

# LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

## SOMMAIRE

### Mémoires originaux :

- Ch. PORCHER. — Le lait au point de vue colloïdal. Recherches sur le mécanisme de l'action de la présure (*à suivre*) . . . 681
- A. LATAIX. — Réfractométrie des Lacto-Sérums (*à suivre*) . . . 711
- S. ORLA-JENSEN. — Recherches sur la pasteurisation basse du lait. Une nouvelle réaction pour contrôler la température de chauffage (*à suivre*) . . . 724
- H. SATASSANO et A. P. ROLLET. — Avantages des pompes à engrenage pour la circulation du lait, de la bière des jus de fruits dans les appareils de pasteurisation . . . . . 740
- K. KATRANJIEFF. — La création de laboratoires vétérinai-

- res en Bulgarie . . . . . 743
- A. BAKKE. — La vitamine C dans le lait concentré sucré (*à suivre*) . . . 749

### Bibliographie analytique :

- Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . . 764

### Bulletin bibliographique :

- 1° Les Livres . . . . . 777
- 2° Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . . 780

### Documents et informations :

- Le Congrès National de laiterie tenu à Londres, le 16 novembre 1926 (*suite et fin*) . . . . . 784
- Le système Boutflour et les vaches laitières . . . . . 790
- Guerre au lait sale en Algérie . . . 791
- Le lait dans les écoles . . . . . 792

## 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)

#### CHAPITRE III.

#### LA CASÉINE

La caséine est la protéine caractéristique de la sécrétion mammaire ; voilà pour le côté physiologique.

*C'est en elle*, avons-nous déjà dit, *que réside l'essentiel du phénomène de la coagulation par la présure*. Pas de caséine, pas de coagulation labique, mais l'inverse n'est pas fatal, car un lait peut très bien ne pas coaguler par la présure, alors qu'il contient cependant de la caséine. C'est que le phénomène de coagulation sous l'influence du ferment-lab, est dépendant d'un grand nombre de circonstances que nous aurons à examiner.

Notre intention est de faire ici comme une mise au point de l'étude de la caséine, en relevant, non pas tout ce qui a été écrit sur cette protéine dans ces dernières années, — cela dépasserait de beaucoup le cadre de notre travail, — mais en retenant les faits essentiels qui soient directement en rapport avec l'esprit de celui-ci.

Une des raisons du grand intérêt de la caséine est qu'elle est la matière première d'une industrie qui a pris dans ces dernières années un grand développement du fait des nombreuses orientations qu'elle présente.

**Le quantum de la caséine dans les différents laits.** La caséine, que la littérature anglaise appelle *caséinogène* réservant le mot *caséine* à ce que nous appelons *paracaséine*, existe dans tous les laits, mais en proportions variables. D'après les documents que nous avons compulsés, il semble que l'on puisse donner le tableau suivant, du moins pour les laits principaux qui ont donné lieu à de nombreuses analyses desquelles une valeur moyenne a été extraite :

TABLEAU XIX  
QUANTITÉ DE CASÉINE PAR LITRE DE LAIT

|                 |           |               |           |
|-----------------|-----------|---------------|-----------|
| Vache .....     | 27-30 gr. | Femme .....   | 5 gr.     |
| Bufflesse ..... | 35-37 gr. | Anesse .....  | 8-10 gr.  |
| Brebis .....    | 40 gr.    | Jument .....  | 10-12 gr. |
| Chèvre .....    | 25-28 gr. | Chienne ..... | 40 gr.    |
| Renne .....     | 80 gr.    |               |           |

Mais le taux absolu de la caséine par litre de lait n'acquiert son entière signification que si on place en face de lui le total des deux autres protéines principales du lait : *albumine* et *globuline*. Et encore, pour mieux comprendre les choses, faudra-t-il dans presque tous les cas, sinon dans tous, disséquer ce total pour y faire la part de ce qui revient, d'un côté, à l'albumine, et de l'autre, à la globuline.

**Laits caséineux et laits albumineux.** — Il est une notion d'origine médicale qui préside à la classification des laits en **laits caséineux** et en **laits albumineux**. Dans les laits caséineux dont le type est le *lait de vache*, l'emprésurage donne lieu à un caillé ferme ; dans les laits albumineux, au contraire, l'emprésurage n'est même pas toujours suivi d'un caillé, — c'est le cas avec le *lait de femme*, — ou quand ce dernier se produit, — c'est le cas avec le *lait de jument*, — au lieu d'avoir la consistance élastique du caillé de vache, il est très mou et se fragmente aisément. Quelquefois même, c'est beaucoup moins un coagulum toujours fragile qu'une bouillie de flocons mal soudés.

La différence entre les laits albumineux et les laits caséineux tient sans doute, pour une part importante, au moindre taux de la caséine dans ceux-ci, — ce n'est cependant pas toujours le cas, notamment pour la chienne, — mais elle relève également de la proportion élevée de l'albumine et de la globuline.

Dans les laits caséineux, c'est toujours la caséine qui domine, atteignant 75-85 % du total des protéines du lait.

Dans les laits albumineux, au contraire, la proportion de caséine dépasse tout au plus 65 % ; quelquefois elle s'abaisse jusqu'à près de 50 %, comme c'est le cas pour le lait de femme.

Les laits dont le taux en caséine a été donné plus haut peuvent maintenant se classer de la façon suivante :

## TABLEAU XX

## LAITS CASÉINEUX

Pour 100 des protéines totales du lait.

|                                       | Vache | Renne | Chèvre | Brebis |
|---------------------------------------|-------|-------|--------|--------|
| Caséine . . . . .                     | 85    | 80    | 75     | 80     |
| Albumine + globuline. . . . .         | 15    | 20    | 25     | 20     |
| Rapport : $\frac{C}{A + G}$ . . . . . | 5,6   | 4     | 3      | 4      |

## LAITS ALBUMINEUX

|                                       | Femme | Jument | Anesse | Chienne |
|---------------------------------------|-------|--------|--------|---------|
| Caséine . . . . .                     | 50-55 | 65     | 65     | 50      |
| Albumine + globuline. . . . .         | 50-45 | 35     | 35     | 50      |
| Rapport : $\frac{C}{A + G}$ . . . . . | 1     | 1,8    | 1,8    | 1       |

Sous sa forme tout à fait vulgaire, la caséine répond à ce que nous appelons couramment le *fromage blanc* qu'on obtient dans les conditions les plus ordinaires, soit dans l'industrie, soit dans les ménages, par addition de présure au lait, rompage du caillé sans chauffer et mise en moule.

La fabrication des fromages est vieille comme le monde, mais elle n'est pas réalisable avec tous les laits. Dans les régions tempérées, elle n'est possible qu'avec les laits de vache, de brebis et de chèvre ; dans les Indes, avec le lait de bufflesse ; dans les pays chauds, avec le lait de chamelle ; disons encore dans la Cordillère des Andes, avec le lait de lama, et dans les régions arctiques, avec le lait de renne.

L'industrie de la caséine que nous avons évoquée tout à l'heure ne saurait également s'intéresser à tous les laits, et seuls les laits caséineux avec lesquels l'emprésurage aboutit à la formation d'un caillé solide, ferme, peuvent être utilisés. Pratiquement, à l'heure actuelle, cette industrie travaille uniquement sur le lait de vache.

## LES CASÉINES DES DIFFÉRENTS LAITS

| On a longtemps discuté sur le point de savoir si les caséines des divers laits étaient des types différents ou si elles pouvaient être rapprochées les unes des autres au point d'être pour ainsi dire identifiées.

Si les premiers chercheurs qui se sont occupés de cette question semblent être arrivés à des résultats discordants, c'est parce que la préparation des caséines, notamment lorsqu'on s'adresse à des laits albumineux et surtout globulineux, n'aboutit pas toujours à des produits faciles à purifier. Beaucoup d'auteurs qui travaillaient sur le lait de femme ont employé des acides dans des conditions mal réglées, et en excès généralement; aussi solubilisait-ils, comme nous l'avons vu, une partie des protéines du lait, tant albumine que globuline et caséine, et ils obtenaient ainsi des dérivés acéto-solubles qu'ils considéraient comme produits normaux du lait et qui ne résultaient après tout que d'une altération des substances originelles. On compliquait donc les protéines du lait, on en multipliait les types sans se rendre compte qu'à l'origine, il n'y en avait pas autant qu'on voulait bien le dire. Quand on précipitait en masse par l'alcool, comme certains auteurs le préconisaient, on obtenait des mélanges d'espèces chimiques disparates et très chargés de sels. Aujourd'hui, nous disposons de méthodes plus sensibles, nous apprécions l'acidité au potentiomètre et nous ne dépassons pas la concentration en ions H qui correspond au point isoélectrique de la caséine, puisque c'est à ce point que la précipitation est maximum. Toutefois, avec E. J. COHN (79), nous devons relever les sources d'erreurs possibles dans la détermination du maximum de précipitation au point isoélectrique. L'une d'entre elles, sans doute la plus importante, est la présence d'une autre protéine ayant un point isoélectrique légèrement différent. Si le point isoélectrique de la caséine est de 4,6-4,7, celui de la globuline du sérum sanguin que nous savons maintenant être identique à celle du lait est de 5,4 (89, 90, 91). La précipitation, nous dit E. J. COHN, serait, dans ce cas, la somme des précipitations des deux protéines; il en résulte que la zone de précipitation est ordinairement élargie et que le point de la précipitation maximum change dans la direction du point isoélectrique de la seconde protéine.

L'importance de l'erreur dépend de la différence des points isoélectriques des deux protéines, de leurs proportions relatives et de leurs relatives solubilités. Or, COHN a montré (89) que les solubilités de la caséine et de la globuline dans l'eau pure sont voisines: 0 gr. 11 par litre pour celle-là, 0 gr. 07 pour celle-ci.

De ces considérations, il résulte, lorsque nous avons des quantités de globuline assez fortes à côté de celles de la caséine, que la séparation de ces deux protéines au point isoélectrique peut être entachée d'une

(79) E. J. COHN. — Studies in the physical chemistry of the proteins. — I. The solubility of certain proteins at their isoelectric points. — *The Journ. of Gener. Physiology*, 1922, 4, 697.

(90) P. RONA et L. MICHAELIS. — Ueber die Fällung der Globuline in isoelektrischen Punkt. — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, 28, 193.

(91) F. A. CSONKA, J. C. MURPHY et D. J. BREESE. — The isoelectric points of various proteins. — *The Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1926, 48, 763.

erreur que nous fait bien comprendre le travail de E. J. COHN. Aussi convient-il d'avoir recours à la séparation par les sels neutres, ce qui doit nous donner dans les quantums respectifs de l'albumine et de la globuline des chiffres plus exacts.

H. MEYER (92), F. TRENDTEL (93) admettent que non seulement les caséines des différentes espèces animales sont différentes, mais que dans une même espèce, elles sont également individuellement différentes.

H. MEYER qui a travaillé sur 16 laits de femme montre que le pouvoir flocculant vis-à-vis des acides varie pour chaque femme, mais qu'il est constant pour une même femme pendant toute la durée de la lactation.

F. TRENDTEL, de son côté, trouve que le point isoélectrique de la caséine du lait de femme oscille entre  $2,19-7,95 \times 10^{-5}$  ( $pH = 4,1-4,6$ ), qu'il est constant chez la même femme.

Ces conclusions sont assez troublantes et ont lieu de nous surprendre. Elles seraient particulières au lait de femme, parce que rien de semblable n'a été constaté avec le lait de vache. Aussi mettons-nous leur solidité en doute, et nous ajouterons, au nom de l'unicité de la fonction mammaire, qu'il y a lieu de reprendre les expériences de ces auteurs en s'assurant de l'absolue pureté des caséines sur lesquelles on aurait à travailler.

Pour les laits albumineux, c'est surtout la caséine du lait de femme qui a donné lieu au plus grand nombre de travaux, et si au début, on s'est employé à la différencier nettement de celle du lait de vache, c'est, encore une fois, parce que les conditions dans lesquelles elle se trouve dans le lait de femme sont telles que l'aspect de ses réactions essentielles y est fort différent de celui qu'elles affectent dans le lait de vache.

Au fur et à mesure que les techniques de la séparation des diverses protéines du lait ont été améliorées, qu'il a été possible d'obtenir, non sans peine, il est vrai, de la caséine pure et en quantités notables de certains laits, comme le lait de femme, on a pu se rendre compte qu'il devenait en même temps de plus en plus difficile de faire des distinctions entre les caséines provenant de laits qui, à l'origine, se comportaient cependant différemment vis-à-vis des acides et de la présure.

Aussi, semble-t-il permis de dire aujourd'hui que de même qu'il n'est qu'un seul sucre dans tous les laits : le lactose, et que tous les lactoses sont identiques (94, 95) il n'est qu'une seule caséine, ou du moins, les

(92) H. MEYER. — Beitrag zur Biochemie des Caseins. — *Biochem. Zeitschr.*, 1926, **178**, 83.

(93) F. TRENDTEL. — Ueber individuelle verschiedenheiten des isoelektrischen punktes beim frauenmilchcasein. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **120**, 371.

(94) DENIGÈS. — Identification et dosage des lactoses dans les différents laits. *J. de Pharm. et de Chimie*. 1892, **27**, 413.

(95) Ch. PORCHER. — Sur le sucre de lait de bufflesse. *Eull. Soc. Chim.* 1903, (3), **29**, 828.

caséines appartiennent-elles très étroitement à un même type chimique. Evidemment, l'édifice de la caséine est beaucoup plus compliqué que celui du sucre de lait, et on peut concevoir sans peine que dans le mode d'union des acides-aminés dont la soudure aboutit à cette protéine, il est des différences ; mais il n'apparaît pas que celles-ci soient telles qu'elles puissent retentir sur ses réactions essentielles, au point de nous engager à établir entre les caséines de diverses provenances des distinctions capitales, qu'il s'agisse de leur composition centésimale, de la qualité et du quantum des acides-aminés qui rentrent dans leur édifice, du taux de leur phosphore et de leur soufre, des réactions biochimiques auxquelles elles se prêtent, soit vis-à-vis de la présure, soit comme antigène.

ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM (96), ABDERHALDEN et LANGSTEIN (97) ont rapproché très étroitement les laits de femme, de vache et de chèvre, au point de vue de leur composition en acides-aminés.

Nous avons vu précédemment ce que H. G. WELLS (69) disait des diverses caséines considérées comme antigènes ; il ne tend rien moins ainsi qu'à les identifier.

Déjà en 1915, H. W. DUDLEY et H. E. WOODMAN (98) en étudiant comparativement l'activité optique des acides-aminés isolés de la caséine racémisée provenant des laits de vache et de brebis, arrivent à la conclusion que si le contenu en acides-aminés des deux caséines apparaît identique, néanmoins il semble que leur arrangement dans la molécule soit quelque peu différent avec l'espèce considérée. Aussi, expriment-ils l'opinion que chaque espèce doit synthétiser sa caséine sur un plan proprement spécifique, mais que cette spécificité résulte plutôt d'un arrangement intramoléculaire différent des divers acides-aminés, sans que cet arrangement modifie notablement la physionomie de l'édifice en son entier.

Les recherches récentes sur l'emploi de la spectrophotométrie pour pénétrer dans la structure des corps, et notamment des protéines, nous permettent de penser que, de ce côté, on pourrait avoir des renseignements utiles. Ainsi que le relève M. CHAMBON (99) : « La chimie biologique a pu, grâce à l'absorption élective de certaines radiations ultraviolettes par les protides, recevoir de précieux renseignements sur l'organisation de ces corps dont on ne connaissait jusqu'à ces dernières années, que les débris d'une dislocation forcenée. Les recherches de Ch. DHÉRÉ sur l'absorption des matières protéiques et de leurs constituants, les

(96) E. ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM. — Vergleichung der Zusammensetzung des Caseins aus Frauen-, Kuh- und Ziegenmilch — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1906, **47**, 458.

(97) E. ABBERHALDEN et LANGSTEIN. — Vergleichende Untersuchung über die Zusammensetzung des Caseins aus Frauen- und Kuhmilch — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1909, **66**, 8.

(98) H. W. DUDLEY et H. E. WOODMAN. — The specificity of caseinogens. A comparative study of the caseinogens of the cow and the sheep. *Biochem. Journ.*, 1915, **9**, 97.

(99) M. CHAMBON. — Les récents progrès de l'analyse. — *Journ. de Médecine de Lyon*, 5 mai 1926, 256.

amino-acides et les dioxopipérazines, ont été continuées par STENSTRÖM et REINHARD qui ont étudié l'absorption ultra-violette du sérum sanguin, par WARD pour les amino-acides, et plus récemment par ABDERHALDEN et HAAS. Ceux-ci tirent précisément argument des analogies entre les spectrogrammes ultra-violets des protéines et des dioxopipérazines pour démontrer la présence de ces derniers noyaux dans les matières albuminoïdes. »

ABDERHALDEN et ROSSNER (100), dans des recherches spectrophotométriques comparées sur les caséines des diverses espèces, sont amenés à conclure à *une concordance assez poussée, et peut-être même complète, dans la structure intime des caséines des différents laits qu'ils ont étudiés : femme, vache et chèvre.*

**LES CIRCONSTANCES QUI ENTOURENT LA CASÉINE ET LEUR INFLUENCE.** — Il est très curieux de constater qu'on a en quelque sorte mis, selon la vieille expression française, la charrue avant les bœufs, car au lieu de se demander si le milieu dans lequel la caséine se trouvait ne pouvait pas influencer ses réactions, on a fait l'inverse et on s'est trop souvent dit : « les caséines sont différentes puisque les réactions des laits qui les contiennent sont à leur tour nettement différentes ».

Déjà F. GUIRAUD (101), dans sa thèse de médecine, après avoir fait la critique de travaux antérieurs s'exprime ainsi : « Jusque dans ces dernières années, on s'est basé sur la façon différente dont se coagulaient les laits de femme et de vache pour établir entre leurs caséines des différences tranchées. On a cru longtemps que la caséine du lait de femme n'était pas coagulée par les acides ; mais E. PFEIFFER a montré que les acides chlorhydrique ou acétique dilués caillent le lait de femme le plus frais, pourvu qu'on élève la température. Seulement, la quantité nécessaire varie pour chaque lait, ce qui explique les résultats négatifs de Ph. BIEDERT qui ajoutait toujours une même quantité d'acide à une même quantité de lait... »

« En somme, aujourd'hui, on tend à admettre qu'il n'y a pas entre les deux caséines des différences considérables. Si la caséine que contient le lait de femme ne donne qu'une fine coagulation, la cause en est dans la minime quantité de l'albuminoïde présent et non dans sa nature spéciale... »

A. BRIOT (102) traduit la même idée sous une forme un peu différente :

(100) E. ABDERHALDEN et E. ROSSNER. — Vergleichende spektrophotometrische Untersuchung von Casein aus verschiedenen Milcharten. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1927, **168**, 171.

(101) F. GUIRAUD. — *Le lait de femme à l'état physiologique*. Thèse Doct. Méd. Bordeaux, 1897.

(102) A. BRIOT. — *Études sur la présure et l'antiprésure*. — Thèse Doct. ès-Sciences, Paris, 1900.

« Quelques auteurs avaient voulu conclure à l'existence d'une caséine spéciale au lait de chaque espèce animale. Ils se basaient sur la conduite différente de ces laits vis-à-vis de la présure. On vient de voir une même caséine, celle du lait de vache, se conduire de manières très différentes vis-à-vis de la présure suivant la dilution, suivant la teneur en sels du milieu. Pour suivre les auteurs, faudrait-il donc admettre que l'adjonction d'eau ou de sel au lait change la nature de son albuminoïde ? Evidemment non. *Ce qui change d'un lait à l'autre, ce sont les conditions salines accompagnant la caséine.* Comme le phénomène de la coagulation dépend exclusivement de ces conditions, il ne faut pas s'étonner de le voir si différent d'un lait à l'autre. »

Semblable réflexion avait d'ailleurs été faite il y a longtemps déjà par REHRER et SCHERER (103, 104). Pour eux, la différence dans l'aspect des flocons de caséine des laits de femme et de vache tiendrait à une proportion différente des sels que ces laits renferment. Ils ont réalisé une expérience vraiment intéressante et qui a passé pour ainsi dire inaperçue : ils ont ajouté le résidu du lait de femme, retenu par un filtre de porcelaine, au sérum provenant du lait de vache qui avait passé à travers le même filtre. Ils ont donc fait un lait dans lequel la caséine est d'origine *femme* et le milieu liquide avec tous ses sels, d'origine *vache*. Ils ont constaté que la caséine du lait de femme se comportait comme celle du lait de vache.

En réalité, la question est un peu plus complexe que ne sembleraient l'admettre REHRER et SCHERER. Les *conditions salines* du lait de femme sont évidemment très différentes de celles du lait de vache, comme nous le verrons par la suite, mais il y a autre chose : il y a cette forte proportion d'albumine et surtout de globuline, par rapport au quantum de caséine, qui fait du lait de femme un lait albumineux, ou mieux encore, globulineux. Le rôle protecteur joué, moins par l'albumine que par la globuline vis-à-vis de la caséine, dans le lait de femme, est si marqué que rapprocherait-on les conditions salines du lait de femme de celles du lait de vache, on n'obtiendrait cependant pas une coagulation du même type avec celui-là qu'avec celui-ci.

Si donc le lait de femme a tant de difficulté à coaguler par la présure et même à précipiter par acidification, puisque les premiers chercheurs ont été jusqu'à nier chez lui la présence de la caséine, il ne faut pas le mettre au compte d'une composition particulière de cette protéine, car, avec de la caséine de lait de femme purifiée convenablement, on peut obtenir toutes les réactions que donne la caséine du lait de vache plus facile à préparer. Inversement, avec la caséine du lait de vache, il nous sera possible de préparer des laits artificiels, lesquels vis-à-vis de la

(103) REHRER. — Die erste Kindernahrung. — *Sammlung klinischer Vorträge* de Volkmann, 1874, n° 70.

(104) SCHERER. — *Handwörterbuch der Physiologie* de Wagner, 1884, 2, 454.

présure ou des acides, se comporteront de la même manière que le lait de femme. Il suffira pour cela de faire varier les proportions des sels du lait, et surtout, les quantités et les proportions relatives des autres protéines associées à la caséine : albumine et globuline. *En d'autres termes, ce sont aussi les circonstances protéiques, et non plus uniquement salines, entourant la caséine qui retentissent sur ses réactions; ce n'est point une constitution chimique particulière.*

Bien que plus loin nous entrons dans quelques détails sur la possibilité d'obtenir synthétiquement un lait qui ait toutes les réactions du lait de femme vis-à-vis de la présure et des acides, nous ne saurions cependant nous appesantir sur ce sujet qui, à lui seul, mérite des développements importants. Nous renvoyons à la conférence que nous avons faite à la clinique Tarnier dans le service du Professeur BRINDEAU (105) et au travail sur le lait de femme que nous ferons paraître plus tard dans *Le Lait*.

**COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE LA CASÉINE.** — La caséine a fait l'objet de nombreuses analyses élémentaires. Nous les rassemblons ici avec le nom des auteurs :

TABLEAU XXI

## COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE LA CASÉINE DU LAIT DE VACHE

|                               | C      | H     | N     | P     | S     | O      |
|-------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| HAMMARSTEN (106). . . . .     | 52,96  | 7,05  | 15,65 | 0,848 | 0,758 |        |
| TANGL (107). . . . .          | 52,69  | 6,81  | 15,65 | 0,877 | 0,832 | 23,14  |
| BUROW (108) . . . . .         | 52,825 | 7,095 | 15,64 | 0,808 | 0,725 | 22,906 |
| VAN SLYKE et BOSWORTH (53). . | 53,50  | 7,13  | 15,80 | 0,710 | 0,720 |        |

Dans le tableau qui suit, nous donnons la composition élémentaire des caséines de diverses provenances :

TABLEAU XXII

## COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES CASÉINES DE DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

|             | C             | H     | N    | P     | S     | O     |        |
|-------------|---------------|-------|------|-------|-------|-------|--------|
| TANGL (107) | Vache. . .    | 52,69 | 6,81 | 15,65 | 0,877 | 0,832 | 23,141 |
|             | Bufflesse . . | 52,88 | 7,81 | 15,78 | 0,773 | 0,833 | 21,925 |
|             | Brebis . . .  | 52,92 | 7,05 | 15,71 | 0,809 | 0,717 | 22,794 |
|             | Chèvre. . .   | 52,90 | 6,86 | 15,48 | 0,760 | 0,700 | 23,300 |
|             | Jument . . .  | 52,36 | 7,09 | 16,44 | 0,877 | 0,528 | 22,705 |
|             | Anesse. . .   | 52,57 | 7,01 | 16,28 | 1,057 | 0,588 | 22,495 |
| BUROW (108) | Chèvre. . .   | 52,81 | 7,02 | 15,64 | 0,810 | 0,720 | 23,000 |

(105) Ch. PORCHER. — Pourquoi le lait de femme ne coagule pas par la présure *Conférences du jeudi soir à la clinique Tarnier*, Vigot fr., édit., Paris, 1909.

(106) O. HAMMARSTEN. — Zur Kenntniss der Nucleoproteide. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1894, **19**, 19.

(107) TANGL. — Die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Kaseine. *Pflügers Arch.*, 1908, **121**, 534.

(108) BUROW. — Beiträge zur Entscheidung der Frage ob die Kaseine verschiedener Tierarten identisch sind ? Thèse Bâle, 1905.

|                   |                                     | C          | H    | N     | P     | S     | O      |
|-------------------|-------------------------------------|------------|------|-------|-------|-------|--------|
| BOSWORTH et VAN   |                                     |            |      |       |       |       |        |
| SLYKE (109)       | Chèvre. . .                         | 52,50      | 7,16 | 15,67 | 0,710 | 0,710 | 23,850 |
| BUROW             | Lapine. . .                         | 52,86      | 7,05 | 15,60 | 0,810 | 0,730 | 22,950 |
| WROBLEWSKI (110)  | Femme . . .                         | 52,24      | 7,32 | 14,97 | 0,680 | 1,120 |        |
| A. W. BOSWORTH et | Vache. . .                          |            |      | 15,80 | 0,710 | 0,720 |        |
|                   | L. A. GIBLIN (111) }<br>Chèvre. . . |            |      | 15,67 | 0,710 | 0,710 |        |
|                   |                                     | Femme. . . |      |       | 15,75 | 0,700 | 0,700  |

Les données de ces tableaux nous interdisent sans doute d'identifier les caséines par l'analyse élémentaire, mais nous répondrons à cela que *les plus grandes différences sont observées avec les caséines des laits dits albumineux, plus difficiles à préparer et à purifier.*

La caséine renferme à côté des quatre éléments essentiels des protéines : C, H, O et N, du phosphore et du soufre. Pour le lait de vache, les moyennes du phosphore et du soufre, assez voisines l'une de l'autre, ne s'éloignent pas de 0,8 %, les premiers chiffres de VAN SLYKE et BOSWORTH pour le phosphore étant peut-être un peu faibles.

La quantité de phosphore qui se trouve dans la caséine à l'état phosphorique est la raison pour laquelle le facteur par lequel on doit multiplier l'azote dosé pour obtenir la quantité de protéine correspondante est différent de celui que l'analyse emploie couramment pour l'albumine et la globuline. Tandis qu'il est de 6,25 pour ces deux dernières substances, il est de 6,39 pour la caséine.

Peu de matières protéiques ont fait l'objet d'autant de travaux que la caséine, ce qui est certes dû à ce qu'on peut l'obtenir dans un grand état de pureté. Enfin, on peut en préparer des quantités considérables en s'adressant au lait de vache qui en est la source habituelle.

**La caséine est une protéine complète.** — Comme la caséine est la protéine que le jeune mammifère ingère dès sa naissance, une raison d'ordre physiologique vient se greffer sur les raisons chimiques pour accentuer l'intérêt de son étude.

Les problèmes de la nutrition et les recherches qu'ils ont provoquées ont donné lieu à de nombreuses analyses de la caséine dans le but de justifier sa haute valeur alimentaire. On peut dire, au point de vue nutritif, que *la caséine est une protéine complète*, car elle contient par ses acides-aminés les matériaux nécessaires à l'édification des tissus du jeune mammifère. Evidemment, il était difficile qu'il en fût autrement, mais il est bon de noter le fait en passant, sans en relever l'aspect finaliste.

(109) BOSWORTH et VAN SLYKE. — The casein of goat's milk, *Journ. of biol. Chem.*, 1916, **24**, 173.

(110) WROBLEWSKI. — *Beitrag zur Kenntnis des Frauenkaseins*. Thèse, Berne, 1894.

(111) A.W. BOSWORTH et L. A. GIBLIN. — The casein of human milk. — *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **35**, 115.

**LES ACIDES-AMINÉS DE LA CASÉINE.** — La caséine est, avec la zéine, de ces quelques protéines qu'on a disloquées assez complètement, au point que l'on peut avoir sous les yeux presque tout l'ensemble des morceaux dont elles sont constituées.

Aujourd'hui, après les travaux de nombreux chimistes parmi lesquels il faut citer, dans l'ordre chronologique : HAMMARSTEN, DRESCHSEL, MORNER, E. FISCHER et ABDERHALDEN, OSBORNE et HARRIS, DAKIN, etc. (112, 113, 114, 115, 116, 117, 118), on arrive à obtenir comme total des acides-aminés rencontrés dans la caséine le chiffre de 97 %.

Nous en empruntons le tableau au chapitre I : *The Organic Chemistry of Casein*, rédigé par R. A. GORTNER, dans le livre de E. SUTERMEISTER. (119).

TABLEAU XXIII  
POURCENTAGES DES ACIDES-AMINÉS ACTUELLEMENT  
ISOLÉS DE LA CASÉINE

(Synthèse des résultats de divers chercheurs).

|   |       |
|---|-------|
| Glycine . . . . .                             | 0,45  |
| Alanine . . . . .                             | 1,85  |
| Valine . . . . .                              | 7,93  |
| Leucine . . . . .                             | 7,92  |
| Iso-leucine . . . . .                         | 1,43  |
| Proline . . . . .                             | 8,70  |
| Phénylalanine . . . . .                       | 3,88  |
| Tyrosine . . . . .                            | 5,70  |
| Acide glutamique . . . . .                    | 21,77 |
| Acide aspartique . . . . .                    | 4,10  |
| Acide hydroxyglutamique . . . . .             | 10,50 |
| Sérine . . . . .                              | 0,43  |
| Hydroxy-proline . . . . .                     | 0,23  |
| Tryptophane . . . . .                         | 1,70  |
| Cystine . . . . .                             | 0,02  |
| Arginine . . . . .                            | 4,84  |
| Histidine . . . . .                           | 3,39  |
| Lysine . . . . .                              | 7,72  |
| Acide diaminotrihydroxydodécanoïque . . . . . | 0,75  |
| Acide-aminé contenant du soufre . . . . .     | 0,40  |
| Ammoniaque . . . . .                          | 1,61  |
| Phosphore . . . . .                           | 0,85  |
| Soufre . . . . .                              | 0,76  |
|   | 96,93 |

(112, 113) O. HAMMARSTEN. — Zur frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. — *Zeitschr. fur physiol. Chem.*, 1883, 7, 227, et 1885, 9, 273.

(114) DRESCHSEL. — Ber. d. math.-phys. Klasse d. Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wiss. 1892, 44, 515. Cité par Hoppe-Seyler-Thierfelder, *Handbuch der physiologisch und pathologisch chemischen Analyse*, 9<sup>e</sup> édition, p. 257.

Quelques différences sont à noter entre ces chiffres et ceux qui sont donnés par d'autres auteurs. C'est ainsi que dans un tableau analogue établi par E. J. COHN et J. L. HENDRY (120), la leucine et l'isoleucine sont groupées, et il est donné comme chiffre maximum de leucine : 9,7 % ; par contre, pour la tyrosine, le chiffre est un peu plus faible. Pour la cystine, COHN et HENDRY donnent selon O. FOLIN et J. M. LOONEY (121) : 0,25 %. Dans sa thèse, V. GEGENHEIMER (122) arrive au chiffre de 0,78 %, ce qui est trois fois la valeur donnée tout d'abord par D. D. VAN SLYKE (123). Cl. RIMINGTON (124) admet aussi la présence d'acide hydroxyaminobutyrique situé par lui dans le peptide phosphoré qu'il a isolé de la caséine.

Quoi qu'il en soit, il semble donc que l'on soit bien près de connaître toutes les molécules élémentaires dont la soudure forme la caséine. Ceci est évident, mais il est une illusion dont il faut savoir se défendre. En effet, l'hydrolyse de la caséine entraîne la fixation de molécules d'eau sur cette dernière, molécules que l'on retrouve dans les acides-aminés séparés les uns des autres et dont le nombre est d'autant plus grand que seront plus nombreux ces acides-aminés, plus petit par suite leur poids moléculaire moyen ; si bien qu'à un poids 100 d'une protéine pure correspond, suivant le cas, un poids 110 à 115 d'acides-aminés résultant de la dislocation complète de cette protéine par voie d'hydrolyse, c'est-à-dire qu'il faut fixer 10 à 15 % d'eau sur la protéine pour en séparer les acides-aminés. Pour la caséine, en raison de la proportion assez forte qu'elle contient d'acides-aminés plutôt lourds comme la tyrosine, le tryptophane, la lysine, la leucine, la proline, nous pouvons raisonnablement admettre qu'à 100 de caséine correspond

(115) K. A. H. MÖRNER. — Zur Kenntnis der Bildung des Schwefels in den Proteinstoffen. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1901-1902, **34**, 285.

(116) E. FISCHER et E. ABDERHALDEN. — Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1904, **42**, 540.

(117) T. B. OSBORNE et I. F. HARRIS. — Nitrogen in Protein Bodies. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1903, **25**, 323.

(118) H. D. DAKIN. — On amino-acids. — *Biochem. Journ.*, 1918, **12**, 290.

(119) E. SUTERMEISTER. — *Casein and its industrial applications*. — The Chemical Catalog Company, Ed. New-York, 1927.

(120) E. J. COHN et J. L. HENDRY. — Studies in the physical chemistry of the proteins II. The relation between the solubility of casein and its capacity to combine with base. The solubility of casein in systems containing the protein and sodium hydroxide. — *The Journ. of gener. physiology*, 1923, **5**, 521.

(121) O. FOLIN et J. M. LOONEY. — Colorimetric Methods for the separate Determination of Tyrosine, Tryptophane and Cystine in Proteins. — *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 421.

(122) V. GEGENHEIMER. — *Studies on the quantitative estimation of the cystine content of casein*. — Thèse Columbia University, New-York City, 1925.

(123) D. D. VAN SLYKE. — The Hexone Bases of Casein. — *Journ of biol. Chem.*, 1913, **16**, 537.

(124) Cl. RIMINGTON. — The phosphorus of caseinogen. II. Constitution of phosphopeptone. — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1187.

environ 110 à 112 d'acides-aminés. Le nombre exact de molécules d'eau à fixer sur la protéine jusqu'à séparation complète de ses acides-aminés peut d'ailleurs être calculé en fonction du nombre de molécules de ceux-ci pour un poids moléculaire donné. En effet, il disparaît autant de molécules d'eau que de molécules d'acides-aminés moins dans les liaisons peptidiques, et autant de molécules d'eau que de molécules d'acides-aminés dans les formations dicétopipéraziniques. Si nous nous reportons au tableau donné par E. J. COHN et J. L. HENDRY du nombre des molécules qui entrent qualitativement et quantitativement dans la caséine affectée d'un poids moléculaire minimum 12.800, nous trouvons que cette protéine est constituée de 83 molécules d'acides-aminés, ce à quoi correspond un poids total de molécules d'eau de 1500, en chiffres ronds, soit pas loin de 12 % d'eau à porter sur la caséine pour son hydrolyse totale.

Dans le tableau que nous avons donné ci-dessus, la somme des acides-aminés de la caséine atteint 97 %. Une marge de près de 15 % existe donc encore entre le poids des acides trouvés et le poids des acides calculés, mais certaines rectifications dans les calculs doivent déjà être faites qui vont nous permettre d'approcher du chiffre 110-112 dont il vient d'être question.

Dans le total de 97, tel qu'il résulte du tableau de GORTNER, le phosphore s'y trouve indiqué comme élément avec un taux de 0,85 % ; or, en fait, c'est comme acide phosphorique qu'il existe dans la molécule et qu'on doit le calculer. Dans ces conditions, au chiffre 0,85 %, nous substituerons celui de 2,68 % au moins, ce qui nous permet déjà d'atteindre de très près le chiffre de 100 %.

Enfin, nous rappellerons que dans l'hydrolyse acide des protéines, il est des pertes en  $\text{CO}_2$ , en  $\text{H}_2\text{S}$ , en groupes méthoxy ( $\text{OCH}_3$ ) pertes volatiles qu'on ne peut toujours récupérer et qui doivent s'ajouter aux 100 % de tout à l'heure, et ainsi, nous nous approchons davantage encore du chiffre 110-112 ci-dessus.

S. M. DUNN (125) a trouvé que l'hydrolyse sulfurique de la caséine libre au maximum 1,52 % d'azote ammoniacal et 0,81 % de  $\text{CO}_2$ .

En résumé, nous ne pouvons qu'être frappé par le total fort élevé des acides-aminés que nous fournit l'hydrolyse de la caséine et auquel n'a atteint jusqu'ici aucune autre matière protéique en dehors de la zéine (a). Ceci va nous permettre de procéder à une première approximation sur l'importance de laquelle nous ne saurions trop appeler l'attention. Il s'agit de déterminer le nombre des *groupements acides* :  $\text{COOH}$  et *basiques* :  $\text{NH}_2$  existant dans les acides-aminés rendus libres par une

(125) S. M. DUNN. — The liberation of carbon dioxide ammonia and amino-nitrogen from casein by acid hydrolysis. *Journ. of the Americ. chem. Soc.*, 1925, **47**, 2564.

a) Cependant ABDERHALDEN a obtenu 86 % pour la fibroïne de la soie et DAKIN 91 % pour la gélatine.

hydrolyse totale de la caséine. Mais pour procéder à un tel calcul, il est indispensable de partir d'un poids moléculaire donné. Ce dernier sera-t-il exact ? N'aura-t-il pas besoin d'être corrigé pour se rapprocher du poids moléculaire vrai qu'il est si difficile de préciser avec les protéines ?

Quel que soit le choix que nous ferons du poids moléculaire de la caséine, cela ne saurait influencer les proportions relatives des divers acides-aminés contenus dans cette protéine, mais il faut néanmoins s'employer à raisonner de la façon la plus serrée possible pour se rapprocher de ce qu'on peut estimer être la vérité.

### POIDS MOLÉCULAIRE DE LA CASÉINE

On sait que le poids moléculaire élevé des protéines est une des caractéristiques de celles-ci, qu'il est en partie responsable de leur aspect colloïdal. Sa détermination a fait l'objet de très nombreux travaux dont on peut dire pour le moins que leur lecture fait surgir la grande difficulté qu'on éprouve à apporter quelques précisions dans cette question. Toutefois, ce n'est pas une raison pour ne pas tenter une détermination dont le mérite sera de nous faire pénétrer intimement dans la structure de la molécule. Nous nous en tiendrons ici évidemment aux travaux qui ont plus spécialement porté sur la caséine.

E. J. COHN, soit seul, soit avec ses élèves, a été amené à s'occuper du **poids équivalent** et du **poids moléculaire** de la caséine. Nous reportons un peu plus loin l'étude de celui-là et nous nous en tenons pour l'instant à l'examen de celui-ci.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS (126) examinent tour à tour les différentes méthodes auxquelles on peut avoir recours pour la détermination du poids moléculaire des protéines et ils en font la critique. Il est certain qu'après le travail classique de Van't HOFF sur l'application des lois des gaz aux solutions, lesquelles établissent une relation entre la pression osmotique et le nombre de molécules dissoutes dans l'eau, on pouvait penser recourir à cette loi pour déterminer le poids moléculaire des protéines. Mais la méthode ne conduit pas à de bons résultats parce qu'elle manque de sensibilité, et c'est pourquoi l'on s'est rabattu sur la composition des protéines considérées par le quantum de leurs acides-aminés pour fixer au moins le *poids moléculaire minimum*, le poids moléculaire probable devant être un multiple entier de ce dernier. Il est certain que c'est par cette voie que l'on aura le plus de chances d'arriver à une détermination exacte ; il dépend donc des progrès de l'analyse dans l'avenir de nous permettre d'approcher du poids moléculaire vrai. On comprend pourquoi nous voyons tant

(126) E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS. — Studies in the physical chemistry of the proteins. — V. The molecular weights of the proteins. The minimal molecular weights of certain proteins. — *Journ. of biol. Chem.* 1925. **63**, 721.

de travaux paraître sur le dosage de tel ou tel acide-aminé dans les protéines. Avec la caséine, nous avons en outre du phosphore et du soufre. Les proportions de ces deux éléments y sont assez voisines et comme leurs poids atomiques sont également voisins, 31 et 32, on est amené à admettre que les nombres des atomes de phosphore et de soufre dans la caséine sont eux-mêmes voisins.

Le dosage du phosphore de la caséine peut se faire avec une grande approximation. Si nous rejetons le premier chiffre donné par L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH : 0,71 %, chiffre trop faible — parce qu'il résultait d'une technique critiquable : l'emploi d'ammoniaque en excès à un moment donné, — nous sommes ramené à des chiffres un peu plus forts oscillant autour de 0,80 % ; O. HAMMARSTEN lui-même admettait 0,85 %.

Nous pourrions calculer sans grande erreur avec le phosphore le *poids moléculaire minimum*. En effet, en admettant qu'il n'y ait que 1 atome de phosphore dans la caséine, avec un taux de 0,80 %, nous aurons un poids moléculaire minimum de  $\frac{31 \times 100}{0,80} = 3.875$ , chiffre légèrement inférieur à 4000. En ayant recours au taux trop faible de 0,71 %, nous aurions un poids moléculaire minimum de 4.300.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. P. PRENTISS déterminent le poids moléculaire minimum de la caséine en se basant, non plus cette fois sur le phosphore, mais sur les acides-aminés de cette molécule.

Dans l'hypothèse où il n'y aurait que 1 seule molécule de tryptophane dont le dosage se fait maintenant avec précision, puisque la plupart des auteurs sont d'accord pour admettre le chiffre de 1,70 %, nous avons un *poids moléculaire minimum de 12.800*, qui est trois fois par conséquent, en chiffres ronds, celui que nous avons admis tout à l'heure dans l'hypothèse où la caséine ne renfermerait qu'un seul atome de phosphore. Par la comparaison de ces chiffres, nous sommes déjà amené à dire que la molécule de caséine renferme au moins 3 atomes de phosphore.

D'une façon générale, étant donné le poids moléculaire d'un acide-aminé et son pourcentage dans la protéine, le poids moléculaire minimum de la protéine sera obtenu par la formule :

$$\text{P.M.m. de la protéine} = \frac{\text{P.M. de l'acide-aminé} \times 100}{\text{Pourcentage de l'acide-aminé dans la protéine.}}$$

Il est certain que si le dosage de l'acide-aminé que l'on veut considérer pour établir le poids moléculaire minimum n'est pas d'une très grande précision, nous risquons ainsi d'aboutir à des valeurs critiquables.

E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS, s'appuyant sur d'autres acides-aminés, ont pu déterminer ainsi le poids moléculaire minimum de la caséine, et en prenant comme base le poids moléculaire de 12.800 dont nous avons parlé tout à l'heure, obtenu à l'aide du

pourcentage du tryptophane, ils ont, en conséquence, pu fixer le nombre des molécules de chaque acide-aminé dans la caséine.

Avec la cystine dont le taux serait de 0,25 % pour O. FOLIN et J. M. LOONEY (121), nous arriverons à un poids moléculaire de 96.000, soit huit fois le poids moléculaire minimum déterminé en partant du tryptophane. Ce poids moléculaire s'abaisserait à une valeur trois fois moindre, si nous prenions le chiffre de V. GEGENHEIMER (108), soit 0,78 % donné par cet auteur.

En résumé, du travail de E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTIS, il résulte que le poids moléculaire minimum de la caséine serait environ de 12.800 (a), mais que le poids moléculaire probable devrait être au moins de 96.000. Ils vont même jusqu'à admettre le double de ce chiffre : 192.000, estimant qu'il est nécessaire, car il n'est guère possible, disent-ils, de concilier certains résultats analytiques sur la base d'un poids moléculaire plus petit. Quoi qu'il en soit, ce que l'on peut dire de certain, c'est que le poids moléculaire vrai de la caséine est beaucoup plus grand que 12.800. Aussi ne saurait-on admettre celui dont parle L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH dans leurs recherches : 8.800, qui est les deux-tiers environ du chiffre de 12.800 que E. J. COHN, J. L. HENDRY et A. M. PRENTISS choisissent pour raisonner sur la constitution de la caséine.

Des travaux récents appuyés sur la cryoscopie des solutions dans le phénol semblent conduire pour les protéines à des poids moléculaires plus faibles qui ont lieu de surprendre.

E. J. COHN et J. B. CONANT (127) reprenant la question font d'abord remarquer combien *il est difficile d'enlever les dernières traces d'eau des protéines*, et dans ces conditions, si la protéine n'est pas absolument sèche, l'eau qu'elle contient joue dans l'abaissement du point de congélation du phénol et tend par conséquent à diminuer dans de fortes proportions le poids moléculaire de la protéine. E. J. COHN et J. B. CONANT sont amenés à conclure de l'étude de l'abaissement du point de congélation des protéines en solution dans le phénol qu'il n'y a nullement dissociation de la protéine en morceaux d'un poids moléculaire faible et que les vrais poids moléculaires des protéines dans le phénol, comme dans l'eau, sont ceux qui sont décelés par les méthodes analytiques et physico-chimiques auxquelles COHN a eu recours dans ses travaux antérieurs.

Le poids moléculaire minimum adopté par COHN : 12.800 — nous préférons 12.000 — va maintenant nous servir de base pour déterminer

a) 12.000 serait peut-être préférable, parce que 12.800 nous semble un peu fort. En admettant 3 atomes de P dans la molécule et un quantum de P = 0,80 %, on a un P. M. = 11,625.

(127) E. J. COHN et J. B. CONANT. — The molecular weights of proteins in phenol. — *Proc. of the nat. acad. of sciences (U. S. A.)*, 1926, **12**, 433.

le nombre des molécules des acides-aminés que l'analyse décèle dans la caséine. Nous trouverons ainsi que celle-ci renferme :

TABLEAU XXIV

## NOMBRE DES MOLÉCULES DES ACIDES-AMINÉS DANS LA CASÉINE

|  |                                 | Nombre de<br>molécules | Nombre<br>de COOH | Nombre<br>de NH <sup>2</sup> |
|--|---------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------------|
| Monoacides et<br>monoaminés.<br>(32 molécules) | Alanine . . . . .               | 3                      | 3                 | 3                            |
|  | Valine . . . . .                | 9                      | 9                 | 9                            |
|  | Leucine . . . . .               | 10                     | 10                | 10                           |
|  | Phénylalanine . . . . .         | 3                      | 3                 | 3                            |
|  | Tyrosine . . . . .              | 4                      | 4                 | 4                            |
|  | Histidine . . . . .             | 2                      | 2                 | 2                            |
|  | Tryptophane . . . . .           | 1                      | 1                 | 1                            |
| Diacides et<br>monoaminés.<br>(31 molécules)   | Acide glutamique . . . . .      | 19                     | 38                | 19                           |
|  | Acide aspartique . . . . .      | 4                      | 8                 | 4                            |
|  | Acide β-hydroxyglutamique . . . | 8                      | 16                | 8                            |
| Monoacides et<br>diaminés.<br>(10 molécules)   | Lysine . . . . .                | 7                      | 7                 | 14                           |
|  | Arginine . . . . .              | 3                      | 3                 | 6                            |
|  | Proline . . . . .               | 10                     | 10                | —                            |
|  |                                 | 83                     | 114               | 83                           |

Nous ajoutons les 10 molécules de proline dont le caractère acide est très marqué, puisque l'azote s'y trouve uniquement sous la forme imine.

**L'ACIDITÉ DUE AUX CARBOXYLES (CO<sup>2</sup>H).** — Ce tableau appelle des réflexions du plus haut intérêt. Les progrès de l'analyse de la caséine ont révélé, grâce surtout aux derniers travaux de DAKIN, la présence d'un grand nombre de molécules de *diacides*. Les premiers chercheurs n'avaient pas trouvé dans la caséine nettement plus de groupements COOH que de groupements NH<sup>2</sup>; ceci était cependant *a priori* difficile à concilier avec la nature acide marquée de la caséine. Or, les plus récents travaux résumés dans les tableaux ci-dessus nous permettent de voir que sur les 83 molécules trouvées avec une quasi-certitude dans la caséine, nous avons 31 molécules de diacides, à côté de 10 molécules de diamines seulement. *Le quantum des acides glutamique, aspartique et β-hydroxyglutamique atteint 36,4 %*; incontestablement, on doit conclure au caractère acide prononcé de la caséine.

Si nous faisons le total du nombre des COOH et des NH<sup>2</sup> qui appartiennent aux acides-aminés du tableau, on obtient : 114 COOH contre 83 NH<sup>2</sup>, c'est-à-dire *un excès de 31 fonctions acides sur les fonctions basiques*. N'oublions pas d'ajouter les 4 fonctions phénol de la tyrosine qui sont susceptibles de s'unir également à des alcalis.

**L'ACIDITÉ RELEVANT DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE.** — Mais à l'acidité des COOH de la caséine vient s'ajouter celle des oxydrides phospho-

riques. Avec un poids moléculaire de 12.000, nous avons vu que la caséine renferme 3 atomes de phosphore. Or, *le phosphore se trouve dans la caséine sous la forme complètement oxydée d'acide orthophosphorique.* Les trois molécules correspondant à ce dernier contiendraient donc 9 OH acides ; mais ceux-ci ne sont pas tous libres, 3 disparaissent déjà dans l'éthérification d'un nombre égal de fonctions alcool de certains acides-aminés. Les tableaux que nous avons donnés nous montrent, en effet, qu'il y a toujours plus d'acides-alcools-aminés que d'atomes de phosphore, donc que de molécules d'acide orthophosphorique. La découverte par DAKIN de 8 molécules d'acide  $\beta$ -hydroxyglutamique est à cet égard très intéressante. D'ailleurs, nous reviendrons plus loin sur tous ces points lorsque nous parlerons de la répartition du phosphore dans la caséine.

### ESSAI SUR LA CONSTITUTION DE LA CASÉINE

La connaissance du nombre et de la nature des acides-aminés qui entrent dans la caséine est déjà d'un vif intérêt, mais ce qui importe davantage, c'est de déterminer quel est leur mode de liaison. Comment sont-ils soudés les uns aux autres ? Quelle est, en un mot, la constitution de la caséine ? C'est une question à laquelle il est impossible de répondre aujourd'hui avec précision. Des ébauches peuvent être tentées, utiles déjà, mais qui n'en restent pas moins fort teintées d'à peu près. En effet, plusieurs tentatives ont été faites pour donner d'une protéine une image géométrique qui soit analogue aux formules de constitution des corps moins complexes. Ce qui rend ici la difficulté particulièrement grande, c'est que pour l'assemblage des molécules plus simples dont la constitution est connue, il est de multiples façons de procéder.

On pourra tout d'abord nous objecter notre ignorance du poids moléculaire vrai, c'est-à-dire, en dernière analyse, celle du nombre réel des molécules plus simples que nous devons unir les unes aux autres. Mais ce n'est pas là, à notre avis, la plus grande difficulté ; elle réside plutôt dans le *modé d'assemblage* ; nous venons de dire qu'on peut en imaginer de nombreux.

Vouloir établir la formule de constitution de la caséine est donc osé, pour ne pas dire plus. D'aucuns pourraient penser qu'il s'agit là d'un jeu de l'esprit, facile après tout, en raison du nombre considérable de solutions qu'il laisse prévoir. Nous acceptons volontiers cette remarque et nous en prenons acte, en reconnaissant toutefois que si elle est valable, mais aussi quelque peu péjorative, ce n'est pas une raison pour reculer devant l'obstacle.

PLIMMER (128) est un des premiers qui aient tenté de donner d'une protéine, — il ne s'agissait pas en l'espèce de la caséine, — une

(128) R. H. PLIMMER. — *The chemical Constitution of the Proteins.* Longmans, Green et Co, Ed., Londres.

formule de constitution nous permettant de comprendre la plupart de ses réactions. Il était guidé par les travaux de FISCHER et de ses élèves sur la constitution des peptides pour l'établissement de laquelle on faisait jouer à l'enchaînement peptidique le rôle principal, quoique FISCHER ait reconnu lui-même que cet enchaînement n'était pas le seul possible ; *il admettait l'existence dans les protéines de noyaux dicétopipéraziniques ou dioxopipérazines ou encore cyclopeptides.*

**Les peptides et les noyaux dicétopipéraziniques.** — Si nous nous reportons à la conférence de A. BLANCHETIÈRE (129) et au rapport de A. MOREL (130), publications d'une riche documentation, nous voyons que l'on peut concevoir les matières protéiques comme résultant de la soudure des acides-aminés, tantôt sous la forme peptidique, tantôt sous la forme dicétopipérazinique. Les cycles dicétopipéraziniques formeraient une masse centrale sur les différents points extérieurs de laquelle viendraient se fixer des peptides ; la structure de l'ensemble serait rayonnée.

ABDERHALDEN et ses élèves ont isolé de la caséine, soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse fermentaire sous l'action de la trypsine, des noyaux dicétopipéraziniques dans lesquels se trouvaient unis, entre eux ou avec des acides-aminés voisins : leucine, valine, alanine, tyrosine, histidine, tryptophane et hydroxyproline.

La labilité des cyclopeptides sous l'influence des acides et des alcalis est assez grande et permet de supposer peut-être que la proportion de ces groupements est plus importante que celle qui a été donnée jusqu'ici.

En utilisant la méthode de A. BLANCHETIÈRE pour la recherche de la présence possible des noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans la caséine, A. MOREL, Ch. PORCHER et A. SIMÉON (131, 132) ont trouvé que la proportion centésimale, par rapport à l'azote total soluble, de l'azote non carbaminé a été après une hydrolyse chlorhydrique à 2 % à 170° de 27,4 après 6 heures avec 20 fois le poids d'acide, de 28,3 après 4 heures avec 20 fois le poids d'acide et de 40 après 4 heures avec 12 fois le poids d'acide : résultats qui sont à rapprocher de ceux obtenus antérieurement par MM. A. MOREL et A. SIMÉON avec la fibrine de sang de bœuf.

Nous devons rappeler que la méthode de A. BLANCHETIÈRE est basée sur le fait que « les peptides et les amino-acides qui possèdent

(129) A. BLANCHETIÈRE. — L'évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 218.

(130) A. MOREL. — Progrès effectués depuis le précédent Congrès de Lyon (1906) dans nos connaissances sur la constitution des matières protéiques. — Congrès de Lyon (1926), de l'Assoc. Franc. pour l'Avanc. des Sciences.

(131) A. MOREL, Ch. PORCHER et A. SIMÉON. — Les noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans la caséine. — *Soc. Chim. de France*, Section de Lyon, 15 juin 1928.

(132) A. SIMÉON. — Contribution à l'étude chimique de la constitution des protéides. Recherches de la présence possible de noyaux 2-5 dioxopipéraziniques dans quelques-uns d'entre eux, par la méthode de Blanchetière. — Thèse Pharm., Lyon, 1928.

à la fois les groupements fonctionnels acides et aminés donnent par combinaison avec la baryte et l'anhydride carbonique des dérivés carbaminés insolubles dans l'alcool et l'acétone, alors que les dioxopipérazines qui ne possèdent aucun de ces groupements libres n'en peuvent donner.

« On conçoit donc facilement qu'après élimination des acides-aminés et des peptides à l'état de carbaminés, l'on puisse sur la solution restante avoir une indication de la quantité de dioxopipérazines par le dosage de l'azote non carbaminé. » (A. SIMÉON).

Comme on vient de le voir, c'est par l'*hydrolyse ménagée* de la caséine, et des protéines en général, que l'on peut être fixé sur la proportion des cyclopeptides qu'elle renferme. Pour peu que l'on agisse violemment avec trop d'acide et en chauffant longtemps, les dicétopipérazines sont à leur tour rompues.

L'emploi des ferments digestifs nous conduit à une *dislocation ménagée des protéines*, ce qui nous permet alors de saisir dans la molécule la possibilité de certaines liaisons que l'on percevrait mal ou pas du tout avec l'hydrolyse acide. On peut admettre que sous l'action des ferments, ce sont d'abord les enchaînements peptidiques extérieurs, plus facilement attaquables, qui se décomposent en mettant en liberté leurs acides-aminés. On sait, en effet, que lysine, tyrosine et tryptophane apparaissent rapidement dans la digestion trypsique.

Les attaques de la pepsine et de la trypsine ne sauraient être quelconques ; elles sont très orientées, spécifiques en quelque sorte, et elles précèdent par étapes dans un sens bien déterminé.

L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR (133, 134, 135) ont formulé une hypothèse, qui sera féconde, sur la constitution des diastases protéolytiques et le mécanisme de leur action. Nous ne pouvons pas malheureusement insister ici, comme nous le voudrions, sur les recherches de ces auteurs qui se sont employés à expliquer les actions différentes de la pepsine et de la trypsine, lesquelles agissent, celle-là en milieu acide, celle-ci en milieu alcalin. Ils admettent que l'état colloïdal n'est pas capable par lui-même de provoquer les phénomènes diastatiques, et que de toute nécessité le liquide interstitiel doit renfermer des électrolytes qui sont en quelque sorte actionnés par les diastases.

Nous reviendrons plus loin sur les différences qu'il y a lieu de noter dans les digestions pepsique et trypsique de la caséine, à l'occasion de la forme qu'affecte le phosphore dans cette dernière. Ne retenons de l'examen présent que quelques données utiles sur la constitution de la caséine.

(133) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — Sur la constitution des diastases protéolytiques et le mécanisme de leur action. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 955.

(134) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — De l'adsorption élective des colloïdes. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 523.

(135) L. HUGOUNENQ et J. LOISELEUR. — Sur la biochimie des électrolytes. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 611.

Que les enchaînements des acides-aminés dans la caséine soient peptidiques ou dicétopipéraziniques, il y a toujours un groupement  $\text{NH}^2$  qui disparaît en même temps qu'un groupement  $\text{COOH}$  lors de la soudure, et lorsque celle-ci affecte des diacides-monoaminés, 1  $\text{COOH}$  reste libre; quand elle touche un monoacide-diaminé, c'est un  $\text{NH}^2$  cette fois qui est libre. Les  $\text{NH}^2$  libres dans la caséine appartiennent à la lysine, et l'azote susceptible de réagir avec l'acide nitreux correspond, en effet, à la moitié des  $\text{NH}^2$  de la lysine. La distribution de l'azote selon la méthode de D. D. VAN SLYKE (136, 137, 138) nous donne également des renseignements importants qui doivent concorder avec ceux que nous apporte la détermination du nombre et de la qualité des acides-aminés de la caséine.

Chez les protéines désaminées qui ont été traitées par l'acide nitreux on n'obtient plus de lysine par l'hydrolyse.

**Le nombre des fonctions acides libres de la caséine.** — Nous verrons plus loin lorsque nous discuterons de la neutralisation de la caséine par les bases quel est le nombre de fonctions acides que l'on peut supposer libres dans la caséine. Il est moindre qu'on pourrait le pressentir d'après les tableaux ci-dessus. Il semblerait, en effet, que 30 carboxyles fussent libres, mais n'oublions pas que l'hydrolyse de la caséine met également en liberté de l'ammoniaque, environ 1,50-1,60 %, ce qui correspond à 12 molécules d'ammoniaque, lesquelles seraient fixées sous la forme amidée sur des carboxyles des acides bibasiques et réduiraient par conséquent d'autant le nombre de fonctions acides libres salifiables par les bases.

DAKIN a suggéré également qu'une partie des acides glutamique et  $\beta$ -hydroxyglutamique existerait dans la molécule sous forme d'anhydrides cycliques.

Comme on le voit, bien faibles sont encore nos connaissances sur la constitution de la caséine. Néanmoins, on ne saurait les ramener à rien, et quand nous comparons ce que nous connaissons maintenant à ce que l'on pouvait préciser il n'y a guère plus de 10 à 15 ans, on peut avancer qu'un grand progrès a été réalisé. La connaissance de la distribution de l'azote dans la protéine selon la technique de D. D. VAN SLYKE, celle des groupements cyclopeptidiques, la détermination des fonctions acides et basiques pouvant rester libres après les soudures si variées entre les acides-aminés nous apportent sans contredit des documents qui nous

(136) D. D. VAN SLYKE. — The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristic of the different amino-acids — *Journ. of biol. Chem.* — 1911, **10**, 15.

(137) R. H. A. PLIMMER et J. L. ROSEDALE. — Analysis of proteins. V. VAN SLYKE'S method of determination of nitrogen distribution. — *The Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1004.

(138) R. H. A. PLIMMER et J. L. ROSEDALE. — Analysis of proteins. VII. Direct estimation of arginine. — *The Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 1020.

permettent de mieux comprendre les réactions chimiques de la caséine. Néanmoins, nous sommes loin encore du jour où l'on pourra s'essayer à donner une formule de la caséine avec quelques chances de côtoyer la vérité.

#### LA PLACE DU PHOSPHORE DANS LA CASÉINE

**Le taux de l'acide phosphorique propre de la caséine.** — C'est O. HAMMARSTEN qui le premier constata que la caséine renferme du phosphore ; le fait a été confirmé par tous les chimistes qui ont étudié plus spécialement cette protéine. On peut admettre que la caséine renferme en chiffres ronds 0,80 % de phosphore. Comme cet élément existe dans la molécule sous la forme d'acide orthophosphorique  $PO^4H^3$ , nous voyons que la proportion d'acide phosphorique appartenant en propre à la caséine atteint donc 2,50 %, ce qui est un quantum remarquablement élevé.

Le phosphore fait partie de beaucoup d'autres protéines, et il y existe, comme dans la caséine, à l'état d'acide orthophosphorique ; mais alors que dans les *nucléoprotéides vraies*, ce dernier entre dans la molécule comme éther d'un hydrate de carbone, dans les *pseudo- ou para-nucléoprotéines* appelées encore *phospho-protéines*, desquelles relève la caséine qui y voisine avec la vitelline du jaune d'œuf et l'ichtyline des œufs de poissons, l'acide phosphorique n'est pas lié de la même façon (139).

**La caséine est un éther phosphorique.** — L'existence de nombreux OH alcooliques dans la caséine rend plausible la possibilité d'une éthérisation de certains d'entre eux par l'acide phosphorique. Nous avons vu plus haut que, dans l'hypothèse du poids moléculaire minimum de 12.000 qui exige la présence de 3 atomes de phosphore, donc de 3 molécules d'acide orthophosphorique, nous avons déjà, en dehors de la sérine dont le pourcentage est faible dans la caséine, 8 molécules d'acide  $\beta$ -hydroxyglutamique, c'est-à-dire plus qu'il n'en faut pour l'éthérisation de l'acide phosphorique, et nous ne parlons pas de l'acide hydroxyaminobutyrique dont la présence est admise dans la caséine par Cl. RIMINGTON. Enfin, rappelons l'acide diaminotrihydroxydodécanoïque de FISCHER et ABDERHALDEN dont l'existence a été ultérieurement mise en doute. En somme, *la caséine serait un éther phosphorique*. Reste à justifier cette hypothèse, ce qui entraîne nécessairement la mise en place de l'acide phosphorique au sein de la molécule.

Nombreux sont les auteurs qui se sont employés à résoudre cette question, et la voie la plus simple pour y parvenir est d'extraire de la molécule originelle, au cours de sa simplification, des groupements moins lourds dans lesquels le phosphore serait concentré. Pour les isoler, la dislocation de la caséine doit plutôt faire appel à des moyens biochimiques.

(139) Th. POSTERNAK. — *Sur le mode de liaison du phosphore et du fer dans l'ovovitelline*. — Thèse Doct. ès Sciences Physiques, Genève, 1928.

ques, moins violents, qu'à des moyens chimiques. En effet, c'est à la pepsine et à la trypsine que l'on s'est adressé pour séparer de la caséine des peptides plus petits dans lesquels se trouve rassemblé le phosphore.

On peut dire, et le dépouillement des travaux auxquels nous allons maintenant procéder nous en apporte la preuve, que l'étude de la digestion de la caséine a été entreprise surtout dans le but de voir ce que devenait le phosphore au cours de la simplification diastasique de cette protéine.

**L'action des alcalis sur la caséine. — La facile séparation de l'acide phosphorique.** — Toutefois, nous devons au préalable enregistrer une acquisition de nature chimique de la plus grande importance ; elle est relative à la *grande labilité de l'acide phosphorique de la caséine en milieu alcalin*. Il y a longtemps qu'on a signalé la faible résistance de la caséine vis-à-vis des alcalis. L. V. LUNDBERG (140), dès 1876, en fait mention. Il constate qu'une solution de caséine renfermant 0,40 % de soude (N/10) portée 7 minutes à l'ébullition ne coagule plus par la présure. Mais si l'on ne chauffe pas et si on laisse à la température ordinaire, le même résultat est acquis au bout de quelques jours. R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS (141) en 1906 notent également que *tout l'acide phosphorique est libéré par la soude à 1 % (N/4) à 38° en quelques heures*.

L. LINDET (142) est frappé de la facilité avec laquelle les bases alcalines et alcalino-terreuses dissocient, même à froid, la molécule de la caséine.

Le fait est donc classique aujourd'hui et tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître qu'en présence de soude à 1 % (solution N/4) à la température ordinaire, le clivage de la molécule de caséine commence du côté de l'acide phosphorique qui se détache en entier. Evidemment, si l'on chauffe, la séparation de ce dernier est plus rapide encore.

Pour L. LINDET, « la soude ne dégrade pas et n'hydrolyse pas l'acide phosphorique aussi vite que la chaux » et, « l'ammoniaque est vis-à-vis de la caséine encore moins énergique que la soude ».

Ces dernières remarques nous engagent donc à ne jamais oublier que la caséine est d'une très grande sensibilité vis-à-vis des bases alcalines et alcalino-terreuses. Si, dans la préparation de cette protéine, lorsqu'on redissout la caséine précipitée pour la reprécipiter à nouveau par un apport acide, la neutralisation de la caséine ne se fait pas avec

(140) L. V. LUNDBERG. — Smårte bidreg till k annedomen om kaseinet. *Uppsala l karef renings f rhand-l ngar*, 1876, **11**, 343. Analyse de Hammarsten in *Maly' Jahrb.*, 1876, **6**, 11.

(141) R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS. — The separation of phosphorus from caseinogen by the action of enzymes and alkali. *Journ. of Physiol.*, 1905-1906, **33**, 439.

(142) L. LINDET. — Sur les formes que le phosphore et le calcium affectent dans la caséine du lait. — *Ann. de l'Inst. Nat. Agron.*, 1912 (2<sup>e</sup> s rie), **11**, fasc. 2. et 8<sup>e</sup> Congr s Intern. de Chimie appliqu e. Londres, 1912, **19**, 199.

soin et qu'on dépasse fortement le  $pH = 7$ , on risque d'en détacher graduellement l'acide phosphorique. Bien entendu, tout dépend des conditions de température et de temps ; il peut arriver que les précipitations ultérieures soient incomplètes, quelquefois même négligeables. C'est que la caséine a été altérée du fait d'une alcalinisation trop forte. Nous verrons plus loin, lorsque nous parlerons de la préparation de la caséine au laboratoire, que les auteurs les plus récents se trouvent d'accord pour ne jamais dépasser le  $pH = 7$  lorsqu'on redissout la caséine au cours de sa purification.

Cela est si vrai que E. J. COHN et R. E. L. BERGGREN (143) font remarquer que si, au cours de sa préparation, la caséine a été amenée à une réaction alcaline franche, le produit final obtenu ne ressemble pas à la caséine que l'on aurait eue s'il n'y avait pas eu d'alcalinisation. Ils notent dans ces conditions une augmentation de la capacité de combinaison de la caséine avec les bases. Peut-être y a-t-il eu, comme ils le ont observer, une partielle hydrolyse ou bien l'ouverture d'anhydrides cycliques rendant ainsi libres des carboxyles antérieurement engagés dans l'anhydrisation.

Alors que l'acide phosphorique se détache aisément du complexe protéique sous l'action des alcalis, il reste plus solidement uni lorsque la protéine est attaquée par les ferments digestifs, lesquels procèdent à une dislocation ménagée et par étapes de la molécule primitive.

**La digestion pepsique de la caséine.** — L'étude de la digestion de la caséine, tant pepsique que trypsique, a donné lieu à de nombreux travaux.

Alors que nos connaissances sur cette protéine étaient faibles, la présence du phosphore avait incité plusieurs auteurs à rapprocher la caséine des nucléo-protéides qui contiennent également du phosphore, mais dont le dédoublement par paliers successifs donne naissance à des corps différents, comme on le vit plus tard. C'est ainsi qu'ils signalent la formation, sous l'action de la pepsine chlorhydrique, de corps qu'ils rapprochaient plus ou moins de la nucléine ou des acides nucléiques. C'est le dosage du phosphore qui les avait guidés dans cette classification.

Les premiers travaux qui ont été faits avec beaucoup d'application sont dus à SEBELIEN (144), SALKOWSKI (145), BIFFI (146), PLIMMER

(143) E. J. COHN et R. E. L. BERGGREN. — Studies in the physical chemistry of the proteins. III. The relation between the amino acid composition of casein and its capacity to combine with base. — *The Journ. of gener. Physiology*, 1924, 7, 45.

(144) SEBELIEN. — Ueber das Verhalten des bei der Pepsindigestion des Caseins abgespaltenen Pseudonucleins. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1895, 20, 443.

(145) SALKOWSKI. — Ueber die Paranucleinsäure aus Casein. *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1901, 32, 245.

(146) BIFFI. — Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Caseins bei der Pankreasverdauung. — *Virchow's Arch.*, 1898, 152, 130.

et BAYLISS (141), REH (147), HÉDIN (148), BISSEGGER et STEGMANN (149) etc... Il est certain, ainsi que le fait remarquer SALKOWSKI, avec HAHN, qu'il est très difficile de comparer les uns aux autres les travaux publiés, parce que l'apparition de tel ou tel produit de la digestion de la caséine et surtout ses proportions relatives dépendent des conditions dans lesquelles la digestion s'effectue ; or, ces conditions ne sont pas les mêmes pour tous les auteurs.

Etant donnés les rapports de voisinage, pour ne pas dire d'identité, de la pepsine et de la présure sur lesquels nous dirons quelques mots un peu plus loin, il n'apparaît pas surprenant qu'on ait obtenu, *avec une pepsine faible et dans des conditions d'acidité également faibles*, un produit de digestion extrêmement visqueux qui occupait la moitié du flacon, quelquefois plus, et qui était extrêmement lent à se digérer. S'agit-il de paranucléine, ou du premier terme de la décomposition de la caséine sous l'action de la présure : la paracaséine ?

*Si la pepsine est plus forte et si la réaction est plus acide*, cette colle de paranucléine disparaît vite, et même lorsqu'on attaque tout de suite la caséine par une pepsine chlorhydrique active, sa formation transitoire n'est pas toujours saisissable. A 37°, 15 et même 10 minutes suffisent pour dissoudre la caséine dans de semblables conditions.

SALKOWSKI avec son élève HAHN a constaté que le phosphore se répartissait inégalement entre la soi-disant paranucléine et l'albumose résiduelle ; la paranucléine aurait une richesse en phosphore de plus de 2 % ; l'albumose de 0,5 à 0,6 %.

*Le phosphore est donc dissous, mais il n'est pas encore sous une forme minérale et il affecte toujours une forme organique.*

Dans un autre travail, SALKOWSKI, voulant pousser plus loin encore l'analogie de la caséine avec les nucléo-protéines, montre que la paranucléine dont il vient d'être question est très sensible aux alcalis, car elle leur cède facilement son acide phosphorique. Une heure au bain-marie avec de la soude à 2 % suffit pour détacher tout le phosphore, sous la forme d'acide phosphorique minéral.

Aujourd'hui, avec la connaissance que nous avons de la constitution des matières protéiques, on doit reconnaître que les morceaux riches en phosphore dont parle SALKOWSKI ne sont autres que des peptides de condensations différentes dans lesquels le phosphore se concentre, mais on ne peut admettre qu'ils soient des individualités chimiques au même titre que les acides nucléiques, voire même que les nucléines.

(147) A. REH. — *Über die Polypeptid-phosphorsäure (Paranucleinsäure) des Caseins.* — *Beiträge zur Chem. Physiol. Pathol.* 1907, **11**, 12.

(148) S. G. HÉDIN. — *Zur Kinetik der Enzyme.* *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1908, **57**, 468.

(149) W. BISSEGGER et L. STEGMANN. — *Zur Kenntnis der bei der Verdauung des Caseins auftretenden Produkte.* *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1908, **58**, 147.

C'est ce que note d'ailleurs SEBELIEN qui fait remarquer que la pseudo-nucléine obtenue par la digestion pepsique n'a aucune constance de composition. Le rendement en paranucléine et son contenu en azote et en phosphore dépendent des circonstances de la digestion.

REH a fait également une étude du soi-disant acide paranucléique de la caséine. Sous l'influence de la pepsine chlorhydrique à 40°, il a évidemment simplifié la caséine par hydrolyse, mais jamais l'acide phosphorique ne s'est libéré d'une façon complète pour prendre la forme minérale. En recourant à l'acétate d'urane comme agent de séparation, il a obtenu ce qu'il appelle des *polypeptides phosphoriques* dans lesquels tout le phosphore de la caséine se trouve concentré, puisque débarrassés de l'urane, ils contiendraient jusqu'à 6,9 % de phosphore. Le peptide de REH serait donc plus de 8 fois plus riche en phosphore que la caséine. Est-ce un polypeptide phosphorique pur ou un mélange ? La question n'est pas encore résolue.

M. DIETRICH (150) a suivi également, dans l'action de la pepsine chlorhydrique, la formation de ce qu'il appelle les *acides caséo-phosphoriques*, et qui ne sont que des polypeptides riches en phosphore.

En résumé, sous l'action de la pepsine chlorhydrique, la caséine se fragmente en plusieurs morceaux d'inégales richesses en phosphore, dans certains desquels cet élément se concentre à un taux si élevé que tout le phosphore de la caséine semble se trouver réuni dans un même peptide, lequel reste néanmoins un produit fort complexe.

ROBERTSON (151, 152), de son côté, a noté la formation de peptides qu'il appelle *paranucléine A* renfermant 1,4-1,6 % de  $P_2O_5$ .

**La digestion trypsique de la caséine.** — La digestion trypsique qui se fait en milieu alcalin aboutit à une solubilisation plus rapide de l'acide phosphorique. Il n'est pas douteux, conformément aux vues de HUGOUNENQ et LOISELEUR, s'appuyant d'ailleurs sur des faits bien connus, que l'hydrolyse qui intervient alors se fait selon un mécanisme différent de celui qui joue au cours de la digestion pepsique.

SEBELIEN est un des premiers qui se soit occupé de la digestion pancréatique ; mais c'est le travail de PLIMMER et BAYLISS (127) qui nous a apporté sur cette hydrolyse fermentaire les indications les plus précises. Il confirme d'abord les expériences de SEBELIEN et de BIFFI, et montre que, dans la digestion trypsique, tout le phosphore de la caséine est solubilisé, détaché tout à fait du complexe protéique, mais sans affecter encore une forme minérale.

(150) M. DIETRICH. — Ueber phosphorhaltige Caseinpeptone. — *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **22**, 120.

(151) T. B. ROBERTSON. — Note of the synthesis of a protein through the action of pepsin. *Journ. of biol. Chem.*, 1907, **3**, 95.

(152) T. B. ROBERTSON. — On the synthesis of paranucléin through the agency of pepsin and the chemical mechanics of the hydrolysis and synthesis of proteins through the agency of enzymes. *Journ. of biol. Chem.*, 1908-1909, **5**, 493.

Fait-on agir la trypsine sur la paranucléine ou soi-disant acide paranucléique de SALKOWSKI que le phosphore en est également rapidement solubilisé.

DIETRICH (150) a étudié également la digestion trypsique de la caséine ; il a obtenu des fragments dont quelques-uns sont très riches en phosphore, jusqu'à 10 %, donc plus riches encore que le polypeptide phosphorique de REH qui en contenait déjà 6,9 % et était lui-même plus riche que l'acide paranucléique de SALKOWSKI.

HÉDIN (148) a vu que la rapidité d'action de la trypsine sur la caséine varie en raison inverse de la quantité de trypsine, ce qui veut dire que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la quantité du ferment.

**LE NOYAU PHOSPHORÉ DE LA CASÉINE.** — Mais derrière toutes ces recherches, qu'elles aient porté sur la digestion trypsique ou sur la digestion pepsique, on ne voit pas encore apparaître un peptide phosphoré simple dont il soit possible de définir la qualité des acides-aminés, ainsi que d'en déterminer le nombre des molécules. Il faut arriver aux recherches récentes de Cl. RIMINGTON et H. D. KAY et à celles de S. POSTERNAK pour fixer le phosphore dans un peptide simple dont la composition soit définie.

Chronologiquement, c'est S. POSTERNAK qui dépose, par l'intermédiaire de la *Société de l'industrie chimique de Bâle* en 1923, un brevet suisse sur la préparation du noyau phosphoré de la caséine au moyen d'une courte digestion trypsique (153).

Dans l'ignorance de cette publication, Cl. RIMINGTON et H. D. KAY font paraître leurs recherches sur le noyau phosphoré de la caséine (124, 154, 155, 156). Ils montrent que la libération par la trypsine d'une *substance phosphorée organique, acide, soluble*, se fait avec une grande rapidité, mais que le clivage ultérieur de l'acide phosphorique, en un mot, la libération de celui-ci sous son aspect minéral, ne se réalise que très lentement. Le corps qu'ils isolent ne contient pas de soufre ; il ne présente pas les réactions glyoxylique, xanthoprotéique et de MILLON, c'est-à-dire qu'il ne renferme pas de noyaux aromatiques. Pour ces auteurs, il s'agit d'une peptone qui n'est hydrolysée que lentement par le suc pancréatique. La soude N/4 (10 gr. par litre) libère le phosphore qu'elle contient sous la forme minérale en 24 heures à l'étuve à 37°. La phosphopeptone en question passe au travers des sacs de

(153) S. POSTERNAK. — Brevet Suisse, n° 104.336, 25 janvier 1923.

(154) H. D. KAY. — Some phosphorus compounds of milk. — I. The presence in milk of organic acid-soluble phosphorus compounds. *Biochem. Journ.*, 1925, **19**, 433.

(155) Cl. RIMINGTON et H. D. KAY. — Some phosphorus compounds of milk. — II. The liberation of phosphorus from caseinogen by enzymes and other agents. *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 777.

(156) Cl. RIMINGTON. — The phosphorus of caseinogen. I. Isolation of a phosphorus containing peptone from tryptic digests of caseinogen. — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1179

collodion. Elle renfermerait 50 % du phosphore organique originel et RIMINGTON lui donne la formule :  $C^{37}H^{62}O^{33}N^9P^3$ . Cet auteur est porté à penser que le reste du phosphore est présent également sous une forme analogue, sinon identique.

L'étude qu'il a faite des acides-aminés contenus dans cette peptone le conduit à y reconnaître : acide hydroxyglutamique : 3 molécules, acide hydroxyaminobutyrique : 4 molécules ; sérine : 2 molécules ; acide phosphorique : 3 molécules. Jusqu'ici, l'acide hydroxyaminobutyrique n'avait été isolé que d'une protéine : la glutine de l'orge.

Le travail de Cl. RIMINGTON appelle l'attention sur l'existence dans la caséine d'un nombre important de molécules hydroxyaminobutyriques ainsi que de sérine. Jusqu'ici le meilleur rendement de la caséine en sérine était de 0,50 %, taux que nous donnons dans le tableau des acides-aminés de la caséine. Il semblerait donc que cette proportion soit trop faible, et avec Cl. RIMINGTON, et aussi S. POSTERNAK comme on le verra plus loin, on doit admettre qu'elle est plus grande et que son taux peut atteindre au moins 1,60 %.

Il y a donc dans la *phosphopeptone* de Cl. RIMINGTON 9 fonctions alcool pour 3 molécules d'acide orthophosphorique. Dans le schéma que cet auteur donne de sa phosphopeptone, tantôt l'acide phosphorique n'intervient que par une de ses fonctions acides dans l'éthérisation de la fonction alcool de l'acide-aminé qui l'avoisine, tantôt il se trouve placé entre deux acides-aminés et deux de ses fonctions acides éthérifient l'une et l'autre des fonctions alcool des deux acides-aminés entre lesquels il se trouve.

La *phosphatase des os* détacherait les deux tiers seulement du phosphore total, celui qui correspondrait au mono-éther phosphorique ; le reste, le dernier tiers, celui qui affecte la forme de di-éther, serait séparé par la *phosphatase du rein*. Ceci peut trouver son explication dans un travail récent de MARTLAND et ROBISON (157) qui ont montré que la phosphatase des os a très peu d'action sur l'éther diéthylique de l'acide phosphorique, tandis qu'elle hydrolyse facilement l'éther monoéthylique.

La phosphopeptone de Cl. RIMINGTON doit se rapprocher de ce que S. POSTERNAK appelle *lactotyryne* (158, 159, 160, 161). Cet auteur,

(157) M. MARTLAND et R. ROBISON. — The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. Part VII. The bone phosphatase. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 665.

(158) S. POSTERNAK. — Sur le noyau phosphoré de la caséine. *C.R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 306.

(159) S. POSTERNAK. — Sur le noyau phosphoré de la caséine du lait. *C. R. des Séances de la Soc. de Phys. et d'Hist. Nat. de Genève*, 1927, **44**, 8.

(160) S. POSTERNAK. — The phosphorus nucleus of caseinogen. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 239.

(161) S. POSTERNAK. — Sur la limite de dégradation des lactotyrynes par la trypsine. — *C. R. des Séances de la Soc. de Phys. et d'Hist. Nat. de Genève*, 1928, **45**, 111.

en effet, a isolé de la caséine, sous l'action de la trypsine, une série de polypeptides voisins qu'il appelle *lactotyrimines* dont le poids moléculaire va de 1902 à 2116, et le taux en phosphore de 6,51 à 5,86 %. Les alcalis caustiques et la baryte en sépareraient peu à peu, lentement à la température ordinaire, mais rapidement à l'ébullition, presque la totalité du phosphore à l'état d'acide phosphorique. Il n'y aurait pas de noyau benzénique dans ce peptide dont la formule serait :  $C^{64}H^{111}N^{15}O^{43}P^4$ . La distribution des acides-aminés dans ce polypeptide phosphorique est différente de celle qui est donnée par Cl. RIMINGTON pour sa phosphopeptone. S. POSTERNAK trouverait, en effet : acide glutamique : 3 molécules ; acide aspartique : 0 molécule, 6 ; isoleucine : un peu plus de 3 molécules ; sérine : 3 molécules et acide phosphorique : 4 molécules. Pour lui, *le noyau phosphoré de la caséine du lait serait formé de 4 acides sérine-phosphoriques.*

#### **Le phosphore de la phosphopeptone et le tissu osseux. —**

Cl. RIMINGTON évoquant la relative résistance de la phosphopeptone au clivage de son acide phosphorique sous l'action de la trypsine entre dans des considérations physiologiques d'un réel intérêt. Si nous devons, dit-il, considérer cette peptone comme un tout, sa diffusibilité rend possible son absorption dans l'intestin et son passage dans le courant sanguin sans transformation. Son hydrolyse facile par les enzymes des os et des cartilages nous fournit la suggestion vraisemblable que le phosphore de la caséine peut, par ce moyen, contribuer en partie à fournir aux os le phosphore minéral qui leur est nécessaire.

Ainsi que nous l'avons fait remarquer antérieurement lorsque nous avons été amené à parler des relations de la globuline avec la caséine, ce qui rend plus particulièrement intéressant les recherches de Cl. RIMINGTON, ce sont ses essais de synthèse de composés phosphorés des protéines. Nous avons vu antérieurement (63, 162) que lorsqu'on phosphoryle la globuline, on obtient un composé qui ressemble beaucoup à la caséine. Il coagule par la présure comme le fait celle-ci. Ses solutions donnent un précipité immédiat par addition de chlorure de calcium. L'action de la trypsine sur la globuline phosphorylée ressemble également à celle que ce même ferment exerce sur la caséine.

#### **La phosphorylation de la caséine qui a perdu son phosphore. —**

Nous devons relever également les expériences de Cl. RIMINGTON sur la phosphorylation de la caséine préalablement déphosphorylée, la déphosphorylation ayant été réalisée par l'action de la soude à 1 % à 37° pendant 24 heures.

En fait, l'action de la soude, dans les conditions ci-dessus, non seulement clive l'acide phosphorique, mais elle s'attaque aussi à la

(162) Cl. RIMINGTON. — Some phosphorus compounds of milk. III. Dephosphorised caseinogen. The action of alkali upon caseinogen. — *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 204.

protéine dont elle diminue le contenu en azote. Une analyse de la caséine déphosphorylée, selon la méthode de D. D. VAN SLYKE sur la distribution de l'azote, montre que la perte est faite surtout d'azote aminé, mais qu'elle porte aussi sur la fraction arginine de la molécule, ce dernier acide-aminé ayant été partiellement transformé en ornithine et ammoniacque.

La caséine déphosphorylée n'est pas coagulée par la présure. Si on la recharge en acide phosphorique, si l'on opère avec elle de la même façon qu'avec la globuline, elle acquiert à nouveau la propriété de coaguler par la présure en présence de chlorure de calcium, peut-être moins facilement que la caséine pure dans les mêmes conditions.

Il est possible, dit Cl. RIMINGTON, et c'est là une remarque très importante, que *la propriété de coaguler par la présure soit en fait dépendante de la présence de phosphore lié organiquement dans la molécule*. Sans doute, la nature de la protéine doit intervenir pour une part, mais les recherches de Cl. RIMINGTON sur l'enlèvement de l'acide phosphorique et sa fixation à nouveau sur la caséine donnent de la force aux considérations ci-dessus.

Il est donc incontestable que le phosphore dans la caséine s'y trouve à l'état d'acide phosphorique, lequel éthérifie des fonctions alcool appartenant à certains acides-aminés de la caséine.

On aurait également pu penser que l'acide phosphorique existât sous la forme de *phosphamides*, d'autant plus que les tentatives faites pour introduire  $\text{PO}^4\text{H}^3$  dans des acides-aminés ont conduit à l'obtention de produits relativement peu stables, sauf dans le cas de la tyrosine. BLANCHETIÈRE, constatant que le mode d'obtention de composés phosphorés synthétiques les montre analogues, sinon identiques, aux phosphoprotéides naturels, suggère que la copulation de l'acide phosphorique avec le complexe protéinique est une éthérification.

Des pages qui précèdent, il résulte bien que la caséine préparée selon la technique que nous indiquons un peu plus loin semble être un corps toujours semblable à lui-même, et nous n'avons pas manqué de le signaler. C'est une des rares protéines que l'on puisse préparer à l'état de pureté, que l'on retrouve toujours avec les mêmes propriétés lorsqu'on la fait intervenir dans des réactions qui se maintiennent au voisinage de la neutralité, c'est-à-dire du  $\text{pH} = 7$ .

La question de savoir si c'est ou non une substance homogène a cependant été remise en discussion. C'est ainsi que LINDERSTROM-LANG (163) dans le laboratoire de SORENSEN, constatant que la solubilité de la caséine dans les solutions diluées de HCl n'est pas une valeur constante, mais dépendait de la proportion de caséine non dissoute qui est présente, y trouvait la preuve que la caséine n'est pas

(163) K. LINDERSTROM-LANG. — Studies on casein. II. Is casein a homogeneous substance? *C. R. des travaux du lab. de Carlsberg*, 1925, **16**, 48.

une substance homogène, mais consiste en un mélange de deux ou plusieurs protéines très semblables dans leur composition chimique et qui restent soudées dans les précipités que l'on obtient avec elles sous la forme de complexes de solubilités différentes.

LINDERSTROM-LANG et KODAMA (164) ont soumis la caséine commerciale à une précipitation fractionnée, et ils ont obtenu des corps qui différaient notamment de solubilité dans HCl dilué. Il est évident que le fait de s'adresser à la caséine commerciale n'était pas souhaitable ; aussi LINDERSTROM-LANG a répété l'expérience avec une caséine préparée au laboratoire, et il en aurait obtenu les mêmes résultats.

Nous pensons avec R. A. GORTNER que la question soulevée par LINDERSTROM-LANG demande des recherches ultérieures, parce qu'il n'apparaît pas, en effet, que des précautions spéciales aient été prises pour assurer l'élimination de la protéine soluble dans l'alcool, laquelle se trouve associée à la caséine quand on la précipite du lait écrémé. Nous rappelons que la caséine étant acide donne avec l'alcool des éthers partiellement solubles dans l'alcool en excès. (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)

### C. — Part revenant, dans l'indice de réfraction, à chacun des composants du lacto-sérum d'ultra- filtration.

Le lacto-sérum d'ultra-filtration étant obtenu et son indice étant déterminé, il nous a paru intéressant de rechercher la part qui revient, dans l'indice de réfraction, à chacun de ses composants.

Aborder le problème par la voie analytique ne nous était pas permis. En effet, le faible débit de nos ultra-filtres ne nous fournissait pas — même en multipliant leur nombre — une quantité de sérum suffisante pour en permettre l'analyse chimique. Devant cette difficulté, nous avons résolu d'opérer par la voie synthétique, en nous appuyant, pour guider nos recherches, sur le remarquable travail du Professeur Ch. PORCHER et de A. CHEVALLIER : « *La répartition des matières salines dans le lait.*

(164) K. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA. — Studies on casein. I. On the solubility of casein in hydrochloric acid. *C. R. des travaux du Labor. de Carlsberg*, 1925, 16, 1.