

57. Etude polarographique de la salive

par D. Monnier et Z. Besso.

(9 I 54)

Dans nos publications précédentes¹⁾, nous avons étudié le comportement de la salive au polarographe, en présence de l'ion cobalt (II) et d'un tampon constitué de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque. Au cours de ces travaux, il a été montré, entre autres, que les courbes obtenues présentaient non pas deux, mais trois vagues, comprises entre celle de l'ion cobalt (II) et celle de l'ion ammonium NH_4^+ . Bien que les polarogrammes du sérum sanguin présentent une certaine analogie avec ceux de la salive, la troisième vague n'y est jamais présente. A notre connaissance, un seul auteur a signalé un saut «présodique», et il l'attribue à l'acide pyruvique. Les expériences que nous avons faites nous permettent d'affirmer que ce saut n'a aucun rapport avec celui dont nous venons de parler. Nous avons donc recherché l'origine de la troisième vague de la salive et nous allons exposer les résultats auxquels nous sommes arrivés.

Le potentiel $E_{\frac{1}{2}}$ de la troisième vague est généralement compris entre $-1,69$ et $-1,72$ volts (par rapport à la surface de mercure prise comme anode). Cette dernière disparaît complètement après un traitement approprié à la potasse, alors que les autres sauts ont tendance à augmenter (loc. cit.). Il est possible que la troisième vague soit due à la présence d'un composé sulfuré, car lors de la dénaturation alcaline on perçoit une odeur de mercaptan. Par contre, cette vague n'est pas sensiblement modifiée par une dénaturation thermique à 80° . Toutes les salives ne présentent pas cette troisième vague. C'est le cas, par exemple, pour certains échantillons pris à jeun. Elle réapparaît le plus souvent lorsqu'on effectue d'autres prélèvements sur le même individu au cours de la journée. L'effet de l'acide pyruvique ayant été cité dans la littérature, nous avons voulu nous assurer que cette substance n'avait aucun effet sensible sur la courbe polarographique de la salive. Le comportement de cet acide est quelque peu complexe, car, en solution, il donne des ions, des molécules non ionisées et présente en outre une forme énolique et une forme cétonique. Au pH 9,5 (celui de notre tampon sel d'ammonium-ammoniaque) on obtient une vague bien définie dont le potentiel $E_{\frac{1}{2}}$ est de $-1,48$ volts environ; il est donc fort éloigné de celui de notre troisième vague. Tout au plus le saut pourrait-il venir s'ajouter à la deuxième vague catalytique. La salive renferme peut-être de l'acide pyruvique, mais sa

¹⁾ Anal. Chim. Acta **8**, 572 (1953); Helv. **36**, 990 (1953).

concentration ne dépasse pas un gamma par cm^3 . Des essais semi-quantitatifs ont été effectués par comparaison avec une solution d'acide pyruvique de concentration donnée, en prenant comme réactif l'aldéhyde salicylique.

Comme le saut de l'acide pyruvique n'est pas catalytique et que, dans la presque totalité de nos essais, la salive est fortement diluée, on peut considérer que l'acide pyruvique est sans effet notable sur nos polarogrammes. L'addition à la salive de faibles quantités de cet acide n'apporte pas de modification sensible à la courbe polarographique. D'autres essais ont mis en évidence le fait que l'ion magnésium n'est pas responsable du troisième saut. Par contre, il est susceptible d'en modifier quelque peu le potentiel et la hauteur; le comportement de cet ion est du reste très complexe, il mériterait une étude approfondie.

Etude polarographique de la salive seule et de la salive en présence du tampon ammoniacal avec et sans cobalt (II).

Pour déterminer l'origine de la troisième vague, nous avons effectué une série de polarogrammes de la salive fraîche seule, puis de la même salive additionnée du tampon ammoniacal avec et sans cobalt (II). Dans le premier cas, nous avons déterminé la courbe polarographique à divers pH (réalisés par addition de quelques gouttes d'une solution de potasse). En milieu légèrement acide ou neutre, on obtient une seule vague qui commence à un potentiel de $-1,8$ volts environ. Elle est due à la réduction des ions alealins et alcalino-terreux. A partir du pH 7,5, cette vague se dédouble et on observe un premier saut compris entre 1,75 et 1,85 volts ($E_{\frac{1}{2}} \cong 1,8$ volts). Le second saut débute au voisinage de 2 volts. Ce phénomène n'a pas de rapport direct avec la troisième vague de la salive dont le potentiel $E_{\frac{1}{2}}$ est de 1,7 volts. Dans les essais que nous venons de décrire, la dilution de la salive est comprise entre 2 et 16.

Nous avons effectué une deuxième série d'essais en présence du tampon ammoniacal, mais sans cobalt. Le troisième saut apparaît alors, ainsi qu'en témoignent les valeurs du Tableau I, et sa hauteur est-à peu près proportionnelle à la concentration de la salive. Par contre, la première vague et la seconde vague n'apparaissent pas. Nous avons alors effectué les mêmes essais, sur le même échantillon de salive, avec le tampon et le cobalt (II). Les courbes polarographiques présentent alors les 3 vagues caractéristiques; la troisième est très semblable à celle que nous obtenons sans cobalt. On peut donc conclure que la troisième vague de la salive est due au tampon ammonium seul, le cobalt ne joue pas de rôle dans cette réduction ou du moins n'y apporte que des modifications souvent peu importantes.

Dans le tableau I, nous donnons quelques-uns des très nombreux résultats obtenus.

Tableau I.

	Conditions	dil.	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h_3 μ_a	$E_1^{\frac{1}{2}}$ volt	$E_2^{\frac{1}{2}}$ volt	$E_3^{\frac{1}{2}}$ volt
1	sans Co	25	0	0	5,3	—	—	1,67
	avec Co	25	2,7	1,9	6,7	1,40	1,59	1,72
2	sans Co	25	0	0	5,4	—	—	1,67
	avec Co	25	2,3	1,5	4,0	1,40	1,60	1,73
3	sans Co	25	0	0	3,3	—	—	1,67
	avec Co	25	2,9	1,6	4,8	1,40	1,60	1,73
4	sans Co	50	0	0	4,2	—	—	1,73
	avec Co	50	3,2	2,3	2,9	1,38	1,61	1,73
5	sans Co	5	0	0	20	—	—	1,70
	sans Co	10	0	0	11	—	—	1,70
	sans Co	20	0	0	6,2	—	—	1,69
	sans Co	25	0	0	5,6	—	—	1,68
6	sans Co	20	0	0	5,6	—	—	1,67
	sans Co	40	0	0	2,5	—	—	1,67
	avec Co	40	2,9	1,2	2,3	1,38	1,59	1,75
7	sans Co	25	0	0	5,6	—	—	1,70
	avec Co	25	5,2	1,9	—	1,37	1,58	1,73

Les polarogrammes d'une même série (1, 2, ...) ont été effectués sur le même échantillon de salive à des conditions différentes.

La mesure de h_3 en présence de la deuxième vague est délicate, car il y a interpénétration de ces ondes, ce qui explique, dans une certaine mesure, la différence entre les valeurs de h_3 (avec ou sans cobalt) pour un même échantillon.

Quelques essais effectués sur le sérum sanguin montrent que ce dernier ne donne pas de vague avant 1,8 volts lorsqu'on travaille en présence du tampon, sans cobalt. La ou les substances responsables du troisième saut de la salive ne se trouvent donc probablement pas dans le sérum sanguin.

Mode opératoire. Dans tous les essais précédents, nous avons procédé de la façon suivante: La salive fraîche (1 cm³ par exemple) est amenée à la dilution désirée par adjonction d'une solution 0,1-m. en chlorure d'ammonium aussi bien qu'en ammoniacque. Lorsque le polarogramme est effectué en présence de cobalt (II), ce dernier s'y trouve toujours à la concentration 0,0016-m. Pour plus de détails, nous renvoyons nos lecteurs aux articles précédents (loc. cit.).

Stabilité de la salive.

Nous avons recherché l'effet du temps sur les polarogrammes de la salive et particulièrement sur le comportement de la troisième vague. Chaque échantillon est conservé, sans traitement préalable, à 4° ou à 20° pendant un temps variant de 0 à 48 h. ou davantage, puis polarographié dans les conditions déjà citées.

Tableau II.

Conditions	Temps	Dil.	Salive conservée à 20°					
			h_1 μ_a	h_2 μ_a	h_3 μ_a	$E_1^{\frac{1}{2}}$ volt	$E_2^{\frac{1}{2}}$ volt	$E_3^{\frac{1}{2}}$ volt
Salive A + tampon	0	50	0	0	1,4	0	0	1,67
Salive A + tampon + Co	0	50	1,8	1,0	1,2	1,39	1,60	1,71
Salive A + tampon	24 h.	50	0	0	0	—	—	—
Salive A + tampon + Co	24 h.	50	1,8	0,45	0	1,36	1,57	—
Salive A + tampon	0	25	0	0	3,8	—	—	1,68
Salive A + tampon + Co	0	25	3,4	1,6	2,7	1,39	1,59	1,71
Salive A + tampon	24 h.	25	0	0	3,4	—	—	1,67
Salive A + tampon + Co	24 h.	25	3,0	1,4	2,2	1,38	1,60	1,71
Salive A + tampon + Co	48 h.	25	2,9	1,0	0	1,40	1,56	—
Salive B + tampon	0	25	0	0	4,2	—	—	1,68
Salive B + tampon + Co	0	25	3,8	1,4	2,4	1,39	1,69	1,70
Salive B + tampon + Co	24 h.	25	3,0	1,2	1,8	1,39	1,59	1,70
Salive B + tampon + Co	48 h.	25	2,9	0,7	0	1,39	1,60	—

La stabilité décroît de la première à la troisième vague. Les polarogrammes de la salive conservée à 20°, pendant 48 h., ne présentent, en général, plus de troisième vague, alors que h_1 ne subit qu'une faible diminution. A 4°, on observe un phénomène semblable, mais moins marqué; la salive se conserve bien pendant 24 h. et les sauts ne sont pas sensiblement modifiés. Après 3 jours, h_1 est encore intact, h_2 légèrement affaibli, alors que h_3 est réduit aux 2/3 environ.

Désalification de la salive.

Nous avons effectué la désalification de la salive afin de voir si les ions qu'elle renferme jouent un rôle dans la formation des divers sauts. Cette opération a été réalisée en plongeant un sachet de cellophane renfermant la salive centrifugée non diluée, dans plusieurs litres d'eau distillée et en faisant varier la durée de la dialyse. Pour éviter une dénaturation avec le temps, nous avons travaillé à 4°. Parallèlement, des essais d'électrodialyse ont été entrepris au moyen d'un dispositif préconisé par A. H. Gordon¹⁾ et modifié par MM. Boissonnas & Haselbach²⁾. Ces derniers y ont adapté un système de réfrigération par circulation d'eau.

Le Tableau III renferme quelques-uns des résultats obtenus. Chaque série d'essais a été entreprise sur des parties aliquotes d'un même échantillon et la polarographie a été

¹⁾ R. Conden, A. H. Gordon & A. J. Martin, Biochem. J. **41**, 590 (1947).

²⁾ Communication privée.

effectuée avant et après dialyse et électrodialyse, dans les conditions indiquées au paragraphe précédent, sur des salives diluées. Nous ne donnons pas les potentiels car ils ne subissent pas de modification au cours de ces opérations.

Tableau III.

Conditions	Dialyse	Temps de dialyse (heures)	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h_3 μ_a
Salive A + tampon	—	—	0	0	3,6
Salive A + tampon + Co	—	—	3,6	1,4	3,3
Salive A + tampon	dialyse simple	24 h.	0	0	0
Salive A + tampon + Co	dialyse simple	24 h.	3,6	0,8	0
Salive A + tampon	électrodialyse	2 h.	0	0	2,9
Salive A + tampon + Co	électrodialyse	2 h.	0,7	1,6	3,3
Salive A + tampon	—	—	0	0	3,1
Salive A + tampon + Co	—	—	2,4	1,5	3,3
Salive A + tampon	électrodialyse	2 h. $\frac{1}{2}$	0	0	2,7
Salive A + tampon + Co	électrodialyse	2 h. $\frac{1}{2}$	0	0,75	2,9
Salive B + tampon + Co	—	—	2,7	1,4	2,1
Salive B + tampon + Co	électrodialyse	2 h. $\frac{1}{2}$	0	0,4	1,9
Salive B + tampon	dialyse simple	48 h.	2,7	0,5	0

L'examen du Tableau III suggère les remarques suivantes :

Une électrodialyse de 2 h. et demi élimine complètement la première vague. Après 20 min., cette dernière est déjà fortement altérée. Par contre, lors de la dialyse simple, elle ne subit aucun changement, même après 48 h.

La deuxième vague (h_2) est plus stable que la première à l'électrodialyse, elle n'est presque pas modifiée après une demi-heure, mais disparaît après 3 h. La dialyse simple diminue aussi h_2 .

La troisième vague (h_3) n'est pas altérée par électrodialyse, même si celle-ci se prolonge plus de 3 h., ce qui fait supposer qu'au voisinage de la cathode, il n'y a pas une forte concentration alcaline, puisque, comme nous l'avons vu, une dénaturation à la potasse fait disparaître cette vague. La dialyse simple, par contre, élimine rapidement et totalement la ou les substances responsables de ce saut.

De ces observations, on peut tirer provisoirement les conclusions suivantes :

La substance (ou les substances) à l'origine de la première vague est réduite sur la cathode. Le comportement de la substance responsable de la troisième vague est plus curieux. On n'observe ni réduction

sur le mercure, ni diffusion, même partielle, à travers la membrane. On peut supposer que la particule est retenue dans le compartiment cathodique par un phénomène électrostatique. De toute façon, le mécanisme des phénomènes polarographiques semble très complexe. Ceci apparaît nettement quand on examine les polarogrammes obtenus sur la salive après dialyse simple, d'une part, et sur celui donné par l'eau distillée ayant été utilisée pour cette opération, d'autre part. Les résultats obtenus sur un même échantillon de salive sont consignés dans le Tableau IV.

Tableau IV.

		Milieu	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h_3 μ_a
1	Salive avant dialyse . .	tampon + Co	3,2	1,7	4,7
2	Salive après 3 h. de dialyse	tampon + Co	3,4	1,1	2,7
3	Eau de dialyse	tampon + Co	0	1,3	1,3
4	Salive avant dialyse . .	tampon	0	0	3,6
5	Salive après 3 h. de dialyse	tampon	0	0	2,5
6	Eau de dialyse	tampon	0	0	0,3

La salive a été diluée 25 fois pour les essais 1, 2, 4 et 5 et dix fois pour les essais 3 et 6. Dans ce dernier cas, les hauteurs ont été calculées pour les salives diluées 25 fois. Les résultats obtenus sur diverses salives montrent que, dans la plupart des cas, les polarogrammes obtenus en présence de tampon et de Co sur la salive dialysée d'une part et sur l'eau de dialyse d'autre part, donnent des sauts h_2 dont la somme est à peu près égale au saut obtenu dans les mêmes conditions sur le même échantillon avant dialyse.

Même observation en ce qui concerne h_3 . Par contre, en l'absence de Co, le saut h_3 du polarogramme de l'eau de dialyse simple est considérablement affaibli. On a vu que dans le cas de la salive non dialysée, ces variations sont beaucoup moins importantes et se font aussi bien dans le sens d'une augmentation que dans le sens d'une diminution du saut h_3 .

Influence de la cystéine et de la cystine sur les sauts catalytiques de la salive.

En présence du tampon ammoniacal et de Co^{II} , la cystine donne un saut catalytique à 1,7 volts environ¹⁾; la cystéine se comporte de façon analogue. Nous avons étudié l'évolution des polarogrammes de la salive en présence de cystine et cystéine libres. Le Tableau V renferme quelques-uns des résultats obtenus.

En présence de cystine, on obtient des résultats semblables, mais il y a une inter-pénétration plus marquée des deux dernières vagues, de telle sorte qu'il n'est pas possible de mesurer séparément h_2 et h_3 .

En résumé, on peut dire qu'en présence de cobalt, le saut h_3 croît lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de cystéine à la salive, mais qu'au contraire, en l'absence de cobalt, l'adjonction de cystéine a pour effet de diminuer h_3 . On peut supposer que la troisième vague est due

¹⁾ I. M. Kolthoff & J. Lingane, Polarography, Vol. 2, p. 853.

à la présence d'au moins deux substances, l'une active aussi bien avec que sans cobalt et l'autre seulement en présence de cobalt. Cette dernière ne donnerait pas de saut sans cobalt et, dans ces mêmes conditions, affaiblirait celui dû à la première substance.

Tableau V.

Polarogrammes effectués sur un même échantillon de salive diluée 50 fois en présence de tampon ammoniacal et de Co^{II} et de quantités variables de cystéine.

Conc. cystéine	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h_3 μ_a	$E_{\frac{1}{2}}^1$	$E_{\frac{1}{2}}^2$	$E_{\frac{1}{2}}^3$	
0.	1,5	1,5	2,0	1,35	1,58	1,71	
10^{-7} -m. . . .	1,4	1,6	2,4	1,37	1,59	1,72	
$2 \cdot 10^{-7}$ -m. . .	1,5	1,8	2,7	1,37	1,58	1,71	
$4 \cdot 10^{-7}$ -m. . .	1,4	1,8	2,7	1,38	1,59	1,72	
10^{-6} -m. . . .	1,5	1,8	3,8	1,39	1,59	1,72	
Polarogrammes effectués sur un même échantillon de salive dans les mêmes conditions que précédemment, mais sans cobalt.							
Conc. cystéine	0	10^{-6}	$2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5} -m.
h_3	4,3	3,8	3,6	3,1	2,9	2,9	2,9

Il n'y a pas de sauts h_1 et h_2 .

SUMMARY.

Diluted human saliva in an ammonia buffer solution and in presence of Co^{II} gives three catalytic waves, whilst blood serum, under the same conditions, gives only two waves. Saliva presents the first two waves only in the presence of Co^{II} , but the third wave appears in buffer solution with or without Co^{II} . After denaturation with potassium hydroxyde under the given conditions the third wave disappears completely, whilst the first and the second waves augment. Saliva changes its properties when kept; the stability of the waves is diminished in regressive order from h_1 to h_3 . After simple dialysis the second and third waves disappear, whilst the first wave does not change. After electro dialysis during two and a half hours, the first wave disappears, but the third wave is hardly changed. The water used for the simple dialysis has also been examined under the polarograph; this gave only the second and the third waves, but the behaviour of the third wave with or without Co^{II} is quite different from the behaviour of h_3 taken from a saliva which has not been dialysed. By addition of cystine or cysteine to the saliva, the third wave increases when Co^{II} is present, but it decreases in the absence of this ion.

Laboratoire de Chimie minérale, de Chimie analytique
et de Microchimie de l'Université de Genève.