

## LE DOSAGE DE L'ENZYME DE SCHARDINGER A L'AIDE DE LA RÉDUCTION DES NITRATES

### I. TENEUR, EN ENZYME, DU LAIT DE FEMME

par

L. M. BURUIANA et E. GERANIOU

Le dosage de l'enzyme de Schardinger du lait présente une importance spéciale, car le groupement prosthétique de cette enzyme est identique à l'ester phosphorique de la riboflavine, l'enzyme même étant un ferment jaune dont le rôle dans les respirations cellulaires est capital. Il est donc intéressant pour la physiologie de la glande mammaire de connaître la quantité et la variation du contenu enzymatique sous l'influence des divers agents endogènes et exogènes.

D'autre part, l'association des vitamines aux protides pour créer des catalyseurs biochimiques à l'action spécifique suggère des idées nouvelles quant au rôle des vitamines dans les processus physiologiques et sur les possibilités de synthèse, très variés, de l'organisme animal. D'après les recherches de HAAS, WRIGHT et SABINE, on sait qu'entre les flavoprotéides et les agents chimiothérapeutiques il y a une compétition remarquable qui explique aussi la résistance des microbes vis-à-vis de ces agents.

Depuis l'observation de SCHARDINGER (1902) quant au rôle des aldéhydes dans la décoloration du bleu de méthylène par le lait, il s'est écoulé beaucoup de temps avant de reconnaître le caractère enzymatique de cette réaction et d'élucider son mécanisme.

A. BACH [1] a constaté que le rôle du bleu de méthylène peut être joué par les nitrates qui subissent également une réduction et MORGAN, STEWART et HOPKINS substituent aux aldéhydes les hydroxypurines (la xanthine, l'hypoxanthine). Basés sur ces réactions spécifiques de l'enzyme de Schardinger (appelée aussi déhydrase, aldéhydrase, etc.), nombre de méthodes ont été imaginées pour doser l'activité enzymatique du lait. Elles sont basées sur l'action de l'hydrogène, aldéhydique ou purinique, activé par l'enzyme. Cet hydrogène activé peut :

1. Réduire le bleu de méthylène.
2. Réduire l'oxygène.
4. Réduire les nitrates en nitrites.
4. Créer dans un milieu anaérobie un potentiel « redox » négatif envers l'électrode d'hydrogène. Nombreux sont les chercheurs qui voient dans cette diversité d'actions de l'hydrogène l'existence de plusieurs déhydrases spécifiques :

Une aldéhyde-réductase, une xanthine-réductase (déhydrase), une diaphorase I (déhydro-coenzyme I) ou simplement une mutase. Jusqu'à présent on n'a pas réussi à isoler des fractions à action strictement spécifique. Selon notre opinion, l'enzyme de Schardinger est unitaire quant à sa composition physico-chimique. On connaît d'ailleurs en enzymologie plusieurs exemples d'enzymes unitaires à action différente selon le substratum.

Parmi les méthodes d'appréciation de l'activité de l'enzyme de Schardinger, la plus ancienne est celle basée sur la décoloration du bleu de méthylène. Elle est d'ailleurs la plus fréquemment utilisée (1).

En mesurant la vitesse de décoloration d'une solution de concentration déterminée, on peut apprécier ou doser l'enzyme du lait ou d'autres liquides biologiques. Cette méthode a l'avantage de la simplicité mais elle est peu précise pour le dosage des petites et très grandes quantités d'enzyme. De plus, elle n'est pas spécifique pour l'action déhydrasique, toute substance libérant de l'hydrogène par n'importe quel mécanisme pouvant la décolorer. De plus le leuco-dérivé formé est très sensible à l'action de traces d'oxygène, à ce qu'il paraît, le blanc de méthylène étant un transporteur d'oxygène. Ce fait a conduit à des techniques compliquées ayant besoin d'appareils spéciaux pour travailler en milieu strictement anaérobie (vide ou atmosphère d'azote très pur).

Au lieu du bleu de méthylène on peut employer comme accepteur d'hydrogène, l'oxygène moléculaire (méthode manométrique de Warburg).

L'eau oxygénée formée à cette occasion inhibe rapidement l'action diastasique de sorte que les résultats obtenus sont inexacts. Dans un travail antérieur [4], nous avons employé pour le dosage de l'enzyme la méthode potentiométrique en mesurant la chute de potentiel dans les solutions d'enzyme en présence d'aldéhyde benzoïque. On détermine l'activité enzymatique soit graphiquement, soit en calculant le dérivé (ou l'angle  $\alpha$ ) de l'équation représentant l'évolution du potentiel en fonction du temps. La méthode, très élégante, nécessite bien entendu une construction assez compliquée

(1) Il faut mentionner que *Lipschitz* et *Gotschalk* [2] ont proposé et utilisé comme accepteur d'hydrogène le m-dinitrobenzène qui se réduit en m-nitro-phényl-hydroxylamine jaune en milieu neutre et rouge en milieu alcalin. Le produit de réduction, contrairement au blanc de méthylène, n'aurait aucune action catalytique en favorisant la réoxydation (transporteur d'oxygène) ce qui le recommande surtout pour l'étude de l'action déhydrasique des tissus. *Dixon* et *Thurlow* [3] affirment que cette méthode peut être facilement employée pour le dosage quantitatif de la déhydrase du lait. (« Can easily be made accurately quantitative by use of colorimetric estimation method with metaphenylen-diamine ».)

mais présente pour le lait le grand avantage de dispenser du bleu de méthylène comme indicateur d'oxydo-réduction.

A. BACH (*loc. cit.*) a remarqué que l'enzyme de Schardinger peut réduire en présence des aldéhydes, formique ou acétique, les nitrates en nitrites.

D'après l'intensité de la réduction on peut déduire l'activité enzymatique du liquide à étudier. Cette méthode préconisée par BACH a été employée par SBARSKY et MICHLIN [5], BACH et NIKOLAJEFF [6] pour doser l'enzyme des produits laitiers et des solutions d'enzyme extraite du lait.

Malheureusement, la technique était variable dans chaque cas et on ne tenait pas compte des influences multiples sur la réduction des nitrates. Les résultats ne sont donc pas comparables et beaucoup trop faibles vis-à-vis de l'activité enzymatique réelle.

A l'occasion des recherches sur la présence des nitrites du lait et sur le pouvoir réducteur des colibacilles du lait envers les nitrates [7], nous avons constaté que la concentration et la nature du réactif défécant, la dilution du lait, la vitesse de réoxydation des nitrites, influencent énormément les résultats obtenus. Nous avons établi à cette occasion une technique précise que nous avons employée pour le dosage de l'enzyme de Schardinger dans le lait de quelques espèces animales.

Nous rapportons dans ce qui suit les détails de cette technique et les résultats obtenus.

### Détermination de l'activité de l'enzyme de Schardinger dans le lait par la réduction des nitrates

#### Réactifs nécessaires :

1. Solution d'aldéhyde benzoïque. On dilue 1 cm<sup>3</sup> d'aldéhyde benzoïque dans 10 cm<sup>3</sup> d'alcool éthylique à 96°. Cette solution n'est pas toxique et n'entrave aucunement l'activité de l'enzyme. De plus, étant antiseptique, elle empêche l'activité microbienne et donc la sécrétion de la déhydrase d'origine bactérienne qui pourrait fausser les résultats si on prolonge l'action enzymatique.

2. Solution à 20 % d'azotate de sodium exempt de nitrites. Les solutions plus anciennes et même la substance pure contiennent presque toujours des traces de nitrites. On évite l'erreur en utilisant dans les dosages effectués un témoin (épreuve à blanc).

3. Solution de sous-acétate de plomb de densité  $d = 1,235$ . Cette solution se prépare en dissolvant au bain-marie 180 grammes d'acétate de plomb dans 700 cm<sup>3</sup> d'eau distillée et en ajoutant peu à peu 110 grammes de litharge (PbO, jaune). Après dissolution presque complète de l'oxyde jaune de plomb on dilue après refroidis-

sement à la densité  $d = 1,235$  et on laisse reposer. On décante le liquide limpide surnageant.

4. Solution étalon de nitrite de sodium. On dissout 1 gr. à 1 gr. 2 de  $\text{NO}^2\text{Na}$  très pur dans 1.000  $\text{cm}^3$  d'eau distillée ou mieux bidistillée sur  $\text{MnO}^4\text{K}$ .

On détermine à l'aide du permanganate de potassium decinormal le contenu en nitrite de sodium. De cette solution stock on prépare par dilution une solution standard qui contient 1 gamma  $\text{NO}^2\text{Na}$ , par centimètre cube.

5. Solution d'acide sulfanilique. On dissout 0 gr. 25 d'acide sulfanilique dans 150  $\text{cm}^3$  de solution d'acide acétique normale.

6. Solution d'alfa naphtylamine. On dissout à chaud 0 gr. 2 d'alfa-naphtyl-amine dans 20  $\text{cm}^3$  d'eau distillée. On filtre et on complète à 150  $\text{cm}^3$  avec de l'acide acétique normal. Les solutions numéros 5 et 6 se conservent séparément dans des flacons bruns bouchés à l'émeri, au froid et à l'obscurité. Elles doivent être bien limpides et incolores au moment de l'emploi.

La chaleur et la lumière solaire modifient les réactifs en réduisant fortement l'intensité de la réaction colorée donnée par les nitrites.

Pour déterminer l'activité enzymatique d'un lait, on procède de la manière suivante : dans une éprouvette très propre on met 10  $\text{cm}^3$  du lait à analyser. On le porte à la température de  $55^\circ$  et on ajoute 0  $\text{cm}^3$  2 de solution d'aldéhyde benzoïque goutte à goutte en agitant, puis 0  $\text{cm}^3$  5 de solution de nitrate de sodium. On mélange et on porte le tout au bain de  $55^\circ$  ou à l'étuve. Après une heure on ajoute 1  $\text{cm}^3$  de solution de sous-acétate de plomb pour déféquer et on complète à 20  $\text{cm}^3$  avec de l'eau distillée exempte de nitrites.

On agite et on filtre. De coutume on obtient un liquide parfaitement clair. S'il est un peu trouble on le repasse encore une fois sur le filtre. Avec le temps ou par dilution avec de l'eau distillée, le filtrat limpide et de couleur jaune verdâtre peut se troubler à cause du carbonate basique de plomb, fait qui ne gêne pas le dosage ultérieur car il est soluble dans les solutions acétiques du réactif des nitrites. De ce filtrat on prend une quantité variable selon la teneur en nitrites (pour le lait de vache il suffit de 0  $\text{cm}^3$  5 à 2  $\text{cm}^3$ , pour le lait de femme on prend 10  $\text{cm}^3$ ), en complétant à 10  $\text{cm}^3$ . On ajoute 1  $\text{cm}^3$  de solution d'acide sulfanilique et après agitation 1  $\text{cm}^3$  de sol. d'alfa-naphtylamine. Après 30 minutes, on compare au colorimètre avec une solution étalon de nitrites qui contient de 2 à 10 gamma  $\text{NO}^2\text{Na}$  pour 10  $\text{cm}^3$ . Le résultat se rapporte à 5  $\text{cm}^3$  de lait.

*Exemple.* Soit 1 cm<sup>3</sup> la quantité de filtrat employée pour le dosage des nitrites formés après une heure à 55°. Cette quantité correspond à 0 cm<sup>3</sup> 5 de lait. Comparant au Duboscq avec un étalon qui contient 10 gamma NO<sup>2</sup>Na dans le même volume final (de 12 cm) on lit pour le lait une hauteur de 20 mm. et pour l'étalon 25 mm. La teneur en nitrites dans 5 cm<sup>3</sup> de lait, après la réduction des nitrates par l'enzyme de Schardinger serait :

$$C = \frac{25 \times 10}{20} \times 10 = 125 \text{ gamma NO}^2\text{Na}$$

La formule générale est donc :

$$I_s = \frac{H_e}{H_1} \times \frac{5}{n} \times C_e = \text{gamma NO}^2\text{Na pour } 5 \text{ cm}^3 \text{ de lait}$$

Formule dans laquelle :

$I_s$  = Indice de Schardinger ou activité de l'enzyme de Schardinger exprimée en gamma de NO<sup>2</sup>Na pour 5 cm<sup>3</sup> de lait (si on veut exprimer le résultat en N<sup>2</sup>O<sup>3</sup> on doit multiplier le résultat en NO<sup>2</sup>Na par le facteur 1,1).

$H_e$  = Hauteur du liquide étalon.

$H_1$  = Hauteur du liquide à mesurer (filtrat après défécation du lait).

$C_e$  = Concentration en gamma NO<sup>2</sup>Na dans l'étalon.

$n$  = cc. du lait correspondant au liquide (filtrat) utilisé dans le dosage des nitrites.

Le volume final, bien entendu, doit être le même dans la solution de dosage et la solution étalon (12 cm<sup>3</sup>). Pour compenser l'erreur qui proviendrait des nitrites préexistants dans le lait ou apportés par les solutions des réactifs, on fait toujours un témoin dans les mêmes conditions sans la fermentation d'une heure à 55°. On défèque immédiatement le lait après l'adjonction de l'aldéhyde benzoïque et de nitrate. La quantité des nitrites trouvés dans le témoin est retranchée de la quantité de nitrites trouvés dans le lait qui a subi la fermentation d'une heure à 55°. Au lieu du colorimètre de Duboscq on peut utiliser le photolorimètre de Pulfrich. On construit une fois pour toutes la courbe qui représente la transparence ou l'extinction, en fonction de la concentration en employant des solutions de nitrites à concentration connue. L'extinction est mesurée en opposition avec une solution étalon préparée identiquement, qui contient de l'eau distillée au lieu de la solution étalon de nitrites. La courbe est représentée par le tracé n° 1 de la figure 1. Comme nous l'avons signalé [7] la formation du colorant diazoamine est en grande mesure influencée par la quantité et la nature du défécant employé. Pour illustrer cette affirmation j'ai déter-

miné les nitrites formés après le même temps de fermentation en défécant avec des quantités croissantes de sous-acétate de plomb.

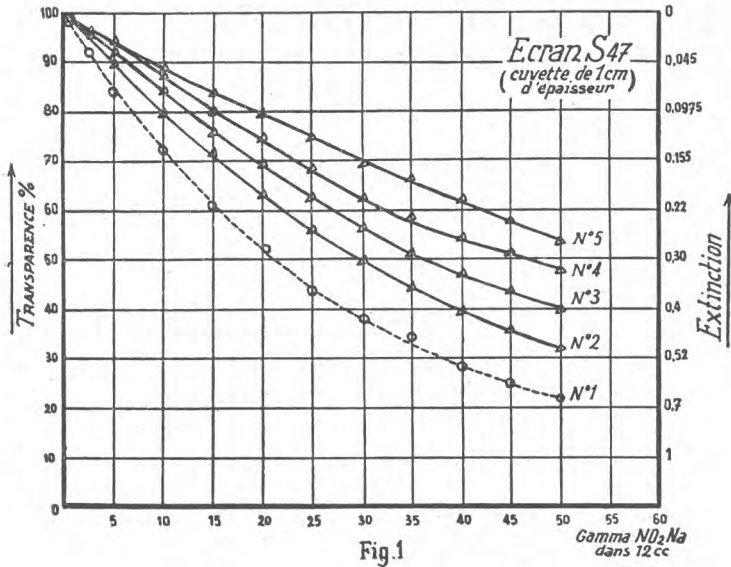


TABLEAU I

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SOUS-ACÉTATE DE PLOMB SUR LA FORMATION DE COLORANT DIAZOAMINÉ

10 cm <sup>3</sup> de lait déféqué avec N cm <sup>3</sup> du sous-acétate de plomb	Contenu en nitrites : gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait (Is = Indice de Schardinger)
Avec : 1 cm <sup>3</sup> .....	175
2 cm <sup>3</sup> .....	145
3 cm <sup>3</sup> .....	121
4 cm <sup>3</sup> .....	98
5 cm <sup>3</sup> .....	77
10 cm <sup>3</sup> .....	33

Au photocolorimètre de Pulfrich l'aspect des courbes, transparence : concentration pour diverses quantités de défécant est représenté par les courbes numéros 2, 3, 4 et 5.

Le meilleur défécant est l'acide acétique à chaud qui n'influence pas, aux concentrations usuelles, la vitesse de formation, ni la couleur du composé diazoaminé. Il a le désavantage avec le lait de femme, de jument, etc., de donner des filtrats troubles.

La quantité, trop grande, de sous-acétate de plomb employée par

BACH et ses collaborateurs pour la défécation du lait est peut-être la cause principale que les résultats trouvés par eux sont si petits en comparaison avec les nôtres.

En vérité SBARSKY et MICHLIN emploient, pour la défécation de 2 cm<sup>3</sup> de lait, 3 cm<sup>3</sup> de sous-acétate de plomb saturé (*loc. cit.*, page 488) ; MICHLIN [8] pour la défécation de 1 cm<sup>3</sup> de colostrum emploie 2 cm<sup>3</sup> de solution saturée de sous-acétate de plomb et BACH et NIKOLAEJEFF (*loc. cit.*) 1 cm<sup>3</sup> de solution saturée de sous-acétate de plomb pour 1 cm<sup>3</sup> de solution d'enzyme. Ils trouvent en moyenne pour le lait et ses dérivés des quantités entre 1,9 et 6 gamma N<sup>2</sup>O<sup>3</sup> (ou 1,71 à 5,4 NO<sup>2</sup>Na) pour 1 cm<sup>3</sup> de lait après un temps de fermentation de 30 minutes à la température de 60-67° C.

Un autre facteur qui intervient dans la réduction des nitrates dans le lait est l'oxydation réversible des nitrites avec le temps.

Ce fait signalé aussi par BACH pour les extraits tissulaires, est très peu évident dans le cas du lait. Dans un exemple illustré par BACH (*loc. cit.*) pour le lait les résultats sont les suivants :

TABLEAU II  
D'APRÈS A. BACH (*loc. cit.*)

Temps en heures	Nitrites en gamma N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> pour 1 cm <sup>3</sup> de lait
0,5 .....	2,923
1 .....	4,901
2 .....	7,501
3 .....	12,075
4 .....	12,441
5 .....	12,390
9 .....	—
12 .....	12,407
24 .....	—

On note que le phénomène réversible, l'oxydation des nitrites, est presque invisible. Ce phénomène est beaucoup plus intense comme nous l'avons constaté pendant nos recherches. Dans les tableaux suivants, nous rapportons les résultats obtenus avec un lait de vache et un colostrum de femme.

On voit que dans le cas du lait de vache analysé le taux de la réoxydation est de 50% dans vingt-quatre heures. Avec le colostrum de femme, la réoxydation est de beaucoup plus rapide. Cette réoxydation des nitrites réduits est d'ailleurs assez variable. Nous avons rencontré des laits dans lesquels la réoxydation était complète après sept heures, mais aussi des laits dans lesquels la vitesse

de réoxydation était assez réduite, 10%-20%, dans vingt-quatre heures.

TABLEAU III

MARCHE DE LA RÉDUCTION DES NITRATES DANS UN LAIT DE VACHE

Temps en minutes	Nitrites en gamma $\text{NO}_2\text{Na}$ dans 5 $\text{cm}^3$ de lait
30 .....	180
60 .....	240
90 .....	260
120 .....	240
250 .....	220
480 .....	190
540 .....	170
1.320 .....	145
1.680 .....	137

TABLEAU IV

MARCHE DE LA RÉDUCTION DES NITRATES DANS LE COLOSTRUM DE FEMME

Temps de fermentation en minutes	gamma $\text{NO}_2\text{Na}$ dans 5 $\text{cm}^3$ de colostrum							
	(colostrum avant la tétée)				(colostrum après la tétée)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
30 .....	3,65	11,50	12,00	12,10	1,40	1,55	2,95	8,22
60 .....	6,00	11,50	12,00	11,00	2,20	2,60	4,50	10,00
90 .....	1,11	6,00	6,10	3,05	1,00	0,50	2,88	4,38
120 .....	0,50	1,50	3,55	2,00	0,22	0,00	1,57	3,10

J'ai pu démontrer [9] que cette réoxydation des nitrites est provoquée par l'eau oxygénée qui se forme, avec le temps, de l'hydrogène activé par l'enzyme de Schardinger et de l'oxygène moléculaire devenu accepteur de l'hydrogène activé.

Nous avons choisi comme temps moyen de fermentation — 1 heure — cette durée étant suffisante pour une fermentation maximum dans la plupart des cas, la réoxydation ne se faisant pas encore sentir dans ce délai de temps, comme on peut le remarquer des quelques exemples déjà donnés (tableau III et IV).

Cette méthode de dosage se prête très bien au dosage de l'enzyme de Schardinger, surtout pour de petites quantités d'enzyme. Elle nous a donné complète satisfaction dans toutes les occasions d'analyse et d'expertise, car on connaît l'importance acquise par cette enzyme dans l'industrie beurrière pour le contrôle de la pas-

teurisation de la crème. En ce qui concerne l'étude de la cinétique enzymatique, elle ne peut donner qu'avec certaines modifications des résultats satisfaisants, à cause du phénomène réversible de l'oxydation des nitrites formés.

### L'activité enzymatique du lait de femme

En étudiant l'activité enzymatique du lait de femme, divers chercheurs ont affirmé que ce lait est exempt d'aldéhyde-réductase. C'est ainsi que SCHMIDT (1906), WEDEMANN (1914) et WILDT (1925) soulignent que le lait de femme à l'encontre du lait d'autres espèces animales, ne contient pas d'enzyme Schardinger. Dans un travail publié il y a quinze années, j'ai infirmé cette opinion (4, *loc. cit.*), généralement admise, en démontrant que le lait de femme contient l'aldéhyde-réductase de Schardinger, en petite quantité suffisante toutefois pour réduire le bleu de méthylène même en présence d'un aldéhyde.

L'importance des enzymes apportées par les aliments n'a pas fait le sujet de nombreuses recherches car on croit que l'organisme animal peut suppléer à ses besoins par les enzymes sécrétées par les cellules spécialisées des divers organes internes et parce que les enzymes étant de nature protéique sont immédiatement et complètement détruites par le suc gastrique, pancréatique, etc. On ne peut savoir dans quelle mesure l'organisme animal peut synthétiser ses enzymes indispensables, mais en ce qui regarde l'affirmation que les enzymes ingérées sont irrémédiablement détruites par les enzymes contenues dans les liquides de digestion, on doit faire une sérieuse réserve. Tout de même, si l'apoférent est disloqué en tant que partie protéique, le coférent est beaucoup plus résistant et peut prendre part immédiatement à la construction d'autres ferments nécessaires pour l'organisme. On a réussi, même *in vitro*, à reconstituer des ferments spécifiques par la synthèse, en couplant un groupement prosthétique avec une protéine ou à changer la spécificité de l'enzyme en changeant la nature de la protéine de l'apoférent.

Si pour les adultes, l'hydrolyse pepsique annule l'importance des enzymes ingérées, les choses sont tout à fait différentes pour les nouveau-nés. Dans l'estomac des jeunes, la pepsine manque et la réaction du contenu stomacal est presque neutre. La quantité et la qualité des enzymes ont dans ce cas un rôle de premier ordre. La remarque de MARFAN et ses collaborateurs qu'on n'a pas observée jamais, l'athrepsie du nouveau-né alimenté au sein, en opposition avec l'alimentation artificielle qui nécessite la stérilisation du lait, peut s'expliquer par la présence dans le lait de femme de grandes quantités d'enzymes.

Nous sommes de plus d'opinion que le nouveau-né a besoin de *certaines enzymes*, spécifiques de l'espèce. La différence entre le lait de femme et celui de vache ne réside pas seulement entre la quantité et la qualité des composants chimiques mais aussi entre les enzymes contenues dans ces laits. Tandis que le lait de vache est riche en peroxydase et en enzyme de Schardinger, le lait de femme est très pauvre ou même ne contient pas ces enzymes. Les choses se passent inversement pour l'amylase et la monobutyrase. On peut donc penser aussi à *la nocivité* des enzymes ingérées. Ces pensées nous ont conduits à déterminer l'enzyme de Schardinger dans le lait de femme.

### Dosage de l'enzyme de Schardinger dans le lait de femme

Dans une éprouvette très propre on met 5 cm<sup>3</sup> du lait de femme à étudier (au besoin une quantité de 2 cm<sup>3</sup> 5 ou moins). On ajoute 0 cm<sup>3</sup> 1 de solution d'aldéhyde benzoïque et 0 cm<sup>3</sup> 25 de solution d'azotate de sodium.

Après une heure de fermentation à la température de 55°, on défèque avec 0 cm<sup>3</sup> 5 de solution de sous-acétate de plomb et on complète à 10 cm<sup>3</sup>. On filtre avec un filtre sec et on prend 5 cm<sup>3</sup> du filtrat limpide dans lesquels on détermine le contenu en nitrites en ajoutant 0 cm<sup>3</sup> 5 de solution d'acide sulfanilique et 0 cm<sup>3</sup> 5 de solution d'alfa-naphtyl-amine. Après 30 minutes, on compare au Duboseq avec une solution étalon qui contient 2,5 gamma NO<sup>2</sup>Na dans 5 cm<sup>3</sup>. Le volume final des solutions à comparer est donc de 6 cm<sup>3</sup>.

$$I_s = \frac{H_e}{H_1} \times 5 = \text{gamma NO}^2\text{Na pour 5 cm}^3 \text{ de lait}$$

$I_s$  = Indice de Schardinger.

$H_e$  = Hauteur du liquide étalon observée au Duboseq.

$H_1$  = Hauteur de la solution à mesurer.

Comme d'habitude, pour compenser les erreurs possibles on fait un témoin, exactement dans les mêmes conditions, sans fermentation (défécation immédiate). On retranche, de  $I_s$ , la quantité de nitrite trouvée dans le témoin et on a la quantité de nitrite obtenue par réduction enzymatique ou l'activité déhydrasique du lait. A l'aide de cette technique, nous avons déterminé le contenu en enzyme de Schardinger ( $I_s$  = indice de Schardinger), dans plusieurs échantillons de lait de femme, avant et après la tétée.

Des tableaux précédents on voit que, en général, le lait de femme est pauvre en enzyme de Schardinger qui peut souvent manquer — ce qui explique en partie l'affirmation des auteurs pré-

TABLEAU V  
 CONTENU EN ENZYME DE SCHARDINGER DE QUELQUES ÉCHANTILLONS DE  
 LAIT DE FEMME, AVANT ET APRÈS LA TÉTÉE

Numéro de l'échantillon	Avant la tétée	Après la tétée
	gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait	gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait
1 .....	1,38	0,34
2 .....	2,83	1,00
3 .....	3,23	1,00
4 .....	traces	—
5 .....	4,00	7,00
6 .....	—	—
7 .....	traces	—
8 .....	0,60	0,76
9 .....	traces	—
10 .....	0,34	—
11 .....	traces	—
12 .....	8,14	6,89
13 .....	1,18	2,79
14 .....	traces	—
15 .....	—	—
16 .....	—	—
17 .....	—	—
18 .....	—	—
19 .....	1,10	0,84
20 .....	—	—
21 .....	1,80	0,98
22 .....	0,8	0,22
23 .....	1,50	1,18
24 .....	0,55	0,80
25 .....	—	—
26 .....	2,10	1,15
27 .....	0,80	—
28 .....	2,35	1,15
29 .....	0,76	0,54
30 .....	3,18	1,00
31 .....	1,10	traces
32 .....	9,19	4,65
33 .....	0,26	0,31
34 .....	0,37	0,43
35 .....	1,00	1,10
36 .....	5,28	4,32
37 .....	0,25	0,30
38 .....	0,24	0,28
39 .....	0,50	0,32
40 .....	0,24	0,20

TABLEAU V (suite)

Numéro de l'échantillon	Avant la tétée		Après la tétée	
	gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait)		gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait	
41 .....	0,26		0,23	
42 .....	0,30		0,32	
43 .....	1,74		4,34	
44 .....	0,94		1,70	
45 .....	0,66		—	
46 .....	—		—	
47 .....	traces		—	
48 .....	0,3		0,50	
49 .....	4,5		7,00	
50 .....	3,5		4,90	
51 .....	0,71		0,56	
52 .....	0,35		0,25	
53 .....	0,50		0,62	
54 .....	0,20		0,20	
55 .....	5,25		3,25	
56 .....	7,40		6,00	

TABLEAU VI

VARIATION DE LA FRÉQUENCE EN RAPPORT AVEC LA QUANTITÉ D'ENZYME

Contenu en gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait (Is)	Avant la tétée		Après la tétée	
	Nombre de cas	%	Nombre de cas	%
Rien ou traces .....	14	25	18	31,1
0-1 .....	22	39,29	23	42,1
1-2 .....	7	12,50	5	8,92
2-3 .....	3	5,30	1	1,71
3-4 .....	3	5,30	1	1,71
4-5 .....	2	3,57	4	7,14
5-6 .....	2	3,57	0	0
6-7 .....	0	0	2	3,57
7-8 .....	1	1,71	2	3,57
8-9 .....	1	1,71	0	0
9-10 .....	1	1,71	0	0

cités, surtout quand les déterminations sont faites à l'aide du bleu de méthylène.

Nous avons constaté que : l'époque de lactation, l'âge de la

mère, le nombre des enfants, le pourcentage de graisse, la période de lactation n'ont aucune influence sur la quantité d'enzyme.

Nous avons remarqué un fait qui doit retenir l'attention : quand le contenu, en enzyme, d'un lait, dépasse 1 gamma  $\text{NO}_2\text{Na}$  pour 5  $\text{cm}^3$  (Is = indice de Schardinger, augmenté) l'enfant se développe mal, sans présenter aucun signe de maladie ou de carence bien défini. C'est donc un pronostic sombre. La courbe « poids âge » reste stationnaire ou descend. Au contraire un contenu réduit en enzyme (indice de Schardinger normal moins de 1 gamma  $\text{NONa}$  pour 5  $\text{cm}^3$  de lait), est un pronostic favorable pour le développement de l'enfant. Le lait des mères ayant des enfants florissants était toujours très pauvre ou exempt d'enzyme.

Il y a besoin, bien entendu, avant d'être catégorique dans cette affirmation, de multiplier les dosages et de les étendre sur un nombre suffisant de cas, ce que nous faisons à l'heure actuelle.

Nous rapportons ci-après un cas typique, d'une femme dont le contenu en enzyme était anormalement grand et dont l'enfant, alimenté exclusivement au sein, dépérissait visiblement sans aucun signe de maladie ou de carence. Il est vrai que la mère était syphilitique et subissait le traitement spécifique arséno-bismutique.

TABLEAU VII  
FEMME MARIÉE S. EN COURS DE TRAITEMENT SPÉCIFIQUE

Date	Avant la tétée	Après la tétée
	gamma $\text{NO}_2\text{Na}$ dans 5 $\text{cm}^3$ de lait (Is)	gamma $\text{NO}_2\text{Na}$ dans 5 $\text{cm}^3$ de lait (Is)
26-II.....	4	7
29-II.....	4,12	4,94
30-III.....	10,00	11,00
20-IV.....	6,52	— non dosé
27-V.....	8,20	— non dosé

A l'encontre du lait, le colostrum de femme s'est montré plus riche en enzyme. Dans le tableau VIII sont indiqués quelques résultats.

SELIGMANN (1906) a remarqué le premier que l'enzyme de Schardinger est adsorbée par les globules de graisse du lait de vache. Séparant par centrifugation la graisse du lait et du colostrum de femme nous avons constaté que le lait dégraissé est beaucoup moins actif, ce qui prouve que les globules de graisse du lait de femme montrent la même adsorption sélective envers l'enzyme de Schardinger. Résultats dans le tableau IX,

**TABLEAU VIII**  
**CONTENU DU COLOSTRUM EN ENZYME DE SCHARDINGER**

Numéro	Avant la tétée :		Numéro	Après la tétée :	
	gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait			gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait <sup>(1)</sup>	
1 .....	2		1 .....	2,20	
2 .....	6		2 .....	2,60	
3 .....	8,2		3 .....	3,68	
4 .....	8,3		4 .....	4,50	
5 .....	10,24		5 .....	5,00	
6 .....	11,00		6 .....	10,00	
7 .....	11,50		7 .....	10,50	
8 .....	12,00		8 .....	13,11	

**TABLEAU IX**  
**CONTENU EN ENZYME DE SCHARDINGER DU LAIT AVANT ET APRÈS  
CENTRIFUGATION**

Numéro	Avant centrifugation		Caractéris- tique
	(Is)		
1 .....	0,25	0	lait
2 .....	0,3	0	»
3 .....	1,25	0,1	»
4 .....	3,25	0,4	»
5 .....	8,20	0,6	»
6 .....	2,60	1,00	colostrum
7 .....	4,50	1,50	»
8 .....	8,20	3,10	»
9 .....	8,30	1,40	»
10 .....	10,00	4,10	»
11 .....	12,00	1,60	»
12 .....	12,30	2,12	»

Dans un récent article POLONOWSKI, BAUDU et NEUZIL (10) étudiant de nouveau l'influence curieuse du froid sur l'activité de la déhydrase (qu'ils appellent suggestivement « révélation »), l'expliquent par la solubilisation des cénapses lipido-protidiques qui lient l'enzyme aux globules gras.

J'ai constaté [4] aussi que l'enzyme du lait soumis au froid (congélation naturelle pendant l'hiver) se détache des globules gras, se « solubilisant » uniformément dans la masse du lait, phéno-

(1) Les difficultés de récolte nous ont obligé à doser l'enzyme avant et après la tétée dans des colostrums provenant de femmes différentes.

mène qui exclut la concentration de l'enzyme par adsorption sélective sur les globules gras, fait qui nous servait à la séparation de l'enzyme de Schardinger.

BURRI et SCHMIDT [11], d'ailleurs bien avant nous, ont observé que le lait tenu une heure à basse température (12-13° ou même à - 4°) présente une vitesse de décoloration du bleu de méthylène accrue, donc une augmentation de l'activité enzymatique. Ils expliquent cette exaltation de l'activité par les processus de solidification et de cristallisation de la graisse.

Nous avons voulu vérifier ce phénomène dans le cas du lait de femme en conservant quelques échantillons à la glacière pendant des temps variables. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

TABLEAU X  
INFLUENCE DU FROID SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU LAIT DE FEMME

Numéro	Gamma NO <sub>2</sub> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait			
	Lait après la traite	Lait tenu 30 minutes à la glacière	Lait tenu 60 minutes à la glacière	Lait tenu 24 heures à la glacière
1 .....	0,26	0,27	0,30	0,25
2 .....	0,24	0,24	0,13	0,22
3 .....	0,37	0,38	0,40	0,35
4 .....	0,50	0,62	0,65	0,53
5 .....	1,00	1,00	1,10	1,00
6 .....	5,28	5,30	6,32	5,30

On voit que, d'après les résultats précédents, l'influence du froid sur l'activité enzymatique du lait de femme est presque nulle.

Ce manque de « révélation » par le froid est peut-être spécifique du lait de femme en opposition avec le lait de vache où la vitesse de décoloration du bleu de méthylène est influencée par d'autres facteurs qui n'affectent pas la vitesse de réduction des nitrites.

Plus révélateur que le froid s'est montrée la dilution. Si on dilue le lait de femme, nous avons constaté que l'activité déhydrasique augmente fortement. Les résultats sont les suivants, tableau XI.

L'augmentation de l'activité enzymatique avec la dilution peut s'expliquer soit par l'existence d'une substance inhibitrice dont la concentration est diminuée par cette dilution, soit par l'influence des ions ou des molécules d'eau sur les groupements actifs de l'enzyme, fait observé aussi avec d'autres enzymes (cas des protéases). On doit tenir compte aussi que, par dilution, la concentration du substratum augmente également.

TABLEAU XI  
INFLUENCE DE LA DILUTION SUR L'ACTIVITÉ DÉSHYDRASIQUE DU LAIT DE FEMME

Numéro	Gamma NO <sup>2</sup> Na dans 5 cm <sup>3</sup> de lait (= Is)			
	Lait non dilué	Lait dilué à un demi	Lait dilué à un cinquième	Lait dilué à un dixième
1 .....	0,20	0,32	—	—
2 .....	0,24	0,40	0,90	—
3 .....	0,26	0,40	0,90	—
4 .....	0,31	0,64	1,50	—
5 .....	0,62	1,00	2,00	2,80
6 .....	0,56	0,80	1,40	1,80
7 .....	0,50	0,83	1,70	—
8 .....	0,76	1,20	2,1	2,00
9 .....	0,84	1,84	1,80	1,00
10 .....	1,00	1,70	2,50	—
11 .....	5,28	5,86	9,90	—

En comparant l'activité déhydrasique du lait de femme avec celle du lait de vache, on constate que celui-ci est en moyenne deux cents fois plus actif que le lait de femme. Cette constatation peut être employée pour dépister les falsifications du lait de femme par le lait de vache, ce qui a été déjà utilisé par RODKEY et BALL [12], avec la méthode manométrique de détermination de l'activité enzymatique. A l'aide de la technique décrite dans le présent travail, j'ai pu reconnaître, avec précision, l'adjonction de 5% ou même moins, de lait de vache dans du lait de femme.

### Conclusions

1. La nouvelle technique proposée pour le dosage de l'enzyme de Schardinger ou déhydrase du lait est basée sur l'observation de A. BACH que cette enzyme est capable de réduire les nitrates en présence des aldéhydes. Cette technique est particulièrement indiquée pour le dosage des petites quantités d'enzyme de Schardinger.
2. Le lait de femme contient de très petites quantités d'enzyme et, dans 25% des cas rapportés, n'en contient pas du tout.
3. Le colostrum est plus riche que le lait et contient *toujours* de l'enzyme.
4. La teneur, en enzyme, du lait n'est pas influencée par l'âge de la mère, la période de lactation, le nombre des enfants ou le taux de matière grasse.
5. Nous avons observé que la quantité d'enzyme était plus

grande dans les laits des mères dont les enfants croissaient ou se développaient mal (laits avec un indice de Schardinger augmenté). S'il n'y a pas d'autres causes (maladies, carences, etc.) bien confirmées et si le contenu en enzyme dépasse beaucoup l'indice de l'unité (1 unité Schardinger =  $I_s = 1$  gamma  $NO^2Na$  dans 5 cm de lait) on peut incriminer le lait maternel et changer le régime alimentaire. On n'a trouvé que très rarement des quantités plus grandes que 1 dans le lait des mères dont les enfants étaient de santé florissante et dont la courbe poids/âge évoluait normalement.

6. Le froid n'accroît pas l'activité enzymatique du lait de femme déterminée avec notre technique, contrairement aux constatations de BURRI et SCHMIDT et POLONOWSKI, BAUDU et NEUZIL.

7. Au contraire la dilution augmente de trois à cinq fois l'activité déhydrasique du lait de femme.

8. Au moyen de notre technique, on peut dépister aisément l'adjonction de 5% ou même moins de lait de vache dans le lait de femme.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BACH. *Biochem. Z.*, 1911, 33, 282.
- [2] W. LIPSCHITZ et A. GOTTSCHALK. *Pflüger's Archiv für ges. Physiol.*, 1921, 1-32, 191.
- [3] M. DIXON et S. THURLOW. *Biochem. J.*, 1924, 18, 989.
- [4] L. M. BURUIANA. Cercetari potentiometrice asupra enzimei lui Schar-dinger. Bucarest, 1935.
- [5] B. SBARSKY et D. MICHLIN. *Biochem. Z.*, 1925, 155, 485.
- [6] A. BACH et K. NIKOLAJEFF. *Biochem. Z.*, 1926, 169, 105.
- [7] L. M. BURUIANA et A. IDICEANU. *Le Lait*, 1949, 238, 449.
- [8] D. MICHLIN. *Biochem. Z.*, 1926, 163, 36.
- [9] L. M. BURUIANA. *Le Lait*, 1950, 291-292, 1.
- [10] M. POLONOWSKI, L. BAUDU et E. NEUZIL. *Le Lait*, 1949, XXIX, nos 281-282, 283-284, 1, 128.
- [11] R. BURRI et H. SCHMIDT. *Biochem. Z.*, 1911, 36, 376-388.
- [12] F. L. RODKEY et E. G. BALL. *The Journal of Lab. a. Clinic. Med.*, 1946, vol. XXXI, n° 3, 354-356.