MÉMOIRES ORIGINAUX

LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE DANS L'ÉTUDE DU LAIT LE LAIT AU POINT DE VUE COLLOÏDAL RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DE LA PRÉSURE

par Ch. PORCHER,

Docteur ès sciences physiques

(Suite)

LE LAIT EST UNE SOLUTION COLLOÏDALE

Le lait envisagé seulement comme une solution colloïdale ou pseudo-solution constitue un ensemble fort complexe aussi.

La richesse du lait en colloïdes. — Chez les mammifères, le lait est, après le sang, le liquide de l'organisme qui renferme le plus de colloïdes (a).

Nous ne dirons pas qu'il y a là des raisons de finalité, car s'exprimer ainsi ne résoud pas la question. Constatons toutefois qu'il est indispensable, pour l'alimentation du jeune qui ne reçoit que du lait, de trouver dans ce liquide tout ce qui est nécessaire pour échafauder la trame protéique des tissus, d'où la nécessité de l'existence de protéines dans le lait. Au surplus, le mode de formation du lait, comme l'histologie le montre, implique fatalement la présence dans cette sécrétion d'une quantité abondante de substances protéiques (32, 33).

La sécrétion lactée est formée, en somme, par la fonte partielle d'une cellule ; c'est le protoplasma de celle-ci dans son ensemble qui constitue la sécrétion, sans que nous ayons pour l'instant à faire de distinction entre cristalloïdes et colloïdes. *Il est donc rationnel d'envisager le lait comme un morceau de tissu* ; or, les tissus des êtres vivants sont presque entièrement formés de colloïdes.

Si la comparaison entre le lait et le sang, sur la base de la richesse de l'un et de l'autre en protéines, est suggestive, les conséquences à en tirer ne vont guère plus loin. Par contre, la comparaison entre les autres sécrétions et la sécrétion lactée est d'un plus vif intérêt.

Les autres sécrétions, quel qu'en soit le type : salivaire, sudoripare, rénale..., ne contiennent normalement pas de colloïdes, ou du moins, n'en renferment-elles que des traces ; le lait, au contraire, en contient des quantités très grandes.

a) Certes, il n'est pas exact de parler de substances colloïdales, car, c'est toujours d'un état colloïdal de la matière dont il s'agit, mais, c'est par ellipse que l'on confond ces deux expressions que nous pourrions employer l'une pour l'autre.

(32) Ch. PORCHER. — La sécrétion lactée in *Traité de Physiologie normale et pathologique* de G. H. Roger et L. Binet, Tome XI, pp. 393-381. Masson et C^{ie} Ed., Paris, 1927.

(33) J. VERNE. — *Le protoplasma cellulaire. Système colloïdal*. G. Doin, Ed., Paris, 1923.

Les colloïdes du lait sont mélangés intimement les uns aux autres, se « protégeant » souvent l'un l'autre ; c'est cette « protection » qui assure la stabilité du mélange.

L'hétérogénéité micellaire des colloïdes du lait. — Nous avons vu que l'ensemble des substances qui se trouvent à l'état colloïdal dans le lait est hétérogène, déjà au point de vue des dimensions des particules. Tel colloïde a des micelles extrêmement fins ; cette finesse est cause de sa stabilité. Tel autre, au contraire, a des micelles de dimensions beaucoup plus considérables ; sa stabilité sera assurée en partie grâce à la protection de colloïdes voisins, et en général de même nature, dont les micelles sont nettement plus petits.

La stabilité des colloïdes du lait résulte aussi pour une part de ce que les colloïdes naturels sont toujours aqueux. Le lait est, en somme, un *hydrosol* ; or, l'eau est un liquide ionisant, et c'est là une raison de la stabilité des solutions colloïdales préparées avec elle, alors que celles que l'on réalise avec l'éther et le benzène, par exemple, liquides non ionisants, n'ont pas de stabilité.

L'état colloïdal est l'état normal des substances à poids moléculaire élevé que l'on trouve dans les sécrétions naturelles. Quelques-unes de ces substances ne sont jamais connues d'ailleurs qu'à l'état de colloïdes ; c'est le cas de l'albumine et de la globuline du lait, de la caséine également ; aussi, les appelle-t-on **colloïdes permanents**.

L'hétérogénéité chimique des colloïdes du lait. — Au point de vue chimique, les colloïdes du lait forment un mélange hétérogène puisqu'on y trouve :

a) Des substances **organiques** : protéines.

b) Des substances **minérales** : phosphates de calcium et aussi de magnésium.

Au sujet des sels de cette dernière base, nous dirons une fois pour toutes que, dans le lait, comme d'ailleurs dans beaucoup de sécrétions animales, on trouve toujours une petite proportion de magnésie à côté de la chaux ; mais il ne semble pas, pour l'étude chimique et biochimique qui constitue l'essentiel de ce travail, que la magnésie intervienne d'une façon différente de celle de la chaux. Aussi, dans les liqueurs synthétiquement préparées qui nous serviront dans nos expériences, négligerons-nous la magnésie, quitte à la remplacer par la quantité de chaux moléculairement correspondante.

L'existence des sels à côté des protéines dans l'ensemble des colloïdes du lait montre, une fois de plus, la *grande diversité des fonctions chimiques qui peuvent exister à l'état colloïdal*.

Les sels minéraux qui sont nettement amorphes revêtent toujours l'aspect colloïdal ; c'est le cas des phosphates tricalcique et trimagnésien que l'on trouve dans le lait.

Comme J. DUCLAUX (34) le fait à juste titre remarquer, ce qui importe dans l'étude de ces sels, ce n'est pas de les étiqueter comme colloïdaux, mais c'est de savoir comment ils ont été formés. Le mécanisme de cette formation nous échappe dans l'étude de la sécrétion naturelle, mais il n'en est plus ainsi lorsque nous nous adressons au lait synthétiquement préparé.

La faculté de prendre l'aspect colloïdal n'est donc pas liée à une constitution chimique particulière, puisque, dans le lait, nous la voyons appartenir à des composés très différents, d'une part, des composés salins : phosphates et caséinates de calcium ; d'autre part, albumine et globuline.

Les colloïdes ont été distingués par le pouvoir d'absorber plus ou moins d'eau, en colloïdes *hydrophiles* ou *lyophiles*, et en colloïdes *hydrophobes* ou *lyophobes*. (a : 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). Dans ceux-là, se rangent les colloïdes organiques naturels.

Tous les colloïdes que l'on rencontre dans le lait sont hydrophiles et, lorsqu'ils précipitent, ils retiennent toujours une grande quantité d'eau.

Les colloïdes hydrophobes, au contraire, n'ont aucune affinité pour l'eau, et ils précipitent en poudre presque anhydre ; c'est ce qu'on obtient avec les métaux colloïdaux.

Cette distinction a été critiquée, mais en tout cas, elle a une valeur relative qu'il ne faut point négliger.

Le sens et l'aspect des réactions qui se passent en milieu colloïdal. — L'état colloïdal ne conditionne pas les réactions qui dépendent étroitement de la nature chimique des corps qui interviennent ; *il n'en trouble pas le sens, il ne fait qu'en modifier l'aspect*, et nous compren-

(34) J. DUCLAUX. — *Les Colloïdes*. 3^e éd. Gauthier-Villars et C^{ie} Ed., Paris, 1926.

a) Pour l'étude du lait au point de vue colloïdal, en dehors du livre de J. Duclaux (31), nous avons consulté avec intérêt les ouvrages et publications de :

(35) A. G. ROCASOLANO. — *Eléments de chimie-physique colloïdale*. Collection Scientia, Gauthier-Villars Ed. Paris, 1920.

(36) W. CLAYTON. — *Colloid Problems in dairy Chemistry (Milk, Butter, Cheese, Margarine and Ice-cream)*. Second report on colloid Chemistry and its general and industrial applications. 2^e éd. — *Depart. of Scient. and Ind. Research*. Londres, 1921.

(37) P. BARY. — *Les Colloïdes. — Leurs gélées et leurs solutions*. Dunod, éd., Paris, 1921.

(38) L. MEUNIER. — *Chimie des colloïdes et applications industrielles*. J. B. Baillièrre et fils éd., Paris, 1924.

(39, 40, 41) A. LUMIÈRE. — a) *Rôle des colloïdes chez les êtres vivants*. Masson et C^{ie} éd., Paris, 1921.

b) *Théorie colloïdale de la biologie et de la pathologie*. Et. Chiron éd., Paris, 1922.

c) *Théorie colloïdale de la vie et de la maladie*. L. Sézanne éd., Lyon, 1925.

(42) R. ZSIGMONDY. — *Traité de chimie colloïdale*. — Edition française. Traduction de J. Andy, C. Gazel et J. Lejeune. Dunod éd., Paris, 1926.

(43, 44) W. KOPACZEWSKI. — a) *Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine*. Vigot frères éd. Paris, 1923.

b) *Introduction à l'étude des colloïdes. Etat colloïdal et ses applications*. Gauthier-Villars et C^{ie} éd., Paris, 1926.

drons mieux ceci lorsque nous étudierons plus loin en détail la notion de « protection » exercée dans le lait par certains colloïdes vis-à-vis des autres.

Faisons remarquer encore, que, dans le lait, les densités des micelles, du moins celles des plus importants pour nous : caséinate et phosphates, ne sont pas très éloignées de celle de l'eau, *ce qui est encore un élément de stabilisation*. Pour les précipiter, il faut en général des doses massives d'électrolytes ; c'est ainsi que nous parlerons, de NaCl ou de SO_4Mg à saturation.

Avec les colloïdes hydrophobes, au contraire, des traces de certains sels suffisent à provoquer leur coagulation.

Dans ce travail, nous préparerons des édifices que nous avons la prétention de comparer aux édifices correspondants rencontrés dans la sécrétion naturelle. Est-il légitime de rapprocher ceux-ci de ceux-là ? Nous donnerons à cette question une réponse positive, mais notons dès maintenant qu'en admettant la similitude chimique des premiers et des seconds, leur ressemblance comme systèmes dispersés n'est peut-être pas aussi forte, car les colloïdes artificiels sont toujours plus facilement résolubles à l'ultramicroscope que les colloïdes organiques naturels correspondants.

Il n'est pas douteux que les processus cellulaires conduisent à des dispersions micellaires plus poussées, ne pouvant être que grossièrement imitées par les procédés mis en œuvre dans les laboratoires. Néanmoins, constatons qu'il est déjà fort intéressant de préparer un complexe analogue à celui du lait, parce que, si dans la chimie minérale, se multiplient chaque jour les colloïdes que l'on peut préparer, les colloïdes de synthèse sont plutôt rares en chimie organique.

La préparation des composés colloïdaux peut se faire, soit en dégradant des particules plus grosses, soit, au contraire, en condensant des molécules plus petites.

Le premier cas répond principalement à la préparation des métaux colloïdaux par le procédé de Bredig consistant en quelque sorte à arracher du métal, au sein de l'eau, sous l'action d'un puissant courant alternatif, des particules extrêmement fines qui resteront dispersées dans le liquide. C'est la méthode dite encore de « pulvérisation électrique ». Elle est sans objet pour ce travail.

Principe de la préparation du système colloïdal essentiel du lait. — Autrement intéressante est la seconde méthode avec laquelle on obtient des particules dispersées par condensation de molécules plus petites qui ont réagi les unes sur les autres.

Nous l'appliquerons plus spécialement à la préparation du complexe : *caséinate de calcium + phosphates de calcium* dans le détail de laquelle nous entrerons plus tard.

On fera du caséinate de calcium par addition de chaux à la caséine. On fera du phosphate de calcium colloïdal par addition d'acide phosphorique à la chaux ; or, cet acide et cette base, à l'état libre, affectent l'état cristalloïde. En somme, on fera prendre l'état colloïdal à quelques substances qui se trouvaient en solution parfaite avant de s'unir.

Nous aurons ainsi obtenu par synthèse un système colloïdal *dont presque toute la masse est organique*. En réalité, cette synthèse est partielle, car la caséine elle-même n'a jamais été obtenue par synthèse ; mais là n'est pas la question, et s'il était bon de retenir cette observation, constatons tout de suite que sa valeur est réduite.

Ce qui importe, c'est de pouvoir obtenir synthétiquement l'édifice qui ressemble étrangement à celui que l'on trouve dans le lait et auquel appartient la propriété caractéristique de cette sécrétion : coaguler par la présure. Il nous sera loisible d'en modifier la **physionomie chimique** et la **physionomie colloïdale** à notre gré ; la physionomie chimique, en le chargeant plus ou moins en phosphates de calcium, en faisant varier sa réaction, c'est-à-dire son *pH* ; la physionomie colloïdale, selon que nous opérerons à *chaud* ou à *froid*, en liqueurs diluées ou en liqueurs concentrées, pour fixer colloïdalement le phosphate de calcium sur le caséinate de calcium préalablement obtenu.

VON WEIMARN a montré que lorsqu'on prépare les colloïdes salins par condensation de molécules acides et basiques, les dimensions des particules dépendent pour beaucoup de la concentration des liqueurs : les particules les plus fines étant obtenues avec les solutions très étendues.

Nous ajouterons enfin que *la température joue un rôle important ici*. Selon que nous fixerons le phosphate de calcium dans le complexe à très basse température, — dans l'eau glacée notamment —, ou à une température plus élevée, — la température ordinaire et au-dessus, — il est certain que la constitution colloïdale est modifiée. Les particules les plus fines seront obtenues à la plus basse température. Ceci, d'ailleurs, est d'observation courante en analyse chimique, puisque nous savons que pour éviter l'état colloïdal des précipités, il convient d'opérer à chaud.

Bien que le lait écrémé soit homogène, ce n'est qu'en apparence car les systèmes colloïdaux qu'il renferme sont, en réalité, hétérogènes. Ils comprennent, en effet, deux phases : 1^o) le milieu : l'eau qui agit comme dissolvant, — c'est une phase —, et 2^o) les corps qui y semblent dissous, mais qui s'y trouvent, en somme, en suspension, à l'état de grande division, en contact avec le dissolvant par une grande surface, — c'est une autre phase. C'est d'ailleurs sur cette surface considérable que portera l'attaque des réactifs chimiques ainsi que celle du ferment-lab.

Cette hétérogénéité des systèmes colloïdaux est nettement mise en valeur par l'ultramicroscope qui nous montre, en outre, que s'il est des diffé-

rences dans les grosseurs des grains des divers colloïdes que nous trouvons dans le lait, *il est, également pour un même colloïde, une gamme de dimensions* jouant cependant dans des limites plus restreintes que celles de l'ensemble des colloïdes du lait. Les colloïdes sont donc bien insolubles dans le liquide disperseur, et ils forment avec lui un système incontestablement hétérogène. *Toutefois cet état physique ne nuit pas à leur ionisation, quand il s'agit de colloïdes salins, ainsi qu'aux réactions qu'ils peuvent avoir avec les sels cristalloïdes voisins.*

Au lieu de commencer par l'étude des colloïdes minéraux, nous préférons aborder tout de suite celle des colloïdes protéiniques. Nous comprendrons mieux après leur étude l'importance et le sens de l'action « protectrice » qu'ils exercent sur les matières minérales à l'état colloïdal : les phosphates insolubles de calcium.

LES COLLOÏDES PROTÉINIQUES

Les composés organiques qui existent à l'état colloïdal dans le lait sont des protéines ; *ils constituent un mélange.*

LES TROIS PROTÉINES ESSENTIELLES DU LAIT. — Il n'est plus contestable aujourd'hui que les protéines du lait de vache se ramènent essentiellement à trois : la **caséine**, l'**albumine** et la **globuline**. (45).

Les humeurs normales (sang) et pathologiques (liquides d'ascites, etc...) de l'organisme, sont très riches en protéines. Or, le voisinage dans le même milieu sous la forme colloïdale de substances chimiques de structures voisines fait que leur *complète séparation* est entourée de telles difficultés qu'il est peut-être impossible de la réaliser d'une manière totale.

Il en est du lait comme du sang, mais peut-être à un moindre degré. Il est assez facile de séparer la caséine des deux autres protéines qui l'accompagnent : l'albumine et la globuline, mais encore faut-il que les proportions de ces dernières, et notamment celles de la globuline, ne soient pas trop élevées. Il est moins aisé de séparer, à leur tour, albumine et globuline ; toutefois, on y arrive assez bien avec la méthode à l'acétone. (22, 23, 23').

La conception de E. Duclaux. — L'erreur de E. DUCLAUX, dont l'esprit si lumineux a jeté sur le lait tant d'aperçus originaux, a été de vouloir ranger les protéines du lait sous un même chef : la caséine, et d'y reconnaître à côté d'une caséine en *suspension*, une caséine en *solution* (46, 47), en ne basant la distinction ainsi établie que sur des

(45) Certains auteurs en reconnaissent même une quatrième. Voir Th. B. Osborne et A. J. WAKEMAN : The proteins of cow's milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **33**, 1 ; mais s'agit-il d'une substance propre ou d'un produit dérivé, ceci est encore sujet à discussion. En tout cas, son taux serait fort réduit.

(46) E. DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1879-1880, n° 5.

(47) E. DUCLAUX. — *Le lait. Etudes chimiques et microbiologiques*. J. B. Baillière et Fils, éd., 1887.

différences d'aspect physique, alors que le point de vue chimique ne devait pas être laissé hors du débat. Il était évidemment fort séduisant de ramener toutes les protéines à un type unique, et E. DUCLAUX ne manque pas, avec sa dialectique, de s'efforcer à y arriver.

L. LINDET (48, 49, 50) admet la même conception, et M. BEAU, élève de ce dernier auteur, dans son livre récent (51) s'en tient à l'expression de *lactéine* pour désigner les matières protéiques du lait, c'est-à-dire « l'ensemble des matières albuminoïdes du lait à l'état où cet ensemble se trouve dans le lait », ceci sans vouloir faire aucune hypothèse sur la constitution de cet ensemble (52).

Il y a lieu de regretter l'usage du mot *lactéine*, d'un emploi commode sans doute, mais qui apporte, sous prétexte de simplification, une véritable confusion dans l'étude de la question.

A la page 7 de son livre, BEAU dit : « La lactéine est dans un état intermédiaire, peu connu exactement jusqu'à ces dernières années, encore même obscur actuellement, l'état colloïdal, état d'équilibre instable mi-solide, mi-soluble. »

Il ne faut pas s'exagérer comme à loisir les difficultés qu'entraîne l'état colloïdal et peut-être comprendra-t-on mieux à la fin de ce travail que, sans doute, nous avons raison lorsque nous venons dire, après tant d'auteurs, que les trois protéines essentielles du lait sont nettement différenciées, que leur séparation suffisamment complète est possible, que chacune a un rôle déterminé et qu'il est relativement facile de le préciser. La seule justification de l'emploi par M. BEAU de son expression *lactéine* pour désigner l'ensemble des protéines du lait se trouve dans le travail en usine, mais non pas dans l'étude scientifique de ces protéines au laboratoire, laquelle fait appel aux méthodes les plus délicates.

M. BEAU, en effet, dans son livre, relève qu'« il y a autant de caséines que de modes de préparation, et particulièrement, d'agents coagulants ». Le grand nombre des sortes de caséine dans le cadre de ces deux types différents : *caséine-acide* et *caséine-présure* s'explique quand on envisage les conditions de leur fabrication industrielle : soins plus ou moins grands apportés, température, « fraîcheur » du lait, etc. Ceci fera l'objet de développements ultérieurs.

Pour séparer caséine, albumine et globuline, bien des moyens s'offriront à nous, tant chimiques que physiques, et quand nous aurons signalé :

a) l'emploi de la *filtration sur bougies de porcelaine* ; b) celui de l'*ultra-*

(48) L. LINDET. — Sur les caséines solubles du lait. *Rev. Gén. du lait*, 1911-1914, 9, 395.

(49) L. LINDET. — Sur les albuminoïdes solubles du lait. 2^e mémoire de l'Inst. Nation. Agron., 1913, 2^e série, 12, fasc. 2.

(50) L. LINDET. — Les matières albuminoïdes du lait. *Le Lait*, 1921, 1, 161.

(51) M. BEAU et Ch. BOURGAIN. — *L'industrie fromagère. I. La science fromagère.* — J. B. Baillière et fils, éd. 1926.

(52) M. BEAU. — Les matières albuminoïdes du lait. — *Le Lait*, 1921, 1, 19.

filtration ; quand nous aurons dit que l'on peut recourir aux acides soigneusement maniés, enfin à la présure, nous jugerons ainsi de la diversité des outils, si l'on peut s'exprimer ainsi, qui nous permettront de ne pas confondre une protéine du lait avec les deux autres. Nous ajouterons : a) que *leurs façons différentes de se comporter vis-à-vis des réactifs précipitants* : sels neutres des métaux alcalins et alcalino-terreux et sels magnésiens ; b) que l'*analyse chimique* qui décèle la présence du phosphore dans la caséine et son absence dans les deux autres protéines ; c) que les *différences qualitatives et quantitatives des divers acides-aminés* que l'on trouve dans l'une et dans l'autre, etc., que tout cela apporte les preuves d'une distinction nettement tranchée entre la caséine, l'albumine et la globuline. Confondre ces trois protéines a le grand inconvénient de masquer des notions importantes dont nous ferons état un peu plus loin, notamment celles de **protection** et de **réversibilité**.

Nous allons étudier successivement les différences chimiques, physiques et biochimiques qui existent entre la caséine, l'albumine et la globuline. Si nous insistons sur certaines d'entre elles, il en est d'autres que nous ne ferons qu'effleurer.

L'ALBUMINE ET LA GLOBULINE

I. — DIFFÉRENCES CHIMIQUES. — A. Composition élémentaire. —

La composition élémentaire de la caséine, de l'albumine et de la globuline a été étudiée par beaucoup d'auteurs ; elle est, peut-on dire, dépourvue d'intérêt, sauf en ce qui concerne la *présence régulière du phosphore dans la caséine, son absence dans la lactalbumine et dans la lactoglobuline*. L'albumine et la globuline du lait ressemblent beaucoup d'ailleurs si elles ne sont identiques, aux composés correspondants du sang de la même espèce ; nous reviendrons sur ce point.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (53) ont récapitulé les différences dans la composition élémentaire dans le tableau suivant :

TABLEAU VIII

	Caséine	Lactalbumine	Lactoglobuline
	%	%	%
C	53,50	52,51	51,88
H	7,13	7,10	6,96
N	15,80	15,43	15,44
S	0,72	1,92	0,86
P	0,71	trace	0,24
O	22,14	23,04	24,64

Il semble que les traces de phosphore trouvées par eux dans l'albumine et le taux non négligeable du même élément qu'ils donnent pour la

(53) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Method for Preparing Ash free Casein and Paracasein. — *Journ. of biol. Chem.* 1913, **14**, 203.

lactoglobuline, — beaucoup plus difficile à séparer en partant notamment du lait de vache lequel en contient très peu, quelques centigrammes par litre, — sont dus à ce qu'ils ont eu affaire à des produits impurs.

B. Les acides-aminés. — L'hydrolyse des matières protéiques, telle qu'elle a été réalisée par tous ceux qui se sont occupés de cette question, nous montre qu'aujourd'hui nous connaissons presque tous les acides-aminés de la caséine avec leur quantum respectif. Peut-être a-t-on poussé moins loin l'hydrolyse de l'albumine et de la globuline. Ce sont les acides-aminés de la caséine qui nous intéresseront le plus, et dans l'étude que nous ferons en particulier de cette protéine, nous y reviendrons en détail.

II. — DIFFÉRENCES PHYSICO-CHIMIQUES. — Tandis que la caséine existe sous la forme saline en affectant l'aspect de micelles d'assez grosses dimensions, l'albumine et la globuline sont, en raison de la petitesse de leurs particules, considérées comme des *colloïdes moléculaires*. Nous comprendrons mieux cette distinction nécessaire quand nous verrons un peu plus loin comment nous séparerons les diverses protéines du lait. Retenons que *ce sont les dimensions extrêmement réduites des particules dispersées de l'albumine et de la globuline qui leur donnent un caractère protecteur* marqué vis-à-vis du caséinate, et encore, aurons-nous à établir une différence appréciable entre l'albumine et la globuline, celle-ci assurant dans des proportions beaucoup plus considérables que celle-là une protection efficace. L'étude synthétique du lait de femme, dont nous parlerons incidemment dans ce travail, permet de l'affirmer de la façon la plus nette.

Nous ne saurions remettre plus loin l'étude générale de la *protection* dans le lait, à laquelle se joint étroitement celle de *réversibilité*.

LA RÉVERSIBILITÉ. — On dit qu'un colloïde est réversible lorsque, sa solution ayant été évaporée *avec précaution*, le résidu obtenu peut être de nouveau remis en contact avec de l'eau et redonner ainsi une liqueur analogue à celle dont il avait été extrait.

Dans le lait, nous avons quatre colloïdes principaux : le caséinate calcique et le phosphate calcique étroitement liés, d'une part, l'albumine et la globuline, d'autre part.

Le caséinate calcique est un colloïde réversible. Sa solution évaporée graduellement, même à chaud, donne un résidu qui se redissout bien dans l'eau, peut-être pas tout à fait en récupérant le degré de dispersion micellaire antérieur, mais en donnant toutefois une liqueur stable.

Avec l'albumine et la globuline, il n'en est pas toujours de même, parce que les précautions exigibles lors de l'évaporation d'une solution colloïdale ne sont pas toujours prises. Si l'on opère à des températures peu élevées, le résidu pourra entrer de nouveau en solution ; mais dans

l'industrie, les dessiccations se font le plus souvent à chaud et à une température telle, qu'albumine et globuline peuvent se trouver partiellement coagulées. Si cette coagulation ne nous est pas apparente lorsqu'on s'adresse au lait, c'est parce que les flocons très fins qui se forment se collent en quelque sorte sur les particules de caséinate de calcium ; elle n'en est pas moins réelle, comme nous le montre le procédé de différenciation chimique du lait cru et du lait cuit par la recherche de l'albumine sur le sérum sulfato-magnésien à saturation.

Dans le complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium, c'est incontestablement *le phosphate de calcium qui est le plus fragile des deux colloïdes en présence* ; c'est lui qui subira la plus forte modification au point de pouvoir être considéré comme un *colloïde vraiment irréversible*. L'action de la chaleur a peut-être pour but de lui faire perdre son aspect colloïdal, mais elle est, en outre, accompagnée de réactions chimiques sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Il y a donc lieu de ne pas toujours considérer la réversibilité, et surtout l'influence de la dessiccation qui nous permet d'en juger la signification, sous un aspect uniquement colloïdal.

Influence de la dessiccation sur l'état colloïdal du lait. —

Le lait possède un édifice salin complexe et important, et au cours de la dessiccation souvent précédée d'une concentration, il y a des changements d'équilibre qui ne sont pas sans entraîner des modifications notables. Pour que la dessiccation amène un trouble minimum, il faut qu'elle soit pour ainsi dire instantanée ; c'est ce qui a lieu avec le procédé dit du « brouillard », dans lequel le lait est réduit en un brouillard impalpable qui vient se former au centre d'un violent courant d'air chaud. La dessiccation est extrêmement rapide, et en même temps, partiellement adiabatique, si bien qu'elle s'accompagne d'un abaissement de température à l'intérieur des gouttelettes infiniment petites qui constituent le brouillard. Mais, quand la dessiccation n'est pas très rapide, comme dans le « procédé des cylindres », qu'elle se fait à une température dépassant nettement 100°, et sous des dimensions considérablement plus grandes que celles d'une des gouttelettes du sus-dit brouillard, il y a altération, d'abord du colloïde le plus fragile : le phosphate calcique, et ultérieurement, avec l'aide du temps, de l'autre colloïde qui lui est associé dans le complexe naturel : le caséinate de calcium. L'état colloïdal de ces deux composés est atteint, et ils ne peuvent plus redonner avec l'eau une pseudo-solution vraiment homogène.

Influence de la congélation sur l'état colloïdal du lait. —

La même irréversibilité du complexe s'accuse vis-à-vis de la congélation, processus physique qui n'affecte nullement les solutions cristalloïdes. La congélation du lait aboutit à un produit qui, remis en présence de l'eau, ne redonne pas une liqueur homogène comme le lait originel.

En général, d'ailleurs, les hydrosols ne résistent pas non plus à la congélation, le dissolvant se séparant du colloïde. Toutefois, pour les raisons que nous avons indiquées tout à l'heure et qui tiennent à l'action des températures assez élevées sur les colloïdes, l'action de la congélation est moins brutale.

LA « PROTECTION » DANS LE LAIT. — Pour résumer ce qui vient d'être dit sur la réversibilité, nous constatons qu'albumine et globuline s'opposent nettement aux deux autres colloïdes : caséinate de calcium et phosphate de calcium, envisagés isolément. Nous pourrions dire maintenant que ce sont *les colloïdes réversibles qui sont les protecteurs des colloïdes irréversibles*.

Sous un autre aspect, nous dirons également que *les colloïdes moléculaires : albumine et globuline, sont les protecteurs des colloïdes salins : caséinate et phosphates, à plus gros micelles*.

La chimie colloïdale du lait est dominée nettement par les phénomènes de protection, protection *double, étagée*, dirions-nous plutôt, car, si dans le complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium, celui-là protège celui-ci, le complexe lui-même sera à son tour protégé *dans le lait* par l'albumine et par la globuline. La proportion du colloïde protecteur vis-à-vis de celle du colloïde protégé est évidemment un élément important de la chimie colloïdale du lait. Elle nous permettra de comprendre l'allure si différente que prennent certains laits vis-à-vis de la présure.

Le phosphate de calcium, avons-nous dit, est *l'élément fragile du complexe* et, de toute nécessité, il doit être protégé. Lorsqu'on le prépare en l'absence de tout colloïde, son instabilité est notoire, mais on sait qu'il suffit d'une petite quantité de gélatine ou d'une plus grande quantité d'albumine, pour voir cette instabilité disparaître. Il est possible, en effet, d'obtenir très facilement du phosphate de calcium colloïdal affectant tout à fait l'aspect qu'il peut avoir dans le lait, dès l'instant que sa formation se fait en présence d'un colloïde stabilisateur. Nous savons ce qu'il est dans le complexe, mais on peut déjà se servir de gélatine ou d'albumine au lieu de caséinate de calcium.

DE TONI (54), dans ses expériences relatives à la précipitation du phosphate de calcium colloïdal au sein de colloïdes de natures chimiques très variées : gélatine, gomme, sérum sanguin, amidon, etc., montre que la stabilité de la préparation est fonction, d'une part, de la concentration du phosphate de calcium et, d'autre part, de celle du colloïde protecteur. Le pouvoir protecteur des colloïdes auxquels on peut recourir est d'ailleurs très variable. La gélatine semble être un de ceux les mieux caractérisés pour tenir en suspension colloïdale le phosphate de calcium. Ceci n'a pas lieu de nous surprendre, car on sait, en effet,

(54) DE TONI. — Ueber Kolloides Kalzium phosphate. — *Kolloides Zeitschr.*, 1921, 28, 145

combien en général son pouvoir protecteur est grand, et nous aurons l'occasion de l'évoquer lorsque nous parlerons des recherches d'ALEXANDER et BULLOWA dans leur tentative d'explication du mécanisme de l'action de la présure. Ce pouvoir protecteur est, sans doute, dans une certaine mesure parallèle au « nombre d'or » des colloïdes employés, donnée sur laquelle nous reviendrons et que nous devons à R. ZSIGMONDY (55).

Dans son travail, DE TONI montre que si pour un même taux de gélatine, on augmente la quantité de phosphate de calcium qu'on y précipite, la suspension qui était colloïdale pour les petites quantités, donne à partir d'un certain point un précipité extrêmement faible, lequel ensuite s'accroît, devient notable et conduit à des congglomérats très visibles.

Faisant jouer un rôle important à la protection du phosphate de calcium par le caséinate, nous avons, ainsi qu'il a été dit plus haut, cherché dans quelle mesure le pouvoir protecteur de la gélatine s'exerce vis-à-vis du phosphate de calcium. C'est un côté du travail de DE TONI que nous avons repris.

A 50 cm³ de gélatine à 12%, on ajoute 0,50 cm³ d'une solution de phosphate de sodium Sørensen (56) à 65 gr. au litre et 0,25 cm³ d'une solution de CaCl² à 90 gr. au litre. L'addition de CaCl² se fait goutte à goutte à la microburette, le liquide chauffé à 40° étant mis en mouvement par l'agitateur électrique.

Dans une autre série d'expériences, on double les doses de phosphate et de chlorure.

Dans une troisième série, on les quadruple, mais on chauffe ces divers milieux à des températures différentes : 65°, 100°, 125°.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU IX.

Gélatine	Température ordinaire	65°	100°	125°
—	—	—	—	—
A 12 % non chargée.	Bloc limpide.	Liquide limpide.	Limpide.	Limpide.
id. + 0 gr., 50 de phosphate de calcium.	Opalescent.	Opalescent.	Plus blanc.	Reffet blanc-jaunâtre.
id. + 1 gr. id.	Plus blanc que le précédent.	Comme à la température ordinaire.	Plus blanc.	Pas de différence.
id. + 2 gr. id.	Plus blanc encore.	Moins blanc qu'à la température ordinaire, reffet bleuâtre.	Comme à 65°.	Comme à 100°.

(55) R. ZSIGMONDY. — *Zur Erkenntnis der Kolloide*, Iena, 1905.

(56) S. P. L. SØRENSEN. — *Etudes enzymatiques*. II. Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques. *C. R. des travaux du Lab. de Carlsberg*, 1909, 8, (1^{re} livraison). Pour la préparation du phosphate bisodique, voir p. 37.

Le taux de 12 % pour la gélatine sera jugé excessif, et la protection exercée par cette quantité de protéine sur le sel de calcium est telle qu'il ne peut en sortir des résultats intéressants. Nous avons opéré avec des solutions moins fortes, à 1, 2, et 5 %. Voici les résultats obtenus.

TABLEAU X.

Gélatine	Température ordinaire	100°
A 1 %. Charge de 2 gr. de phosphate de calcium.	Liqueur visqueuse. Dépôt floconneux et liquide surnageant blanc bleuâtre.	Liquide limpide; dépôt floconneux.
A 2 %. Charge identique.	Liquide plus blanc que le précédent, dépôt moins abondant.	Dépôt floconneux.
A 5 %. Charge de 0 gr. 50 de phosphate de calcium.	Bloc opalescent.	Même aspect que la gélatine ci-dessus à 2 %
id. + charge de 1 gr.	Bloc un peu plus blanc que le précédent.	Même aspect que la gélatine ci-dessus à 2 %.
id. + charge de 2 gr.	Bloc plus blanc encore.	Dépôt, masse moins blanche.

Nous pouvons conclure de ces expériences que plus grande est la quantité de phosphate de calcium dont on provoque la formation au sein de la gélatine, plus la liqueur est blanche, qu'elle fasse bloc par refroidissement ou qu'elle reste liquide à chaud, et lorsque le taux de la gélatine dans les solutions est plus faible, le phosphate de calcium précipite.

Il était intéressant de voir ce que donneraient les charges croissantes de phosphate de sodium pour une même quantité de CaCl_2 , ainsi que des charges croissantes de CaCl_2 pour des mêmes quantités de phosphate de sodium.

De ces deux sels, l'un d'eux, vis-à-vis de la caséine est dit *coagulant* : c'est le CaCl_2 ; l'autre, le $\text{PO}_4\text{Na}^+\text{H}$ est dit *peptisant*.

Les solutions de gélatine sont à 12 %.

TABLEAU XI.

CaCl_2	Phosphate de sodium	Température ordinaire	A 100°
0,5 cm ³	1 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Bloc un peu plus blanc, homogène.
id.	2 cm ³	Bloc homogène moins blanc que le précédent.	Moins blanc.
id.	4 cm ³	Précipitation dans la masse.	Précipitation au fond du tube; gélatine transparente surnageant.
id.	8 cm ³	Encore moins blanc que le précédent, floculation très marquée.	Analogue au précédent.

II

0,25 cm ³	2 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Même aspect qu'à la température ordinaire.
0,50 cm ³	2 cm ³	Bloc opalescent, homogène.	Légèrement plus blanc différence peu sensible.
1 cm ³	2 cm ³	Même aspect.	Plus blanc, stable.

Nous voyons que malgré la qualité peptisante du phosphate disodique, l'accroissement de l'apport de ce dernier conduit à une augmentation du phosphate calcique qui finit par précipiter.

D'autres expériences, dans le détail desquelles nous n'entrons pas ici, nous ont montré que *le pouvoir protecteur de l'albumine du sang est nettement inférieur à celui de la gélatine*, mais les quantités de phosphate de calcium qui doivent être protégées dans le lait ne sont pas telles qu'il faille cependant négliger le rôle protecteur de l'albumine, rôle qui n'est pas niable et qui s'ajoute à celui du caséinate de calcium, mais en venant après lui.

L'action protectrice exercée par certains colloïdes semble être la conséquence d'un phénomène d'adsorption du colloïde protecteur par le colloïde protégé. Ce qu'on peut dire de certain, c'est que les actions qui interviennent sont des *actions de surface*; mais, en dehors de cela, on ne saurait nier que les phénomènes d'adsorption, bien qu'extrêmement généraux, sont en somme, difficilement mesurables.

Les corps **stabilisants**, c'est-à-dire qui protègent d'autres colloïdes ont en général des fonctions chimiques voisines. C'est bien le cas pour l'albumine et la globuline considérées par rapport au caséinate de calcium, mais ce ne l'est plus du tout par rapport au phosphate de calcium.

On s'est demandé comment l'action protectrice pouvait s'exercer.

C'est ainsi que J. LOEB (57, 58), étudiant la nature des forces qui déterminent la stabilité des suspensions de particules de collodion enrobées de gélatine ou d'ovalbumine, montre que lorsqu'on met en contact des membranes de collodion avec une solution à 1 % d'une protéine comme la gélatine, l'ovalbumine cristallisée, la caséine ou l'oxyhémoglobine, il se forme à la surface de la membrane une couche de protéine solide que vingt lavages à l'eau chaude n'enlèvent pas. Des forces très énergiques entrent en jeu; elles ne dépendent pas du tout de l'ionisation de la protéine, puisque la couche adhérente se fait aussi bien lorsque la protéine est au point isoélectrique que lorsqu'elle est en deçà ou au delà de celui-ci, c'est-à-dire plus acide ou plus alcaline.

Doit-on tenir compte, comme se le demande J. LOEB, des forces

(57) J. LOEB. — *Les Protéines*, Paris 1924.

(58) J. LOEB. — *La théorie des phénomènes colloïdaux*, Paris, 1925. Ces deux volumes ont été traduits par H. Mouton, F. Alcan, éd.

de valence secondaire de même ordre que celles qui interviennent dans les phénomènes d'adhésion en général ?

Le « nombre d'or ». — J. LOEB rattache la formation de cette couche de protéine sur le collodion à l'action protectrice de certains colloïdes. ZSIGMONDY (39, 48) et ses collaborateurs ont trouvé [que l'or colloïdal est précipité de ses solutions par le chlorure de sodium, et que cette précipitation peut être prévenue par l'addition à la solution de divers colloïdes parmi lesquels se trouvent des protéines. Pour faire entrer des données mesurables dans ce phénomène, ils ont défini ce qu'ils appellent le *nombre d'or*. C'est le nombre de milligrammes de substance protectrice qui suffit juste à empêcher l'agglutination des micelles d'une solution de 10 cm³ d'or colloïdal à 0,05 % auxquels on ajoute 1 cm³ de chlorure de sodium à 10 %.

Le pouvoir protecteur élevé de la globuline. — SCHULZ et ZSIGMONDY ont donné les valeurs suivantes pour les différentes protéines contenues dans le blanc d'œuf.

TABLEAU XII.

Globuline	0,02-0,05
Albumine cristallisée	2,00-8,00

Il y a, comme on le voit, une très grande différence entre le « nombre d'or » de l'albumine et celui de la globuline. Il est de 100 à 160 fois plus élevé avec celle-là qu'avec celle-ci.

G. E. HOLM, dans le chapitre VII : « Physical Equilibria of Milk », du livre de L. A. ROGERS (59), donne le *nombre d'or* de colloïdes variés :

TABLEAU XIII.

Colloïdes	Nombre d'or en milligrammes
Gélatine	0,005-0,010
Caséine	0,01 (comme caséinate d'ammonium).
Lactalbumine	0,02-0,04 (albumine et globuline du sérum du lait).
Albumine de l'œuf	0,06-0,30
Gomme arabique	0,15-0,25
Fécule	25,00

Les deux tableaux que nous venons de donner ne se superposent pas ; c'est ainsi que dans le second, nous voyons le nombre d'or de l'albumine de l'œuf être inférieur de beaucoup à celui qui est donné dans le premier tableau. Il est vrai que dans celui-ci, il s'agissait

(59) L. A. ROGERS et COLLABORATEURS. — *Fundamentals of dairy Science*, Chem. Catalog Company Ed., New-York, 1928.

d'albumine recristallisée à plusieurs reprises. Faisons remarquer également que dans le second tableau, sous le chef : lactalbumine, on comprend sans doute tout à la fois l'albumine et la globuline du sérum du lait, c'est-à-dire un mélange dans lequel il y a au moins 10 fois plus d'albumine que de globuline, lesquelles sont difficiles à séparer dans le lait de vache. Il serait cependant intéressant de le faire pour apprécier leur *nombre d'or* respectif. Quoi qu'il en soit, on est autorisé à dire que la gélatine est un excellent colloïde protecteur, ainsi que la globuline, alors que l'albumine ne l'est guère. Le *nombre d'or* ne saurait d'ailleurs être une valeur absolue, car aussi bien que les autres propriétés physiques des sols, il varie avec les conditions dans lesquelles ceux-ci ont été préparés.

La caséine, sous la forme de caséinate bien entendu, a un pouvoir stabilisant qui ne saurait être nié, puisqu'elle suffit à protéger les phosphates de calcium du lait.

Si la globuline, comme nous le verrons, jouit de propriétés protectrices très fortes, cela est dû à ce que sa fonction acide est beaucoup plus accentuée que sa fonction basique ; aussi, peut-on considérer qu'elle existe sous forme salifiée et qu'il vaut mieux parler de globulinate que de globuline.

Nous comprenons maintenant quelles sont les circonstances dans lesquelles l'action protectrice générale des colloïdes s'exerce. Il faut, selon J. LOEB, que les colloïdes protecteurs soient capables de former des couches adhérentes à la surface des particules à protéger et, ensuite, que les molécules formant cette couche possèdent pour les molécules du solvant, — ici l'eau, — une affinité très grande, plus forte que ne l'est leur affinité réciproque, et qui tient justement à ce qu'elles possèdent, comme LANGMUIR et HARKINS l'ont mis en valeur, de nombreux groupes *hydrophiles* tels que les groupes COOH et NH^2 . En d'autres termes, fait remarquer J. LOEB, les colloïdes protecteurs doivent avoir une véritable solubilité cristalloïde. Il est donc nécessaire que leurs micelles soient aussi fins que possible ; or, c'est le cas pour l'albumine et la globuline qui ont été rangées dans les *colloïdes moléculaires*.

Le taux élevé de la globuline dans un lait ou un colostrum protège considérablement les autres colloïdes, si bien que les réactions qu'ils présenteraient avec la plus grande netteté si la globuline était absente peuvent ne pas se produire. Le rôle essentiel, en effet, du colloïde protecteur, c'est de protéger l'autre colloïde contre la coagulation, qu'elle soit provoquée par les acides ou par la présure.

III. — DIFFÉRENCES BIOCHIMIQUES. — Nous ne visons pas sous ce titre les différences que présentent les colloïdes principaux du lait vis-à-vis de la présure, puisque nous reviendrons sur le phénomène de la coagulation par ce ferment. Nous verrons que l'albumine et que la globuline ne sont pas attaquées par lui. Ce que nous entendons traiter

maintenant, d'ailleurs très rapidement, c'est la question des sérums *anti-* préparés avec la caséine, l'albumine et la globuline, considérées chacune comme antigène spécifique.

La spécificité des sérums anti- préparés avec les protéines du lait. — La question a fait l'objet de nombreux travaux, et sans en faire l'historique complet, ce qui dépasserait le cadre de ce travail, nous rappellerons qu'on a voulu différencier les laits les uns des autres au moyen de leur sérum *anti-*. Mais utiliser le lait, c'est travailler avec un matériel compliqué, fait de l'association de plusieurs protéines dont les proportions relatives varient selon l'espèce de lait considéré, et pour une même espèce, selon qu'il s'agit de lait ou de colostrum. Aussi, les auteurs qui ont voulu distinguer les protéines du lait au moyen de sérums *anti-*, ont-ils dû laisser de côté le lait lui-même et s'adresser à ses trois protéines essentielles séparées soigneusement l'une de l'autre.

C'est ce qu'ont fait d'abord J. BAUER et S. ENGEL (60). De leurs recherches, il résulte que la globuline et l'albumine sont moins différenciées entre elles qu'elles ne le sont toutes deux à l'égard de la caséine ; toutefois, il importe de faire remarquer, et ceci est important, que *la globuline se rapprocherait davantage de la caséine que l'albumine* ; nous y reviendrons dans un moment.

Les protéines du lait, du colostrum et du sérum sanguin. — J. BAUER et S. ENGEL ont également constaté que les trois matières protéiques du colostrum se comportent absolument comme celles du lait et que la globuline et l'albumine du lait ne se différencient pas des protéines correspondantes du sérum sanguin.

Il semble donc pour ces auteurs que *globuline et albumine soient identiques dans les trois milieux : lait, colostrum et sérum du sang*.

Avec le *lait de femme*, ils ont vu aussi que sa globuline se différencie de sa caséine par les sérums *anti-* ; l'albumine n'y existerait qu'en quantité plus restreinte.

Les recherches de CROWTHER et RAISTRICK (61) confirmées quelques années plus tard par celles de H. E. WOODMAN (62) ont montré que, si *les globulines du sérum sanguin, du colostrum et du lait sont identiques*, l'albumine du sérum se différencierait de celle qui se trouve dans le colostrum et dans le lait. Le taux de la globuline dans le colostrum de vache oscillerait entre 6 et 12 %, mais il baisserait rapidement dès que la véritable sécrétion lactée apparaît pour descendre au chiffre de

(60) J. BAUER et S. ENGEL. — Ueber die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweisskörper in der Kuh- und Frauenmilch. — *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **31**, 46.

(61) CROWTHER et RAISTRICK. — A comparative study of the proteins of the colostrum and milk of the cow and their relations to serum proteins. *Biochem. Journ.*, 1916, **10**, 434.

(62) H. E. WOODMAN. — A comparative investigation of the corresponding proteins of cow and ox serum, cow's colostrum and cow's milk by the method of protein racemisation. *Biochem. Journ.*, 1921, **15**, 187.

0,005 % lequel est beaucoup plus faible que celui que nous avons donné dans un tableau précédent.

LES RELATIONS DE LA GLOBULINE ET DE LA CASÉINE. — Cl. RIMINGTON (63), relevant les faits intéressants des auteurs que nous venons de citer, en tire des considérations qu'il applique à la physiologie de la sécrétion mammaire. On peut concevoir, fait-il remarquer, que les protéines du sang fournissent le matériel qui va servir à la synthèse de la caséine par la cellule mammaire. La facile perméabilité des cellules de la glande mammaire à la sérum-globuline, qui résulte de l'identité de cette protéine respectivement dans le sérum, le colostrum et le lait, plaide en faveur de l'hypothèse ci-dessus, avec cette réserve que les proportions contenues dans le colostrum et dans le lait sont très différentes.

Quoi qu'il en soit, pour RIMINGTON, l'acidité de la globuline, la ressemblance très grande relevée entre celle-ci et la caséine par CROWTHER et RAISTRICK dans la distribution de leur azote nous portent à croire que *la caséine n'est sans doute qu'une globuline sur laquelle sont venues se fixer par éthérification des molécules d'acide phosphorique.*

Dans le travail rappelé ci-dessus, RIMINGTON fait état des recherches sur la phosphorylation des protéines. Il rappelle les premiers travaux de C. NEUBERG et H. POLLAK (64), d'une part, de C. NEUBERG et W. OERTEL (65), d'autre part, sur la *phosphorylation des protéines*. C. NEUBERG et W. OERTEL ont montré que la globuline du sang phosphorylée, c'est-à-dire sur laquelle du phosphore avait été fixé sous forme d'acide phosphorique, coagule par la présure.

Cl. RIMINGTON reprend cette question sur laquelle nous reviendrons plus en détail dans un chapitre ultérieur lorsque nous parlerons de la constitution de la caséine. Mais nous tenons à faire remarquer dès maintenant, puisque cela rentre dans le cadre de la question examinée en ce moment, que *la globuline sur laquelle on fixe de l'acide phosphorique au moyen d'oxychlorure de phosphore, en se servant d'une réaction analogue à celle de Schotten-Baumann pour la benzylation, se rapproche singulièrement de la caséine.*

Toutes ces considérations sont certainement du plus vif intérêt, étant donné qu'elles nous ouvrent des horizons sur l'origine physiologique de la caséine.

(63) Cl. RIMINGTON. — Phosphorylation of proteins. — *C. R. des travaux du laboratoire Carlsberg.*, 1927, **17**, n° 2.

(64) C. NEUBERG et H. POLLAK. — Ueber die Phosphorylierung von Eiweiss und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen. — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, **26**, 529.

(65) C. NEUBERG et W. OERTEL. — Ueber die Einführung von Phosphorsäure in Aminosäuren, Peptone, Albumosen und Proteine. — *Biochem. Zeitschr.*, 1914, **60**, 491.

E. MUFFET (66, 67), dans des recherches entreprises dans notre laboratoire sur le sort de la caséine au cours de la rétention lactée, est amené à conclure que sous l'action des ferments solubles sécrétés par les leucocytes qui interviennent dans la rétention, il se forme de la globuline aux dépens de la caséine. Si l'on injecte une solution d'un caséinate dans une mamelle « sèche », laquelle ne sécrète plus, on peut saisir l'importance de l'afflux leucocytaire et suivre en même temps le sort de la protéine.

Si on se sert de *caséine iodée*, la répartition de l'iode dans les produits retirés de la mamelle un temps variable après l'injection nous permet d'y trouver des albumines coagulables par la chaleur contenant de l'iode, mais pas de phosphore.

Comme nous nous étions adressé à des caséines d'un taux faible en iode, ce qui est recommandable dans des recherches de cet ordre ainsi que LIEBEN et LASZLO (68) le montrent, nous sommes fondé à dire que *les albumines coagulables iodées provenaient de la dislocation de la caséine au cours de la rétention*.

Pour nous résumer, il semble bien que le caractère spécifique du lait relève surtout de son albumine et de sa globuline, beaucoup moins de *sa caséine qui paraît être un antigène banal* dont la spécificité n'est nullement démontrée avec la même rigueur qu'elle l'est pour les albumines.

C'est la conclusion d'ailleurs à laquelle était arrivé H. G. WELLS, en 1925 (69), puisqu'il s'exprime de la façon suivante : « Un sérum préparé avec une caséine donnera des réactions avec la caséine d'une autre espèce, même éloignée » et « la caséine du lait d'un animal d'une espèce donnée, montre des relations biologiques plus étroites avec la caséine des laits d'autres espèces, qu'avec les protéines du sérum du lait ou du sérum sanguin de sa propre espèce ».

LES SELS MINÉRAUX COLLOÏDAUX

Les colloïdes minéraux du lait se ramènent aux *phosphates de calcium* avec un peu, avons-nous vu, des sels correspondants de magnésium. Ils sont constitués par un mélange de sels, partie bicalcique, partie tricalcique ; du moins, est-ce la conclusion à laquelle nous arriverons en partant, tant des données numériques que de celles qui nous sont fournies par l'étude de la réaction du milieu.

SÖLDNER (14), ainsi que les premiers chercheurs qui se sont occupés

(66) E. MUFFET. — *Contribution à l'étude de la rétention lactée. Le sort de la caséine dans ce processus*. — Thèse Doct. Vét., Lyon, 1928.

(67) Ch. PORCHER et E. MUFFET. — *Le sort de la caséine dans la rétention lactée*. — C. R. Soc. Biol., section de Lyon, séance du 18 mars 1929.

(68) F. LIEBEN et D. LASZLO. — *Ueber die Iodaufnahme von Casein*. *Biochem. Zeitschr.*, 1925, **158**, 110.

(69) H. G. WELLS. — *The Chemical Aspects of Immunity*. *American Chemical Society Monograph*, Chem. Catalog Company Ed., New-York, 1925, 73.

de cette question, avait conclu à l'existence du phosphate tricalcique dans le lait normal. Pour L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (16) il ne s'agirait que de phosphate bicalcique et nullement de tri-. C'est d'ailleurs à cette opinion que semble se rallier PALMER (70). Par contre, W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER (71, 72) estiment qu'il y a dans le lait un mélange de phosphates bi- et de tri-calciques protégé par les colloïdes qui en assurent l'équilibre physique. Il est évident que les proportions de ces sels varient aussi avec la quantité de CO_2 présente ; elles sont liées aux variations par ailleurs de l'équilibre acide-base du lait.

L'intervention du CO_2 conduit à des déplacements d'équilibre qui ont été également étudiés par HOLT, LA MER et CHOWN (73) et par HASTINGS, MURRAY et SENDROY (74).

Nous montrerons que l'étude de la mécanique chimique des phosphates de calcium permet d'éclairer les réactions qui portent sur le complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium. Nous insisterons sur la *relative solubilité du phosphate bicalcique* à laquelle on ne pense pas toujours et qui, pour nous, est d'une grande importance ; l'étude de la dialyse du complexe artificiellement préparé sera, de son côté, particulièrement suggestive.

Instabilité des colloïdes minéraux du lait. — Ce qui distingue les colloïdes minéraux du lait des colloïdes protéiniques, c'est, bien entendu, en dehors du côté chimique, leur *instabilité*. Alors que l'albumine et la globuline sont stables pour les raisons que nous avons antérieurement relevées, — extrême finesse des micelles notamment, — que le caséinate de calcium est également stable, il n'en est pas de même des phosphates de calcium, lesquels, préparés en dehors de tout colloïde protecteur environnant, sont fragiles et précipitent de suite. *De toute nécessité*, avons-nous vu, *les phosphates de calcium du lait doivent être protégés* ; leur stabilisation est d'abord assurée par le caséinate de calcium.

(70) L. S. PALMER. — The effect of heat on the calcium salts and rennet coagulability of cow's milk. *Proceed. of Soc. for Experimen. Biol. and Med.*, 1921, **19**, 137.

(71) W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER. — Physico-chemical studies on proteins. II. Alkali binding, a comparison of the electrometric titration of proteins and of phosphoric acid with sodium and calcium hydroxides. *J. Phys. Chem.*, 1923, **29**, 769.

(72) W. F. HOFFMAN et R. A. GORTNER. — *Colloid Symposium Monograph II*, 209-368, 1925. — Chemical Catalog Company, Ed., New-York.

(73) L. E. HOLT, V. K. LA MER et H. B. CHOWN. — Studies in calcification. — I. The solubility product of secondary and tertiary calcium phosphate under various conditions. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **64**, 509.

(74) A. B. HASTINGS, C. D. MURRAY et J. JR SENDROY. — Studies of the solubility of calcium salts. — I. The solubility of calcium carbonate in salt solutions and biological fluids. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **71**, 723.

L'union des deux systèmes salins du complexe : caséinate de calcium d'une part, phosphates de calcium, d'autre part, est vraiment sous la dépendance de la protection exercée par celui-là sur ceux-ci. Elle est donc de nature purement physique, et non pas de nature chimique comme il serait cependant rationnel de le supposer. En effet, dans le système : caséinate de calcium + phosphates de calcium, on pourrait admettre l'hypothèse que la molécule de chaux soit salifiée, partie par la caséine, et partie par l'acide phosphorique, selon le schéma :

La chaux aurait donc à se partager, peut être pas exactement par moitié, mais selon des proportions qui varieraient avec le degré d'ionisation des H acides de la caséine et de l'acide phosphorique, ainsi qu'avec la température. Les affinités acides en présence sont en effet très différentes. L'acide phosphorique est un acide beaucoup plus fort que la caséine, et il déplacera toujours celle-ci de ses combinaisons salines ; *a fortiori* lui sera-t-il facile de s'emparer de l'excès de calcium d'un caséinate calcique alcalin d'un $\text{pH} > 7$.

Il est toutefois préférable d'admettre deux colloïdes nettement distincts, ayant chacun son calcium, peut-on dire, mais associés dans un ensemble stable, l'un protégeant l'autre, le **protecteur colloïde** : caséinate de calcium, étant le plus stable, en même temps que réversible, le **colloïde protégé** : phosphate de calcium, étant irréversible et le moins stable. L'étude ultramicroscopique nous montre que, dans le complexe, les plus petits micelles appartiennent au caséinate, les plus gros, au phosphate.

Il est si vrai qu'il s'agit bien là de deux colloïdes distincts placés l'un à côté de l'autre et formant un système en équilibre, qu'il est possible de rompre ce dernier au moyen de la centrifugation.

Déjà L. LINDET et L. AMMANN (75) avaient remarqué que « le produit visqueux et plastique qui se dépose sur les parois des bords des écrémeuses centrifuges, et qui est connu en laiterie sous le nom de « boues d'écraimeuses », renferme du phospho-caséinate de chaux ». Nous estimons que ce dépôt est formé des plus gros micelles du complexe, lesquels avec l'aide du temps, de la centrifugation et de la température, — au moins 30° — à laquelle on a porté le lait avant de le faire passer à l'écraimeuse, finissent par être jetés par la force centrifuge contre la paroi du bol.

(75) L. LINDET et L. AMMANN. — Contribution à l'étude des matières albuminoïdes solubles du lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1906, 5, fasc. 2.

Mais, dans leur étude des boues de centrifuge, LINDET et AMMANN n'ont pas décelé la séparation, par la centrifugation, du caséinate et du phosphate. Il y a lieu cependant de la supposer possible, étant donnée la différence de grosseur des micelles du caséinate et de ceux des phosphates. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH l'ont facilement mise en évidence dans les conditions suivantes :

Ils ont fait passer 400 livres (livre anglaise de 453 gr.), soit 175 litres de lait, 18 fois de suite dans la même écrémeuse centrifuge, et ils ont recueilli la boue de centrifuge après les 1^{er}, 6^e, 12^e et 18^e passages ; ils en ont analysé la portion insoluble. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XIV.

	Caséine	Cendres	P total	P de la caséine	P des phosphates	Ca	P organique P minéral
	—	—	—	—	—	—	—
	%	%	%	%	%	%	%
Après le 1 ^{er} passage	86,31	10,43	2,182	0,621	1,561	3,386	1/2,51
— 6 ^e —	90,07	9,35	1,950	0,649	1,301	3,246	1/2,00
— 12 ^e —	90,84	9,53	2,011	0,645	1,366	3,343	1/2,11
— 18 ^e —	91,98	9,62	2,023	0,662	1,361	3,223	1/2,06

« Le pourcentage élevé du phosphore minéral dans le dépôt après le premier passage indique que les phosphates sont plus lourds que les caséinates et peuvent en être séparés avec une certaine vitesse de l'écumeuse ».

Une expérience plus sévère que la précédente a été réalisée par ces mêmes auteurs pour justifier cette dernière proposition.

Ils placent environ 1 litre de lait dans le bol clos d'une écrémeuse faisant 5.000 tours à la minute et font tourner pendant 4 heures ; ils recueillent la « boue » après les deux premières heures, puis après les deux dernières et en font l'analyse. Les résultats montrent que « les 2/3 du phosphore minéral sont éliminés du lait dans les deux premières heures de rotation », ce qui, une fois de plus, indique nettement que « les phosphates sont plus lourds que les caséinates ». Les rapports de la caséine aux phosphates se montrent ici tout à fait irréguliers, ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas de combinaison définie. Le tableau ci-dessous résume cette dernière expérience :

TABLEAU XV.

« Boue » par période de 2 heures	Caséine	Cendres	P total	P de la caséine	P des phosphates	Ca	P organique P minéral
	—	—	—	—	—	—	—
	%	%	%	%	%	%	%
2 premières heures . . .	90,68	9,32	1,909	0,653	1,256	3,090	1/1,92
2 dernières heures . . .	91,12	8,88	1,434	0,656	0,781	2,691	1/1,19

Ces résultats entraînent, nous disent L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, cette conséquence importante que si les phosphates étaient en combinaison avec la caséine, si, en d'autres termes, phosphates de

calcium et caséinate de calcium formaient un ensemble aux parties étroitement solidaires, nous devrions trouver le même rapport entre le phosphore organique et le phosphore minéral dans les deux dépôts ; or, il y a entre eux la plus grande différence, puisque ces rapports sont 1/1,92 pour le premier, 1/1,19 pour le second. Le premier est donc beaucoup plus riche en phosphate calcique.

A la vitesse de 1.200 tours par minute, on ne lance pas beaucoup de caséinate sur la paroi du bol, mais nettement plus de phosphate qui se trouve avoir la composition du bicalcique (0 gr. 40 de dépôt pour 500 cm³, avec une rotation de 30 minutes).

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont également tiré de leurs recherches cette seconde conséquence : le phosphate calcique du lait est surtout sous la forme bicalcique. Nous discuterons plus loin cette question.

En résumé, dans les expériences des deux auteurs américains, ce n'est pas le phosphore de la caséine qui est affecté, c'est uniquement celui des phosphates, ce qui ne doit pas nous surprendre, puisque les micelles phosphatiques sont plus gros et plus denses. *Leur hydrophilie est également moins marquée.*

Mais pour que la séparation des micelles phosphatiques et caséinatiques soit obtenue par la centrifugation, *il importe que celle-ci soit prolongée.* Il n'est pas douteux que si, au lieu de se servir des écrémeuses ordinaires, on utilisait la **super-centrifugation**, on obtiendrait une séparation plus parfaite encore entre les deux sortes de micelles dont il vient d'être question. Des expériences à ce sujet sont en cours à notre laboratoire.

LA SÉPARATION DES PROTÉINES DU LAIT

Nous venons d'envisager les rapports des colloïdes du lait entre eux, surtout au point de vue de la protection exercée par certains sur les autres. Nous allons examiner maintenant comment nous séparerons les diverses protéines du lait, ce qui nous permettra de pénétrer encore mieux dans la microstructure de cette sécrétion. Nous avons déjà fait allusion à la difficulté de séparer les colloïdes complètement les uns des autres. Des phénomènes d'adsorption, jouant entre eux, rendent ardue l'analyse d'un liquide colloïdal, et le cas du lait, hydrosol complexe, est un exemple à citer en premier lieu.

Nous verrons tout à l'heure, à propos de la **filtration** du lait, qu'*il est difficile d'avoir une séparation complète*, car les grosses particules qui sont arrêtées sur le filtre retiennent toujours une partie des grains les plus fins et, ceci, quel que soit le mode de filtration auquel on ait recours.

Faisons remarquer également que *si l'on coagule certains des colloïdes dans un mélange colloïdal complexe, ceux qui coagulent entraînent une partie de ce qui se trouve en suspension dans le voisinage.* Ceci est très

marqué notamment pour le lait. Sous l'action de la présure, le caillé qui se forme entraîne les globules graisseux, système dispersé à grosses particules, puisque le sérum qui s'exsude par synérèse du coagulum formé sous l'action du lab est tout à fait débarrassé de sa matière grasse, à condition, bien entendu que cette synérèse se soit accomplie dans le repos, avec lenteur et que des actions brutales n'aient pas été exercées sur le caillé. Par contre, l'albumine et la globuline sont expulsées par synérèse, et il n'en reste dans le coagulum que dans la mesure où ce dernier doit être considéré comme une éponge dont les mailles emprisonnent fatalement le liquide au sein duquel la coagulation s'est effectuée.

Les difficultés de la séparation. — Le chimiste et le physiologiste rencontrent beaucoup de difficultés pour séparer les protéines qui se trouvent dans les mélanges, et les deux principales méthodes auxquelles ils ont recours : **la coagulation fractionnée par la chaleur**, et **la précipitation fractionnée par les sels**, n'ont guère qu'une valeur qualitative ; les résultats quantitatifs qu'on en tire sont parfois entachés d'erreurs non à négliger.

En raison des phénomènes d'adsorption, les colloïdes coagulants, en se précipitant, retiennent toujours un peu des autres substances du milieu disperseur. Dans quelle mesure ? Nous venons de voir que dans le cas de l'emprésurage, la matière grasse est entraînée, l'albumine et la globuline, laissées de côté.

Mais, si nous considérons les composants de l'édifice salin du lait, d'aspect cristalloïde, il ne semble pas qu'ils soient adsorbés, même dans la plus petite mesure, par les colloïdes. La filtration sur bougies de porcelaine, si critiquable à certains points de vue, laisse passer dans le sérum tous les sels solubles et dans leur intégrité, ou du moins, si adsorption il y a, — peut-être des équilibres de Donnan entrent-ils en jeu, — la mesure des quantités adsorbées rentrerait dans le cadre des erreurs d'analyse.

Il en est de même lorsqu'on filtre sur bougie Chamberland après coagulation par la présure ; le sérum qui s'est exsudé par synérèse renferme tous les éléments solubles du lait originel ; il en est ainsi de son filtrat.

MOYENS POUR SÉPARER LES PROTÉINES DU LAIT. — Les moyens mis en œuvre pour séparer les diverses protéines du lait sont : *physiques*, *chimiques* et *biochimiques*.

A. Moyens physiques : Les moyens physiques sont *mécaniques* ou *calorifiques*.

I. Moyens mécaniques. — Puisque le lait est un assemblage de systèmes dispersés constitués de particules de dimensions et de densités différentes, il était naturel que l'on pensât à les séparer les uns des autres en recourant aux moyens mécaniques qui s'offrent à nous sous la forme

de la **filtration** et de la **centrifugation**, avec les diverses modalités qu'ils présentent. Leur intérêt réside surtout dans ce qu'ils ne touchent nullement aux équilibres préexistant dans le lait. On pourra, à certains d'entre eux, adresser des critiques, montrer leur *insuffisance* et surtout leur *irrégularité* pour le but à poursuivre, mais ce qu'on en peut dire, c'est que, laissant de côté les protéines et n'envisageant que la partie vraiment dissoute, ils n'apportent aucun trouble dans les proportions des composants en solution vraie.

La filtration. — Parmi les moyens mécaniques, un des plus intéressants auxquels ont ait recours est la *filtration*, mais celle-ci peut s'exercer de diverses manières. On peut faire appel, soit aux bougies de porcelaine, soit aux ultrafiltres. Quelle que soit d'ailleurs la membrane filtrante que l'on utilise, qu'elle soit grossière, épaisse, comme peut l'être une couche de porcelaine, qu'elle soit, au contraire, mince et serrée, comme la membrane des ultra-filtres, *toujours* le complexe naturel : caséinate de calcium + phosphate de calcium qui existe à l'état insoluble dans le lait est retenu sous la forme d'un enduit visqueux, gluant, gardant dans ses mailles humides une partie faible, mais incontestable, des autres constituants du lait, dont on peut d'ailleurs le débarrasser en le délayant à plusieurs reprises dans de l'eau distillée, une filtration suivant chaque délayage. Cette couche humide, lorsqu'elle vient d'être déposée, *retient par adsorption un peu de l'albumine et de la globuline mais elle laisse passer l'édifice cristalloïde en son entier.*

L'emploi des bougies de porcelaine. — La méthode de filtration sur bougies de porcelaine n'est point susceptible de conduire à ces « erreurs et à ces fausses conclusions » dont on s'est plu à la charger. Avec elle, on ne détruit nullement l'équilibre préexistant du lait originel, puisque, encore une fois, *on ne fait que séparer mécaniquement ce qui est insoluble de ce qui est soluble* ; on ne détermine pas de précipitation, puisqu'il n'y a aucune altération des concentrations. Si l'on redélaye dans le filtrat la couche visqueuse qui est restée sur la paroi de porcelaine, on reconstitue une liqueur qui a toutes les propriétés physiques, chimiques et biochimiques du lait de départ que l'on avait jeté sur la bougie.

Nous empruntons beaucoup ici au livre de J. DUCLAUX (33) pour les considérations qui vont suivre. On lira aussi avec profit l'ouvrage tout récent de G. GÉNIN (76, 77).

Quand des cristalloïdes et des colloïdes existent simultanément dans une même solution, chacun se comporte vis-à-vis de la membrane comme s'il était seul. Ceci est un fait depuis longtemps acquis par l'étude de l'osmose et de la dialyse ; c'en est un du même ordre lorsqu'il s'agit de

(76, 77) G. GÉNIN. *Osmose, Dialyse, Ultrafiltration*. Dunod, éd. Paris, 1928, et Une application de la chimie colloïdale, *Le Lait*, 1929, 9, p. 240.

la filtration dans laquelle joue une pression qui s'exerce d'une façon plus ou moins considérable d'un côté de la membrane pour obliger la liqueur à la traverser.

Bien que simple, en apparence, le phénomène de la filtration est plutôt compliqué. « Certains colloïdes ne traversent pas le papier-filtre alors qu'ils ne contiennent aucune particule visible au microscope ordinaire et, d'autre part, l'on sait que les pores du papier laissent passer facilement des objets de dimension microscopique. »

« Les pores des bougies de porcelaine ne sont pas en-dessous des dimensions microscopiques ; d'après les mesures de M. GRENET, elles ont environ $2\ \mu$ de diamètre, autant que l'on peut parler de diamètre quand il s'agit d'un canal de forme très irrégulière et sinueuse ». (J. DUCLAUX).

Le théorie de la filtration sur bougie de porcelaine n'est point faite. Sans doute, aura-t-elle à faire intervenir le phénomène d'*adsorption* qui est ici une sorte d'adhésion entre la matière du filtre et les particules en suspension, mais elle ne doit pas négliger non plus l'influence de la viscosité.

La filtration du lait est d'abord rapide, puis elle diminue progressivement et le débit devient extrêmement lent. Les canaux du filtre se rétrécissent peu à peu par colmatage. Bien que la filtration, comme le dit J. DUCLAUX, — qu'elle se fasse sur papier ou sur porcelaine, — n'ait aucune importance théorique, elle n'en fournit pas moins des indications qui doivent être retenues.

Les recherches sur ce qu'on peut appeler une séparation mécanique des divers constituants du lait par filtration sont déjà anciennes, HOPPE-SEYLER pensa d'abord à employer une membrane animale. mais devant les difficultés d'obtenir quelque chose de régulier et d'impureté, on se rejeta sur les membranes poreuses et minérales.

H. HELMHOLTZ eut recours à des cylindres de porcelaine ou encore à des plats non vernissés sur lesquels on répandait le lait. Tout était absorbé par la pâte poreuse, sauf l'insoluble que l'analyse révélait être formé de caséine, de chaux et d'acide phosphorique, c'est-à-dire des constituants propres du complexe naturel auxquels la graisse s'ajoutait, bien entendu, quand on travaillait avec du lait entier.

Les filtres en terre poreuse manquent évidemment d'uniformité, et ce n'est pas là leur moindre défaut.

La forme bien connue des bougies Chamberland a facilité singulièrement les recherches sur la filtration et nombreux sont les auteurs qui y ont eu recours. Avant L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, nous citons E. DUCLAUX, ENGLING, CAMERER, SÖLDNER, etc...

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont pensé que la filtration sur bougie de porcelaine leur permettrait de s'assurer du véritable état des protéines et des sels dans le lait et de séparer nettement les uns des

autres les systèmes dispersés, ceux à gros grains restant sur le filtre. L'idée était rationnelle et les recherches qu'elle a provoquées ont donné des résultats probants, sauf peut-être ceux qui concernent les deux colloïdes : albumine et globuline que nous avons appelés des *colloïdes moléculaires* parce que leurs grains dispersés se rapprochent par leurs dimensions de ceux des cristalloïdes. Les phénomènes de protection et d'adsorption qui jouent beaucoup plus nettement entre les colloïdes eux-mêmes qu'entre ceux-ci et les cristalloïdes nous permettent de comprendre que le passage de l'albumine à travers les filtres ne puisse pas être régulier. Nous allons y revenir dans un instant.

Ce qui traverse les bougies de porcelaine; ce qui reste à leur surface. — Quand on filtre du lait écrémé sur une bougie Chamberland, l'eau passe au travers entraînant avec elle tous les composés en solution vraie. Dans le tableau ci-dessous emprunté au travail de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (15, 16), nous donnons les résultats que ces auteurs ont obtenus sur deux laits écrémés. Nous voyons que *passent intégralement* le potassium, le sodium et le chlore, éléments minéraux, le lactose, l'acide citrique et l'azote non protéique, éléments organiques, parce que les uns et les autres revêtent une forme cristalloïde. La caséine, par contre est retenue entièrement; mais où il y a partage, ce qui conduit à un passage partiel dans le sérum, c'est pour l'albumine, la chaux, la magnésie et le phosphore, c'est-à-dire pour des éléments qui affectent dans le lait, soit tout à fait l'aspect colloïdal : c'est le cas de l'albumine, soit, au contraire, partie l'aspect colloïdal et partie l'aspect cristalloïde : c'est le cas de la chaux, de la magnésie et du phosphore.

Dans le tableau ci-après, le pourcentage de l'albumine dans le sérum est très différent pour les deux laits mis en expérience; il est de 70 % dans un cas, 37 % dans l'autre, soit un peu plus de la moitié du précédent.

L'irrégularité du passage de l'albumine sur les bougies de porcelaine a porté L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH à conclure que l'albumine du lait de vache est partiellement en véritable solution et partiellement en émulsion, la partie en suspension étant adsorbée par la caséine quand le lait est frais, mais passant en solution quand le lait est acide ou quand on lui ajoute du formol pour en prévenir l'altération microbienne.

L. S. PALMER et R. G. SCOTT (78) ont repris les recherches de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. Ils font tout d'abord remarquer, en parfait accord avec les précédents auteurs, qu'aucune discussion n'est possible pour la caséine qui se présente dans le lait à l'état colloïdal entièrement à un degré de dispersion relativement faible, ce qui permet de com-

(78) L. S. PALMER et R. G. SCOTT. — The physicochemical State of the Proteins in Cow's Milk. — *Journ. of biol. Chem.*, 1919, 37, 271.

prendre qu'elle soit retenue tout à fait par les filtres de porcelaine, et — nous le verrons tout à l'heure, — ainsi que par les ultra-filtres.

TABLEAU XVI.

CONSTITUANTS DU SÉRUM DE LAIT OBTENU PAR FILTRATION SUR BOUGIE DE PORCELAINE

	I			II		
	Lait	Sérum	‰	Lait	Sérum	‰
Lactose.				5,75	5,75	100
Albumine.	0,525	0,369	70,29	0,506	0,188	37,15
Caséine.	3,35			3,07	0,00	0,00
Azote non protéique. .				0,049	0,049	100,00
Acide citrique.				0,237	0,237	100,00
Phosphore (total : organique et minéral) . .	0,125	0,067	53,60			
Phosphore minéral. . .	0,096	0,067	70,00	0,087	0,056	64,40
Calcium.	0,128	0,045	35,16	0,144	0,048	33,33
Magnésium.	0,012	0,009	75,00	0,013	0,007	53,85
Potassium.	0,354	0,352	99,44	0,120	0,124	100,00
				0,055	0,057	100,00
Chlore.	0,081	0,082	100,00	0,076	0,081	100,00
Cendres.				0,725	0,400	55,17

Le passage de l'albumine à travers les bougies de porcelaine.

— Quant à l'albumine, PALMER et SCOTT ne sauraient confirmer les conclusions de leurs devanciers américains. Pour eux, l'emploi d'un filtre Pasteur-Chamberland ne peut nous permettre de juger si l'albumine existe dans le lait à l'état colloïdal ou en solution vraie, pour deux raisons essentielles :

a) D'abord, parce que *les dimensions des pores du filtre de porcelaine sont très variables pour des bougies de même numéro commercial*, et

b) Ensuite, parce que *les dimensions des particules dispersées de l'albumine peuvent être influencées grandement par les réactifs employés pour conserver le lait*. De toute nécessité, en effet, le lait que l'on jette sur un filtre de porcelaine doit être additionné d'un antiseptique, puisque la filtration est lente ; sans cette addition, l'acidification serait fatale et, par suite, les recherches analytiques seraient viciées.

Ph. RUPP (79) a constaté que les premières portions qui passent (50 à 75 cm³) n'ont pas la composition constante de celles qui suivent ; il recommande de les laisser de côté et de ne faire porter l'analyse que sur celles que l'on recueille ultérieurement.

Quand on lit avec soin son travail, on constate qu'à la fin de l'expérience, bien que la filtration se fit entre 5° et 8° C., l'acidification du lait a permis le passage de proportions légèrement plus élevées de chaux,

(79) Ph. RUPP. — Chemical changes produced in Cow's Milk by Pasteurisation. U. S. Depart. of Agric., Bur. of Animal Industry, Bull. 166, 1913.

de magnésie et de phosphore, ce qui tient à une partielle solubilisation de la partie correspondante de ces éléments qui affecte normalement la forme colloïdale.

Pour la filtration sur bougie de porcelaine, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, au lieu de recourir à de basses températures, utilisaient le chloroforme, estimant sans doute que ce parfait antiseptique pour le lait n'altérerait pas les colloïdes. Or, PALMER et SCOTT montrent que le chloroforme laissé en contact, soit avec du lait entier, soit avec son sérum, cause une réduction importante dans la proportion de l'albumine coagulable par la chaleur quand on compare avec le même lait analysé frais ; le chloroforme provoquerait une partielle précipitation de l'albumine ou, du moins, son agglomération en particules plus grosses, que les pores de la paroi de porcelaine retiendraient alors.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH avaient constaté que le lait après addition de formol (tableau XVII) laisse passer presque toute son albumine dans le sérum (92,21 % pour le lait formolé, 55,64 pour le lait frais).

TABLEAU XVII.
PASSAGE DE L'ALBUMINE AU TRAVERS DES BOUGIES DE PORCELAINE

	Albumine dans 100 cm ³	p. 100 dans le sérum
I		
Lait frais	0,312	
Sérum de ce lait frais filtré sur bougie. .	0,143	45,83
Sérum d'emprésurage	0,187	59,94
II		
Lait frais	0,266	
Sérum de ce lait frais	0,148	55,64
Sérum du même lait acide	0,253	95,11
Sérum du même lait formolé	0,245	92,21

PALMER et SCOTT constatent bien que le **lait formolé** laisse passer davantage d'albumine, mais c'est loin de la proportion ci-dessus donnée par leurs collègues américains. Ils trouvent 3,50 % seulement de l'albumine dans le sérum pour le lait chloroformé, 10,30 % pour le lait formolé.

Des différences de même ordre furent constatées entre les résultats de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH, d'une part, ceux de PALMER et SCOTT, d'autre part, avec le **lait acidifié**. L'acidification du lait en rompant l'édifice colloïdal antérieur libérerait l'albumine de toute adsorption possible par la caséine ce qui ferait que, à la filtration sur bougie, toute ou presque toute l'albumine passerait. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH en trouvent 95,11 % dans le sérum du lait acide, alors que dans le sérum du lait frais, il y en a 55,64. PALMER et SCOTT sont loin de trouver un quantum aussi élevé. Avec les filtres qu'ils ont utilisés et dont la *porosité était faible*, ils n'ont pas retrouvé dans

le sérum du lait acidifié par de l'acide lactique plus de 10 % de la quantité de l'albumine du lait frais.

Comment expliquer ces divergences numériques considérables, car, s'il y a accord sur le sens du phénomène : *le moindre passage de l'albumine dans le sérum avec le lait frais qu'avec le lait formolé et le lait acidifié*, il y a désaccord complet sur les proportions trouvées par les uns et par les autres.

Le filtre de porcelaine ne permet pas de séparer avec netteté les protéines dites solubles, — l'albumine en est la principale, — *de la caséine*. Par conséquent, on juge de suite ce que peuvent avoir de tendancieux les conclusions que, par l'étude des sérums filtrés, l'on tirerait d'un pareil passage relativement au véritable état des protéines non caséiniques du lait. A notre avis, les divergences de L. L. VAN SLYKE et A. W. BOWORTH et de PALMER et SCOTT doivent trouver leur raison dans la différence des porosités des parois filtrantes. Elle seule suffit à tout expliquer. Peut-être invoquerons-nous encore l'hétérogénéité des grains dans une même espèce de colloïdes ainsi que la viscosité, mais l'essentiel, réside, encore une fois, dans la différence des perméabilités.

En conséquence, il ne faut pas, au point de vue théorique, attacher à ces expériences plus d'importance qu'elles semblent avoir au premier abord, parce qu'un facteur dont il est impossible d'être réellement maître : la porosité du filtre, intervient d'une façon majeure pour modifier les résultats ; on pourrait être incité à tirer de ceux-ci des conclusions pour le moins exagérées. Une très grande circonspection s'impose dans l'examen de ces résultats et leur interprétation.

Le sérum de filtration sur bougie de porcelaine. — Le sérum qu'on obtient par filtration sur bougie Chamberland à pâte serrée est un liquide limpide d'une couleur jaune avec un faible reflet verdâtre. La pâte est-elle tendre, une légère opalescence est constatée. La perméabilité est-elle plus grande encore, — c'est le cas pour les bougies Berkefeld, — le liquide que l'on recueille est même laiteux ; c'est que les plus petits micelles du caséinate et du phosphate peuvent traverser leur paroi. E. HEKMA (80) l'avait d'ailleurs constaté. Alors dit-il, que le sérum obtenu par passage du lait au travers d'une bougie Chamberland, marque B, donne un liquide clair, on obtient un liquide blanc et trouble si le même lait a passé à travers une bougie de Berkefeld.

L'enduit retenu par les bougies de porcelaine. — Le produit visqueux qui est retenu à la surface de la bougie de porcelaine forme une masse d'un blanc grisâtre, d'une consistance de glue, ayant l'apparence de la colle et qui, lorsqu'elle est séchée, ressemble à du blanc d'œuf en paillettes. Chimiquement, cet enduit est formé de caséinate

(80) E. HEKMA. — Plaques lactiques et gel de présure. — *Arch. néerland. de Physiol. de l'Homme et des Animaux*, 1922, 7, 223.

et de phosphate de calcium ayant retenu par adsorption une proportion variable d'albumine et, purement et simplement, à la manière d'une éponge, un peu des substances qui sont en solution vraie dans l'eau du lait.

Si on le dilue soigneusement dans de l'eau distillée, on reconstitue un liquide blanchâtre ayant l'apparence du lait originel et qui peut être filtré à nouveau. Après plusieurs traitements analogues, on obtient finalement en le délayant vigoureusement une dernière fois dans l'eau, une liqueur stable *qui ne coagule plus par la présure*. Alors que la première dilution coagule assez nettement, la seconde moins bien, la dernière ne coagule plus du tout.

Si l'on emprésure du lait, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont trouvé que le sérum obtenu renferme plus d'albumine après filtration sur bougie que le sérum correspondant du lait avant son emprésurage. Il y a lieu de noter que cet excès est dû à la protéose détachée de la caséine par le clivage labique.

L'ultra-filtration. — La filtration sur bougie de porcelaine ne pouvant donner de résultats décisifs sur l'état des albumines dites solubles dans le lait, en raison déjà de la grande irrégularité de la porosité des échantillons d'un même type de bougie, — *a fortiori* lorsqu'il s'agit de bougies commercialement différentes, — on a pensé à recourir aux ultra-filtres dont l'étude a été si bien entamée par MALFITANO. Là encore, *il y a beaucoup de relativité et la séparation ne saurait être parfaite*.

Les résultats du passage des principes minéraux du lait sont sensiblement du même ordre de grandeur que ceux qui nous sont donnés par les bougies de porcelaine, ainsi que l'a constaté CHIENCHI WHA (81). Le Cl et le K traversent entièrement, le Ca et le P en partie. Le caséinate et le phosphate de calcium sont évidemment retenus sur les ultra-filtres. Quant à l'albumine, tout dépend de la porosité de la membrane laquelle, en général, est bien moins perméable que les parois de porcelaine. A. LATAIX (82) a pu réaliser des filtres de collodion qui lui ont permis d'obtenir un lacto-sérum tout à fait dépourvu de substances protéiques, très propre à des déterminations réfractométriques.

Nous avons utilisé les ultra-filtres pour la détermination de la grandeur du morceau détaché de la caséine par l'action du lab. Les filtres étaient préparés au laboratoire selon une technique sur laquelle nous ne pouvons pas revenir ici (83).

(81) CHIENCHI WHA. — Beitrag zum Verhalten von Calcium, Kalium, Chlor und Phosphor in der Milch und zur Technik der Ultrafiltration. *Bioch. Zeit.*, 1924, **144**, 278.

(82) A. LATAIX. — Contribution à l'étude de la réfractométrie des lacto-sérums. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1929.

(83) M. PIETRE et A. VILA. — La dialyse sur sirop de saccharose. Application à la séparation du fibrinogène. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1914, **1**, 18.

On peut obtenir des filtres à une seule couche, plus ou moins perméables, selon la concentration en coton-poudre du collodion employé. De même, on peut réaliser avec un même collodion des filtres à deux et trois couches. Nous ne saurions conseiller d'aller au-delà, car il est préférable d'obtenir des filtres plutôt minces. Bref, il est donc possible d'avoir toute une gamme de perméabilités.

Les filtres obtenus dans ces conditions sont vraiment assez homogènes, alors que ceux que le commerce fournit et qui sont faits par dessiccation de collodion sur une cartouche en papier-filtre sont d'une irrégularité notoire. On peut avoir encore recours aux ultra-filtres D.M.S. qui nous ont donné d'excellents résultats ; ils permettent, entre autres avantages intéressants, d'obtenir des grandes quantités de liqueur, plusieurs centaines de cm^3 , à condition, encore une fois, de travailler sur du lait écrémé.

La super-centrifugation. — Nous avons déjà vu que par la centrifugation à très grande vitesse, il est possible, non pas de séparer complètement le complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium, mais d'en coller contre la paroi du bol de l'écumeuse les grains les plus lourds, et dont la plus grande part est faite de phosphate de calcium.

L'emploi de la super-centrifugation à laquelle nous nous sommes adressé pour d'autres expériences en cours nous permettra certainement de plaquer contre le bol le complexe en son entier, le caséinate et le phosphate, c'est-à-dire *les grains tout à la fois les plus lourds et les plus volumineux des colloïdes du lait*. Là encore, par cette modalité mécanique de séparation, on n'apportera aucun trouble dans les concentrations, puisqu'on opérera à bol fermé ; aussi, ne saurait-on envisager des déplacements d'équilibre ou des modifications dans les équilibres antérieurs préexistants.

II. Moyens calorifiques. — Ce n'est peut-être pas une expression très heureuse que de dire ici moyens calorifiques, en les rangeant dans les moyens physiques à côté des moyens mécaniques. Sous l'action de la chaleur, il est possible de séparer certaines protéines du milieu dans lequel elles sont en solution, mais nous devons reconnaître en même temps que des modifications chimiques sont engendrées.

Nous savons que *lorsqu'on porte le lait de vache à l'ébullition, l'albumine qu'il renferme coagule, mais le phénomène n'est nullement apparent*. Les coagulats très fins qui se produisent se collent contre les micelles du complexe bien moins altérés et lorsqu'on précipite ceux-ci, ils entraînent en même temps l'albumine, si bien que dans le sérum obtenu, il n'en reste plus. Comme la séparation de l'albumine peut être réalisée de diverses façons, notamment par les *sels neutres*, nous avons là un *moyen facile de distinguer le lait cru du lait bouilli*. Il consiste à saturer le lait par le sulfate de magnésium. On jette sur un filtre et on obtient

une liqueur limpide qui, dans le cas du lait cru, se trouble et précipite à l'ébullition et, dans le cas du lait cuit, reste inaltéré.

Si l'on filtre, sur porcelaine, du lait qui a été porté à l'ébullition, le sérum obtenu est également dépourvu de son albumine.

L'action de la chaleur sur l'albumine du lait. — L'albumine du sérum obtenu par filtration sur bougie peut donc être séparée de son solvant par coagulation. Mais il y a lieu de faire remarquer tout ce qu'il y a de contingences autour de l'action de la chaleur sur l'albumine du lait. C'est une erreur de penser que l'albumine du sérum de filtration sur bougie coagule *toute* lorsqu'on porte à l'ébullition. Après la coagulation en apparence la plus complète, il est toujours possible de retrouver dans le filtrat une quantité souvent importante de protéines laquelle précipitera alors entièrement par le réactif d'Almen au tanin acétique. Quelquefois même, la fraction qui coagule est moindre que celle qui, ne coagulant pas, sera précipitée par ce réactif. Il y a longtemps que ce fait est connu, car dès 1870, ZAHN montrait que, par la chaleur, on ne peut obtenir une complète précipitation de l'albumine du lait, mais il ne semble pas qu'il le soit encore suffisamment, puisque trop d'auteurs ont recours à la coagulation par la chaleur pour précipiter la lactalbumine du sérum, semblant admettre ainsi que cette précipitation puisse être totale. Et cependant, lorsqu'on fait bouillir le lait lui-même, nous savons que toute l'albumine est coagulée, puisqu'on n'en trouve point dans le sérum sulfato-magnésien. Peut-être est-ce au contact du complexe qu'est dû l'entraînement total de l'albumine altérée par la chaleur ? Il y aurait là une conséquence d'un voisinage intime dont l'explication nous échappe. Dans le sérum de filtration du *lait cru* sur bougie, ces relations n'existent plus pour l'albumine qui a passé.

Il ne saurait être question de la possibilité de l'existence dans le lait d'albumines ayant les caractères des protéoses-peptones, car il n'est aucune preuve certaine qu'il y ait dans le lait *frais* des protéoses. Nous dirons même qu'on a pensé à leur présence, justement parce qu'on avait constaté que la coagulation par la chaleur laissait dans le filtrat des protéines précipitables par les réactifs les plus sensibles, et qu'on ne s'était pas d'abord demandé si la chaleur entraînait bien toutes les protéines. Comme conséquence de ces remarques, nous dirons que *la coagulation par la chaleur ne peut jamais nous donner une mesure exacte des protéines dites solubles du lait.*

L'acido-solubilisation. — La question de l'existence de protéoses-peptones dans le lait appelle ici une observation extrêmement importante. C'est celle qui est relative à l'*acido-solubilisation des protéines à chaud*. NEUMEISTER voulant étudier la question de la présence de peptones dans le lait remarque que, *en solution faiblement acide, la coagulation*

par la chaleur donne toujours lieu à la formation de protéines solubles aux dépens des protéines coagulables. Nous aurons l'occasion, dans le cours de ce travail, de noter combien il est facile de dissoudre à chaud les protéines du lait, la caséine comme l'albumine, pour peu que l'on soit dans des conditions d'acidité un peu fortes. Si l'on ne se tient pas exactement au point isoélectrique, si l'on est nettement en-dessous, c'est-à-dire dans une zone d'acidité marquée, l'action de la chaleur à l'ébullition amène une solubilisation partielle de la protéine. Peut-on dire qu'il s'agisse de peptonisation ? Nous ne pensons pas qu'il faille aller si loin dans la dégradation de l'albumine et nous croyons préférable d'envisager la formation d'acido-albumine. C'est cette *acido-solubilisation*, — appelée souvent *acéto-solubilisation*, parce que c'est à l'acide acétique que l'on avait recours, mais elle est réalisable avec tout autre acide : lactique, chlorhydrique, — qui est responsable de beaucoup d'erreurs d'interprétation de divers auteurs. Rappelons que si MILLON et COMMAILLE ont signalé dans le lait la présence d'une protéine spéciale qu'ils ont appelée *lacto-protéine*, c'est justement parce qu'ils ne s'étaient pas gardés, l'ignorant à ce moment, de la formation de protéines acido-solubles. C'est leur technique qui était responsable ; elle avait engendré une protéine, pour eux, nouvelle, alors que celle-ci ne faisait que dériver des protéines normales du lait : caséine et albumine, par action conjuguée de la chaleur et de l'acide.

Si c'est une pratique peu recommandable de vouloir doser l'albumine du lait par la coagulation à chaud, on arrive néanmoins à des résultats, acceptables le plus souvent, si l'on acidifie un peu ; mais, retenons maintenant qu'il ne faut le faire qu'avec beaucoup de précautions, car si l'acidification est forte, nous retombons sur un autre inconvénient, celui d'une acido-solubilisation.

Lorsqu'on veut déterminer le quantum de la lactalbumine sur le sérum, évidemment dépourvu de caséine, il faut employer des réactifs chimiques dont le plus courant est celui d'ALMEN au tanin acétique. Bien entendu, une pareille séparation est brutale ; on englobe tout à la fois l'albumine et la globuline. Passe encore pour le lait de vache dans lequel la proportion de globuline est extrêmement faible, mais pour d'autres laits où le quantum de la globuline est élevé, souvent plus que celui de l'albumine, — notamment le lait de femme, — la méthode de séparation de l'albumine et de la globuline par le réactif d'ALMEN ne saurait être utilisée. De toute nécessité, il faudra employer les sels neutres dont il sera parlé tout à l'heure, ou recourir à la méthode à l'acétone de PIETTRE et VILA.

L'ébullition du lait et la « protection ». — Revenons encore sur certains points intéressants de l'ébullition du lait. A l'état cru, nous avons vu que l'albumine ajoute sa protection, mais après, et assez

loin derrière, celle que le caséinate de calcium exerce en premier lieu sur le phosphate de calcium. En d'autres termes, si l'albumine protège le complexe, ce n'est que dans une faible mesure. Quand le lait est bouilli, il n'y a, avons-nous vu, aucune coagulation *visible* de l'albumine, du moins avec les laits de vache, de chèvre, de brebis. Les grains d'albumine et de globuline, colloïdes moléculaires que la chaleur a altérés et a sans doute fait grossir, ne précipitent pas : *c'est le caséinate de calcium qui les protège*. Les rôles se sont donc renversés sous l'action de la chaleur.

La chaleur à partir de 63° altère l'état physique des colloïdes du lait, à l'exception du caséinate de calcium, si toutefois, pour ce dernier, on ne monte pas trop haut. En effet, les phosphates de calcium, l'albumine et la globuline sont altérés nettement à l'ébullition, mais le quatrième colloïde du lait : le caséinate de calcium reste sensiblement inaltéré dans les mêmes conditions. *Protégé tout à l'heure, peu il est vrai, par l'albumine dans le lait cru, il est protecteur à son tour de cette même albumine dans le lait bouilli.*

Nous faisons remarquer tout à l'heure qu'il devait s'agir ici des laits de vache, et aussi de chèvre et de brebis, car l'observation qui précède n'est pas générale. Avec les **laits riches en albumine et en globuline** : *lait de chienne* notamment, avec les **colostrums** : de *vache*, cette fois ou de toute autre espèce, également riches en ces deux protéines, l'ébullition peut amener une coagulation visible, parce que les proportions d'albumine et de globuline sont telles vis-à-vis de celles du caséinate de calcium qu'il n'y a pas assez de ce dernier pour protéger à l'ébullition la quantité très grande de flocons qui se fait par coagulation des protéines dites solubles. Bref, nous avons, au point de vue protéique, toute une gamme de compositions de laits et de colostrums qui nous permet de relever une gradation d'aspects à l'ébullition. Entre le lait de chienne qui coagule en donnant un sérum trouble, — le coagulum étant formé de flocons d'albumine et de globuline qui ont entraîné presque tout le caséinate, — et le lait de vache qui ne coagule pas, car c'est le caséinate plus abondant qui retient les flocons plus rares d'albumine et de globuline, nous pourrions avoir tous les intermédiaires que nous trouverons plus aisément dans les colostrums aux compositions chimiques si disparates.

Dans ces phénomènes, intervient en outre un élément de complication, c'est l'édifice salin ; nous en ferons l'examen plus loin.

II. **MOYENS CHIMIQUES.** — Sous ce chef, nous rangeons l'action des acides et des sels neutres.

Séparation par les acides. — C'est un point qui fera l'objet de tels développements que nous ne ferons ici que l'effleurer. Nous verrons, en effet, que lorsqu'on opère dans des conditions de réaction conve-

nable, — il faut entendre par cela un pH bien fixé, — on détermine la précipitation totale de la caséine et de la globuline, et on laisse l'albumine dans la liqueur.

La préparation de la caséine, — nous entendons parler ici seulement de la *caséine-acide* —, non pas celle qui se fait au laboratoire, mais la préparation industrielle, est redevable de grands progrès à cette notion qu'il faut opérer au point isoélectrique pour obtenir des produits purs.

La quantité de globuline du lait de vache est si faible qu'elle ne trouble ni la préparation au laboratoire, ni la fabrication dans l'industrie, mais il n'en serait pas de même si nous devions opérer sur des laits riches en globuline. Dans ce cas d'ailleurs, le rôle protecteur si marqué de la globuline vis-à-vis de la caséine ne serait pas sans engendrer de très grandes difficultés dans la séparation.

Séparation par les sels neutres. — Sous le nom de sels neutres, nous désignons les *sels de bases et d'acides forts*, les bases étant la soude, la potasse, l'ammoniaque auxquelles nous joignons la magnésie, les acides étant l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique. On les a d'ailleurs utilisés pour l'analyse du lait dans les mêmes conditions que pour d'autres humeurs de l'organisme renfermant à côté les unes des autres, albumines et globulines. Dans le lait, une complication survient ; c'est la présence de la caséine.

Les *nitrates* ont été aussi employés, mais ils sont d'un moindre intérêt. Quant aux sels *alcalino-terreux* : de *calcium*, *baryum* et *strontium* dont les actions se ressemblent en raison de leur grande parenté chimique, leur étude prendra tout un chapitre. La magnésie est voisine de la chaux, mais elle a cet avantage sur cette base que son sulfate est très soluble dans l'eau. La comparaison entre chaux et magnésie ne peut se faire avec profit que si l'on s'adresse aux chlorures de ces bases, sels très solubles dans l'eau.

Ceci dit, nous ne ferons que rappeler dans le tableau ci-dessous les précipitations qui se présentent lorsque, au lait, on ajoute les sels neutres dont nous venons de parler.

TABLEAU XVIII.

DIFFÉRENCES DANS LA PRÉCIPITATION DES PROTÉINES DU LAIT
PAR LES SELS NEUTRES

	Caséine	Albumine	Globuline
NaCl à saturation.	Précipite totalement.	Reste soluble.	Reste soluble.
Sulfate d'ammonium à saturation.	Précipite totalement.	Précipite totalement.	Précipite déjà à demi- saturation.
Sulfate de magnésium à saturation.	Précipite totalement.	Reste dissous en mi- lieu neutre, préci- pité par acidifica- tion.	Précipite totalement.

Il est possible de jouer des trois sels dont il est question dans ce tableau pour séparer caséine, albumine et globuline. Comme on opère avec des sels à saturation et que le volume des liqueurs primitives est modifié, il faut évidemment tenir compte, puisqu'on travaille sur le filtrat, de cette augmentation de volume nécessitée par la dissolution du sel, de façon à faire subir aux calculs les corrections indispensables.

Quand on sature du lait avec NaCl, le filtrat renferme l'albumine et la globuline. Ce filtrat dialysé, puis repris par l'eau, est saturé à son tour par SO_4Mg ; on précipite ainsi la globuline et on laisse en solution l'albumine. Si la séparation est toujours complète en ce qui regarde la caséine, il semble qu'il en soit de même avec cette méthode pour l'albumine et la globuline. Nous avons donc là un moyen de séparer les trois matières protéiques du lait et du colostrum. Aussi l'emploi raisonné des sels neutres a-t-il permis de procéder aux dosages respectifs des trois matières protéiques essentielles des différents laits qui ont été examinés.

III. — **MOYENS BIOCHIMIQUES.** — Sous le nom de moyens biochimiques, nous devons surtout désigner les **ferments**.

Le premier ferment auquel on ait eu recours est la **présure**. Comme l'étude de son action est la question dominante de ce travail, elle sera reportée plus loin. Toutefois, nous relèverons en passant que l'action fermentaire exercée par le lab sur la caséine ne lui appartient pas en propre. D'autres protéases animales, végétales ou microbiennes peuvent conduire à la même action. Dans certaines conditions, en effet, on coagulerait le lait avec ces ferments, comme on le fait avec la présure en prenant toutefois quelques précautions.

Nous ne parlerons pas ici, puisque ce sera l'objet d'un paragraphe spécial, de l'identité ou non de la *pepsine* et de la *présure*, mais disons qu'avec la *trypsine*, la *papaine*, ferment végétal, et les *protéases* du *B. Subtilis*, microbe très protéolytique, on peut obtenir des coagulations du lait. Certaines de nos recherches ont pu être troublées, en effet, par la présence d'abord insoupçonnée du *B. Subtilis*, lorsque nous n'opérons pas à l'abri d'antiseptiques ; nous y reviendrons.

Etude ultra-microscopique du lait et de ses colloïdes. (a) —
L'étude ultra-microscopique du lait et surtout celle de ses colloïdes considérés séparément peut être la source d'une documentation précieuse

a) Pour l'étude comparative ultra-microscopique des différents laits, se reporter aux travaux ci-dessous :

(84) KREIDL et NEUMANN. — Ultramikroskopische Beobachtungen über das Verhalten der Kaseinsuspension in der frischen Milch und bei der Gerinnung. — *Pflüger's Arch. für Physiol.*, 1908, **123**, 523.

(85) KREIDL et NEUMANN. — Ueber die ultramikroskopischen Teilen der Milch,

Envisagé uniquement en soi, l'examen ultra-microscopique ne nous donnerait que des indications fragmentaires, mais si nous savons joindre ces dernières à celles que nous obtiendrons, d'autre part, avec l'ultra-filtration et la filtration sur bougie de porcelaine, nous compléterons ainsi nos renseignements en les rendant plus productifs.

L'étude ultra-microscopique du lait peut s'aborder par la voie analytique et la voie synthétique. Par la voie analytique, nous examinerons le lait et le sérum clair obtenu par filtration sur bougie Chamberland et nous en ferons la comparaison. Le sérum obtenu par filtration sur bougie Chamberland a déjà été étudié par HEKMA (73). C'est un liquide clair qui, examiné à l'ultra-microscope, fournit un fond sombre sur lequel ne se détachent que quelques points lumineux; les micelles visibles sont donc rarissimes pour ne pas dire absents dans le sérum de bougie de porcelaine qui, débarrassé totalement, comme on le sait, du caséinate et du phosphate de calcium constitue, *au point de vue colloïdal*, une solution pour ainsi dire pure d'albumine du lait, solution homogène, n'ayant aucune tendance à flocculer.

Nous dirons encore que *la solution d'albumine forme un système colloïdal non résoluble*, par opposition aux *solutions de caséinate et de phosphate de calcium, sels qui sont résolubles*. L'albumine du lait, dans la classification des systèmes dispersés colloïdaux, se trouve au bas de l'échelle. Les dimensions de ses particules sont voisines de 5 μ . L'ultra-microscope passe à côté d'eux, tandis qu'il décèle parfaitement le caséinate de calcium et le phosphate de calcium dont la structure est micellaire. La question se pose de savoir si les micelles du caséinate de calcium et ceux du phosphate de calcium ont les mêmes dimensions ou si, au contraire, les dimensions des uns sont plus grandes que celles des autres. La voie synthétique va permettre de nous fixer sur ce point. Nous pouvons reconstituer, en effet, un édifice colloïdal analogue à celui du lait en partant de l'albumine auquel nous ajouterons successivement du caséinate et du phosphate de calcium. L'albumine dont nous sommes parti est tirée du sang. Examinée à l'ultra-microscope à la dilution convenable, on observe un champ obscur avec de très rares taches lumineuses ponctiformes. *L'aspect obtenu est le même que celui*

(Laktokonien). *Sitzungsb. d. Kais. Akad. S. Wissensch. in Wien, Math. Naturw. Kl.* mars 1908, 117.

(86) KREIDL et NEUMANN. — Über einen neuen Form bestandteil in der Milch (laktokonien). *Wien. Klin. Woch.*, 13 février 1908, 21, 214.

(87) KREIDL et NEUMANN. — Zur Frage der Labgerinnung in Sauglingsmagen. *Centr. für Physiol.*, 1908, 22, 133.

(88) G. MOURIQUAND et Ph. RUSSO. — Etude comparative de quelques laits au point de vue de leur teneur en colloïdes visibles au microscope par l'éclairage latéral sur fond sombre. Explication de leurs différences de digestibilité. a) *Soc. Méd. des Hôpitaux de Lyon*, 17 mai 1910; b) *Lyon Médical*, 1910 (II) p. 83.

donné par le sérum de filtration du lait sur bougie Chamberland. Cette solution d'albumine colloïdale est donc à l'état moléculaire ; elle n'est pas résoluble. Si nous y ajoutons du caséinate de calcium, dont la réaction soit voisine de celle du lait (pH autour de 6,7-6,8), l'aspect à l'ultramicroscope change tout à fait : le champ n'est plus obscur, il est lumineux, mais grisâtre, et semé d'une infinité de petites particules plus ou moins brillantes, animées d'un mouvement qui leur est propre.

Les dimensions de ces particules sont estimées aux environs de 30 μ , elles s'étagent de 20 μ jusqu'à 50 μ en moyenne. Si nous introduisons dans cette solution du phosphate de calcium colloïdal, par apports successifs, d'abord de chaux, ensuite d'acide phosphorique, le nombre des points très lumineux augmente fortement et leurs dimensions sont plus considérables ; elles s'étagent depuis 40 à 50 μ jusqu'à 100 μ .

L'albumine a donc, en solution, une constitution colloïdale différente de celle du caséinate et du phosphate de calcium, mais on ne peut pas signaler le fait sans évoquer à nouveau la notion de *protection d'un colloïde par un autre* qui a été l'objet plus haut de larges développements.

Nous devrions entrer maintenant dans l'étude de la caséine qui est le support protéique essentiel de la réaction que la présure exerce sur le lait, mais auparavant, nous pensons qu'il est bon de nous débarrasser de l'étude du lait considéré comme une solution vraie.

LE LAIT EST UNE SOLUTION VRAIE

Théoriquement, le lait, démuné de sa matière grasse et de ses colloïdes comme y est arrivé A. LATAIX (75) laisse une solution vraie que l'on doit envisager sous deux aspects.

a. **LE LAIT EST UNE SOLUTION IONIQUE PAR SES SELS :** Chlorures de sodium et de potassium, phosphates mono- et bi-potassique, citrates tri-potassique, tri-magnésien et tri-calcique qui sont des **électrolytes**. Nous rappellerons qu'ils possèdent, tant au point de vue physiologique qu'au point de vue physico-chimique, des physionomies particulières. Parmi eux, il est des **molécules élaborées**, très caractéristiques de la sécrétion mammaire : c'est tout d'abord le cas de l'**acide citrique**. Les phosphates alcalins qui ne sont pas positivement caractéristiques du fonctionnement de la cellule sécrétrice, car on les trouve ailleurs, donnent cependant au lait une figure spéciale, en raison de leurs fortes proportions dans les matières salines ; on sait qu'ils sont les **facteurs principaux de l'acidité actuelle de cette sécrétion**. Enfin, les chlorures jouent un rôle essentiel pour conserver au lait son équilibre osmotique ; ils sont également les **facteurs principaux de la résistivité**.

Les déplacements salins à l'état pathologique. — La répartition de ces sels n'est pas quelconque ainsi que nous l'avons fait remarquer dans des pages qui précèdent. Dans les diverses circonstances anormales et pathologiques qui modifient la physionomie chimique de la

sécrétion mammaire, la partie saline du lait dont il vient d'être question éprouve des déplacements d'équilibre menant à une autre répartition *que l'on peut prévoir* :

1^o Si le taux des phosphates mono- et bi-potassiques vient à baisser, celui de l'acide citrique baisse parallèlement, tandis que celui des chlorures s'élève ;

2^o La diminution des phosphates potassiques entraîne corrélativement une diminution de l'acidité actuelle ;

3^o Le développement de l'alcalinité du lait, c'est-à-dire la marche du pH vers 7 et même parfois au delà de 7 et l'augmentation du taux des chlorures marchent de pair.

Ces trois propositions constituent les termes d'un syllogisme que l'analyse des laits anormaux : laits de rétention, et celle des laits pathologiques : laits de mammites, campe solidement.

β. LE LAIT EST UNE SOLUTION MOLÉCULAIRE par ses **non-électrolytes**, solution dans laquelle nous distinguerons :

1^o D'un côté, le *lactose*, autre composé caractéristique du lait, le gros morceau, pondéralement parlant, de cette sécrétion, — l'eau étant de côté, — et le *facteur principal de l'indice de réfraction du sérum*.

2^o *L'ensemble azoté non protéique*. Cet ensemble très hétérogène n'est nullement spécifique de la sécrétion mammaire. Il dépend, pour une part, de l'alimentation, mais il doit être considéré beaucoup plus comme un produit d'excrétion de la mamelle, lorsqu'on envisage celle-ci comme un rein.

Dans cet ensemble azoté non protéique, on trouve de l'urée, des dérivés de la guanidine : créatine et créatinine et des acides-aminés. En fait, dans ces composés, il est des fonctions acides et des fonctions basiques, mais leur dissociation électrolytique est très peu accentuée.

Il y a lieu également de relever les déplacements d'équilibre que l'on peut constater dans cette petite portion du lait.

Quand le taux du lactose baisse, celui de l'azote non protéique monte (rétention, mammites).

Si nous associons les deux ensembles qui précèdent, électrolytes et non-électrolytes, dont la dissolution dans l'eau donne au lait les caractères d'une solution vraie, et que nous examinons les déplacements d'équilibre qui se produisent entre eux, nous les résumerons en rappelant le fait principal que nous avons mis en relief il y a longtemps déjà : *Quand le quantum du lactose diminue, celui du chlorure de sodium s'élève* (1, 2, 3, 4).

Tous les composants du lait considéré comme solution vraie sont, est-il besoin de le rappeler, des *cristalloïdes*. Ils traversent dans leur intégrité les filtres, aussi bien les membranes de porcelaine que les ultra-filtres.

Si nous nous reportons au tableau qui résume la classification, appliquée au lait, des systèmes dispersés d'OSTWALD, nous voyons que les trois principes du lait qui, hormis l'eau, pèsent le plus, se trouvent chacun dans un compartiment qui lui est propre : la matière grasse appartient à la *face émulsion*, le lactose à la *face cristalloïde*, la caséine à la *face colloïde* et nous répéterons, car cela en vaut la peine, que définir le lait en disant qu'il est une émulsion n'est pas inexact, mais certainement incomplet, car c'est le présenter sous un seul aspect, le moins intéressant au point de vue auquel nous nous plaçons dans ce travail. (*A suivre.*)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RÉFRACTOMÉTRIE DES LACTO-SÉRUMS

par A. LATAIX,

Docteur-Vétérinaire Capitaine

Travail du Laboratoire de Chimie-Physique du Professeur A. Boutaric

(Faculté des Sciences de l'Université de Dijon)

(Suite)

B. Causes des différences entre les indices de réfraction fournis, pour un même lait, par les diverses méthodes de préparation des lacto-sérums¹

Pour un *même lait* nous avons déterminé l'indice de réfraction des lacto-sérums obtenus par la plupart des différentes méthodes de préparation indiquées précédemment et nous avons trouvé les résultats suivants, à la température de 20° C.

TABLEAU I

Sérum à l'asaprol	n = 1,3419
Sérum au cuivre	n = 1,3419
Sérum chlorurocalcique.....	n = 1,3421
Tétraserum II.....	n = 1,3427
Sérum spontané	n = 1,3433
Sérum chloruromercurique	n = 1,3434
Tétraserum I	n = 1,3437
Sérum acétique	n = 1,3439

On ne peut qu'être frappé par les différences d'indices fournis par ces méthodes.

¹ Tout ce qui suivra à partir de ce chapitre, *s'applique à des laits de mélange* et non à des laits individuels sujets, comme on le sait, à de grandes variations dans leur composition et dans leurs propriétés.