

ACTIVITÉ THROMBO-PLASTINIQUE DU LAIT

(Troisième Note)

par

F. BRUGHERA

Istituto Provinciale Protezione Assistenza Infanzia — Milano
(Dir. Gén. Prof. C. Torricelli)

P. SALVADORI F. PELLEGRINO

Centro Sperimentale del Latte — Milano
(Dir. Dr. P. Salvadori)

La présente recherche sur l'activité thromboplastinique du lait est la suite de nos études, parues sous la forme de deux publications précédentes [1-7]. Elle a été réalisée dans le but de mettre en évidence si cette activité est réellement comparable à celle du sang et si elle a en commun avec cette dernière des facteurs identiques ou similaires à ceux, déjà connus, de la coagulation du sang.

Le critère de recherche que nous avons choisi à cet effet a été celui de confronter les températures critiques et les temps critiques y relatifs des facteurs thromboplastiniques du plasma de sang humain (AHG ; PTC ; facteur plaquettaire) à ceux des facteurs analogues présumés dans le lait humain.

On sait que le facteur VIII (AHG) est entièrement inactivé après chauffage à 56° C pendant 20 mn ; mais déjà après un traitement de 2 mn à la température susdite, une petite quantité seulement de ce facteur parvient à survivre à l'attaque thermique.

Le facteur IX (PTC) perd toute activité après 10 mn de chauffage à 56° C [3].

Le facteur plaquettaire thromboplastinique [4] est celui de la tierce qui présente la plus grande thermo-stabilité, de sorte que son activité reste intacte même après 30 mn de chauffage à 56° C.

A rendre les recherches encore plus complexes contribue le fait que, de son côté, la thromboplastine des tissus n'est que relativement thermo-labile : après 20 mn de chauffage à 60° C, elle perd une partie de son activité, mais conserve intactes les caractéristiques des thromboplastines incomplètes ou partielles. Il s'ensuit que son activité résiduelle représente un équivalent fonctionnel du facteur plaquettaire de la thromboplastine [5-6].

Ce sont là les principes théoriques sur lesquels nous nous sommes basés pour les recherches suivantes.

Comme d'habitude, nous fournirons les temps obtenus à tous les examens effectués sur un seul lot de lait et non pas les moyennes obtenues sur tous les laits analysés. Nous avons remarqué, en effet, que les variations entre les différentes masses de lait, quoique considérables, respectent la proportion des différences en temps des diverses expériences.

Nous avons choisi un lait de femme qui nous a fourni un temps de Quick (1) plutôt long (0,2 cm³ de lait de femme + 0,1 cm³ de substrat plasmatique humain lyophilisé et reporté à son volume : temps de coagulation à 37° C : 38 s) et l'avons porté, pendant un temps de 10 mn, à une température de 56° C (tab. 1) : en répétant le temps de Quick sur cet échantillon, nous n'avons obtenu aucun phénomène de coagulation (2).

Ce fait témoignait assurément en faveur d'une réduction totale (ou, du moins, considérable) de l'activité thromboplastinique de l'échantillon traité à la chaleur.

TABLEAU I

<i>Lait de femme réchauffé à 56° C pour 10 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Lait de femme témoin (pas réchauffé)	38 s
Lait de femme rech.	pas de coagulation
Lait de femme rech. + PTC	1 mn 5 s
Lait de femme rech. + PTC + AHG	30 s
Lait de femme rech. + AHG + FP	pas de coagulation
Lait de femme rech. + PTC + FP	40 s
Lait de femme rech. + AHG	pas de coagulation
<i>Lait de femme réchauffé à 56° C pour 20 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Lait de femme rech.	pas de coagulation
Lait de femme rech. + PTC	1 mn 26 s
Lait de femme rech. + PTC + AHG	35 s
Lait de femme rech. + AHG + FP	pas de coagulation
Lait de femme rech. + PTC + FP	4 mn 20 s
Lait de femme rech. + AHG	pas de coagulation

(1) Notre définition « temps de Quick » est entendue comme une évaluation du système de coagulation, où la thromboplastine calcique est donnée par le lait et la prothrombine et le fibrinogène sont donnés par le plasma standard.

(2) Sur d'autres échantillons, nous avons simplement observé un grand retard dans la coagulation, mais cette dernière avait quand même lieu encore qu'au triple du temps par rapport à l'échantillon cru : nous ne nous sommes pas encore penchés sur ce phénomène, pour en trouver le motif, d'autant plus qu'il s'agit là d'une variante ne compromettant en rien le résultat des recherches suivantes.

En présumant que le PTC était devenu déficitaire dans le lait en question, nous avons fait un mélange où un tiers était représenté par le facteur IX du commerce, lyophilisé et reporté à son volume, et deux tiers, par du lait dénaturé à la chaleur : malgré la plus grande dilution, nous avons obtenu un temps de Quick sur le plasma du sang égal à 1 mn 5 s. Toutefois, ce dernier élément était assez loin de la valeur initiale, fournie par l'échantillon cru ; d'un autre côté, nous savions que le facteur VIII, qui perd son activité d'une façon totale après 20 mn à 56° C, est déjà bien moins actif après 2 mn ; en effet en contrôlant à nouveau le temps de Quick sur un mélange constitué par du lait traité à la chaleur comme facteur plaquettaire, du facteur VIII du commerce et du facteur IX du commerce, nous avons obtenu la coagulation dans l'espace de 30 s.

D'autre part, si nous ajoutions, au lait en question, de l'AHG seulement, nous ne parvenions à obtenir nul phénomène de coagulation sur le substrat plasmatique.

Les examens ci-dessus indiqueraient deux faits importants :

1) Dans le lait humain, traité pendant 10 mn à 56° C, un élément de la coagulation, remplaçable par du PTC plasmatique, viendrait à manquer complètement, tandis qu'un autre, remplaçable par du AHG plasmatique, serait considérablement inactivé ;

2) Dans ce même lait, nul déficit ne se serait vraisemblablement créé de facteur plaquettaire présumé, ou de calcium ionique ou d'autres facteurs déterminants, en ce qui concerne son activité coagulante sur le substrat plasmatique humain.

Comme preuve de contrôle de ce que l'échantillon examiné dénotait une carence d'un facteur analogue au PTC, nous avons préparé un mélange où le lait, utilisé comme facteur IX, représentait un tiers du volume total, tandis que les deux autres tiers étaient formés par du facteur VIII et du facteur plaquettaire. Comparé à un substrat plasmatique, ce mélange ne manifestait aucun phénomène de coagulation et semblait donc dépourvu de toute activité thromboplastinique, à l'encontre de ce qui se passait lorsqu'on se servait de lait humain cru.

Pour démontrer la survivance partielle du facteur VIII, nous avons mélangé, en parties égales, le lait de femme traité à la chaleur (56° C pendant 10 mn) avec le PTC et le facteur plaquettaire du commerce : ce mélange nous a fourni un temps de Quick sur le plasma égal à 40 s.

Par la suite, un échantillon de lait de la masse utilisée précédemment a été chauffé, pendant 20 mn, à 56° C : dans ces conditions, on ne parvenait à obtenir aucune coagulation du substrat plasmatique (avec d'autres échantillons, nous n'avons obtenu que rarement des temps de Quick plus que quintuplés).

Pour dissiper, une fois pour toutes, le doute que ces résultats pouvaient être influencés par des altérations de concentrations ioniques du calcium, dues à la chaleur, nous avons maintenu ce même lait à 56° C pendant 10, 20, 30, 60 et 120 mn et avons introduit 0,2 cm³ des différents échantillons obtenus dans le même nombre d'éprouvettes contenant du mélange thromboplastinique du commerce, formé par 0,2 cm³ de AHG + 0,2 cm³ de PTC + 0,2 cm³ de facteur plaquettaire. Autrement dit, nous avons utilisé les différents échantillons de lait humain chauffé, à la place de la solution ordinaire de CaCl₂ 0,025 M dont on se sert pour les essais hématologiques. En comparant 0,2 cm³ de ces différents mélanges thromboplastiniques à 0,1 cm³ de substrat plasmatique humain, nous avons toujours obtenu des temps de coagulation autour de 20 s. Par cette expérience nous avons voulu démontrer que le chauffage du lait humain à 56° C ne comporte pas de variations déterminantes des ions de calcium, même après 120 mn et que cette concentration est plus que suffisante pour promouvoir les phénomènes de coagulation à tous les temps de chauffage sous examen.

En partant de l'hypothèse comme quoi dans l'échantillon de lait humain traité, pendant 20 mn, à 56° C, il devrait y avoir un déficit de AHG et de PTC, avec une survivance à peu près absolue du facteur plaquettaire, nous avons mélangé, à volume égal, le lait susdit, utilisé comme facteur plaquettaire, avec du AHG du commerce et du PTC du commerce. Nous avons obtenu un temps de Quick de 35 s, donc un temps inférieur de 3s à celui fourni par l'échantillon cru (tab. 1).

A ce moment-là, une fois démontrée l'intégrité de la fonction exercée par le facteur plaquettaire présumé du lait, il fallait démontrer la disparition de l'activité de AHG. Dans ce but, nous nous sommes servis du lait traité à la chaleur pendant 20 mn comme facteur VIII, nous l'avons mélangé avec du PTC et un facteur plaquettaire du commerce et avons obtenu un temps de Quick sur le plasma de 4 mn 20 s, avec la formation d'un mauvais produit de coagulation. Compte tenu de ce que, comme déjà dit plus haut, ce même essai, fait avec du lait chauffé pendant 10 mn à 56° C, avait fourni un temps de 40 s, il nous semble vraisemblable de penser que, en effet, un troisième élément peut être considéré comme sélectionnable par le moyen du chauffage à des temps différents ; cet élément se comporte d'une façon superposable avec celle du facteur VIII de la coagulation du sang, tant en ce qui concerne sa sensibilité à la chaleur, que pour ce qui est de sa possibilité d'être remplacé par le facteur en question en vue de la coagulation plasmatique.

Avant de tirer des conclusions de ces quelques notes, nous voudrions souligner une autre donnée qui, à notre avis, pourrait contribuer à mettre en évidence les hypothèses de base : le lait

humain, porté à 56° C pendant 20 mn et qui, selon notre opinion, ne conserverait qu'une activité similaire à celle du facteur plaquettaire, s'il est ultérieurement additionné de facteur plaquettaire du commerce et de AHG dans les proportions usuelles, ne donne lieu à aucun phénomène de coagulation s'il est confronté à du substrat plasmatique. Nous avons déjà dit plus haut que le même lait mélangé avec du PTC et du facteur plaquettaire fournit un temps de 4 mn 20 s, avec la formation d'un mauvais produit de coagulation. Ces données diffèrent, en effet, d'une façon sensible, si elles sont comparées au temps de 35 s, fourni par le mélange du même lait de femme, enrichi tant de AHG que de PTC.

En résumé, nous avons l'intention de tâcher de mettre en évidence si l'activité thromboplastinique du lait humain est soutenue par une substance quelconque, capable d'une telle activité dans un sens plus large, ou bien par une thromboplastine générale du type tissulaire, ou bien encore, par une thromboplastine vraisemblablement du type plasmatique, qui aurait en commun avec celle du sang des caractéristiques nettes et très ressemblantes avec certains des facteurs fondamentaux de la première phase de l'hémo-coagulation.

Dans ce but, nous avons voulu faire des expériences analogues aux expériences précédentes, en chauffant à 56° C, pendant 10 et pendant 20 mn, tant un mélange thromboplastinique entièrement formé par des facteurs standard du commerce, qu'une thromboplastine tissulaire, non calcique, toujours du commerce.

Les résultats de ces dernières expériences, que l'on trouve aux tableaux 2 et 3, mettent en évidence un parallélisme bien net dans le comportement du lait et celui de la thromboplastine plasmatique après le chauffage. Si l'on tient compte de ce que les temps de 2 mn, que certaines des combinaisons indiquées au tableau 3 ont fait enregistrer, ne représentent que des temps de recalcification purs et simples et de ce que ces derniers peuvent être considérés comme les équivalents du manque de coagulation au cours des mêmes expériences, faites en parallèle avec du lait de femme, l'analogie entre le lait humain et la thromboplastine plasmatique semble devoir être considérée comme encore plus évidente.

Par contre, nous faisons remarquer que les données fournies par ces mêmes essais, réalisés avec de la thromboplastine tissulaire, diffèrent d'une façon assez nette de tous les autres tests faits précédemment et que, l'extrême contraction des temps de réaction indique une sensibilité à la chaleur beaucoup moins poussée, de la part de la fraction thermo-labile de la thromboplastine tissulaire dont, en effet, l'activité ne diminue que très peu à 56° C. Nous ajouterons que, à notre avis, les différences de temps obtenues au cours des expériences avec chauffage de la thromboplastine tissulaire à 10 et 20 mn, ces différences donc sont si petites qu'elles

TABLEAU II

<i>Mélange thromboplastine plasmatique réchauffé à 56° C pour 10 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Mélange témoin (pas réchauffé)	13 s
Mélange rech.	2 mn
Mélange rech. + PTC	14 s
Mélange rech. + AHG + PTC	15 s
Mélange rech. + AHG + FP	2 mn
Mélange rech. + PTC + FP	37 s
Mélange rech. + AHG	2 mn
<i>Mélange thromboplastine plasmatique réchauffé à 56° C pour 20 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Mélange rech.	2 mn
Mélange rech. + PTC	40 s
Mélange rech. + PTC + AHG	14 s
Mélange rech. + AHG + FP	2 mn
Mélange rech. + PTC + FP	38 s
Mélange rech. + AHG	2 mn

TABLEAU III

<i>Thromboplastine tissulaire réchauffée à 56° C pour 10 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Thr. tiss. témoin (pas réchauffée)	12 s
Thr. tiss. rech.	20 s
Thr. tiss. rech. + PTC	10 s
Thr. tiss. rech. + PTC + AHG	12 s
Thr. tiss. rech. + AHG + FP	23 s
Thr. tiss. rech. + PTC + FP	12 s
Thr. tiss. rech. + AHG	19 s
<i>Thromboplastine tissulaire réchauffée à 56° C pour 20 mn</i>	<i>Temps de coagulation sur plasma humain</i>
Thr. tiss. rech.	27 s
Thr. tiss. rech. + PTC	12 s
Thr. tiss. rech. + PTC + AHG	13 s
Thr. tiss. rech. + AHG + FP	29 s
Thr. tiss. rech. + PTC + FP	15 s
Thr. tiss. rech. + AHG	18 s

Pour les méthodes de détermination des temps de Quick et pour la technique d'application de chaque facteur voir notre note précédente.

feraient exclure une dualité de composants à sensibilité calorique différente, mais, tout au plus, une détérioration progressive et partielle d'une substance unique, en raison directement proportionnelle à la durée du traitement à la chaleur.

Conclusions

En réexaminant les données ci-dessus, on peut remarquer que le chauffage du lait humain à 56° C influence indubitablement son activité thrombo-plastinique, en séparant une fraction thermo-stable (qui maintient sa capacité coagulante sur le plasma, si on y ajoute du AHG et du PTC) d'une fraction thermo-labile (totalement inactivée ou presque).

Sur la base des résultats obtenus, il semblerait évident que la substance thermo-stable exercerait une activité similaire à celle du facteur plaquettaire thromboplastinique ; de leur côté, les expériences réalisées nous dirigeraient, en général, vers un facteur lipidique, hémostatique et thermo-stable, sans nous fournir, cependant, la possibilité de distinguer s'il s'agit d'un facteur coïncidant avec le facteur plaquettaire de la thromboplastine ou, simplement, d'une substance dont l'activité est analogue à celle des céphalines, des extraits lipidiques des tissus, du facteur lipidique thermo-stable de Bordet-Howel de la thromboplastine des tissus.

Dans notre première note sur cette question nous avons formulé l'hypothèse comme quoi l'activité thromboplastinique du lait est du type plasmatique. Par la présente recherche, qui reste encore dans le domaine des études préliminaires, nous nous sommes proposés de faire un premier gros dépistage, en vue de nous orienter dans le sens d'une évaluation discriminative au sujet du type de thromboplastine éventuellement présente dans le lait.

Etant admis que la substance étudiée et exerçant une activité thromboplastinique, est divisible, grosso modo, en deux fractions (celle qui perd son activité après 20 mn de chauffage à 56° C et celle qui résiste à ce traitement), il ne nous restait plus que de tourner nos recherches vers la possibilité d'examiner la sensibilité à la chaleur de la partie thermo-labile, en fractionnant les temps de chauffage. Nous espérons pouvoir mettre en évidence, en effet, si la fraction thermo-labile en question fait preuve d'un comportement univoque (fait qui nous aurait orientés vers un certain parallélisme avec le facteur protéique de Chargaff, donc dans le sens d'une thrombo-plastine du type tissulaire) ou bien manifeste une dualité de comportement (observation qui nous aurait permis de supposer la présence de plus d'un facteur, avec la possibilité donc de supposer la présence, dans le lait humain, d'une thromboplastine complexe à type plasmatique).

A notre avis, les hypothèses formulées dans notre première note se trouveraient entièrement confirmées par les données actuelles : non seulement la fraction thermo-labile de la thromboplastine présumée du lait a-t-elle révélé un dualisme qui indiquerait la présence de plusieurs facteurs (ou au moins de deux), mais, pour une même température critique, s'est-elle avérée sensible aux mêmes temps critiques de durée de l'échauffement, qui sont consi-

dérés typiques du facteur VIII et du facteur IX de la coagulation du sang. En outre, nous avons pu noter que les facteurs présumés, rendus déficitaires par la chaleur, peuvent être remplacés, d'une façon spécifique, par ceux de la coagulation du sang. Nous pouvons ajouter encore que, si deux facteurs sont déficitaires en même temps, l'adjonction d'un seul d'entre eux s'avère insuffisante et seule la présence de tous les deux reconduit le mélange aux valeurs normales de coagulation sur le plasma.

Nous nous proposons, dans un avenir proche, d'approfondir davantage la question et de préciser si nos déductions sont exactes ou non.

Résumé

Faisant suite à leurs publications précédentes sur le même sujet, les auteurs font une nouvelle série de recherches dans le but de déterminer à quel type de thromboplastine peut être référée l'activité coagulante du lait de femme, à l'égard du substrat plasmatique de sang humain. A travers l'évaluation critique des données fournies par les expériences tendant à déterminer la sensibilité à la chaleur de la thromboplastine présumée du lait, les auteurs orienteraient leur opinion vers une activité thromboplastinique du type plasmatique, analogue à celle du sang.

Summary

Previous research was further developed to investigate which type of thromboplastin may be responsible for the clotting action exerted by human milk on the plasmatc substratum of human blood.

The suggestion that a thromboplastinic activity of the plasmatc type similar to that of blood seems substantiated by a critical appraisal of results obtained from tests aimed at determining the heat sensitivity of the presumed milk thromboplastin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRUGHERA F., SALVADORI P. et PELLEGRINO F. — Activité Thromboplastinique du lait (1^{re} note) *Le Lait*, 46, 159, 1966.
- [2] INTROZZI P. — *Traité Italien de Médecine Interne* (Sang, Organes hémopoïétiques, Système réticulo, Histiocytaire). Vol. I, p. 585, édit. Abruzzini, 1961, Rome.
- [3] INTROZZI P. — *Idem* comme ci-dessus, p. 586.
- [4] INTROZZI P. — *Idem* comme ci-dessus, p. 591.
- [5] INTROZZI P. — *Idem* comme ci-dessus, p. 582.
- [6] BABY E. — *Biologie des Hémorragies et des Thromboses*, édit. Masson & C., Paris, p. 26.
- [7] SALVADORI P., BRUGHERA F. et PELLEGRINO F. — Activité thromboplastinique du Lait (2^e note) *Le Lait*, mai-juin, 271, 1966.