ACTIVITÉ THROMBOPLASTINIQUE DU LAIT

(Deuxième note)

par

P. SALVADORI, F. BRUGHERA, F. PELLEGRINO

Centro Sperimentale del Latte, Milano

(Direttore Dr Pietro Salvadori)

Istituto Provinciale Protezione Assistenza Infanzia

(Direttore Prof. C. Torricelli)

A la suite de notre première note sur l'activité thromboplastinique du lait [1], nous avons voulu développer ultérieurement le thème de la recherche, dans le but de démontrer à l'aide de nouvelles preuves la validité de ce que nous affirmions dans la première publication et de rechercher une éventuelle superposition et interchangeabilité des effets entre l'activité thromboplastinique du sang et celle du lait.

Deuxièmement, il était dans nos intentions d'évaluer si la présence de thromboplastine de type plasmatique dans le lait avait une importance plus ou moins déterminante dans la réaction de coagulation de la caséine et, éventuellement, d'étudier si même dans le lait, comme d'ailleurs dans le sang, la thromboplastine tissulaire aurait révélé un comportement superposable à celui de la Thromboplastine plasmatique dans l'inter-réaction enzymatique de la coagulation.

Tout d'abord, nous avons tenté de nous procurer de la caséine soluble, sans activité thromboplastinique et encore potentiellement en mesure de coaguler par la présure, afin de pouvoir évaluer si en l'absence de ladite activité thromboplastinique et en présence de Ca Cl₂ la coagulation présurique se produirait également et, par suite, quelle influence aurait pu exercer l'adjonction de thromboplastine plasmatique d'origine hématique.

Nous avons essayé d'atteindre ce but en soumettant à des lavages répétés, en eau distillée, la caséine naissante obtenue par centrifugation (15 000 t/m) de lait de vache, dans l'espoir de pouvoir la séparer de la présence des éventuels facteurs de la première phase de la coagulation.

L'essai a été vain puisque nous avons constaté que, même après des lavages répétés, la caséine naissante mise de nouveau en sus-

pension dans l'eau conservait sa capacité de coaguler le substrat plasmatique de sang humain ; sous l'action de la présure la caséine naissante, lavée, donnait des temps de coagulation très courts, dus à sa forte instabilité.

Cette première observation étant faite, nous nous sommes attachés à neutraliser l'activité thromboplastinique du lait au moyen de l'héparine et par la chaleur, en nous réservant de confronter, par la suite, les valeurs obtenues avec du lait de vache entier, cru, non traité.

Dans ce sens, et en supposant toujours que le lait héparinisé ainsi que le lait pasteurisé ont des temps de coagulation par la présure beaucoup plus longs (au cours de nos essais la coagulation ne se produisait pas même, après plusieurs heures), nous avons agi sur différents lots de lait de vache soit héparinisé, soit pasteurisé, et nous y avons ajouté, à tour de rôle, les différents facteurs de première phase de l'hémocoagulation (AHG ; PTC ; facteur plaquettaire). Les traitements de pasteurisation et d'héparinisation des laits empêchent la coagulation du lait par la présure ; de plus, leur activité thromboplastinique sur substrat plasmatique est également considérablement retardée voire totalement inhibée dans le cas du lait héparinisé.

Le lait humain a été exclu de ces expériences car, étant donné la faible quantité de caséine qu'il renferme et le manque de spécificité de la présure que l'on trouve normalement dans le commerce dans le sens de fournir une claire action coagulante, ce lait ne permettait pas une observation de données valables et superposables. Chaque masse de lait de vache utilisée pour les différentes expériences a été conservé pendant toute la durée des examens dans un bain à 4° C afin de réduire au minimum les variations d'acidité lactique et les échantillons utilisés pour les tests n'étaient portés à 37° C qu'au dernier moment seulement.

Puisque nous avons utilisé différents lots de lait, logiquement, nous avons constaté une variabilité des résultats dans les examens préliminaires de coagulation par la présure, qui fournissaient des temps légèrement différents pour chaque masse examinée. Les rapports entre les temps obtenus dans chaque série de déterminations étaient d'autre part pratiquement constants et reproductibles ; pour plus de simplicité nous rapporterons les valeurs moyennes de tous les examens que nous avons effectués.

Dans l'exécution du premier groupe d'essais nous avons utilisé du lait de vache héparinisé dans les proportions suivantes : 9 cm³ de lait cru additionné de 1 cm³ d'héparine à 5 p. 100 ; la présure (titre 1/12 500) était toujours diluée à 20 p. 100. Comme contrôle nous avons utilisé le même lait de vache cru. Dans chaque essai, les examens ont été réalisés après dilution préalable en eau distillée, afin de reconstituer le volume que nous aurions obtenu par la suite par adjonction des facteurs thromboplastiniques intrinsèques.

TABLEAU I

Test de coagulation par la présure (tit. 1/2 500) du lait de vache cru qui a été traité avec de l'héparine

Epreuves effectuées	Moyenne des temps de coagulation
1 cc lait hép. + 0,9 cc H ₂ O + 0,1 cc présure	Pas de coagulation après 1 heure
{ 1 cc lait hép. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	
	3 mn 15 s
Facteur déficitaire : facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait hép. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	3 mn 10 s
Facteur déficitaire : PTC	
{ 1 cc lait hép. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	3 mn 55 s
Facteur déficitaire : AHG	
{ 1 cc lait hép. + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	2 mn 10 s
Facteurs déficitaires : PTC et facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait hép. + 0,3 cc AHG + 0,6 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	13 mn 30 s
Facteurs déficitaires : AHG et PTC	
{ 2 cc lait hép. + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	7 mn 15 s
Facteurs déficitaires : AHG et facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait hép. + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	4 mn 15 s

Afin de simplifier cet exposé, nous allons omettre les proportions utilisées dans l'exécution des tests qui seront rapportées dans les tableaux.

Tous les essais de coagulation ont été effectués à 37° C, après incubation préalable de 6 minutes des mélanges de génération. En utilisant du lait de vache cru, non héparinisé, plus eau distillée et présure, nous avons obtenu un temps de coagulation base de 3 mn 7 s. Le même lait traité avec héparine à 5 p. 100 dans les proportions mentionnées ci-dessus et comparé, après dilution en eau distillée, avec présure, ne présentait aucun signe de coagulation après 8 heures.

Ce même lait héparinisé était ensuite enrichi avec les trois facteurs intrinsèques d'hémocoagulation de première phase (tableau I) et traité avec la présure fournissait un temps de coagulation de 3 mn 15 s., pratiquement comparable au temps obtenu avec le lait non héparinisé.

Cet essai est déjà, par lui-même, significatif : il montre une participation possible des facteurs de première phase dans la réaction présure- Ca^{++} -caséine. Nous tenons à préciser qu'en l'absence de présure ni le mélange thromboplastinique plasmatique, ni la thromboplastine tissulaire, ne réussissaient à produire dans le lait aucun phénomène de coagulation.

Pour un examen plus approfondi de cette éventuelle inter-réaction, nous avons effectué une série de déterminations en rendant le mélange de génération tour à tour déficitaire de l'un des trois facteurs.

Les valeurs obtenues, en maintenant constante la valeur de la réaction (le facteur déficitaire étant chaque fois remplacé par de l'eau distillée) ont été les suivantes :

déficit de AHG : temps de coagulation 2 mn 10 s.

déficit de PTC : temps de coagulation 3 mn 55 s.

déficit du facteur plaquettaire : temps de coagulation 3 mn 10 s.

Toujours sur du lait héparinisé, d'autres essais ont été effectués, en rendant déficitaires, tour à tour, contemporanément, deux facteurs du mélange de génération qui, d'autre part, était toujours maintenu à volume constant par addition d'eau distillée. Quand on ajoutait seulement le facteur VIII° (AHG) le coagulum n'était pas très net et se produisait après 13 mn 30 s. En présence du seul facteur IX° (PTC) le coagulum était très évident après 4 mn 15 s.

En présence du seul facteur plaquettaire le coagulum a été clairement obtenu après 7 mn 15 s.

Ayant constaté le fait que dans tous les tests avec déficit du facteur VIII° et dans les tests avec déficit du facteur plaquettaire les temps obtenus étaient inférieurs aux temps relevés avec le

mélange de génération renfermant tous les éléments disponibles, et après avoir contrôlé la stabilité du pH dans les différents mélanges, il nous était apparu comme vraisemblable que les variations de dispersion colloïdale, provoquées par l'adjonction en remplacement d'eau distillée, pouvaient jouer le rôle d'élément accélérant la réaction de coagulation.

Pour cette raison, nous avons effectué une série d'essais de contrôle au cours desquels, aux différents mélanges à l'examen, ont été ajoutées de petites quantités d'eau distillée, tout en laissant inchangés les autres éléments. Les données fournies par ces examens ont indiqué clairement un allongement des temps de coagulation proportionnel à la quantité d'eau distillée introduite. Nous pensons donc que, par la simple substitution d'un ou deux facteurs par H_2O et sans augmentation de volume du mélange base, les variations, de temps devraient sans aucun doute se maintenir entre des marges d'erreur minimales, en ayant, tout au plus, une tendance à l'allongement des temps de réaction.

A notre avis, cette inversion des résultats, apparemment injustifiée, est donc bien réelle et nous avons l'intention d'en rechercher les causes lors d'expériences à venir.

De toute manière, l'hypothèse — en ce qui concerne les données susmentionnées — d'un excès de facteur VIII° (AHG) dans le lait nous semble saisissante.

Ce facteur, par inter-réaction avec les deux autres, ou du moins avec l'un d'entre eux, pourrait provoquer le commencement de la réaction ; par contre, tout seul, il en serait incapable. En effet, cela serait démontré par l'essai dans lequel le mélange de génération était déficitaire à la fois du facteur IX° (PTC) et du facteur plaquettaire : dans ces conditions, on aurait seulement dans le mélange un excès de facteur VIII° (AHG), résultant de l'adjonction du facteur antihémophilique ajouté par nous-mêmes et de celui qui serait éventuellement présent dans le lait et qui, tout seul, serait incapable de provoquer le commencement de la réaction de coagulation.

En est la preuve le temps de 13 mn 30 s avec formation de mauvais coagulum.

Par contre, lorsque l'on ajoutait seulement le PTC (temps 4 mn 15 s) ou seulement le facteur plaquettaire (temps 7 mn 15 s), la réaction s'effectuait normalement bien qu'avec des temps différents, mais typiques pour chacun des deux essais.

Une autre preuve éventuelle pourrait être recherchée dans les examens effectués avec mélange déficitaire d'un seul facteur : en présence de PTC et du facteur plaquettaire (déficit de AHG), en effet, le lait héparinisé a donné un temps de coagulation par la présure de 2 mn 10 s et donc nettement plus court que dans les

essais effectués en parallèle avec déficit de PTC (3 mn 55 s) et avec déficit de facteur plaquettaire (3 mn 10 s).

D'un point de vue purement hypothétique on pourrait par conséquent admettre qu'une quantité plus ou moins grande de facteur VIII° standard commercial du mélange de génération n'a aucune interférence sur la formation du coagulum dans les essais à la présure.

Cette hypothèse serait indirectement confirmée par les observations de O'Brien et autres [2, 3, 4], d'après lesquels l'action de l'héparine tendrait à l'inhibition du seul facteur IX (PTC) dans la génération thromboplastinique.

D'une façon tout à fait identique se sont déroulés les tests sur lait de vache pasteurisé (95° C pendant 30 mn) : le lait ainsi traité n'a en effet montré aucune trace de coagulation même 8 heures après avoir été traité avec la présure, avec les dilutions et dans les pourcentages habituels.

Dans cette série d'expériences également, le lait de vache a retrouvé sa capacité de coaguler sous l'action de la présure si on y ajoutait les facteurs de coagulation de première phase (AHG ; PTC ; facteur plaquettaire) et il donnait un temps moyen de 8 mn 17 s. Comme nous le montre le tableau n° 2, dans les essais avec mélange de génération thromboplastinique déficitaire d'un seul facteur, le temps de coagulation le plus court (6 mn 47 s) a été enregistré quand le facteur VIII° (AHG) était déficitaire, tandis que dans les essais avec présence d'un seul facteur, la coagulation ne s'est pas produite seulement quand le seul facteur ajouté était le AHG. Nous faisons remarquer la parfaite correspondance des données qui ressort de la comparaison des temps obtenus sur lait héparinisé et sur lait pasteurisé.

Enfin, comme preuve ultérieure de ce que nous venons d'affirmer, nous avons voulu répéter les mêmes essais sur lait de vache cru, non traité, dans le but de contrôler les temps sans possibilité d'interférences de la part des artifices apportés au lait pour en limiter la capacité de coagulation. En effet, nous avons pu constater que même dans ce cas l'adjonction des trois facteurs thromboplastiniques hématiques réduisait le temps de coagulation à la présure des 3 mn 7 s des essais en blanc à 1 mn 20 s des essais avec adjonction des trois facteurs de première phase.

Comme nous l'indique le tableau n° 3, les tests effectués avec déficit d'un ou deux facteurs ont fait enregistrer des différences de temps minimales, même si on les compare avec ceux du mélange de génération complet, temps qui ne respectaient pas toujours le rythme des examens décrits plus haut. Il faut d'ailleurs tenir compte du fait que l'observation de la réaction initiale de coagulation ne peut pas être toujours parfaitement exacte et que, par conséquent, les quelques secondes de différence ne peuvent pas être considérées

TABLEAU II

Test de coagulation par la présure (tit. 1/2 500) du lait de vache pasteurisé

Epreuves effectuées	Moyenne des temps de coagulation
1 cc lait past. + 0,9 cc H ₂ O + 0,1 cc présure	Pas de coagulation après 1 heure
{ 1 cc lait past. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	8 mn 17 s
Facteur déficitaire : facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait past. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	7 mn 15 s
Facteur déficitaire : PTC	
{ 1 cc lait past. + 0,3 cc AHG + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	13 mn 10 s
Facteur déficitaire : AHG	
{ 1 cc lait past. + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	6 mn 47 s
Facteurs déficitaires : PTC et facteurs plaquettaires	
{ 1 cc lait past. + 0,3 cc AHG + 0,6 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure..... incubation à 37° C pour 6 mn	Pas de coagulation après 1 heure
Facteurs déficitaires : AHG et PTC	
{ 1 cc lait past. + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	27 mn
Facteurs déficitaires : AHG et facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait past. + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC } + 0,1 cc présure..... incubation à 37° C pour 6 mn	25 mn

TABLEAU III

Test de coagulation par la présure (tit. 1/2 500) du lait de vache cru non traité

Epreuves effectuées	Moyenne des temps de coagulation
1 cc lait + 0,9 cc H ₂ O + 0,1 cc présure	3 mn 07 s
{ 1 cc lait + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 20 s
Facteur déficitaire : facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait + 0,3 cc AHG + 0,3 cc PTC + 0,3 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 03 s
Facteur déficitaire : PTC	
{ 1 cc lait + 0,3 cc AHG + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 13 s
Facteur déficitaire : AHG	
{ 1 cc lait + 0,3 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 05 s
Facteurs déficitaires : PTC et facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait + 0,3 cc AHG + 0,6 cc H ₂ O } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 14 s
Facteurs déficitaires : AHG et PTC	
{ 1 cc lait + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc facteur plaquettaire } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn 18 s
Facteurs déficitaires : AHG et facteur plaquettaire	
{ 1 cc lait + 0,6 cc H ₂ O + 0,3 cc PTC } + 0,1 cc présure incubation à 37° C pour 6 mn	1 mn

comme déterminantes. Spécialement pour ces derniers tests il faut considérer le fait que les facteurs thromboplastiniques plasmatiques ont été ajoutés à un lait déjà biologiquement intègre dans le sens de sa capacité de coagulation ; par conséquent, nous retenons comme étant suffisamment significative l'observation d'une réduction du temps de coagulation à la présure dans les cas où l'on augmente l'activité thromboplastinique préexistante à l'aide de trois, de deux ou même d'un seul facteur de première phase.

Pour compléter notre recherche, nous avons répété tous les essais en comparant, en présence de présure, tous les différents types de lait à l'étude additionnés d'un extrait de thromboplastine tissulaire (cervelle de lapin) : dans ce cas aussi nous avons pu observer les mêmes variations déjà relevées dans les examens avec adjonction de thromboplastine plasmatique, mais avec des temps considérablement réduits.

Nous reproduisons ci-dessous synthétiquement les résultats enregistrés :

Lait héparin. $1\text{ cm}^3 + \text{H}_2\text{O } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: ne coagule pas après 1 heure.

Lait héparin. $1\text{ cm}^3 + \text{thromboplast. Tiss. } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: 2 mn 19 s.

Lait past. $1\text{ cm}^3 + \text{H}_2\text{O } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: ne coagule pas après 1 heure.

Lait past. $1\text{ cm}^3 + \text{thromboplast. Tiss. } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: 1 mn 20 s.

Lait non traité $1\text{ cm}^3 + \text{H}_2\text{O } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: 3 mn 50 s.

Lait non traité $1\text{ cm}^3 + \text{thromboplast. Tiss. } 0,9\text{ cm}^3 + \text{présure } 0,1\text{ cm}^3$: 1 mn 03 s.

Conclusions

Sans considérer les nombreuses hypothèses que notre recherche laisse entrevoir, ni la possibilité de recherches ultérieures dans le but d'approfondir le problème en question, nous pensons pouvoir confirmer, sur la base des résultats obtenus, les points suivants :

1) La propriété du lait de vache de coaguler en présence de présure est en liaison étroite avec l'importance de son activité thromboplastinique.

2) L'activité thromboplastinique du lait peut être réintégrée ou remplacée par l'adjonction des facteurs de première phase de l'hémocoagulation ; on peut en dire autant de la thromboplastine tissulaire.

3) Le lait, tout comme le plasma sanguin, sont réciproquement sensibles dans le sens de la coagulation et l'activité thromboplastinique de l'un réintègre celle de l'autre.

4) Les différences de temps obtenues par la technique des mélanges de génération déficitaires des différents facteurs et la possibilité de reproduire ces mêmes temps, fait considérer comme étant très probable une analogie fondamentale des éléments qui déterminent l'activité thromboplastinique du lait et celle du sang.

5) La capacité également démontrée par la thromboplastine tissulaire de réveiller les propriétés enzymatiques du lait vis-à-vis de la présure, est une preuve de spécificité non absolue de la thromboplastine plasmatique ; mais les différences de temps (comme cela arrive aussi d'autre part dans les déterminations sur plasma sanguin) enregistrées avec les deux types de thromboplastine, sont une preuve de la distinction intrinsèque d'action qui semblerait confirmer notre hypothèse.

6) Etant donné que tous les tests ont été effectués sans jamais ajouter de Ca Cl_2 et sans jamais apporter de variation, dans la mesure du possible, au titre de la présure ni au volume des mélanges, les réactions de coagulation se sont révélées sensibles uniquement aux facteurs de génération thromboplastinique ajoutés, sans que les variations de l'état physico-chimique de la caséine ni les différentes quantités d'eau distillée nécessairement ajoutées, n'aient eu une influence déterminante sur la validité des tests.

Résumé

Comme suite à leurs expériences précédentes sur l'activité thromboplastinique du lait, les auteurs démontrent combien cette activité est en liaison étroite avec le phénomène de la coagulation par la présure, tout en la considérant comme un coefficient indispensable de la réaction enzymatique.

Par adjonction des facteurs de la première phase de l'hémocoagulation ou par celle de la thromboplastine tissulaire, ils réussissent à restituer au lait dénaturé sa capacité de coaguler de nouveau en présence de présure, prouvant ainsi la réciprocité d'action entre l'activité thromboplastinique hématique et celle du lait.

Les réactifs de la Warner Chilcott que nous avons utilisés ont été fournis par la maison Angiolini de Milan.

Le plasma humain de la Warner Chilcott que nous avons utilisé est le « plasma substrate » et non le « Diagnostic plasma ».

Cet ouvrage est parvenu à notre rédaction le 2 mars 1966.

Summary

As a further development of previous experimentation by the same researchers on thromboplastinic milk activity, the conclusion was reached that such an activity is closely related to the process of rennet-induced coagulation, and should therefore be regarded as a necessary factor in the enzyme reaction.

According first stage blood-clotting factors, or tissue thromboplastinic, results in milk recovering its capacity to curdle under the action of rennet, which evidences a reciprocal action between the thromboplastinic activities of blood and milk.

The Warner Chilcott reagents used for the experiments were purchased from Messrs. Angiolini, Milad.

Paper reached the Editor's Office on set of march 1966.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BRUGHERA F., SALVADORI P. et PELLEGRINO F. — « L'activité thromboplastinique du lait (*Première Note*). *Le Lait*, **46**, 159, 1966.
 - [2] O'BRIEN J. R. — *Nature*, **181**, 1801, 1958.
 - [3] O'BRIEN J. R. — *J. Clin. Pathol.*, **13**, 93, 1960.
 - [4] LUNDBLAD Roger L. et DAVIE Earl W. — *Biochemistry*, **3**, 11, 1720-1725, 1964.
-