma fasciculare</i> (Kst.)..... | — | 1,17 |
| <i>Pholiota cylindracea</i> (Fr. ex D. C.)..... | — | 2,81 |
| <i>Pholiota præcox</i> (Fr. ex Pers.)..... | — | 1,01 |
| <i>Hebeloma radicosum</i> (Bull.) Rick..... | — | 0,70 |
| <i>Rhodophyllus solsticialis</i> (Fr.) Q..... | — | 6,72 |
| <i>Entoloma lividum</i> (Bull.)..... | (Lamelles) | 1,80 |
| <i>Clitopilus orcella</i> (Fr.)..... | (Total) | 0,23 |
| <i>Collybia maculata</i> (Alb. et Schw.)..... | — | 1,28 |
| <i>Collybia distorta</i> (Fr.)..... | — | 0,90 |
| <i>Collybia grammocephala</i> (Bull.)..... | — | 0,40 |
| <i>Collybia dryophila</i> (Bull.) | (Chapeau) | 4,06 |
| | (Stipe) | 0,82 |

L'acide allantoïque varie donc, dans ces expériences, depuis 0^{gr},14 jusqu'à 6^{gr},72 par kilogramme de plante sèche. Des variations aussi étendues peuvent être également constatées chez le même individu pris à des âges différents :

| État du développement. | Acide allantoïque en grammes pour 1 000 gr. de plante sèche. |
|--------------------------------------|---|
| <i>Coprinus micaceus.</i> | |
| 1. Non sporulé..... | 0,75 |
| 2. Sporulé..... | 2,96 |
| 3. Mûr. Lamelles déliquescentes..... | 4,69 |
| <i>Leucocoprinus cæpestipes.</i> | |
| 1. Très jeune..... | 1,66 |
| 2. Non épanoui..... | 2,50 |
| 3. Épanoui..... | 2,63 |
| 4. Flétri..... | 7,08 |

CHAPITRE VI

Formation et accumulation de l'acide allantoïque pendant la germination.

Par R. FOSSE, P. DE GRAEVE et P.-E. THOMAS.

(Comptes Rendus, t. CXCVI, p. 883.)

Dans son intéressant travail, R. BONNET (1) trouve de petites quantités d'azote allantoïque dans le Lupin et la Lentille, avant et après germination (1).

1. Après avoir identifié l'acide allantoïque par l'analyse quantitative élémentaire de son dérivé dixanthylé, obtenu en partant de la plantule du Trèfle violet, germé aseptiquement, à l'obscurité, six jours à 31°, nous avons constaté l'accumulation de ce principe durant la germination de *Melilotus officinalis* et de *Trifolium sativum*.

2. *Accumulation de l'acide allantoïque pendant la germination.* — Des graines de *Melilotus officinalis* et de *Trifolium sativum* sont mises en germination, à la température ordinaire, à la lumière, sur des assiettes poreuses, maintenues constamment humectées d'eau de source.

L'acide allantoïque initial, voisin de 0^{gr},1 par kilogramme de plante sèche, avant germination, s'élève, après germination, à 6^{gr},85 chez le Mélilot (35 jours) ; 12^{gr},9 chez le Trèfle violet (20 jours) :

| Durée de la germination en jours. | Poids d'acide allantoïque en grammes par kilo- gramme de plante sèche. | Rapport acide allantoïque de plantule à acide allantoïque initial. |
|---|--|--|
| <i>Melilotus officinalis.</i> | | |
| 0..... | 0,097 | 1 |
| 8..... | 1,68 | 17,3 |
| 10..... | 2,14 | 22 |
| 15..... | 2,69 | 27,7 |
| 23..... | 4,10 | 42,4 |
| 35..... | 6,85 | 70 |
| <i>Trifolium sativum</i> (Trèfle violet). | | |
| 0..... | 0,100 | 1 |
| 3..... | 1,225 | 12,2 |
| 5..... | 4,46 | 44,6 |
| 7..... | 6,6 | 66 |
| 10..... | 8,03 | 80,3 |
| 20..... | 12,9 | 129 |

Comme l'asparagine ou la glutamine chez les végétaux supérieurs, comme l'urée chez les Champignons (N. N. IWANOFF), l'acide allantoïque peut s'accumuler dans la plantule en quantités notables.

(1) R. BONNET, *Bull. Soc. Chimie biol.*, XI, 1925, p. 1929-1961.

Si l'on place en germination aseptique, à l'obscurité, à 31°, des graines de *Trifolium sativum* (variété Trèfle violet), l'acide allantoïque croît avec rapidité et atteint 17^{gr},4 par kilogramme de plante sèche après douze jours. Le rapport de l'azote allantoïque à 100 parties d'azote total s'élève à 8,8.

La même graine, mise en germination à la lumière, sur l'eau, à la température ordi-

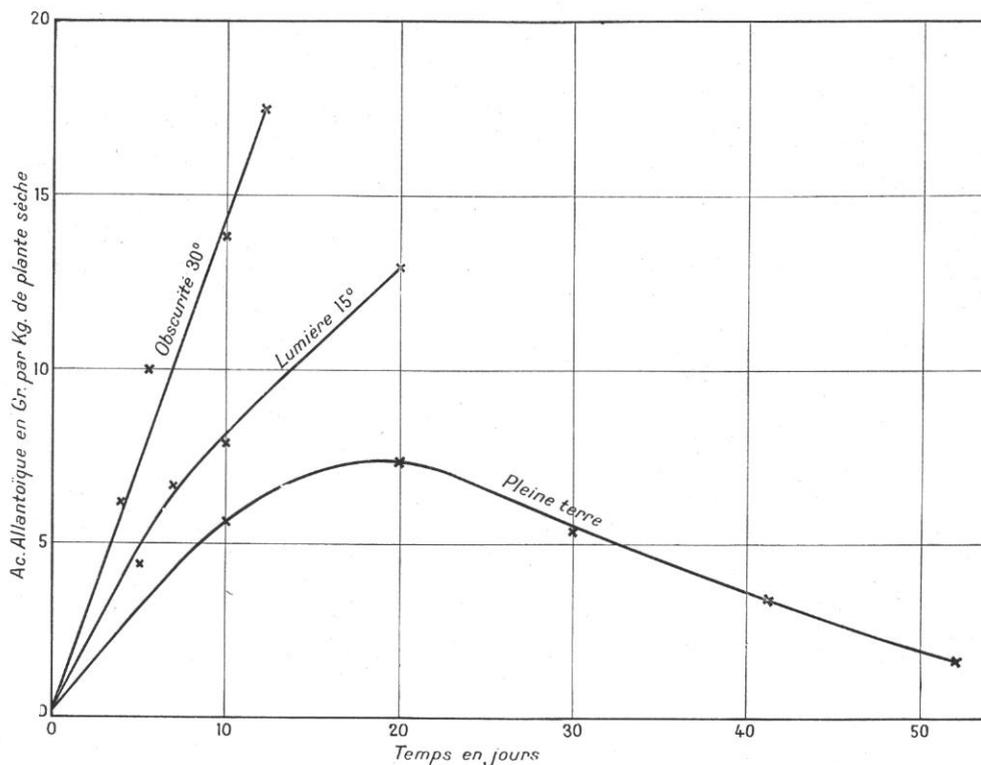


Fig. 4.

naire, produit encore 12^{gr},9 d'acide allantoïque par kilogramme de plante sèche, après vingt jours.

Enfin, dans des cultures de Trèfle violet, dans la terre, que nous devons à M. GUILLAUMIN, professeur au Muséum, la teneur en acide allantoïque s'élève à 7^{gr},25 après vingt jours et le rapport de l'azote allantoïque à 100 parties d'azote total égale 2,83. Puis l'acide allantoïque va en décroissant très lentement, ainsi que le montrent les graphiques.

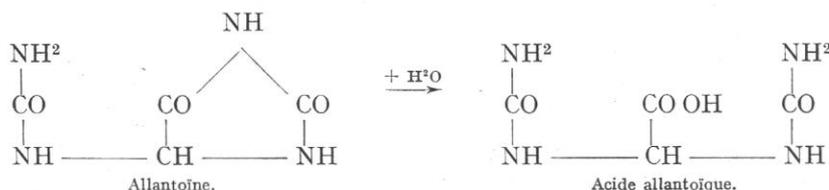
CHAPITRE VII

Un nouveau ferment, l'allantoïnase.

(En collaboration avec A. BRUNEL) (1).

De nombreux végétaux et animaux renferment ce ferment, producteur d'acide allantoïque par simple fixation d'eau sur l'allantoïne.

(1) R. FOSSE et A. BRUNEL, *Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 426, 1067.



DISTRIBUTION DE L'ALLANTOÏNASE.

VÉGÉTAUX.

Semences de Légumineuses :

| | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Acacia longifolia.</i> | <i>Coronilla varia.</i> |
| <i>Anthyllis Hermaniæ.</i> | <i>Cytisus Alschingeri.</i> |
| <i>Astragalus glycyphylloïdes.</i> | <i>Ervum lens.</i> |
| <i>Cercis siliquastrum.</i> | <i>Genista tinctoria.</i> |
| <i>Cicer arietinum.</i> | <i>Glycina soja.</i> |
| <i>Colutea arborescens.</i> | <i>Lathyrus latifolius.</i> |
| <i>Lathyrus niger.</i> | <i>Phaseolus vulgaris.</i> |
| <i>Lathyrus odoratus.</i> | <i>Pisum sativum.</i> |
| <i>Lathyrus pratensis.</i> | <i>Pisum elatius.</i> |
| <i>Lotus tetragonolobus.</i> | <i>Scorpiurus sulcata.</i> |
| <i>Lupinus albus.</i> | <i>Soja hispida.</i> |
| <i>Medicago minima.</i> | <i>Trifolium montanum.</i> |
| <i>Melilotus alba.</i> | <i>Trifolium procumbens.</i> |
| <i>Melilotus officinalis.</i> | <i>Trigonella polycerata.</i> |
| <i>Mimosa pudica.</i> | <i>Vicia hirsuta.</i> |
| <i>Ononis fructicosa.</i> | <i>Vicia lutea.</i> |
| <i>Phaseolus lunatus.</i> | <i>Vicia pisiformis.</i> |
| <i>Phaseolus multiflorus.</i> | <i>Vicia sylvatica.</i> |
| <i>Phaseolus Mungo.</i> | |

(En collaboration avec A. BRUNEL et P. DE GRAEVE) (1).

Organes des Légumineuses : radicelle, racine, tige, feuille, fleur totale, légume frais total, gousse et graine séparées de *Phaseolus vulgaris*; racine, tige et feuille de *Soja hispida* récolté sans fleurs.

Semences appartenant à d'autres familles que les Légumineuses :

- Ombellifères : *Fœniculum dulce*, *Daucus carotta*.
 Solanacées : *Nicotiana tabacum*.
 Composées : *Tanacetum vulgare*.
 Chénopodiacées : *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Atriplex hortensis*.
 Urticacées : *Humulus lupulus*, *Cannabis sativa*, *Urtica dioïca*.
 Malvacées : *Althæa rosea*.
 Rutacées : *Ruta graveolens*.
 Rosacées : *Prunus laurocerasus*, *Prunus domestica*, *Persica vulgaris*, *Potentilla recta*, *Fragaria indica*.
 Cucurbitacées : *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*.
 Muscinés, *Polytrichum formosum*.
 Champignons : *Psalliota campestris*, *Aspergillus niger* (spores et mycélium), *Claviceps purpurea*.

(1) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXIX, 1929, p. 716.

ANIMAUX

(En collaboration avec A. BRUNEL) et P. DE GRAEVE.

Échinodermes : *Echinaster sentus* (Étoile de mer), *Echinus miliarus* (Oursin), *Ophiura texturata* (Ophiure).
 Crustacés : *Maia squinado* (Araignée de mer), *Carcinus mænas* (Crabe), *Homarus vulgaris* (Homard),
Astacus fluviatilis (Écrevisse), *Crangon vulgaris* (Crevette).
 Poissons : *Anguilla vulgaris* (Anguille), *Esox lucius* (Brochet), *Cyprinus carpio* (Carpe), *Squalius cephalus*

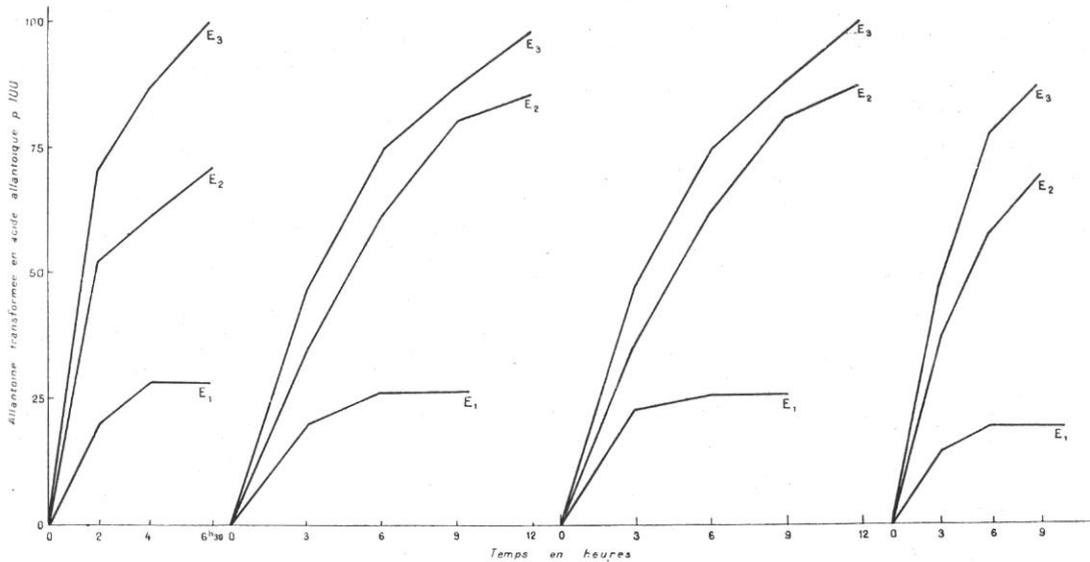


Fig. 5.

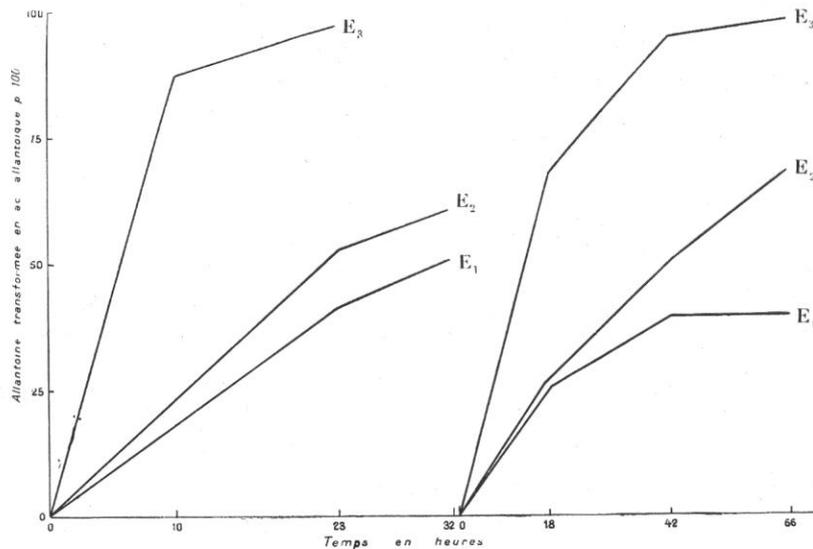


Fig. 6.

(Chevaine), *Conger vulgaris* (Congre), *Clupea harengus* (Hareng), *Pleuronectes limanda* (Limande), *Pleuronectes platessa* (Plie), *Gadus merlangus* (Merlan), *Raja clavata* (Raie), *Scyllium canicula* (Roussette), *Salmo salar* (Saumon).

Batraciens : *Rana viridis*, *Rana temporaria* (Grenouille).

Tandis que la transformation de l'allantoïne en acide allantoïque, par l'action du Soja, de divers *Phaseolus* et de l'extrait glycéринé de Grenouille ou de Hareng tend à devenir totale en présence de carbonate d'ammonium (E_3) ou de calcium (E_2), en l'absence de ces sels (E_1), elle est au contraire très limitée, ainsi que le montrent les graphiques ci-contre.

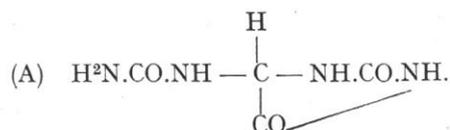
L'allantoïnase a été, en outre, caractérisée par A. BRUNEL (*Comptes Rendus*, t. CXCII, 1931, p. 442) dans une foule de Champignons.

QUATRIÈME PARTIE

NATURE RACÉMIQUE DE L'ALLANTOÏNE PRÉTENDUE INDÉDOUBLABLE DÉCOUVERTE DE SES COMPOSANTS ACTIFS : LE LÉVOGYRE, PAR FERMENTATION ; LE DEXTROGYRE, CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

(En collaboration avec P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE) (1).

Les belles et nombreuses synthèses de l'allantoïne, réalisées par GRIMAUX (2). SIEMONSEN (3), L.-J. SIMON et G. CHAVANNE (4), H. BILTZ et E. GIESSLER (5), conduisent toutes à l'existence dans sa molécule d'un atome de carbone asymétrique.



D'après les célèbres travaux de PASTEUR, LE BEL et VAN'T HOFF, l'allantoïne doit : ou dévier la lumière polarisée, ou donner, sous l'influence d'agents biologiques, un corps doué du pouvoir rotatoire.

Or l'allantoïne, naturelle ou synthétique, n'était connue avant nos recherches que sous une seule forme optiquement inactive, prétendue indédoubleable. Sous l'action de bactéries provenant de l'urine fermentée, L. B. MENDEL et H. D. DAKIN (6) virent cet uréide se détruire partiellement en formant de l'ammoniaque sans produire de corps doué du pouvoir rotatoire.

J. JACOBSON pense qu'il devient, dès lors, très invraisemblable de considérer la formule asymétrique de GRIMAUX (A) comme le seul symbole possible de la structure de l'allantoïne : « Durch Diesen Befund wird die Formel (de Grimaux), sals alleiniges Symbol der Allantoin-Struktur recht unwahrscheinlich (7). »

Deux autres formules sans carbone asymétrique ont été proposées : l'une monocyclique (B), l'autre bicyclique (C) (8).

(1) R. FOSSE, P.-E. THOMAS et DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CXCVIII, 1934, p. 689, 1374 et 1954.

(2) E. GRIMAUX, *Bull. Soc. chim.*, t. XXVI, 1876, p. 845 ; *Ann. chim.*, 5^e série, t. II, 1877, p. 389.

(3) SIEMONSEN, *Liebig's Annalen*, Bd. CCCXXXIII, 1904, p. 108, 133, 137.

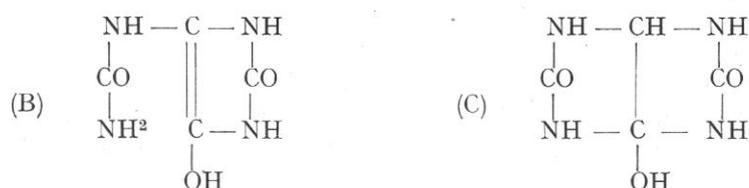
(4) L.-J. SIMON et G. CHAVANNE, *Comptes Rendus*, t. CXLIII, 1906, p. 52.

(5) H. BILTZ et E. GIESSLER, *Berichte Deutsch. chem. Ges.*, Bd. XLVI, 1913, p. 3413.

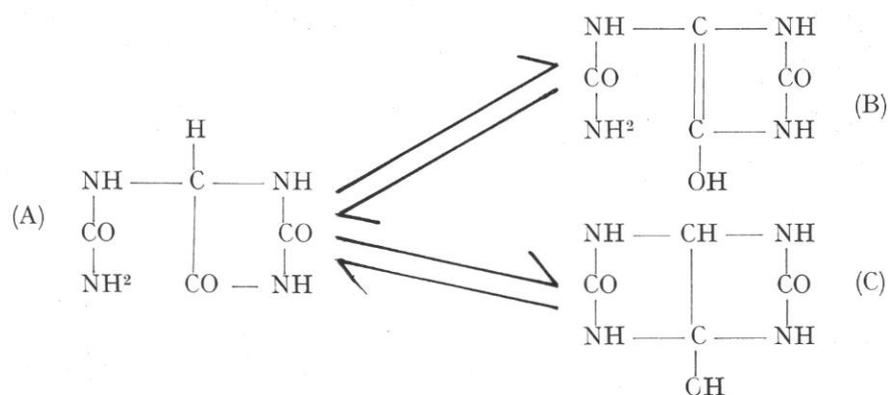
(6) L. B. MENDEL et H. D. DAKIN, *Journ. Biol. chem.*, t. VII, 1909-1910, p. 153, 156.

(7) V. MEYER et J. JACOBSON, *Lehrbuch der organische Chemie*, Berlin, 1923, vol. II, 3^e partie, p. 461-462.

(8) TITHERLEY, *Journ. chem. Soc.*, t. CIII, 1913, p. 1336.



Cependant la formule (A) n'avait pas été complètement abandonnée, puisqu'on admettait encore que l'allantoïne en solution existe sous deux formes tautomères en équilibre, (A) d'une part, (B) ou (C) d'autre part.



Nos expériences révèlent et démontrent que l'allantoïne active sur la lumière polarisée, lévogyre, se forme au cours de la fermentation de l'allantoïne sous l'influence de l'allantoïnase et que l'allantoïne dextrogyre existe dans la feuille de *Platanus orientalis*, ainsi que dans l'urine de Veau.

L'allantoïne est donc un composé racémique, et la formule donnée par GRIMAUZ est exacte.

CHAPITRE PREMIER

Nature racémique de l'allantoïne prétendue indédoubleable.

TRANSFORMATION DE L'ALLANTOÏNE PRÉTENDUE INDÉDOUBLABLE EN ALLANTOÏNE DOUÉE DU POUVOIR ROTATOIRE, LÉVOGYRE. — Dissoudre à chaud l'allantoïne (10 gr.) dans l'eau (1 000 cc.); refroidir à 40°; ajouter du sesquicarbonat d'ammonium (2 gr.), du *Soja hispida* broyé (10 gr.), du chloroforme; maintenir le mélange dans un bain d'eau à 40°, durant sept heures.

PRÉPARATION DE L'ALLANTOÏNE LÉVOGYRE l PURE. — Déféquer par l'acétate de plomb; précipiter par H²S; évaporer le filtrat dans le vide à siccité; épuiser les cristaux broyés par de l'eau à 40°; filtrer pour séparer l'allantoïne inactive; précipiter la solution par l'acétate de mercure-sodium de WIECHOWSKI; décomposer le précipité par H₂S; évaporer le filtrat à sec dans le vide; épuiser les cristaux pulvérisés par de l'eau à 40° et aban-

donner à cristallisation à la température ordinaire. Après plusieurs cristallisations semblables, on obtient l'allantoïne *l* pure, en longues aiguilles de plusieurs centimètres de long, groupées en houppes, solubles dans, environ 30 fois, leur poids d'eau à + 15°, de pouvoir rotatoire spécifique égal à -92° .

L'allantoïnase n'existant pas seulement chez les végétaux, mais aussi chez certains animaux (Batraciens, Poissons, Crustacés, Échinodermes), nous avons été conduits à

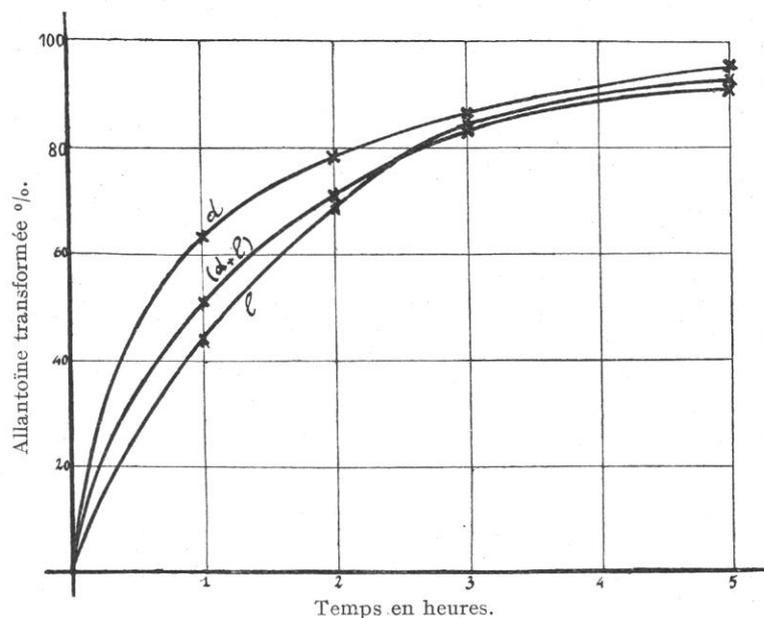


Fig. 7.

chercher si ce ferment, pris chez les Poissons, se comporte comme celui des végétaux.

L'expérience démontre que l'allantoïne *l* se forme et peut être isolée dans l'action de l'allantoïnase du foie de Raie sur l'allantoïne (*d* + *l*) (1).

RACÉMISATION DE L'ALLANTOÏNE *l*. — Elle se produit très facilement en milieu alcalin, à la température ordinaire et aussi en milieu neutre à 100°. La présence d'un peu d'acide acétique ralentit la vitesse de racémisation à 100°.

CHAPITRE II

Allantoïne dextrogyre.

Avec P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE, cet uréide a été découvert dans les feuilles de Platane. Nous l'en avons retiré par une méthode semblable à celle qui nous a permis de l'isoler du produit de fermentation de l'allantoïne.

Ce corps, dont le pouvoir rotatoire spécifique est égal à $+92^{\circ}$, mêlé à son isomère en solution concentrée, produit un précipité d'allantoïne (*d* + *l*).

(1) R. FOSSE, P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CXCVIII, 1934, p. 1374.

Les trois formes d'allantoïde d , l ($d + l$) se présentent, d'après les renseignements qu'a bien voulu nous donner M. P. GAUBERT, soit en longues aiguilles groupées, soit en prismes courts isolés, suivant les circonstances de la cristallisation. Tous ces cristaux appartiennent au système monoclinique (1).

P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE (2) ont découvert l'allantoïne d chez les animaux. Ils l'ont très aisément retirée de l'urine de Veau.

CHAPITRE III

Mécanisme de la fermentation de l'allantoïne.

(Par P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE.)

Pour expliquer la formation d'allantoïne lévogyre au cours de la fermentation de l'allantoïne ($d + l$), P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE (3) admettent que l'isomère d se détruit plus vite que l'isomère l . Cette hypothèse se vérifie aisément, si on dose comparativement après des temps variables l'acide allantoïque formé par les trois formes d'allantoïne, soumises à l'action de l'allantoïnase. L'allantoïne dextrogyre se détruit plus vite que l'allantoïne racémique, et celle-ci plus vite que la lévogyre. Après un certain temps, les vitesses de transformation tendent vers une même valeur, par suite de la racémisation des composés actifs due à l'alcalinité du milieu (Voir fig. 7).

(1) R. FOSSE, P.-E. THOMAS et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CXCVIII, 1934, p. 1953.

(2) P. GAUBERT (*Comptes rendus*, t. CXCIX, 1934 p 213).

(3) P.-E. THOMAS et DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CXCVIII, p. 1615.

CINQUIÈME PARTIE

ANALYSE QUANTITATIVE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE TRÈS PETITES QUANTITÉS D'ACIDE ALLANTOÏQUE ET D'ALLANTOÏNE A DE TRÈS GRANDES DILUTIONS

Le dosage de l'allantoïne peut se ramener au dosage de l'urée incluse dans sa molécule libérée par l'action successive des alcalis et des acides. L'acide allantoïque, formé d'abord, se scinde, ensuite, en ses composants, acide glyoxylique et urée (R. Fosse et V. Bossuyt). En titrant ainsi des solutions d'allantoïne pure, on trouve des chiffres fort approchés (1).

CHAPITRE PREMIER

Analyse quantitative basée sur sa transformation en acide allantoïque par l'action de l'allantoïnase du Soja (2).

(En collaboration avec A. BRUNEL et P. DE GRAEVE).

La méthode précitée ne peut être appliquée, sans modifications préalables, aux milieux biologiques contenant : urée, uréides, guanéides, protides. Il faut, dans ces circonstances, tenir compte de l'urée préformée, détruite ou engendrée par l'action des alcalis et, par conséquent, trouver un procédé approprié pour la doser.

Remplace-t-on l'action des alcalis sur l'allantoïne par celle du *Soja hispida*, toutes les difficultés signalées disparaissent. Deux fermentations simultanées se déclarent : l'allantoïnase transforme l'allantoïne en acide allantoïque et l'uréase détruit l'urée libre ambiante.

Le dosage de l'allantoïne sous forme d'urée, même en présence d'urée, comprend les opérations :

(1) R. FOSSE et V. BOSSUYT, Analyse quantitative et caractérisation de l'allantoïne (*Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 106).

(2) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, Analyse quantitative biochimique de l'allantoïne en présence d'urée (*Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 1418).

Action de 1 p. 100 de Soja, à 40°, durant dix heures ou commodément pendant la durée d'une nuit ;

Hydrolyse, trente minutes à 60°, de 5 ou 10 centimètres cubes de liquide filtré, par l'acide chlorhydrique à la concentration N/20 ; défécation par l'iodomercurate et précipitation de l'urée à l'aide du xanthidrol.

En titrant ainsi de très nombreuses solutions d'allantoïne de concentrations comprises entre 0^{gr},2 et 1 gramme, avec ou sans urée, nous obtenons la quantité théorique d'allantoïne soumise au dosage, avec une approximation toujours inférieure à ± 1 p. 100 (2).

DOSAGE DE L'ALLANTOÏNE DANS L'URINE A L'ÉTAT D'URÉE DIXANTHYLÉE, APRÈS ACTION DES DIASTASES DU SOJA EN MILIEU CYANURÉ ET HYDROLYSE ACIDE. — L'uréase détruit l'urée libre ambiante, l'allantoïnase transforme l'allantoïne en acide allantoïque, et le cyanure inhibe l'uricase. L'acide chlorhydrique détruit les ferments et scinde l'acide allantoïque en acide glyoxylique et urée, que l'on précipite par le xanthidrol à l'état de dérivé xanthylé.

Cette technique convient parfaitement pour l'analyse de l'urine des Mammifères, sauf l'Homme, qui n'élimine seulement que quelques centigrammes d'allantoïne par vingt-quatre heures (1).

CHAPITRE II

Dosage spectrophotométrique de l'acide allantoïque.

(En collaboration avec A. BRUNEL et P.-E. THOMAS) (2).

La coloration rouge extrêmement sensible que développe l'acide glyoxylique en présence du réactif phénylhydrazinique se prête admirablement, dans des conditions bien déterminées, même à la dilution de un deux-millionième, au dosage spectro-photométrique de cet acide et des deux uréides : acide allantoïque et allantoïne qui lui donnent naissance, le premier, par simple hydrolyse ; le deuxième, par fermentation suivie d'hydrolyse.

Préparation des solutions étalons d'acide allantoïque. — Introduire dans une fiole jaugée de 1 litre de l'allantoate de potassium pur à l'analyse, pesé à la microbalance, correspondant à une quantité d'acide allantoïque comprise entre 0^{mg},5 et 15 milligrammes. Ajouter de l'eau et HCl normal (10 à 20 cc.) pour que le titre acide soit compris entre N/50 et N/100.

Technique et mesure de la densité d'absorption de la réaction colorée glyoxylique. — Placer deux minutes au bain d'eau bouillante, en tubes à essais :

| | |
|---|----------------------------------|
| Solution étalon d'acide allantoïque..... | 2 cc. |
| Chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 p. 100..... | II gouttes (0 ^{cc} ,10) |

(1) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 1632.

(2) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. E. THOMAS, *Comptes Rendus*, t. CXCXII, 1931, p. 1615.

puis, après refroidissement rapide par courant d'eau, ajouter :

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| HCl concentré..... | 1 ^{cc} ,2 |
| Ferricyanure de K à 5 p. 100..... | 1 goutte (0 ^{cc} ,05) |

Mesurer au spectrophotomètre de JOBIN et YVON, dans une cuvette de 1 centimètre d'épaisseur, pour $\lambda = 5200 \text{ \AA}$, la densité d'absorption totale $\delta = 2 \text{ colog. sin } \theta$ (θ angle lu à l'appareil). Effectuer la même mesure $\delta_0 = 2 \text{ colog. sin } \theta_0$ sur un mélange identique n'ayant pas subi l'action de la chaleur. La différence $\delta - \delta_0 = \Delta$ est la densité d'absorption de la solution colorée produite par l'acide glyoxylique. Si l'on trace la courbe des densités d'absorption Δ en fonction des concentrations en acide allantoïque, on obtient une droite.

CHAPITRE III

Dosage spectrophotométrique de l'allantoïne.

Fermentation. — Placer au bain d'eau à 40°-42° :

| | |
|---|----------------------|
| Solution titrée contenant au minimum 0 ^{mg} ,5 d'allantoïne et au maximum..... | 100 cc. |
| <i>Soja hispida</i> finement broyé (1 p. 100)..... | 1 gr. |
| Cyanure de potassium (0 ^{gr} ,75 p. 1 000)..... | 0 ^{gr} ,075 |
| Sesquicarbonate d'ammonium (2 p. 1 000)..... | 0 ^{gr} ,2 |
| Chloroforme | X gouttes. |

Après une nuit de fermentation de ce milieu, où la présence de cyanure suspend l'activité de l'uricase, centrifuger, déféquer, diluer avec HCl N/100 à un volume tel que le titre en acide allantoïque ne dépasse pas 15 milligrammes par litre.

Réaction colorée et dosage spectrophotométrique. — Opérer comme dans le cas de l'acide allantoïque. Du Δ trouvé et de la courbe précédente on déduit la teneur en acide allantoïque. Ce chiffre, multiplié par 0,897 (rapport des poids moléculaires $\frac{\text{Allantoïne}}{\text{Acide allantoïque}}$) et par le coefficient de dilution, donne le titre en allantoïne.

DOSAGE DE L'ALLANTOÏNE EN PRÉSENCE DE L'ACIDE URIQUE. — Le milieu de fermentation doit contenir du cyanure pour inhiber l'uricase du *Soja*, ainsi que le montrent de nombreuses expériences.

APPLICATION AU DOSAGE DE L'ALLANTOÏNE DANS L'URINE HUMAINE. — Tandis que 500 centimètres cubes d'urine étaient jusqu'ici nécessaires pour une évaluation approximative de cet uréide, 5 centimètres cubes nous suffisent pour une détermination précise et rapide.

Mode opératoire. — Placer au bain d'eau à 40°, dans une fiole bouchée à l'émeri :

| | |
|---------------------------|---------------------|
| Urine humaine..... | 5 cc. |
| Eau..... | 10 cc. |
| Cyanure de potassium..... | 0 ^{gr} ,01 |
| <i>Soja hispida</i> | 0 ^{gr} ,15 |
| Chloroforme..... | V gouttes. |

Après une nuit de fermentation, introduire 5 centimètres cubes du liquide filtré dans un tube à centrifuger ; aciduler très légèrement par $\text{SO}^4\text{H}^2\text{N}$; ajouter alternativement une goutte de tungstate de sodium à 5 p. 100 et d'acide sulfurique N/3 jusqu'à obtention d'un liquide limpide après centrifugation ; laver trois fois le dépôt avec HCL N/100 ; filtrer sur filtre sans pli dans une fiole jaugée (20 cc.) et compléter le volume avec cet acide N/100.

L'application de cette méthode à l'urine de sept individus nous a conduit à une teneur en allantoïne comprise entre 18 et 35 milligrammes par litre.

CHAPITRE IV

Dosage de l'allantoïne dans le sang de quelques Mammifères (1).

ANDREW HUNTER a réussi à isoler l'allantoïne pure du sang de plusieurs Mammifères avec un rendement de 7^{mg},8 par litre pour le sérum de Bœuf et de 5^{mg},7 pour le sérum de Porc (*Journ. of Biol. Chem.*, t. XXVIII, 1917, p. 369-374).

DOSAGE DE L'ALLANTOÏNE DANS LE SÉRUM (Bœuf, Veau, Cheval, Mouton et Porc) (2). — *Mode opératoire.* — Placer au bain d'eau, à 40°, en vases clos :

| | |
|---------------------------------|----------------------|
| Sérum..... | 5 cc. |
| Eau..... | 20 cc. |
| <i>Soja hispida</i> | 0 ^{gr} ,25 |
| Cyanure de potassium..... | 0 ^{gr} ,015 |
| Sesquicarbonate d'ammonium..... | 0 ^{gr} ,05 |
| Chloroforme..... | V gouttes. |

Après quinze heures de fermentation, traiter le liquide d'après les indications précédentes.

L'allantoïne, contenue dans le sérum d'animaux tués à l'abattoir, varie entre 10^{mg},7 et 26^{mg},9 par litre.

CHAPITRE V

Dosage de l'allantoïne dans les graines (1).

Découverte en 1881 par SCHULTZE et BARBIERI dans les végétaux (Érable, Platane), l'allantoïne a été depuis rencontrée dans quelques graines : Tabac (SCURTI et PERCIA-

(1) R. FOSSE, A. BRUNEL et P.-E. THOMAS, *Comptes Rendus*, t. CXCII, 1931, p. 1615.

BOSO); *Datura* DE PLATO); Froment (POWER et SALVAY, FOSSE, BRUNEL, DE GRAEVE, THOMAS et SARAZIN); Orge, Maïs, Pois, Soja (*Comptes Rendus*, t. CXCI, 1930, p. 1153).

DOSAGE DE L'ALLANTOÏNE DANS LES GRAINES. — *Mode opératoire*. — Placer au bain d'eau à 40° :

| | |
|---------------------------------|----------------------|
| Graine finement broyée..... | 1 gr. |
| Eau..... | 20 cc. |
| <i>Soja hispida</i> | 0 ^{gr} ,2 |
| Cyanure de potassium..... | 0 ^{gr} ,015 |
| Sesquicarbonate d'ammonium..... | 0 ^{gr} ,05 |
| Chloroforme | V gouttes. |

Après une nuit de fermentation, introduire 5 centimètres cubes du liquide filtré dans un tube à centrifuger ; déféquer par le tungstate de sodium à 10 p. 100 et l'acide sulfurique 2/3 N ; filtrer sur filtre sans plis dans une fiole jaugée de 20 centimètres cubes ; délayer dans 3 à 4 centimètres cubes d'acide chlorhydrique N/100 ; ajouter 1 goutte de tungstate et d'acide sulfurique ; centrifuger ; filtrer ; répéter deux fois le même traitement ; compléter à 20 centimètres cubes avec HCl N/100 ; puis, suivre le mode opératoire déjà décrit.

Quand la teneur en allantoïne de la graine dépasse 0^{gr},8 par kilogramme, une dilution plus forte devient nécessaire, le dosage spectrophotométrique ne pouvant être exécuté sur des liqueurs trop colorées.

Les recherches ont porté sur des graines de récolte récente ou très ancienne, aimablement mises à notre disposition par notre regretté collègue le Professeur Henri LECOMTE. Cinquante individus ont été étudiés, de familles diverses :

| | | |
|---------------|-----------------|----------------|
| Liliacées. | Composées. | Crucifères. |
| Graminées | Urticacées. | Légumineuses. |
| Ombellifères. | Polygonacées. | Cucurbitacées. |
| Solanacées. | Chénopodiacées. | |

3. Par leur teneur très variable en allantoïne, comprise entre 0^{gr},02 et 3^{gr},3 par kilogramme, les 50 végétaux examinés se répartissent en quatre catégories :

| Allantoïne par kilogramme. | Nombre d'individus. |
|--|---------------------|
| 0 ^{gr} ,02 à 0 ^{gr} ,09..... | 20 |
| 0 ^{gr} ,1 à 0 ^{gr} ,41..... | 20 |
| 0 ^{gr} ,5 à 0 ^{gr} ,88..... | 8 |
| 1 ^{gr} ,7 à 3 ^{gr} ,3 | 2 |

Deux graines se distinguent nettement des autres par leur remarquable richesse en allantoïne : *Phaseolus mungo* (1^{gr},7) et *Dolichos sinensis* (3^{gr},3). Cet uréide est-il un principe constant des végétaux ? Des expériences sont poursuivies pour répondre à cette question.

SIXIÈME PARTIE

L'ACIDE URIQUE CHEZ LES VÉGÉTAUX

CHAPITRE PREMIER

Une deuxième fermentation nouvelle. Transformation de l'acide urique en acide allantoïque par des ferments végétaux ou animaux.

(En collaboration avec A. BRUNEL et P. DE GRAEVE) (1).

FERMENTS VÉGÉTAUX TRANSFORMANT L'ACIDE URIQUE EN ACIDE ALLANTOÏQUE. — A une époque où l'acide urique, n'ayant pu être décelé dans les plantes, était considéré comme d'origine exclusivement animale, nous avons démontré que de nombreux végétaux l'attaquent et, ouvrant ses deux noyaux hérétocycliques, le transforment en acide allantoïque.

1. Les graines fraîches de légumineuses, servant à l'alimentation de l'Homme (Pois, Haricot, Fève), possèdent une puissance de transformation de l'acide urique en acide allantoïque des plus nettes.

L'identification de l'acide allantoïque ainsi formé a été réalisée par l'analyse : 1^o de son dérivé dixanthylé ; 2^o de son sel d'argent.

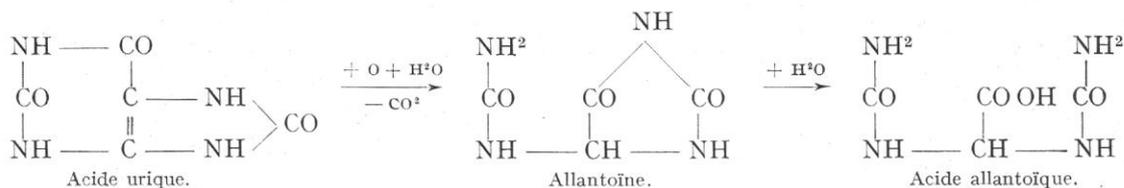
2. La même transformation est provoquée par les semences sèches des Légumineuses récoltées en 1928 :

Cicer arietinum.
Dolichos lablab.
Faba vulgaris.
Genista scoparia.
Glycina soja.
Lathyrus sylvestris.
Medicago sativa.
Melilotus alba.
Melilotus officinalis.
Phaseolus lunatus.

Phaseolus multiflorus.
Phaseolus mungo.
Phaseolus vulgaris (Flageolet, Haricot
Princesse à rames).
Pisum elatius.
Pisum sativum.
Soja hispida.
Soja hispida var. nigra.
Spartium junceum.

(1) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, t. CLXXXIX, 1929, p. 213 ; t. CXC, 1930, p. 79.

3. La fermentation allantoïque de l'acide urique résulte de l'action de deux diastases : l'une, appartenant à la classe des oxydases découverte en 1894, au Muséum, par Gabriel BERTRAND, dégrade l'acide urique en allantoïne, comme l'uricase des animaux ; l'autre, dont nous avons fait connaître l'existence chez des végétaux et des animaux, produit l'acide allantoïque par simple fixation d'eau sur l'allantoïne.



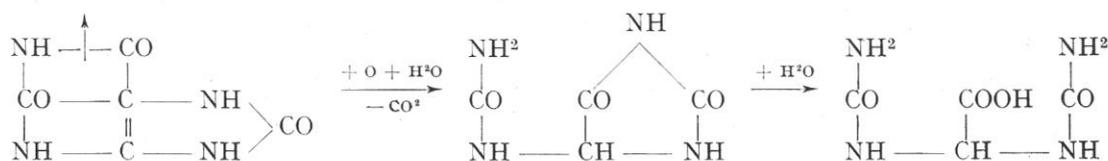
FERMENTS ANIMAUX TRANSFORMANT L'ACIDE URIQUE EN ACIDE ALLANTOÏQUE. — C'est à CHASSEVANT et Ch. RICHEL, en 1898, que l'on doit la découverte de la destruction de l'acide urique par les ferments hépatiques, et à WIECHOWSKI, en 1907, celle de la formation de l'allantoïne dans ces conditions.

L'allantoïne est-elle toujours le produit final de la dégradation diastasique de l'acide urique par le foie des divers animaux ? Nos expériences démontrent que l'acide allantoïque se forme par fermentation de l'acide urique en présence du foie des Batraciens et Poissons, chez lesquels nous avons déjà signalé l'allantoïnase : *Rana viridis*, *Rana temporaria* ; Sélaciens : *Raja clavata*, *Raja punctata* ; Téléostéens : *Cyprinus carpio*, *Tinca vulgaris*, *Gadus merlangus*, *Scomber scombrus*, *Clupea harengus*, *Mullus barbatus*, *Pleuronectes limanda*.

L'acide allantoïque résultant de la fermentation de l'acide urique a été identifié par l'analyse quantitative de son sel d'argent cristallisé et pur.

Conclusions.

L'acide allantoïque se forme dans les deux fermentations que nous avons découvertes, aux dépens : soit de l'allantoïne, sous l'influence de l'allantoïnase, contenue chez les végétaux et chez certains animaux ; soit de l'acide urique, en présence d'organes de végétaux (Légumineuses) ou d'animaux (Batraciens et Poissons). Cette dernière fermentation est l'œuvre de deux diastases : l'une, l'uricase, oxyde et hydrate l'acide urique pour donner, avec perte de CO², l'allantoïne que, l'autre, l'allantoïnase, transforme en acide allantoïque par simple fixation d'eau :



CHAPITRE II

Un nouveau principe des végétaux : l'acide urique.

(En collaboration avec P. DE GRAEVE et P.-E. THOMAS) (1).

1. L'existence, si souvent cherchée et discutée du formol dans les plantes, fondement de la célèbre hypothèse de BAEYER sur l'assimilation chlorophyllienne du carbone, semblait être enfin démontrée. Des extraits alcooliques de feuilles vertes, préparés avec le concours de la chaleur, produisent en effet la réaction colorée de SCHRYVER (2).

Mais cette réaction, prétendue spécifique de l'aldéhyde formique, appartient aussi à l'acide glyoxylique (3).

Les sucres de certaines feuilles vertes peuvent la produire avec intensité s'ils ont subi l'action de la chaleur, mais, préparés à froid et récemment, leur réaction reste très faible ou négative.

En outre, l'urée apparaît par chauffage des sucres en même temps que la substance chromogène. Les deux corps formés simultanément doivent donc dériver de l'hydrolyse d'un uréide instable, dont ils révèlent la présence dans les feuilles.

Quel est cet uréide ?

L'acide allantoïque, isolé et identifié par l'analyse élémentaire, successivement sous la forme de son dérivé dixanthylé, mercurique et argentique (R. Fosse) (4).

2. D'où provient l'acide allantoïque ? De l'hydratation fermentaire de l'allantoïne. C'est en effet ce que démontrent :

a. L'allantoïnase (5), ferment végétal extrêmement répandu, qui lui donne naissance *in vitro* par fixation d'une molécule d'eau sur l'allantoïne.



b. La présence simultanée d'allantoïne, d'acide allantoïque et d'allantoïnase dans la même plante (6).

c. La transformation en acide allantoïque qu'éprouve l'allantoïne contenue dans le suc de plusieurs plantes, centrifugé, chloroformé et placé à 40°.

(1) R. FOSSE, P. DE GRAEVE et P.-E. THOMAS, *Comptes Rendus*, t. CXCIV, 1932, p. 1408 ; t. CXCV, 1932, p. 1198.

(2) SCHRYVER, *Proc. Roy. Soc. London*, série B, t. LXXXII, 1910, p. 226 ; *Chem. Centralblatt*, t. I, 1910, p. 1366 ; GAB. BERTRAND et P. THOMAS, *Manipulations de chimie biologique*, Paris, 2^e édition, 1913, p. 441.

(3) R. FOSSE et A. HIEULLE, *Comptes Rendus*, t. CLXXIX, 1924, p. 637 ; t. CLXXXIII, 1926, p. 1114.

(4) R. FOSSE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXII, 1926, p. 175 et 869 ; t. CLXXXIII, 1926, p. 1114 ; R. FOSSE et A. HIEULLE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXIV, 1927, p. 1596 ; R. FOSSE et V. BOSSUYT, *Comptes Rendus*, t. CLXXXV, 1927, p. 308.

(5) R. FOSSE et A. BRUNEL, *Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 426 et 1067 ; R. FOSSE, A. BRUNEL et DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 1418 et 1632 ; t. CLXXXIX, 1929, p. 716 ; A. BRUNEL, *Comptes Rendus*, t. CXCI, 1931, p. 442.

(6) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXIX, 1929, p. 716 ; R. FOSSE, A. BRUNEL, P. DE GRAEVE, P.-E. THOMAS et J. SARAZIN, *Comptes Rendus*, t. CXCI, 1930, p. 1153.

3. *Quelle est la substance génératrice de l'allantoïne ? L'acide urique, encore inconnu chez les végétaux.*

Depuis sa découverte chez l'Homme par SCHEELE, en 1776, cet uréide a été trouvé dans la plupart des animaux vertébrés ou invertébrés. Signalé dans les spores d'une moisissure, l'*Aspergillus orizæ*, par MIDZUHO SUMI (1), il n'a pu encore être isolé ou même simplement caractérisé dans les plantes supérieures. CZAPEK (2) constate ce fait négatif à deux reprises : « Harnsäure im Pflanzenreiche noch nicht nachgewiesen... » ; « Die Harnsäure, die man bisher aus dem Pflanzenreiche nicht kennt... ».

L'acide urique joue, cependant, chez les végétaux un rôle physiologique indéniable :

1° Marin MOLLIARD (3) démontre que l'urate de sodium accélère le développement des radis cultivés aseptiquement. En comparant les résultats de trois cultures, contenant 1/1000 d'azote sous forme de nitrate de sodium, d'urée ou d'urate de sodium, c'est avec ce dernier sel que la récolte est maximum.

2° D'après Antonin NÉMEC (4), la graine de Soja détruit l'acide urique avec production d'ammoniac, grâce à la participation de plusieurs ferments.

3° Les graines de *Soja hispida* et d'autres légumineuses, très nombreuses, transforment l'acide urique en acide allantoïque (5).

Pour établir que l'acide urique est la substance mère de l'allantoïne et de l'acide allantoïque, il faut d'abord prouver son existence dans les plantes. Cette *preuve*, très difficile à obtenir, ne peut être donnée *que par l'analyse quantitative élémentaire du corps isolé parfaitement pur.*

CARACTÉRISATION DE L'ACIDE URIQUE PAR L'URICASE. — Un végétal contient de l'acide urique, lorsque la quantité d'acide allantoïque qu'il produit sous l'influence de l'uricase et de l'allantoïnase réunies est plus grande qu'en présence de l'allantoïnase seule. Une foule de graines produisent ce résultat, lorsqu'on les laisse fermenter spontanément dans l'eau, à 40°, en présence ou non de cyanure, qui, sans action sur l'allantoïnase, suspend complètement l'activité de l'uricase.

Le dosage spectrophotométrique de l'acide allantoïque dans des graines soumises à ces conditions nous a ainsi révélé la présence de l'acide urique dans : le Blé, l'Ortie, le Navet, le Cresson, la Fève, le Mélilot, la Coronille, le Lupin blanc, la Gesse, le Concombre.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE L'ACIDE URIQUE PAR L'ANALYSE. — Du Mélilot officinal ou de Sibérie, du Trèfle incarnat et de la Fève des marais (graines), nous avons isolé l'acide urique rigoureusement pur à l'analyse, en mettant successivement en œuvre une précipitation argentico-magnésienne et deux précipitations mercuriques.

TECHNIQUE. — Placer en contact une heure, avec dix fois leur poids d'eau glacée, les

(1) MIDZUHO SUMI, *Biochemische Zeitschrift*, t. CXCIV, 1928, p. 161 ; *Chem. Centralblatt*, t. I, 1929, p. 2545.

(2) CZAPEK, *Biochemie der Pflanzen*, 3^e édition, t. III, 1925, p. 193 et 203.

(3) M. MOLLIARD, *Comptes Rendus*, t. CLIII, 1911, p. 958.

(4) A. NÉMEC, *Biochemische Zeitschrift*, t. CXII, 1921, p. 286.

(5) R. FOSSE, A. BRUNEL et P. DE GRAEVE, *Comptes Rendus*, t. CLXXXIX, 1929, p. 189 ; t. CXC, 1930, p. 79.

graines finement broyées ; centrifuger et déféquer les macérations par le tungstate de soude et l'acide sulfurique, puis par la mixture magnésienne ; précipiter les purines par l'azotate d'argent ammoniacal ; traiter à chaud le dépôt par l'acide sulfurique dilué ; précipiter la liqueur par le sulfate acide mercurique ; chauffer le dépôt avec l'acide chlorhydrique ; refroidir et laver les cristaux obtenus à l'alcool ; les dissoudre dans de l'eau bouillante et précipiter de nouveau par le sulfate de mercure ; chauffer l'urate mercurique avec l'acide chlorhydrique ; refroidir, laver les cristaux à l'alcool et les dissoudre dans de l'eau bouillante : l'acide urique pur cristallise par refroidissement.

TENEUR EN ACIDE URIQUE DE QUELQUES GRAINES.

| Noms. | Acide urique par kilogramme de plante. |
|--|---|
| <i>Faba vulgaris</i> (Fève des marais)..... | 0,230 |
| <i>Melilotus officinalis</i> (Mélilot)..... | 0,250 |
| <i>Trifolium sativum</i> (Trèfle violet)..... | 0,240 |
| <i>Sorghum halepense</i> (Sorgho d'Alep)..... | 0,176 |
| <i>Coronilla varia</i> (Coronille variée)..... | 0,130 |
| <i>Lepidium sativum</i> (Cresson alénois)..... | 0,108 |
| <i>Acer campestre</i> (Érable champêtre)..... | 0,054 |
| <i>Ricinus major (communis)</i> (Ricin)..... | 0,061 |
| <i>Lupinus albus</i> (Lupin blanc)..... | 0,048 |
| <i>Glycina sola</i> (Soja à grain jaune)..... | 0,030 |

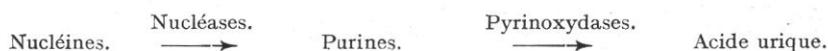
L'ACIDE URIQUE EST DONC UN PRINCIPE NATUREL DES VÉGÉTAUX COMME DES ANIMAUX.

SEPTIÈME PARTIE

CONCLUSIONS

I. L'acide urique est la source d'où dérivent : l'allantoïne racémique, ses deux isomères optiques, l'acide allantoïque et une partie de l'urée et de l'ammoniaque formées par les plantes.

L'azote de l'acide urique dérive, chez les végétaux comme chez les animaux, des nucléïnes :



Il passe, ensuite, successivement à l'état d'allantoïne et d'acide allantoïque, grâce aux ferments uricase et allantoïnase.

L'origine urique de l'acide allantoïque et le mécanisme de sa formation sont comme inscrits dans les graines. A l'état de vie ralentie, une foule d'entre elles contiennent l'acide urique, accompagné ou non d'allantoïne, d'uricase et d'allantoïnase. Plusieurs renferment simultanément tous ces uréides et tous ces ferments, liés entre eux par la relation :



DISTRIBUTION DE CES URÉIDES ET FERMENTS DANS QUELQUES GRAINES (I).

| Noms. | Acide urique (*). | Uricase. | Allantoïne (*). | Allantoïnase. | Acide allantoïque (*). |
|------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|---------------|------------------------|
| <i>Acer pseudoplatanus</i> | 0,054 | + | 0,096 | + | 0,054 |
| <i>Cicer arietinum</i> | — | + | + | + | — |
| <i>Faba vulgaris</i> | 0,300 | + | — | + | — |
| <i>Genista scoparia</i> | 0,045 | + | 0,065 | + | trace |
| <i>Hordeum vulgare</i> | — | — | + | — | — |
| <i>Lathyrus latifolius</i> | — | + | 0,14 | + | 0,302 |
| <i>Lupinus albus</i> | 0,048 | — | 0,056 | + | — |
| <i>Melilotus officinalis</i> | 0,250 | + | 0,08 | + | — |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | — | + | + | + | + |
| <i>Pisum sativum</i> | — | + | + | + | + |
| <i>Soja hispida</i> | 0,03 | + | 0,05 | + | 0,06 |
| <i>Triticum sativum</i> | 0,078 | — | 0,196 | — | 0,04 |

(*) En grammes par kilogramme de plante sèche.

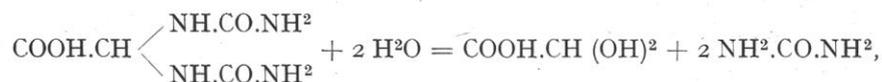
(1) R. FOSSE, P. DE GRAEVE et P.-E. THOMAS, *Comptes Rendus*, t. CXCVI, 1933, p. 883.

Trifolium sativum :

| | | | | | |
|----------------------------|-------|---|------|---|-------|
| Trèfle violet..... | 0,266 | + | 0,07 | + | 0,107 |
| Trèfle incarnat..... | 0,06 | + | 0,1 | + | trace |
| <i>Vicia sativa</i> | 0,031 | + | 0,38 | + | — |
| <i>Zea mays</i> | — | + | + | — | — |
| <i>Urtica dioica</i> | trace | — | 0,09 | — | 0,314 |

(*) En grammes par kilogramme de plante sèche.

2. Le rôle physiologique de substance uréogène, que possède l'acide allantoïque, découle de sa faculté de libérer avec une extrême facilité ses composants, l'urée et l'acide glyoxylique, par hydrolyse, sans qu'il soit nécessaire de recourir à une action diastasique. La réaction :

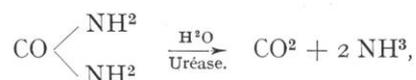


se produit en milieu acide des plus faibles.

Tandis qu'à $p\text{H} = 7,3$ l'acide allantoïque reste inaltéré, après cinq jours à la température ordinaire, à $p\text{H} = 6,8$, dans les mêmes conditions, l'acide glyoxylique fait déjà son apparition.

3. Le métabolisme de l'azote d'origine urique atteint sa dernière étape, grâce à un autre ferment, l'uréase, fort répandu chez les végétaux, où il accompagne couramment l'uricase et surtout l'allantoïnase.

En hydratant l'urée, non directement assimilable par la plante :



l'uréase lui procure son aliment azoté par excellence, l'ammoniaque, qui lui est absolument indispensable pour réaliser la synthèse de ses protides et concourt ainsi au même but que les nombreux ferments désaminants des acides aminés issus des albuminoïdes.