

50376  
1973  
164

N° d'ordre : 412

50376  
1973  
164

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre

DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

**Claudine MAZURIER-DEHAINE**

ETUDES SUR LE ROLE PHYSIOLOGIQUE  
DES LACTOTRANSFERRINES

Recherche des lactotransferrines dans les selles de nourrissons



Présenté le 10 Octobre 1973, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	M.	J. MONTREUIL	Président
	Melle	G. SPIK	Rapporteur
	M.	G. FONTAINE	Examineur
	M.	M. GOUEMAND	Invité

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de  
Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques  
de LILLE I, sous la direction de Monsieur le Professeur  
J. MONTRBUIL et de Mademoiselle G. SPIK, Maître de Conférences.

## TABLE DES MATIERES

---

<u>INTRODUCTION</u>	p.	1
<u>GENERALITES</u>	p.	3
<u>I - EFFETS DES DEUX MODES D'ALIMENTATION, NATUREL ET ARTIFICIEL, CHEZ LE NOURRISSON</u>		
<u>A - SUR LE PLAN QUANTITATIF</u>	p.	5
<u>B - SUR LE PLAN QUALITATIF</u>	p.	8
1 - Statistique de GYORGY	p.	8
2 - Observations cliniques	p.	10
<u>II - LE LAIT ET LA DEFENSE LOCALE AU NIVEAU DE L'INTESTIN DU NOURRISSON</u>	p.	11
<u>A - LA FLORE INTESTINALE DES NOURRISSONS</u>		
1 - Etude des selles	p.	12
2 - La flore bifide	p.	12
3 - Facteurs favorisant l'implantation de la flore bifide	p.	14
4 - Invasion par des germes pathogènes	p.	15
<u>B - PROTEIDES QUI PROTEGENT L'INTESTIN DU NOURRISSON</u>		
1 - Les inhibiteurs trypsiques	p.	17
a) caractères généraux		
b) activité.		

2 - Le lysozyme		
a) caractères généraux	p.	18
b) activité biologique	p.	20
3 - Les globulines immunes		
a) caractères généraux	p.	20
b) rôle biologique		
$\alpha$ - l'activité des anticorps	p.	21
$\beta$ - immunité circulante	p.	23
$\gamma$ - protection de l'intestin	p.	25
4 - La lactotransferrine		
a) caractères généraux	p.	27
b) rôle biologique		
$\alpha$ - apport de fer au nourrisson	p.	27
$\beta$ - absorption intestinale du fer	p.	29
$\gamma$ - protection de la muqueuse intestinale	p.	30
<u>III - CONCLUSIONS</u>	p.	33

TRAVAUX PERSONNELS p. 35

1° - MISE EN EVIDENCE DE COMPOSES LACTES DANS LES SELLES DE NOURRISSONS - CARACTERISATION ET DOSAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE.	p.	36
--	----	----

— MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATIONS DES ECHANTILLONS

<u>A - COLLECTE DES SELLES</u>	p.	37
<u>B - TRAITEMENT</u>	p.	37
<u>C - TAMISAGE MOLECULAIRE</u>	p.	38

II - MISE EN EVIDENCE D'OLIGOSACCHARIDES

<u>A - CHROMATOGRAPHIE</u>	p.	38
<u>B - ELECTROPHORESE</u>	p.	39

III - MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES

<u>A - METHODE ELECTROPHORETIQUE</u>	p.	39
<u>B - METHODES IMMUNOLOGIQUES</u>		
1 - Les antisérums	p.	39
2 - Immunodiffusion double	p.	40
3 - Immunoélectrophorèses	p.	41

IV - DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES

<u>A - PRINCIPE</u>	p.	42
<u>B - MODE OPERATOIRE</u>	p.	43
1 - Matériel	p.	43
2 - Technique	p.	44

— RESULTATS

<u>I - TRAITEMENT DES SELLES</u>	p.	46
<u>A - TRAITEMENT</u>		
<u>B - TAMISAGE MOLECULAIRE</u>		

<u>II - MISE EN EVIDENCE D'OLIGOSACCHARIDES</u>	p.	48
<u>III - MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES</u>		
<u>A - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE</u>	p.	50
<u>B - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE</u>		
1 - Chez les nourrissons alimentés au lait de Femme	p.	50
2 - Chez les nourrissons alimentés au lait en poudre	p.	56
3 - Conclusions		
<u>IV - ETUDE QUANTITATIVE DE LA "COPROLACTOTRANS-</u>		
<u>FERRINE"</u>	p.	59
<u>A - MISE AU POINT DU DOSAGE PAR IMMUNODIFFUSION</u>		
<u>DOUBLE</u>	p.	60
<u>B - APPLICATIONS</u>	p.	62
1 - Analyse des selles traitées (SF)		
2 - Analyse des fractions obtenues par tamisage moléculaire (SG)		
3 - Rapport entre lactotransferrine ingérée et "coprolactotransferrine"		
a) Chez un nourrisson alimenté au sein	p.	65
b) Chez un nourrisson alimenté au lait artificiel additionné de lactotransferrine humaine	p.	66
— CONCLUSIONS	p.	70

2° - ISOLEMENT DE LA "COPROLACTOTRANSFERRINE" PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	p.	73
— MATERIEL ET METHODES	p.	74
<u>I - PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	p.	74
<u>II - MATERIEL</u>		
<u>A - FRACTIONS CONTENANT L'ANTIGENE</u>	p.	75
<u>B - PREPARATION DES FRACTIONS ENRICHIES EN ANTI- CORPS</u>		
1 - Précipitation au sulfate d'ammonium	p.	77
2 - Immunoadsorption	p.	77
3 - Contrôle des anticorps obtenus	p.	77
<u>C - UN AGENT INSOLUBILISANT : LE GLUTARALDEHYDE</u>	p.	78
<u>III - INSOLUBILISATION DES ANTICORPS</u>	p.	79
<u>A - METHODE PHYSIQUE</u>	p.	81
<u>B - METHODES CHIMIQUES</u>	p.	81
1 - Protéines réticulées	p.	81
2 - Protéines greffées		
a) L'Enzacryl-Polythiolactone	p.	83
b) Le Sépharose activé par le bromure de cyanogène	p.	83
c) Le Biogel activé par le glutaraldéhyde	p.	88
<u>IV - FIXATION ET ELUTION DE L'ANTIGENE</u>		
<u>A - PROCEDES EN "BATCH"</u>	p.	90
1 - Fixation		
2 - Lavage		
3 - Elution		

## B - PROCÉDES EN COLONNE

1 - Colonne de polyacrylamide	p.	91
2 - Colonne de sépharose	p.	92

## — RESULTATS

### I - PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN

#### ANTICORPS

<u>A - PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM</u>	p.	93
<u>B - IMMUNOADSORPTION</u>	p.	95
<u>C - CONCLUSIONS</u>	p.	99

### II - ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTES TECHNIQUES

#### D'IMMUNOADSORPTION

<u>A - ETUDE DE L'INSOLUBILISATION DES ANTICORPS</u>	p.	99
1 - Etude quantitative	p.	99
2 - Etude qualitative	p.	100
<u>B - ETUDE DE L'AFFINITE DES IMMUNOADSORBANTS</u>		
1 - Affinité pour la lactotransferrine pure	p.	102
a) Etude qualitative	p.	102
b) Etude quantitative	p.	104
2 - Affinité pour la lactotransferrine du lacto-sérum	p.	105
<u>C - CONCLUSIONS</u>	p.	106

### III - APPLICATION A L'ISOLEMENT DE LA "COPROLACTO-

#### TRANSFERRINE"

<u>A - ANTICORPS ENCHASSES DANS UN GEL DE POLYACRY- LAMIDE</u>	p.	108
--	----	-----



<u>B - ANTICORPS INSOLUBILISES SUR L'ENZACRYL- POLYTHIOLACTONE</u>	p.	108
<u>C - ANTICORPS INSOLUBILISES PAR LE GLUTARALDEHYDE</u>	p.	110
1 - Anticorps réticulés par le glutaraldéhyde	p.	110
2 - Anticorps greffés sur du Biogel activé par le glutaraldéhyde	p.	112
 — CONCLUSIONS	p.	113
  3*) ETUDE DE LA "COPROLACTOTRANSFERRINE"	p.	115
  — MATERIEL ET METHODES		
  <u>I - MATERIEL</u>	p.	117
  <u>II - METHODES</u>		
  <u>A - ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA "COPROLACTOTRANS-         FERRINE"</u>	p.	118
  <u>B - MISE EN EVIDENCE DE LA FIXATION DU FER</u>		
1 - Emploi du fer radioactif	p.	118
2 - Méthode spectrophotométrique	p.	120
  — RESULTATS		
  <u>I - ETUDE IMMUNOLOGIQUE</u>		
  <u>A - CONFIRMATION DES RESULTATS PRECEDEMMENT         OBTENUS</u>	p.	121
  <u>B - RAPPORT ENTRE LACTOTRANSFERRINE DEGRADEE         ET "COPROLACTOTRANSFERRINE"</u>	p.	123

- 1 - Hydrolyse trypsique
- 2 - Lactotransferrine "vieillie"

## II - ETUDE DE LA FIXATION DU FER

### A - EMPLOI DE FER RADIOACTIF

- 1 - Comptage en radioactivité p. 126
- 2 - Autoradiographies p. 128

### B - METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE p. 130

— CONCLUSIONS p. 131

CONCLUSIONS GENERALES - DISCUSSION p. 132

BIBLIOGRAPHIE p. 136

## INTRODUCTION

---

Les travaux que nous avons effectués sur la mise en évidence, l'isolement et l'étude de la "coprolactotransferrine" (lactotransferrine présente dans les selles de nourrissons alimentés par leur mère) s'inscrivent dans le cadre des recherches menées, au Laboratoire, sur le problème de la maturation du lait de Vache.

Le lait de Femme renferme des constituants spécifiques auxquels on attribue un rôle bénéfique dans le développement du nouveau-né. En effet, les immunoglobulines IgA, l' $\alpha$ 1 - antitrypsine, les glycopeptides responsables de l'activité bifidus et la lactotransferrine semblent protéger l'intestin des nourrissons de l'action des germes pathogènes et diminuent les risques de diarrhées infantiles.

Nous nous sommes particulièrement intéressée à la lactotransferrine qui, par sa propriété de fixer réversiblement le fer, doit posséder un rôle primordial, au niveau de l'intestin, dans l'absorption du fer et dans la protection de la muqueuse en privant les Bactéries du fer indispensable à leur développement. C'est pour démontrer que, chez le nourrisson, la lactotransferrine apportée par le lait maternel résiste, tout au moins en partie, aux conditions physiologiques de la digestion, que nous avons recherché cette glycoprotéine dans les selles de nouveaux-nés alimentés au lait de Femme. Nous avons également recherché cette protéine dans les selles d'enfants nourris au lait de Vache, afin de déterminer son origine exogène ou endogène. Enfin, nous nous sommes attachée à isoler "la coprolactotransferrine" afin

de démontrer que la lactotransferrine conserve, tout au long du tractus digestif, sa propriété de fixer réversiblement le fer.

Dans ce mémoire, nous exposons les problèmes concernant le rôle des composants lactés dans la protection intestinale du nouveau-né. Nous rapportons notamment les résultats obtenus lors de la caractérisation, par des méthodes immunologiques, et lors de l'isolement, par des méthodes fondées sur la chromatographie d'affinité, de la lactotransferrine se retrouvant dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme.

## GENERALITES

---

1° - Effets des deux modes d'alimentation, naturel ou artificiel, chez les nourrissons.

2° - Le lait et la défense locale au niveau de l'intestin du nourrisson.

Chez les Mammifères, l'alimentation du nouveau-né est assurée par une sécrétion des glandes mammaires de la mère : le lait. Ce liquide biologique comporte les éléments nécessaires à la survie du nouveau-né et permet sa croissance jusqu'au stade où, sans problème, il pourra être sevré. Le lait maternel est donc l'alimentation naturelle de tous les jeunes Mammifères, et, sans être finaliste, on peut dire qu'il est parfaitement adapté à leur développement. Cependant, l'Homme a essayé, pour diverses raisons, de remplacer l'alimentation naturelle de sa progéniture, le lait de Femme, par un lait d'origine animale, en particulier par le lait de Vache. De ce fait, la composition du lait de Vache, dont l'emploi s'avérait désastreux il y a encore un siècle, a été très étudiée et comparée à celle du lait de Femme.

Dans le premier paragraphe de la partie concernant les effets des deux modes d'alimentation, naturel et artificiel, sur les nourrissons, nous résumons l'ensemble des travaux qui ont permis de modifier la composition des laits artificiels afin de les rendre, du point de vue quantitatif, semblables au lait de Femme.

Dans le second paragraphe, nous aborderons le problème de la maternisation du lait sous un angle qualitatif.

Enfin, nous nous attacherons plus particulièrement, dans la deuxième partie, à un des aspects de la maternisation en analysant les facteurs alimentaires qui peuvent intervenir dans la protection intestinale des nourrissons.

I - EFFETS DES DEUX MODES D'ALIMENTATION, NATUREL ET ARTIFICIEL,  
CHEZ LES NOURRISSONS.

Pour répondre à CRUVEILLER qui écrit : "la supériorité du lait de mère est rapidement affirmée, généralement admise, difficilement prouvée", nous nous proposons de mentionner ci-dessous les travaux qui permettent de comparer la valeur du lait artificiel et maternel, sur le plan quantitatif tout d'abord, puis d'un point de vue plus qualitatif. Nous limiterons ce problème très important à certains de ses aspects biochimiques et physiologiques, négligeant l'aspect psychologique de la question qui est sans doute important, mais bien mal connu, bien qu'il ait été l'objet d'une étude de HEINSTEIN (1).

A - SUR LE PLAN QUANTITATIF

Les études effectuées sur la composition chimique des laits de Femme et de Vache ont été particulièrement bien résumées dans la revue générale de MONTREUIL (2). Nous avons rassemblé dans la figure 1 (p. 6) les principales différences entre ces deux laits : le lait de Femme est moins riche en sels minéraux et en protéines, mais contient 1,5 à 2 fois plus de glucides que le lait de Vache.

De nos jours, on trouve sur le marché des laits en poudre dont la composition en substances énergétiques est très proche de celle du lait de Femme. Ces laits ont une efficacité très valable lorsqu'on les juge sur le critère de la courbe de poids des nourrissons. En effet, les enfants nourris au biberon retrouvent très vite leur poids de naissance et se développent bien avec, de façon générale, un gain pondéral moyen se situant entre 20 et 35 g par jour. Comme le montre la figure 2 (p. 7), la courbe de poids de bébés pesant entre 1 750 g et 2 500 g à la naissance est tout à fait satisfaisante s'ils sont nourris avec un bon lait artificiel. De plus, chez des enfants

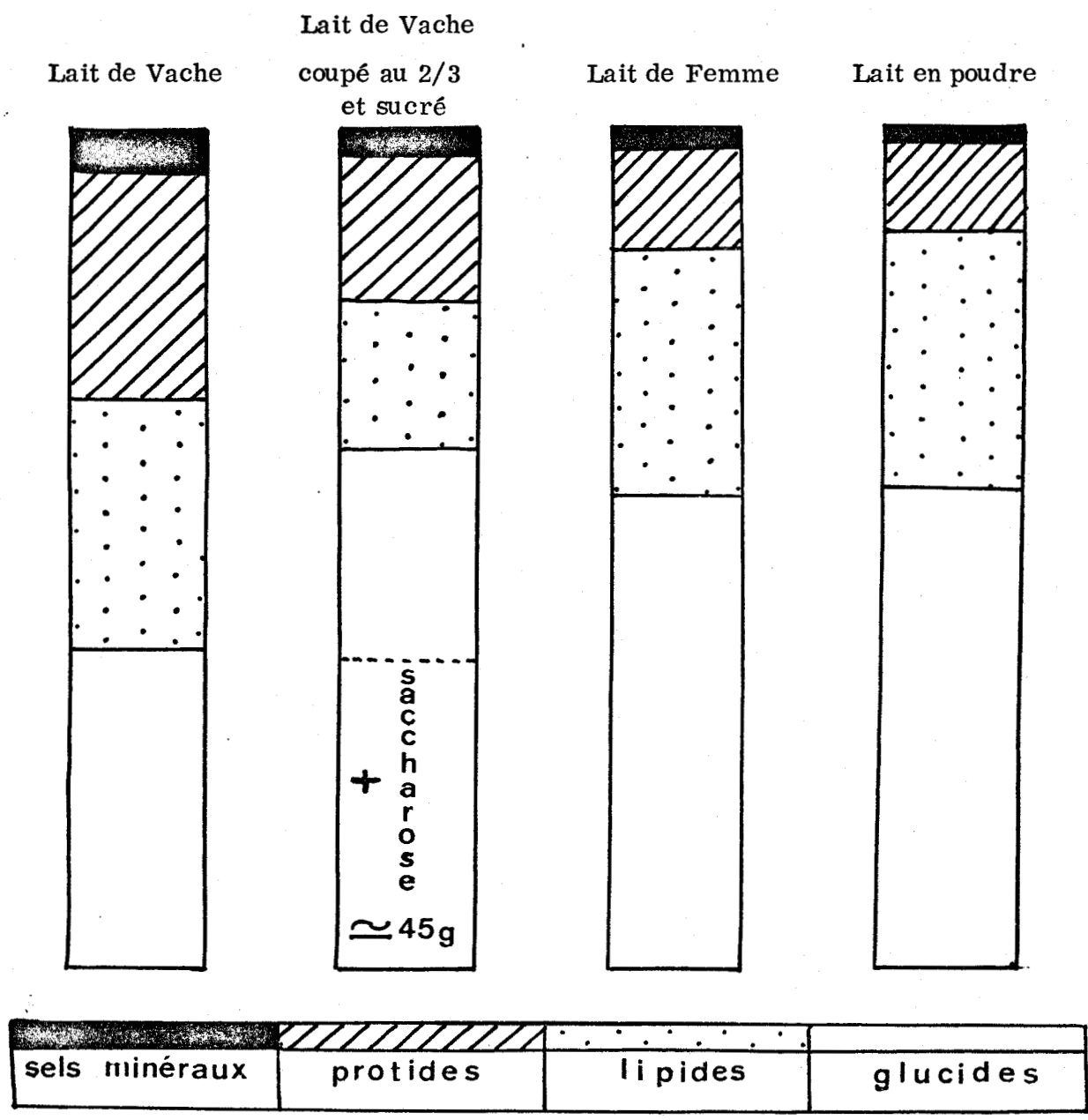


Figure 1 :

Composition du lait de Vache pur, du lait de Vache coupé au 2/3 d'eau et additionné de 45 g de saccharose, du lait de Femme et d'un lait artificiel (S. M. A. S 26).





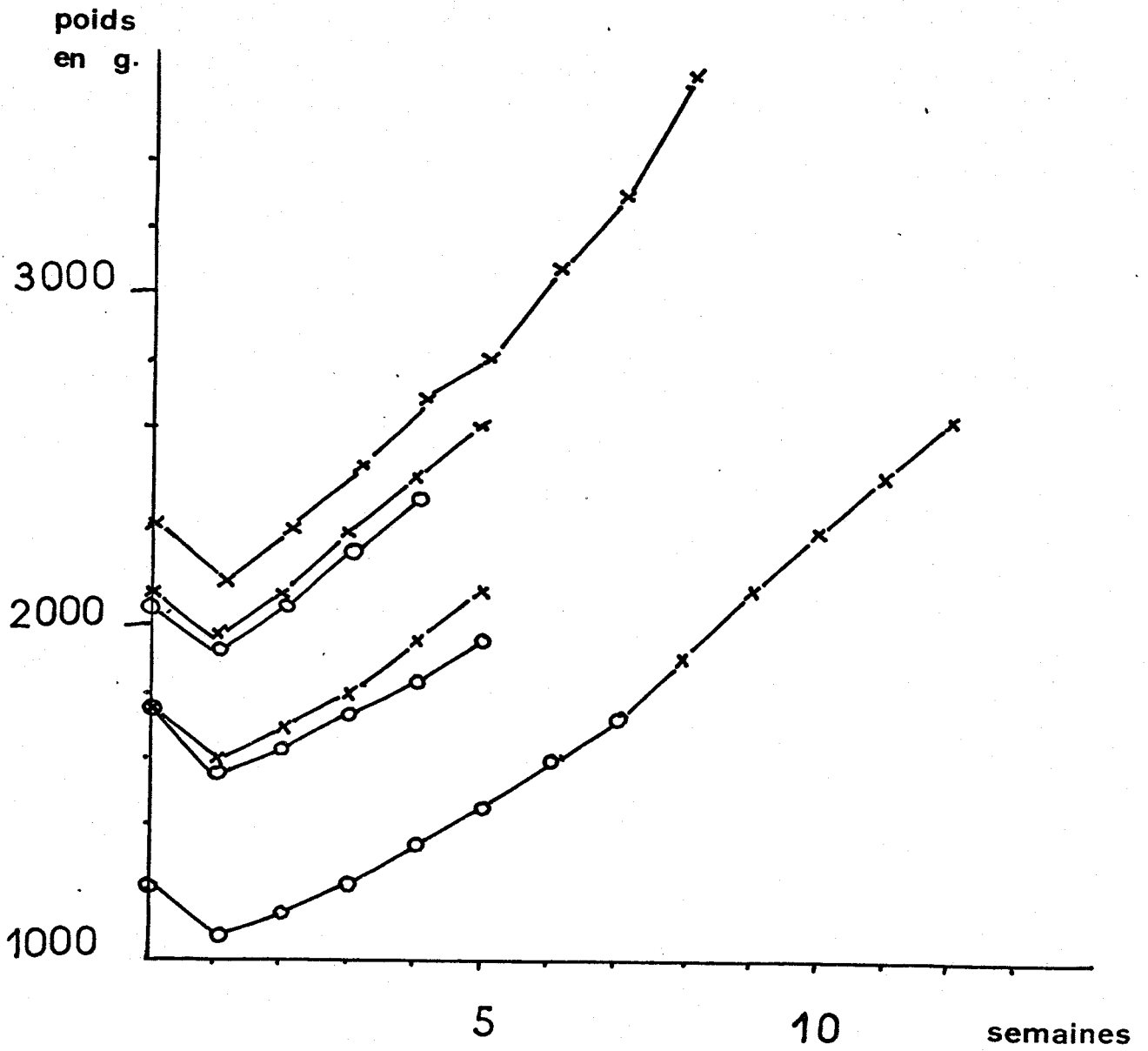


Figure 2 :

Gain pondéral hebdomadaire de nourrissons alimentés au lait maternel

( o—o ) ou artificiel ( x—x ).



plus petits, souvent prématurés, les résultats sont tout aussi valables.

Néanmoins, on sait que pour juger de la valeur nutritionnelle d'un régime, les augmentations de poids n'ont pas une valeur absolue car elles peuvent refléter également une rétention hydrique tissulaire. Cette infiltration d'eau qui s'apprécie sur le "turgor" (consistance du tissu cellulaire sous-cutané) est l'un des critères cliniques des pédiatres qu'on ne peut négliger, à côté du critère pondéral, pour comparer les deux types de régime alimentaire, naturel et artificiel, du nourrisson.

Il semble donc que, du point de vue énergétique, le problème de la maternisation du lait de Vache est de nos jours, bien résolu, et c'est, sans doute, ce qui a permis à AIKEN et HYTTEN (3) de dire que l'alimentation artificielle est un substitut satisfaisant de l'allaitement au sein. Néanmoins, il existe encore de grandes différences entre ces deux types de lait, si nous nous plaçons sur un plan qualitatif.

## B - SUR LE PLAN QUALITATIF

Nous envisagerons l'effet des deux modes d'alimentation, naturel ou artificiel, en évoquant tout d'abord l'étude statistique de GYORGY (4), puis en mentionnant les troubles ou maladies du nourrisson que des praticiens attribuent au lait artificiel.

### 1 - STATISTIQUE DE GYORGY

Comme l'indique le tableau I (p. 9) le taux de mortalité et de morbidité est nettement supérieur chez les enfants nourris artificiellement. Chez les enfants bénéficiant d'une alimentation mixte, ces taux sont intermédiaires.

La statistique de GYORGY (5) établie en 1962 à partir de 2 266 cas étudiés, confirme, aux yeux de certains auteurs, les observations des pédiatres citées ci-dessous. Mais d'autres ne croient pas en la supériorité

TABLEAU I

Taux de mortalité et de morbidité chez les enfants nourris au sein ou recevant une alimentation mixte ou artificielle (d'après GYORGY -5 -).

	Nombre de cas	Mortalité p. 1000	Morbidité p. 1000
Sein	971	10,2	223,4
Mixte	1 441	25,7	464,2
Artificiel	854	57,3	573,7



du lait maternel et pensent que la répartition de l'allaitement au sein et au biberon fait entrer en cause de nombreux facteurs qui faussent les études du type de celle de GYORGY.

## 2 - OBSERVATIONS CLINIQUES

Les troubles de tolérance, digestifs ou carenciels, imputés au lait artificiel sont les suivants :

### a - L'intolérance au lait de Vache

due à des allergènes, la  $\beta$  - lactoglobuline et l'  $\alpha$  - lactalbumine, qui conservent leur nocivité dans le lait en poudre.

### b - L'intolérance transitoire au saccharose

qui est parfois observée chez les nourrissons alimentés avec les laits artificiels qui sont complétés avec ce disaccharide.

c - L'anémie hypochrome par carence martiale, maladie répandue en pratique pédiatrique, mais dont certains praticiens constatent la rareté chez les enfants nourris au sein d'une mère qui a suffisamment de lait.

d - L'érythème fessier ou dermite d'irritation péri-anale, qui sont favorisés par l'alcalinité des selles des enfants nourris au lait artificiel et rares chez les nourrissons alimentés au lait de Femme, dont les selles sont acides.

e - Les diarrhées gastro-intestinales, parfois bénignes, mais pouvant présenter un caractère gravissime. Ces diarrhées sont beaucoup moins fréquentes chez les enfants alimentés naturellement.

f - Certaines maladies infectieuses des voies respiratoires, des méningites, et des septicémies sont, aux dires de ROBINSON (6),

SYDON et FAXEN (7) et WINBERG et WESSNER (8), plus fréquentes chez les bébés alimentés artificiellement.

A la suite de ces observations, certains biochimistes pensent, comme MONTREUIL (9), que le problème de la maternisation du lait n'est pas totalement résolu, et orientent leurs recherches vers la détermination du rôle biologique de certaines substances spécifiques du lait de Femme. Ce sont ces substances et particulièrement celles qui peuvent intervenir au niveau de l'intestin du nourrisson, qui ont retenu notre attention.

## II - LE LAIT ET LA DEFENSE LOCALE AU NIVEAU DE L'INTESTIN DU NOUR- RISSON.

Le problème du rôle du lait dans la défense du nourrisson contre les Entérobactériacées, a été soulevé depuis longtemps, car le nouveau-né ne possède, à la naissance, aucun anticorps contre ces germes.

De nombreux praticiens ont constaté que les diarrhées sont beaucoup moins fréquentes chez les enfants nourris au sein que chez ceux alimentés "artificiellement" (voir à ce sujet les articles de ALEXANDER -10-, ROSS et DAWES -11-, HINTON et Mac GREGOR -12-). TASSOVATZ et KOTSICH (13) et SVIRSKY-GROSS (14) croient également que le lait de Femme assure une meilleure protection du nourrisson, car ils ont pu soigner des infections épidémiques dues à E. coli, en alimentant leurs jeunes malades au lait de Femme alors que tout autre traitement avait échoué (+). Ce fait a été confirmé par FONTAINE (15) qui a guéri, par le même moyen, plusieurs bébés souffrant de graves diarrhées.

Les entérites étant provoquées généralement par des germes pathogènes, nous comparerons tout d'abord la flore intestinale des enfants nourris au sein ou au biberon. Les différences observées nous amèneront à poser le

---

(+) Ces auteurs redécouvraient ainsi une thérapeutique séculaire des pays du Proche-Orient.

problème de la flore bifide de l'intestin du nourrisson, puis à signaler les différents composés du lait qui peuvent protéger la muqueuse intestinale de l'action de certains germes pathogènes.

## A - LA FLORE INTESTINALE DES NOURRISSONS

### 1 - ETUDE DES SELLES

Le moyen le plus simple d'étudier la flore intestinale du nourrisson est d'identifier et de dénombrer les Bactéries présentes dans leurs selles. Plusieurs observations et notamment les travaux de BULLEN et WILLIS (16) ont mis en évidence les différences entre la flore intestinale des nourrissons alimentés au sein ou au biberon. Ces différences qui apparaissent dans la figure 3 (p. 13) tirée de leur article, se traduisent par une prédominance de Lactobacilles anaérobies Gram + chez les nourrissons alimentés au sein et de coliformes Gram -, comme E. coli, chez ceux nourris "artificiellement". En outre, ces mêmes auteurs ont mis parfois en évidence dans les selles d'enfants nourris au biberon des Clostridia, des Bactéroïdes, des Proteus et des Pseudomonas aeruginosa.

### 2 - LA FLORE BIFIDE

Les travaux de BULLEN et al. (17) et les études des selles et de la flore bactérienne des nourrissons faites notamment par TISSIER (18) et MORO (19), mettent en évidence la prépondérance des Lactobacillus bifidus chez les enfants nourris au sein.

Pour certains, la flore bifide n'est que le reflet d'un état satisfaisant du milieu intestinal car elle s'étend lorsque, comme nous le verrons dans la figure 4 (p. 16), les germes pathogènes disparaissent.

D'autres auteurs comme BULLEN et WILLIS (20) et ROSS et DAVES (21) pensent que ces bactéries jouent un rôle dans la protection de l'intestin ; en acidifiant le milieu par la fermentation du lactose en acides lactique et acétique, elles défavoriseraient la croissance des coliformes pathogènes.

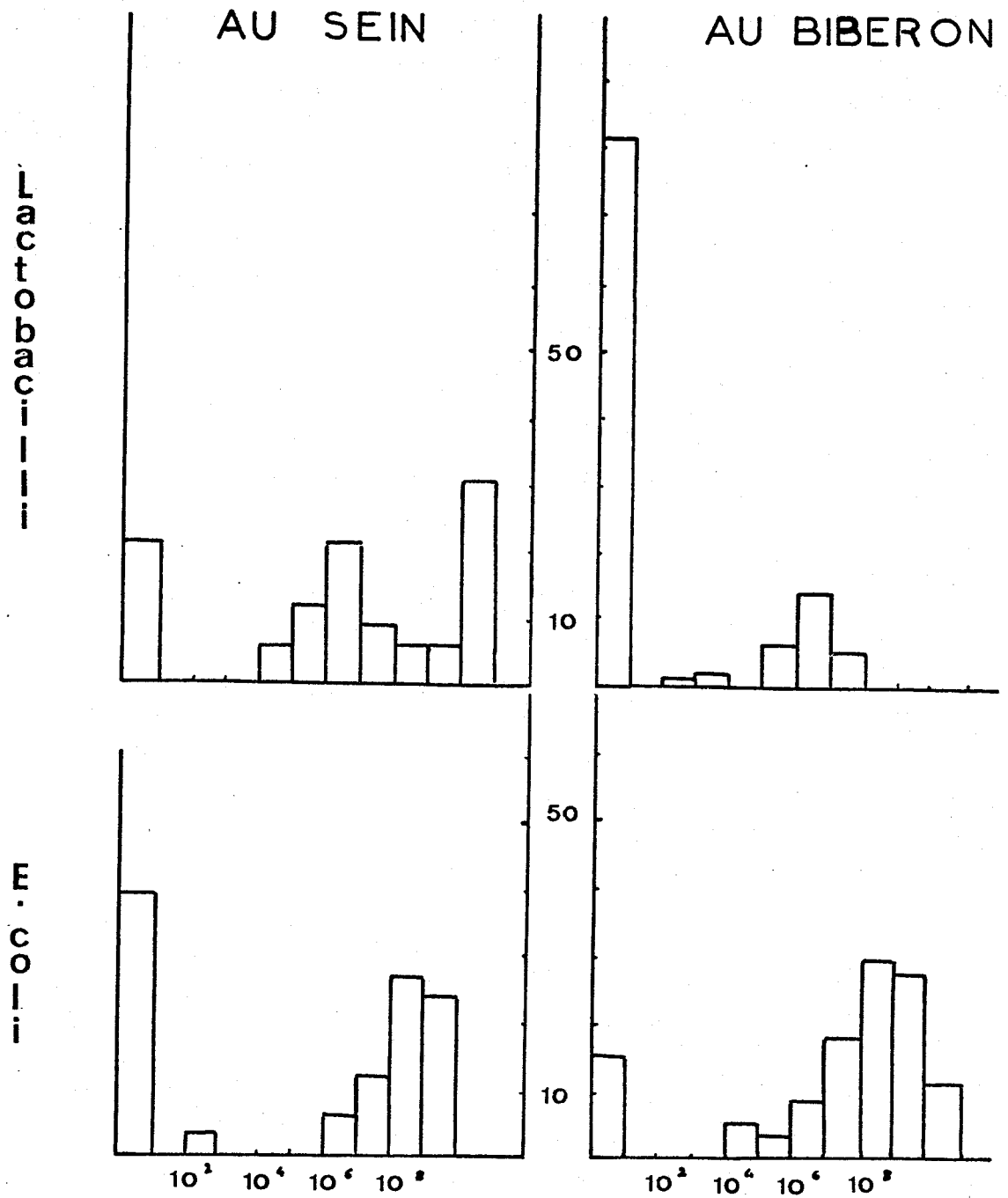


Fig. 3 :



Numération des Lactobacilles et de Bactéries coliformes Gram -

(E. coli) dans les selles d'enfants nourris au sein ou au biberon, d'après BULLEN et WILLIS (22).

(En ordonnée sont reportés les nombres d'échantillons de selles analysés, en abscisse, le nombre de Bactéries par gramme de selles).

Cette hypothèse semble être confirmée par les travaux de TASSOVATZ (23) et SCHNEEGANS et al. (24) qui ont soigné des gastro-entérites par implantation de bifidus chez les malades. Les facteurs du lait de Femme qui induisent la prolifération de cette flore bifide pourraient donc être, indirectement, bénéfiques pour le nourrisson.

### 3 - FACTEURS FAVORISANT L'IMPLANTATION DE LA FLORE BIFIDE.

Pour BULLEN et WILLIS (25) le lait de Femme devrait sa supériorité au fait qu'il est riche en lactose, mais plus pauvre en phosphates et protéines que le lait de Vache. Ces caractères pourraient expliquer que le pH dans le gros intestin des nourrissons alimentés au sein, soit assez bas, grâce à la fermentation du lactose et au faible pouvoir tampon du lait ingéré, pour que démarre la prolifération des Lactobacilles.

Certains travaux, plus précis, cités dans les revues générales de BELL CROMBIE et GRANT (26); de KUHN (27), de LEVESQUE (28) et de RAYNAUD (29) montrent qu'il existe, dans le lait de Femme, des substances favorisant la croissance des Lactobacillus bifidus.

Certains oligosaccharides azotés spécifiques du lait de Femme qui ont la particularité de posséder le motif structural de la N-acétyl-lactosamine favorisent la prolifération de L. bifidus var. Penn, mais ne présentent pas d'activité prolifératrice vis-à-vis des autres souches de Lactobacillus bifidus qu'on trouve habituellement dans l'intestin des nourrissons. Ces oligosaccharides qui possèdent donc une activité biologique dénommée LBF I (Lactobacillus Factor) ont été isolés et étudiés notamment par KUHN (30), GYORGY, KUHN, NORRIS, ROSE et ZILLIKEN (31) et TOMARELLI et al. (32). Selon O'BRIEN, GLICK et ZILLIKEN (33), ils apportent au L. bifidus var. Penn, la glucosamine qu'il ne peut synthétiser.

Les souches normales de type "TISSIER" ont besoin d'autres facteurs



pour se développer. HIRANO et al. ( 34) ont isolé du colostrum de Femme quatre fractions glycopeptidiques qui sont des facteurs de croissance de la souche TISSIER. Ces glycopeptides agissent probablement in vivo et expliqueraient la prolifération des L. bifidus dans l'intestin du nourrisson alimenté au sein. RAYNAUD ( 35) a également isolé, à partir d'hydrolysats protéiniques de la caséine de Vache, des peptides actifs sur la souche TISSIER qui sont appelés facteurs II (LBF II).

#### 4 - INVASION PAR DES GERMES PATHOGENES

La différence de comportement de jeunes animaux, alimentés au lait artificiel à base de lait de Vache ou tétant leur mère, à la suite d'ingestion d'une quantité donnée d'E. Coli a été bien mise en évidence par BULLEN ROGERS et LEIGH ( 36).

Ces auteurs ont observé que, parmi les Cochons d'Inde nourris "artificiellement", certains perdent du poids ou périssent en cours d'expérience. Des numérations de germes au niveau de leur petit et gros intestin ont permis de montrer que les Bactéries pathogènes ingérées s'y multiplient pendant quelque temps, ainsi que le montre la figure 4 (p. 16).

Tous les jeunes animaux nourris par leur mère ont, au contraire, bien supporté l'expérience, leur milieu intestinal n'est pratiquement pas colonisé par les germes pathogènes.

Il est difficile de savoir si les germes de type Lactobacillus bifidus interviennent alors directement en inhibant la prolifération des germes pathogènes ou s'ils sont simplement le reflet d'un état satisfaisant de l'intestin dû à l'action bactéricide ou bactériostatique de certains protéides lactés qui semblent agir, comme nous le verrons ci-dessous, dans la protection intestinale.

#### B - PROTEIDES QUI PROTEGENT L'INTESTIN DU NOURRISSON

Parmi les protéides du lait, Mac KENZIE ( 37) distingue la caséine et les substances du petit lait qui sont la  $\beta$  - lactoglobuline, l'  $\alpha$  - lactalbumine et les protéides mineurs qui n'existent qu'en faible quantité.

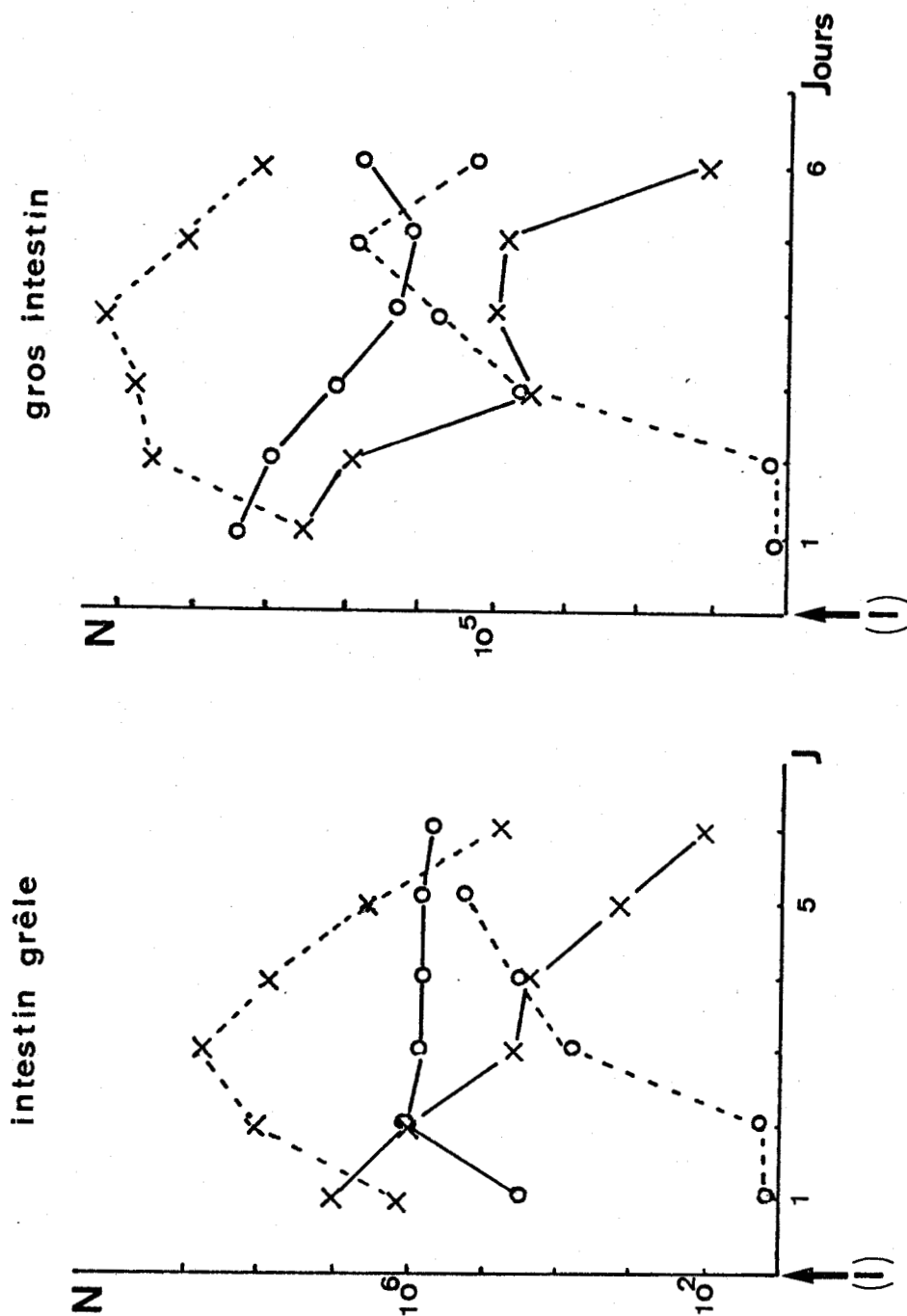


Figure 4 :

Numération journalière des Lactobacilles (o) et de E. Coli 0111 (x) dans le petit et le gros intestin de Cochons d'Inde, allaités par leur mère (—) ou artificiellement (----), après ingestion (I) d'environ 10<sup>6</sup> E. Coli à la naissance (d'après BULLEN et al. - 38 -).



Les recherches effectuées à propos de ces protéides mineurs dont certains possèdent une activité enzymatique, se sont rapidement développées ces dernières années et les résultats acquis ont été résumés par GROVES (39).

Certains de ces protéides semblent jouer un rôle dans l'intestin du nourrisson. Parmi eux, on trouve des composés qui inhibent le développement des Bactéries, et que REITER et ORAM (40) regroupent sous le nom de "lacténines" et d'autres substances dont l'action n'est pas encore bien connue bien qu'elles soient, in vivo, liées à une meilleure protection intestinale du nourrisson.

## 1 - LES INHIBITEURS TRYPSIQUES

### a - Caractères généraux

La présence d'inhibiteurs tryptiques dans les colostrums et laits de Femme et de Vache est connue depuis longtemps déjà et, dans les revues générales de DESNUELLE et al. (41) et de LASKOWSKI (42) les propriétés de ces substances sont analysées. L'inhibiteur tryptique isolé du lait de Femme donne, par des méthodes immunologiques, une réaction d'identité avec l' $\alpha$ 1-antitrypsine du sérum humain. Comme elle, c'est une glycoprotéine de constante de sédimentation 3,5 S, de masse moléculaire 45 000, dont le point iso-électrique est de 4,0.

CECHOBA et al. (43) ont séparé du colostrum de Vache trois inhibiteurs tryptiques. L'un d'eux, qui existe en plus grande quantité, a été isolé et étudié. C'est une protéine de MM 10 500, de pH i 4,2, dont la structure primaire présente plusieurs analogies avec l'inhibiteur tryptique du pancréas du Boeuf.

### b - Activité

L'activité des inhibiteurs présents dans les laits de Femme et de Vache peut être exprimée en pourcentage d'inactivation d'une quantité donnée de trypsine. Selon HEYNDRICKX (44), cette activité est identique dans le

lait de Femme et de Vache, elle serait maximale au troisième jour post-partum, lorsque 1 millilitre de lait inhibe 50 à 70  $\mu$ g de trypsine.

Le fait que HYANEK et al. (45) aient pu mettre en évidence ces inhibiteurs tryptiques dans les fèces de jeunes animaux qui têtent est très important. Il montre notamment que ces substances sont insensibles aux conditions (pH, enzymes protéolytiques) qu'ils rencontrent dans l'estomac des animaux allaités et qu'ils peuvent être actifs car ils restent intacts, au niveau de leur intestin. Ces inhibiteurs tryptiques pourraient donc protéger certains protéides de l'action des enzymes digestifs.

Ainsi, en inhibant l'hydrolyse tryptique de lacténines protidiques possédant une activité bactéricide ou bactériostatique, les inhibiteurs tryptiques peuvent jouer un rôle dans la protection intestinale du nourrisson.

## 2 - LE LYSOZYME

### a - Caractères généraux

Le lysozyme est une glycosidase qui est capable d'hydrolyser la muréine, principal élément pariétal des Bactéries, en coupant les liaisons glycosidiques de l'acide N-acétyl muramique. Il s'agit donc d'une N-acétyl muramidase. Cette protéine, isolée généralement du blanc d'oeuf, existe également dans les sécrétions lactées de nombreux Mammifères, et aussi dans d'autres liquides d'excrétion comme les larmes.

Dans le tableau II (p. 19) sont rassemblées les principales caractéristiques des lysozymes des laits de Femme et de Vache. Le lysozyme du lait de Femme, de constante de sédimentation 2,19 S, possède une activité enzymatique importante (3,5 fois celle du lysozyme isolé du blanc d'oeuf); son point isoélectrique est de 11 et son pH optimal d'action se situe à pH 6,35. Le lysozyme de Vache lui, a une constante de sédimentation de 2 S, un point isoélectrique de 9,5, un pH optimal d'action de 7,90, mais une activité dix fois moindre que celle du lysozyme du lait de Femme. Cette différence est accentuée par le fait que le taux de lysozyme dans le lait humain

TABLEAU II

Caractères généraux des lysozymes de lait de Femme et de Vache (d'après SHAHANI - 46 -).

	Lait de Femme	Lait de Vache
Taux (en mg/l)	300 (50 à 2 000)	0,1
Constante de sédimentation	2,19 S	2,00 S
pH:	11	9,5
pH optimal d'action	6,35	7,90
Activité	3,5 unités	0,35 unités



est environ 3 000 fois supérieur à celui du lait de Vache.

### b - Activité biologique

ROSENTHAL et LIEBERMAN (47) furent les premiers à soupçonner le rôle du lysozyme dans le développement de la flore intestinale du nourrisson. PRICKETT et al. (48) ont montré que le lysozyme du lait de Femme se retrouve dans les fécès des nourrissons alimentés au sein, mais que le lysozyme du lait de Vache n'existe pas dans les selles des enfants nourris avec ce lait.

VAKIL et al. (49) ont montré que, in vitro, plusieurs micro-organismes sont sensibles à l'activité des lysozymes du lait de Femme et de Vache.

PRICKETT et al. (50) ont remarqué chez 11 espèces de Mammifères que le rapport Bactéries Gram + / Bactéries Gram - dénombrées par coproculture, suit le pourcentage de lysozyme dans les selles des jeunes animaux qui têtent et dans le lait de leur mère. Ainsi, chez les nourrissons, les chiots et les châtons qui boivent du lait maternel riche en lysozyme, la flore fécale est elle, à prédominance Gram +.

HAENEL, GOLDBACH et GRUTTE (51) ont également remarqué l'influence de l'alimentation du nourrisson sur la teneur en lysozyme et en germes putréfiants présents dans ses selles.

Il semble donc que le lysozyme du lait humain puisse jouer directement un rôle dans la protection au niveau de l'intestin du nourrisson, en intervenant dans un système de régulation de l'équilibre entre les différentes espèces, pathogènes ou non, de Bactéries.

## 3 - LES GLOBULINES IMMUNES

### a - Caractères généraux

Les immunoglobulines du lait de Vache, qui sont essentiellement des Ig G, représentent 50 à 75 p. 100 du taux des globulines immunes du colostrum. Leurs caractéristiques sont rassemblées dans le tableau III (p. 22) ;

elles ont la même structure caractéristique (quatre chaînes, dont deux plus lourdes, réunies par des ponts disulfure) que les Ig G sériques, la même masse moléculaire de 160 000. Outre ces Ig G, MACH PAHUD et ISLIKER (52) ont caractérisé dans le colostrum de Vache, une Ig A de sécrétion.

Les globulines immunes du colostrum et du lait de Femme appartiennent surtout, ainsi que le soulignent MONTREUIL CHOSSON HAVEZ (53) et MURALT et al. (54), à la classe des Ig A. Dans le tableau III (p. 22) sont notées les principales caractéristiques de ces Ig A : leur constante de sédimentation (11 S) et leur masse moléculaire (385 000) permettent de les distinguer des Ig A sériques. Ces différences sont dues à la présence d'un fragment supplémentaire appelé pièce de sécrétion ou PS, qui est commun, ainsi que le soulignent BISERTE et al. (55) à toutes les Ig A isolées des liquides de sécrétion.

Ces Ig A de sécrétion représentent 90 p. 100 des immunoglobulines du lait de Femme avec un taux évalué par certains auteurs à plus de 30 mg/ml ; elles sont accompagnées d'Ig G et de quelques Ig M. Dans le colostrum de Femme, ROWE et FAHEY (56) et ISHIZAKA et al. (57) ont mis également en évidence des traces d'Ig D et d'Ig E.

#### b - Rôle biologique

Pendant longtemps le rôle biologique des immunoglobulines du lait n'a été étudié qu'en fonction de la place qu'elles représentaient dans l'immunité circulante acquise du nourrisson. Nous étudierons donc tout d'abord cet aspect de la question, puis nous aborderons un problème évoqué plus récemment : celui de la participation des immunoglobulines dans la protection de l'intestin.

#### α - Activité des anticorps

- L'activité des anticorps du lait de Vache est très importante pour le Veau, on peut même dire qu'elle est vitale. En effet, celui-ci ne possède

TABLEAU III

Caractères généraux des globulines immunes du lait de Femme et de Vache

	Lait de Femme	Lait de Vache
<u>Globulines immunes</u>		
Taux	35 (colostrum)	70 (colostrum)
(en g/l)		à 5 (20è jour)
<u>Ig G</u>		
Taux (en g/l)	0,36 (3è au 8è j)	
	à 0,09 (9è au 26è)	40 à 60 (colostrum)
Masse moléculaire		160 000
Constante de sédimentation		6,5 à 6,7 S
<u>Ig A</u>		
Taux (en g/l)	18 à 30 (colostrum)	Existe
	à 1 (4è j.)	dans le colostrum
Masse moléculaire	385 000	
Constante de sédimentation	11,4 S	10,8 S
<u>Ig M</u>		
Taux (en g/l)	1,6 (colostrum)	Traces
	à 0,1 (4è j.)	





à la naissance aucun anticorps sérique et c'est le lait maternel qui est pourvu des anticorps dirigés contre de nombreuses Bactéries ou virus auxquels il doit faire face pendant les premiers jours de la vie.

- Les immunoglobulines du colostrum et du lait de Femme sont également le support de diverses activités anticorps, ainsi que le soulignent les références regroupées par PAUPE et MEYER ( 58 ) et reproduites dans le tableau IV (p. 24) tiré du mémoire de CHERON ( 59 ) sur les immunoglobulines du lait. Les Ig A du lait humain sont notamment dirigés contre le virus poliomyélitique, les Streptocoques, les Pneumocoques et les germes pathogènes les plus importants pour les nouveaux-nés : les E. coli du groupe O

### β - Immunité circulante

Le phénomène d'immunisation passive par la mère chez le Mammifère nouveau-né est connu depuis longtemps et on sait maintenant qu'il diffère selon le type de placenta des différentes espèces.

- Chez le Veau, l'immunisation est réalisée par le colostrum de la mère car les Ig G du lait sont capables de franchir la barrière intestinale du nouveau-né. CHERON ( 60 ) présente dans son mémoire les différentes hypothèses d'absorption des globulines colostrales bovines sur lesquelles nous ne reviendrons pas.

- Chez l'Homme, le problème du passage des globulines immunes n'est pas encore tout à fait résolu. On sait que le nourrisson possède, à la naissance, des anticorps circulants d'origine maternelle, qui ont traversé la barrière placentaire durant la vie foetale. Les travaux de VAHLQUIST ( 61 ) ont permis de montrer que le nouveau-né n'est pas capable d'absorber des anticorps apportés par l'alimentation ; BLANC ( 62 ) impute ce fait à la nature de la muqueuse intestinale du nourrisson et non aux anticorps du lait

TABLEAU IV

Anticorps présents dans les colostrum et lait humain (d'après PAUPE et MEYER - 63-).

ANTICORPS	REFERENCES
: Antitoxine diphtérique	: LEMETAYER <u>et al.</u> (1950) ;
:	: LIEBLING et SCHMITZ (1943)
:	: VON GENDERSEN (1934) ; SUGG
:	: (1935) ; VIGNES <u>et al.</u> (1948) ;
:	: ARNON <u>et al.</u> (1959).
: Antitoxine tétanique	: DEBRE <u>et al.</u> (1930) ;
:	: LEMETAYER <u>et al.</u> (1950).
: Antistreptolysines	: MALMAS <u>et al.</u> (1951) ;
:	: NORDBRING (1957).
: Antistaphylolysines	: VIGNES <u>et al.</u> (1948) ; NORDBRING
:	: (1957) ; DOBIAS <u>et al.</u> (1957).
: Anticorps coquelucheux	: ADAMS <u>et al.</u> (1947).
: Anticorps typhiques O et H	: LECLAINDRE (1927) ; TIMMERMAN
:	: (1931) ; CASTAIGNE (1897) ;
:	: SCHUBERT et GRUNBERG (1949).
: Agglutinines dysentériques	: WONG et WONG (1930).
: Anticorps colibacillaires	: ABRAHAM (1929) ; TOOMEY (1934) ;
:	: SCHNEIDER et PAPP (1938) ;
:	: MALMAS <u>et al.</u> (1951) ; ARNON <u>et</u>
:	: <u>al.</u> (1959) ; HODES (1964) ;
:	: SUSSMAN (1961) ; ADINOLFI <u>et al.</u>
:	: (1966).
: Anticorps grippaux	: HUMMELER (1953).
: Anticorps poliomyélitiques	: SABIN (1950) ; PINTER (1953) ;
:	: GONZAGA <u>et al.</u> (1963) ; HODES <u>et</u>
:	: <u>al.</u> (1962) (1964) ; MICHAELS (1965)
: Anticorps antioxsakie B 5	: HODES (1964).
: Anticorps ourliens	: HUMMELER (1953).
: Anticorps vaccineux	: WEISS (1939).



humain, car ces Ig A se retrouvent dans le sang d'un veau alimenté au lait de Femme. Mais ces travaux sont remis en question depuis la mise en évidence de la structure particulière des anticorps humains. Certains auteurs, en effet, se demandent si la pièce de sécrétion ne pourrait pas permettre le passage des Ig A au travers de l'intestin du nourrisson. Cette hypothèse permet en effet d'expliquer les constatations de ROBINSON ( 64), SYDON et FAXEN (65), WINBERG et WESSNER ( 66) quant à la fréquence moins importante des infections des voies respiratoires, des méningites et des septicémies chez les bébés nourris au sein.

#### γ - Protection de l'intestin

Bien que le passage des Ig A du lait de Femme au travers de l'intestin du nourrisson soit douteux, ces immunoglobulines semblent jouer un rôle important dans la protection du nourrisson. Ce fait a été récemment souligné par de nombreux auteurs dont PAUPE et MEYER ( 67) qui estiment que seulement 0,3 p. 100 des anticorps peuvent être absorbés par le nourrisson. En effet, plusieurs constatations permettent de penser que les Ig A interviennent dans un système de défense local de l'intestin du nourrisson.

- Les Ig A de sécrétion sont, selon TOMASI BIENENSTOK ( 68) et HANSON et BRANDTZAEG ( 69), plus résistantes au changement de pH et aux enzymes protéolytiques que les Ig A sériques ou que les autres immunoglobulines. KENNY et al. (70), MICHAEL et al. (71) et GINDRAT et al. (72) ont d'ailleurs pu les mettre en évidence dans les selles de nourrisson.

- Les Ig A de sécrétion, selon TOURVILLE et TOMASI ( 73) sont les principales immunoglobulines de la majorité des sécrétions. TOMASI et al. ( 74) ont, de ce fait, émis l'hypothèse que ces immunoglobulines protégeaient les membranes muqueuses de l'agression bactérienne. Ce problème est évoqué dans la revue générale de HANSON et al. ( 75).

- L'observation de WARREN et al. ( 76 ) qui ont constaté que les enfants nourris au sein sont plus résistants à la vaccination orale anti-poliomyélitique montre que les anticorps anti-virus du lait humain agissent au niveau du tractus digestif.

- Le lien existant entre la santé et notamment l'immunité locale de l'intestin, et la présence d'anticorps intestinaux qui a été mise en évidence en 1938 par TORIKATAR et IMAIZUMA est actuellement à l'étude. HUET et al. ( 77 ), par exemple, soulignent le rôle des Ig A dans la protection de la muqueuse intestinale; selon eux une partie des diarrhées, chez l'adulte, est due à une atrophie des villosités provoquée par une diminution des Ig A. Récemment, CERF et al. ( 78 ) ont montré également la corrélation qui existe, chez 66 sujets, entre la quantité d'Ig A intestinale et l'indice microbien. CRABBE ( 79 ) a montré, qu'à la suite d'infections, la synthèse des Ig A par les plasmocytes de la sous-muqueuse de la paroi intestinale était augmentée. Le déficit en Ig A peut même entraîner, ainsi que l'ont constaté JOHNSON et al. ( 80 ), une malabsorption et une anémie ferriprive, consécutive à la dégradation des villosités de l'intestin.

- Enfin, MICHAEL et al. ( 81 ) ont trouvé une relation entre le taux d'anticorps et le nombre des Bactéries coliformes des selles de nourrissons ; les Ig A inhiberaient donc, in vivo, la croissance de ces bactéries pathogènes.

Ces diverses observations nous permettent de penser que les immunoglobulines apportées par le lait maternel, peuvent jouer un rôle dans la protection de la muqueuse intestinale du nouveau-né. Il faut cependant convenir que le rôle biologique de ces globulines immunes est encore mal connu, et qu'on attend toujours les expériences prouvant qu'elles participent bien à la défense locale de l'intestin. Ce type d'expérience permettrait de revaloriser l'allaitement naturel qui a régressé après la publication des travaux de VAHLQUIST ( 82 ) qui dénigrait l'importance des immunoglobulines maternelles.

#### 4 - LA LACTOTRANSFERRINE

##### a - Caractères généraux

Les principales caractéristiques des lactotransferrines du lait de Femme et de Vache qui ont fait l'objet d'un mémoire de SPIK (83) sont résumées dans le tableau V (p. 28). Les deux protéines diffèrent par leur masse moléculaire, leur point iso-électrique, leur pourcentage en oses. Le taux de fer qu'elles peuvent fixer à saturation est de 1,47 p. 1000 ce qui permet notamment à BLANC et ISLIKER (84), MASSON et HEREMANS (85) et SPIK (86) d'affirmer qu'une molécule fixe au plus deux atomes de fer sur ses sites spécifiques. Il est à noter que le lait de Femme contient environ 1,5 g de lactotransferrine par litre, alors que le lait de Vache n'en contient que 20 à 500 mg, mais que SCHUCHET - DERECHIN (87) a isolé de ce lait, un autre métallo-protéide semblable à la transferrine sérique qu'on ne trouve qu'à l'état de traces dans le lait humain.

##### b - Rôle biologique

Le rôle biologique de la lactotransferrine du lait est encore bien mal connu. Pendant longtemps on s'est contenté de dire que cette glycoprotéine capable de fixer le fer, devait être vraisemblablement une source de ce métal pour le tout jeune enfant. Dans un premier temps, nous envisagerons donc cette intervention de la lactotransferrine dans l'apport du fer au nourrisson, puis nous aborderons la question de l'activité intestinale de cette métalloprotéine, et particulièrement son rôle dans l'absorption du fer et dans la protection de la muqueuse.

##### α - Apport du fer au nourrisson

- BLANC et ISLIKER (88) ont émis, l'hypothèse que le fer sérique abandonné par la transferrine au niveau de la glande mammaire, se fixe sur la lactotransferrine néoformée. Pour BLANC (89), la lactotransferrine aurait un rôle primordial, car elle permettrait l'introduction directe du fer dans le lait et que "le taux en fer du lait maternel serait en relation directe

TABLEAU V

Caractéristiques principales des lactotransferrines.

	Lait de Femme	Lait de Vache
Taux (en g/l)	4,9 (colostrum) à 1,8 (à partir 10èj):	0,02 à 0,5
Masse moléculaire	77 000	80 000
Point iso-électrique	5,50	7,8 - 8,1
Pourcentage en oses neutres	3,1 à 4,1 p. 100	4,6 à 5,6 p. 100
Nombre d'atomes de fer fixés	2	2



avec le taux de lactotransferrine synthétisée".

- MASSON ( 90) met en doute l'intervention directe de la lactotransferrine dans l'apport du fer par la sécrétion mammaire. Son argument principal est qu'il n'existe aucune relation entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine dans les laits de différents Mammifères. MASSON n'écarte pas cependant totalement la lactotransferrine car, selon lui, elle pourrait agir de la façon suivante : le fer de cette glycoprotéine pourrait être capté par les cellules épithéliales de la glande mammaire au repos, et être stocké dans des granules lipidiques. C'est l'élimination de ces granules dans les canaux galactophores en période de lactation qui serait à l'origine de la plupart du fer véhiculé par le lait.

Ainsi, il n'est pas encore prouvé que la lactotransferrine favorise, de façon importante, l'apport du fer au nourrisson. Cette hypothèse permet cependant d'expliquer facilement, par les différences de taux de lactotransferrine dans les deux laits, les considérations de BLANC ( 91 ) et de divers praticiens qui ont remarqué que l'anémie par ferriprivation est plus marquée chez les nourrissons alimentés au lait de Vache que chez ceux qui sont allaités par leur mère. Une différence d'absorption du fer au niveau de l'intestin, qui est évoquée ci-dessous, pourrait également fournir une explication à cette observation.

### $\beta$ - Absorption intestinale du fer

L'absorption intestinale du fer traitée dans le mémoire de SPIK ( 92) n'a pas encore été l'objet d'expériences convaincantes, et l'intervention de la lactotransferrine dans ce mécanisme n'a été étudiée que chez un animal d'expérience, le Cochon d'Inde, par DE LAEY et al. (93). L'hypothèse la plus plausible concernant l'absorption du fer chez l'adulte a été émise par HELBOCK et SALTMAN ( 94). Selon eux, le fer dans le tractus digestif est sous forme d'ions ferriques chélatés. Ces chélates qui sont, suivant les au-

teurs, des polyols, des glucides, des protides (dont la lactotransferrine) ou des citrates, assurent un transport rapide et intense du fer dans la cellule intestinale. DE LAEY, MASSON et HEREMANS ( 95) ont montré récemment par des expériences effectuées in vivo, chez le Rat et le Cochon d'Inde, que la lactotransferrine exogène diminuait ce transport et inhibait donc l'accumulation de fer au niveau de la paroi intestinale. La lactotransferrine endogène endo-cellulaire du tractus digestif, aurait le même effet car son inactivation par l'action, sur la muqueuse duodénale, d'anticorps anti-lactotransferrine provoque une augmentation de l'incorporation de fer dans les cellules intestinales. Une fois dans la cellule intestinale, les chélates ferriques, dans le schéma de HELBOCK et SALTMAN ( 96) reproduit p. 31 (figure 5), sont pris en charge par "des chélateurs endogènes" du cytoplasme puis par des constituants de la partie séreuse de l'intestin, qui, associés à l'A. T. P. , permettent le passage des chélates dans le courant sanguin.

#### γ - Protection de la muqueuse intestinale

La synthèse de protéines semblables à la lactotransferrine n'est pas seulement localisée au niveau de la glande mammaire. Cette protéine a été mise en évidence non seulement dans le lait, mais aussi dans la salive, les sécrétions bronchiques, dans les tissus de l'estomac et du colon, et dans le tractus génital. Cette large répartition soulignée par MASSON et al. ( 97) suggère que la lactotransferrine puisse jouer, tout comme les IgA de sécrétion qui l'accompagnent souvent, un rôle dans la défense contre l'infection des surfaces épithéliales.

Cette hypothèse semble se confirmer car on a pu démontrer que la lactotransferrine possédait in vitro, une activité bactériostatique. Ce sont ces expériences, ainsi que les travaux de BULLEN et al. , qui sont les seuls à avoir expérimenté in vivo sur le rôle de la lactotransferrine, que nous allons envisager.



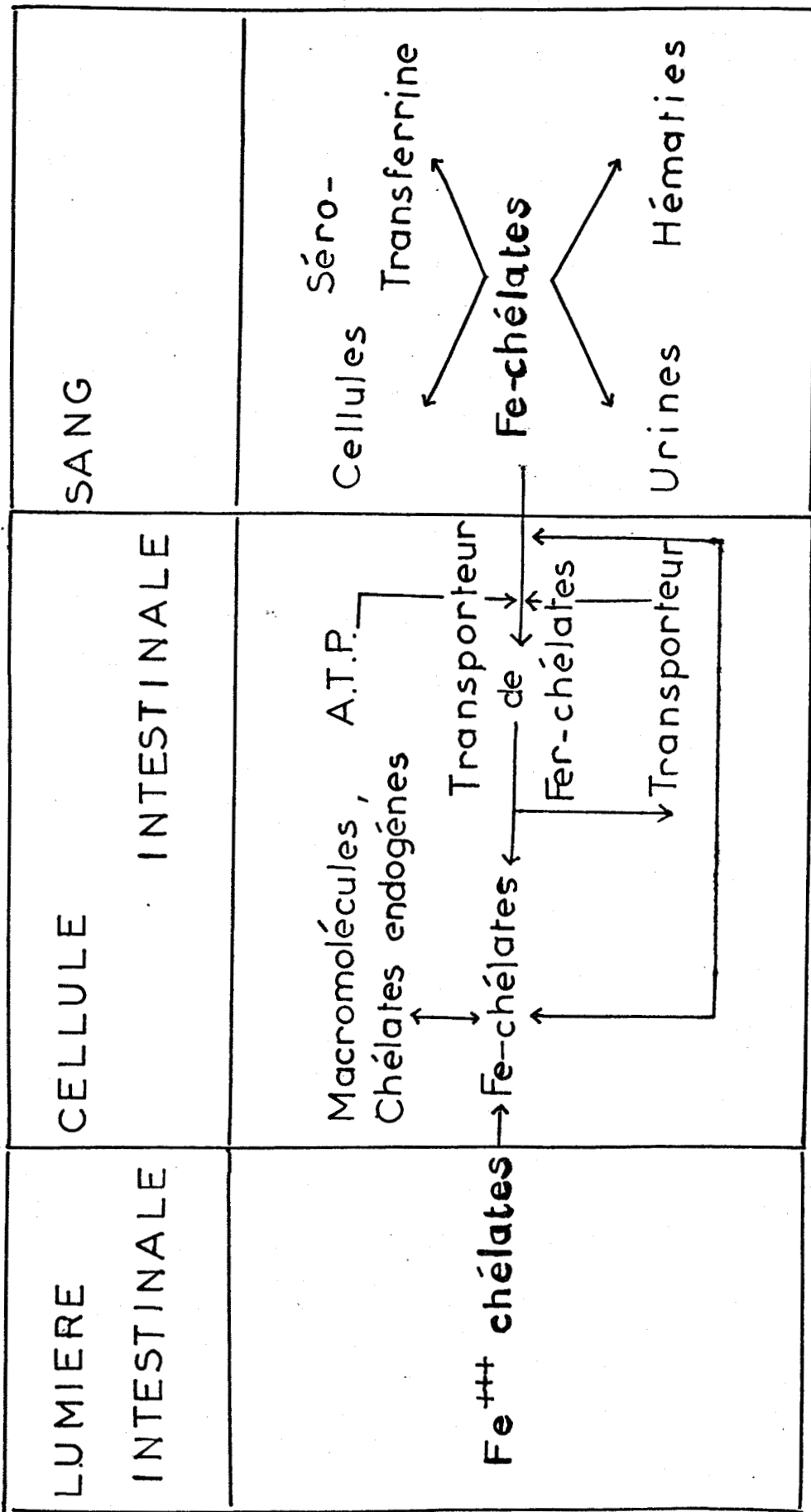


figure n° 5

Mécanisme de transport du fer à travers l'intestin (selon HELBOCK et SALTMAN - 98 -).



### Expérimentation in vitro

- L'activité antibactérienne de la lactotransferrine, posée d'abord en hypothèse par MONTREUIL (99), a été établie indépendamment, mais la même année par MASSON et al. (100), ORAM et REITER (101) et BLANC (102). Elle se manifeste à l'égard de diverses Bactéries : Staphylococcus albus, S. aureus, Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS -103-), Bacillus subtilis et B. stearothermophilus (ORAM et REITER -104-), de E. Coli (BULLEN, ROGERS et LIEGH - 105 -) et de champignons comme Candida albicans (KIRKPATRICK et al. - 106 -).

Deux constatations ont permis de montrer que cette activité antibactérienne était en relation avec la capacité de fixer le fer de la lactotransferrine :

- la lactotransferrine, une fois saturée en fer, perd ses propriétés bactériostatiques ;

- la lactotransferrine, plus avide de fer que la transferrine sérique, est capable d'inhiber la croissance de B. stearothermophilus résistant à la transferrine.

### Mode d'action :

On pense que la lactotransferrine agirait en captant le fer du milieu indispensable aux micro-organismes. Cet élément semble en effet, jouer un rôle dans le métabolisme des Bactéries. Il interviendrait, selon BULLEN, ROGERS et LEWIN (107) et MELCHING et WAS (108), dans l'accumulation du RNA, et pourrait, comme l'ont démontré ROBBINS et PEDERSON, chez les animaux supérieurs, être en relation avec la division cellulaire.

### Expérience in vivo :

L'expérience que BULLEN, ROGERS et LEIGH (109) ont effectuée chez le Cochon d'Inde dont le lait est riche en lactotransferrine, montre

l'importance du rôle joué in vivo par la lactotransferrine. En effet, une surcharge en fer due à l'ingestion d'hématine par le jeune animal est suivie d'une augmentation du nombre des E. coli au niveau de son intestin.

Ces diverses expériences nous amènent à penser que la lactotransferrine du lait, qui n'est que partiellement saturée, perd son fer au niveau de l'estomac du nourrisson, puis intervient dans l'intestin, sous sa forme apo, en captant le fer indispensable à la croissance de nombreux germes pathogènes. Par la suite, chez l'adulte, la lactotransferrine endogène secrétée par les cellules du tractus gastro-intestinal pourrait intervenir, de la même façon, dans la protection de l'intestin.

### III - CONCLUSION

Les connaissances acquises sur le mécanisme de la protection intestinale du nourrisson sont encore très fragmentaires. Certaines expériences que nous avons reportées permettent néanmoins de préciser que des protéides comme les inhibiteurs trypsiques, le lysozyme, les immunoglobulines de type Ig A et la lactotransferrine peuvent intervenir dans la défense du nourrisson contre les Bactéries intestinales pathogènes.

Comme le lysozyme et les Ig A ont été retrouvés dans les selles des nourrissons, on peut dire qu'ils sont, du moins en partie, intacts dans leur intestin et de ce fait, capables de jouer le rôle bactériostatique qu'ils manifestent in vitro.

La même démonstration n'a pas encore été faite pour la lactotransferrine qui se retrouve, comme les Ig A de sécrétion, dans le colostrum, le lait, la salive, les larmes et les sécrétions nasales. Nous avons donc dans un premier temps, recherché ce constituant dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme, afin de vérifier si il peut résister aux enzymes

digestifs du nouveau-né et agir in vivo, au niveau de l'intestin. Puis, nous avons essayé d'isoler la lactotransferrine retrouvée dans les selles afin de déterminer principalement si elle conserve encore la capacité de fixer le fer dont dépendent son activité bactéricide et son rôle dans l'apport du fer au nourrisson.

Ière PARTIE

---

MISE EN EVIDENCE DE COMPOSANTS LACTES DANS  
LES SELLES DE NOURRISSONS  
CARACTERISATION ET DOSAGE DE LA  
LACTOTRANSFERRINE

### TRAVAUX PERSONNELS

---

- 1° - Mise en évidence de composants lactés dans les selles de nourrissons -  
Caractérisation et dosage de la lactotransferrine.
  
- 2° - Isolement de la "coprolactotransferrine" par chromatographie d'affi-  
nité.
  
- 3° - Etude de la "coprolactotransferrine".

MISE EN EVIDENCE DE COMPOSANTS LACTES  
DANS LES SELLES DE NOURRISSONS -  
CARACTERISATION ET DOSAGE DE LA LACTO-  
TRANSFERRINE.

Les travaux exposés dans ce chapitre ont été effectués, non pas dans le cadre d'une étude systématique des composants des selles, mais pour tenter de mieux connaître les constituants du lait susceptibles de jouer un rôle dans la protection intestinale du nourrisson et d'expliquer les bienfaits de l'alimentation maternelle. Nous nous sommes limitée :

1 - A la caractérisation d'oligosaccharides spécifiques du lait de Femme dans les selles d'enfants allaités par leur mère.

2 - A la recherche, dans les selles de nourrissons alimentés naturellement ou artificiellement, de certaines protéines auxquelles nous avons fait allusion dans les généralités : l' $\alpha$  1-antitrypsine (p. 17 ), les Ig A (p. 20 ) et surtout la lactotransferrine (p. 27 ).

MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION DES ECHANTILLONS

A - COLLECTE DES SELLES

La plupart des selles que nous avons étudiées ou fractionnées ont été recueillies dans le Service du Professeur DELECOURT de la Maternité Salengro de Lille. Elles proviennent de nourrissons âgés de 3 à 8 jours, et alimentés soit au sein, soit au lait artificiel "Galliazyme".

Nous avons également bénéficié du précieux concours du Professeur FONTAINE du Centre Hospitalier Régional de Lille. Dans son Service de Pédiatrie ont été recueillies notamment, des selles d'un enfant de 6 semaines, qui avait reçu un supplément de lactotransferrine humaine dans ses biberons de lait artificiel.

B - TRAITEMENT

Afin de minimiser les risques de dégradation, nous nous sommes efforcée de traiter, en chambre froide, et dans les plus brefs délais, les différents échantillons recueillis journallement.

Les selles sont mélangées, à + 4° C, avec au moins 20 fois leur poids d'eau additionnée de toluène. Lorsque le mélange est bien homogène, il est filtré sur papier Whatman n° 3. Le filtrat lyophilisé est appelé Fraction S (Selles filtrées). Nous appellerons SF les fractions de selles de nourrissons alimentés au lait de Femme et SV les fractions obtenues à partir de féces de nourrissons alimentés au biberon.



Certains filtrats de selles ont été dialysés, 3 jours à + 4°C, dans des boudins Nojax 18 contre de l'eau permutée. Lyophilisés, ils constituent les fractions SD (Selles filtrées et dialysées).

### C - TAMISAGE MOLECULAIRE

Le fractionnement des extraits des selles filtrées et lyophilisées (Fraction SF) est réalisé par gel filtration sur colonne de Sephadex de type SG 75, SG100 et SG150.

100 g de poudre de Sephadex sont mis à gonfler dans l'eau pendant 24 heures, puis introduits dans une colonne de verre de 6 x 150 cm. La colonne est prête à l'emploi après passage d'une dizaine de litres d'eau dégazée (débit 60 ml/h).

1,5 à 2 g de fraction SF sont dissous dans 40 ml d'eau et centrifugés 15 mn à 4000 t/mn avant d'être déposés au sommet de la colonne. L'éluion est réalisée par de l'eau dégazée contenant 0,8 mg d'azide de sodium par litre. Le débit est réglé à 50 ml/h, des fractions de 15 ml sont recueillies au collecteur de fractions. L'enregistrement à 253 mn permet de repérer le passage des substances de nature protidique.

## II - MISE EN EVIDENCE D'OLIGOSACCHARIDES

Pour mettre en évidence les oligosaccharides présents dans le lait de Femme, nous avons utilisé les deux méthodes suivantes :

A - Chromatographie sur papier.

B - Electrophorèse sur papier.

### A - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier Whatman n° 3 M. M. est réalisée dans le solvant de JERMYN et ISHERWOOD (110) ; la migration dure 40 heures. Le témoin utilisé est le mélange d'oligosaccharides neutres présents

dans la fraction dialysable du lait de Femme.

### B - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

L'électrophorèse en cuve ou toit est effectuée avec le tampon de MICHL (111) modifié par GRIMMONPREZ (112). Les dépôts sont réalisés à 10 cm du bord anodique d'une feuille de papier Whatman n° 3, la tension appliquée est de 7 V/cm et la durée de la migration est de 15 heures. Le témoin utilisé est un mélange d'oligosaccharides présents dans la fraction adialysable du surnageant S<sub>9</sub> du lait de Femme.

## III - MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES

### A - METHODE ELECTROPHORETIQUE

Nous avons effectué des électrophorèses sur bande d'acétate de cellulose dans le tampon de LAURELL (113) de pH 8,6. La migration est poursuivie pendant 1 h 30, sous une tension de 110 V. La coloration des protéines est réalisée avec le réactif à l'Amidoschwarz.

### B - METHODES IMMUNOLOGIQUES

Après avoir mentionné la nature des antisérums utilisés, nous décrirons brièvement les deux méthodes immunologiques que nous avons appliquées (immunodiffusion double et immunoelectrophorèse).

#### 1 - LES ANTISERUMS

Les antisérums que nous avons utilisés sont les suivants :

a - ASH : Sérum équin anti-protéines sériques humaines, provenant de l'Institut Pasteur.

b - AS α 1 : Sérum de lapin de chez BEHRINGWERKE, spé-

cifique de l'  $\alpha$  1 antitrypsine.

c - AS-LV : Sérum préparé au laboratoire, en injectant à un lapin, quatre fois, à une semaine d'intervalle, 15 mg de lactosérum de Vache additionnés d'adjuvant de Freund.

d - AS-LF : Sérum anti-lait de Femme préparé de la même manière que le sérum anti-lait de Vache.

e - AS-LTF : Sérum de lapin anti-lactotransferrine humaine (LTF).

f - AS-IgA : Sérum de lapin anti-Ig A de sécrétion humaine.

Ces deux derniers antisérums sont préparés, au Laboratoire, en injectant 7 mg de lactotransferrine ou d'Ig A du colostrum humain. Leur monosp cificit  est contrôlée par immunoélectrophorèse ; ils ne doivent révéler que l'arc de la protéine qu'on a injecté aux lapins lorsqu'on les met en présence d'une solution de lactosérum à 5 ou 10 p. 100.

## 2 - IMMUNODIFFUSION DOUBLE

Nous avons utilisé la technique d'immunodiffusion radiale double d'OUCHTERLONY (114) en utilisant le dispositif en rosette, soit sur un support gélifié, soit sur cellogel.

### a - Sur support de gélose

Des dépôts de 2  $\mu$ l d'antigène (  1 p. 100 s'il s'agit d'une solution de protéine pure -LTF ou IgA-, à 10 p. 100 s'il s'agit de lactosérum ou de fractions SG 1 des selles, à 40 p. 100 si on veut analyser des fractions S de selles brutes) sont effectués à 8 mm d'une cuvette centrale contenant 5  $\mu$ l d'antisérum. Une diffusion de 5 heures est généralement suffisante pour as-

surer la formation des arcs. Les plaques de gélose doivent être ensuite lavées pendant 2 jours dans de l'eau physiologique, puis dans de l'eau permu-  
tée ; après séchage sous papier Whatman n° 3, elles peuvent être colorées  
par le réactif à l'Amidoschwartz.

#### b - Sur support de cellogel

Sur support de cellogel les dépôts sont de 1  $\mu$ l d'antigène et de 2  $\mu$ l  
d'antisérum. La diffusion est poursuivie pendant 18 heures. Les bandes de  
cellogel sont ensuite lavées, sous agitation magnétique pendant 2 heures  
dans du sérum physiologique, puis elles sont colorées par une solution d'  
Amidoschwartz.

### 3 - IMMUNOELECTROPHORESES

#### a - Immunoélectrophorèse classique

Nous avons utilisé la méthode d'immunoélectrophorèse de GRABAR  
et WILLIAMS (115).

- sur gélose en suivant la technique de SCHEIDEGGER (116)
- et sur cellogel en procédant de la façon suivante :

Deux dépôts ponctuels de 2  $\mu$ l d'antigène sont effectués à 4,5 cm du  
bord cathodique d'une bande de cellogel, on les soumet aux conditions d'élec-  
trophorèse classiques. Ensuite, on dépose entre les deux lignes de migra-  
tion une bande étroite de papier Whatman n° 3 (5 x 0,2 cm) imbibée d'anti-  
sérum. La bande de cellogel est laissée dans la cuve d'électrophorèse pen-  
dant 18 h, temps nécessaire à la diffusion. Les arcs de précipitation sont  
révélés au réactif à l'Amidoschwartz après lavage du support.

#### b - Technique de fente courte

Nous avons utilisé la technique de fente courte pour vérifier l'identi-  
té entre deux antigènes déposés de part et d'autre du support de gélose.  
Pour ce faire, la fente d'antisérum est raccourcie afin qu'une des extrêmi-  
tés d'un arc formé puisse se raccorder avec l'arc correspondant de l'autre

dépôt.

#### IV - DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE PROTEINES

Deux types de dosage immunologique, en milieu gélifié, ont été mis au point sur la lactotransferrine : l'immunodiffusion radiale simple selon MANCINI (117) et l'électroimmunodiffusion d'après la méthode de LAURELL (118). Nous décrivons en détail la première technique qui a été appliquée au dosage de la "coprolactotransferrine".

##### A - PRINCIPE

###### 1 - IMMUNODIFFUSION SIMPLE

L'immunodiffusion simple s'effectue dans un milieu gélifié contenant l'un des réactants du système antigène-anticorps, le plus souvent, l'anticorps. Il se forme autour des puits qu'on remplit avec des solutions d'antigène, un complexe antigène-anticorps. Au point d'équivalence, tous les antigènes sont liés aux anticorps, un précipité insoluble se forme et s'immobilise dans l'agar sous forme d'un anneau blanchâtre.

D'après FAHEY (119), à un temps donné, une forme de représentation graphique permettant le dosage de l'antigène, consiste à reporter le diamètre du cercle de précipitation ( $n$ ) en fonction du logarithme de la concentration en antigène ( $Ag$ ) car

$$n = K_1 \log_e (Ag) + K_2$$

Dans la méthode de calcul adoptée par MANCINI (120) on exprime la surface délimitée par l'anneau de précipitation proportionnellement à la concentration en antigène :

$$S = S_0 + K_3 (Ag)$$

où  $S_0$  est la surface du puits.

## 2 - ELECTROIMMUNODIFFUSION

Le principe de cette méthode énoncé en 1960 par RESSLER a été appliqué par LAURELL (121) au dosage des protéines plasmatiques. Cette méthode est fondée sur la migration électrophorétique et la précipitation spécifique d'un antigène, à sa zone d'équivalence, dans un gel contenant les anticorps correspondants. L'aspect des lignes de précipitations obtenues est celui de pics dont la surface est proportionnelle à la quantité d'antigène. Lorsque les pics sont des triangles isocèles de base égale au diamètre du puits où sont introduits les antigènes, la mesure de la hauteur des pics, plus simple à effectuer, peut suffire pour tracer la courbe. En portant en ordonnée ces mesures et, en abscisse, le logarithme de la quantité d'antigène, on obtient une droite ou une courbe faiblement incurvée.

### B - MODE OPERATOIRE

#### 1 - MATERIEL

- Antisérum A-LTF
- Gamme étalon de concentration croissante en lactotransferrine (0,25 à 2 p. 1000)
- Gélose ordinaire
- Agarose A 37<sup>(x)</sup> à 1 p. 100 dans le tampon véronal de  $\mu$  0,1.
- Tampon véronal pH 8,6

. solution mère :

Véronal sodé	26,76 g
Acétate de Na, 3 H <sub>2</sub> O	17,66 g
Eau	qsp 2 l.

(ajuster au pH avec HCl 1 N)

. tampon  $\mu$  0,1 :

Solution mère	2 volumes
Eau distillée	1 volume.

---

(x) Agarose A 37 : l'Industrie Biologique Française.

## 2 - TECHNIQUE

Les différentes étapes des techniques employées sont schématisées figure 6 (p. 45).

### a - Préparation du support gélifié

Au centre d'une plaque de 7,5 x 10 cm recouverte de 13,5 ml de gélose ordinaire, on découpe une fenêtre de 7,5 x 2,5 cm. Dans cette fenêtre on coule 3 ml d'une gélose spéciale obtenue en ajoutant 100  $\mu$ l de sérum anti-lactotransferrine humaine à 2,9 ml de gélose A 37 maintenue à 37° C.

### b - Dépôt de l'antigène

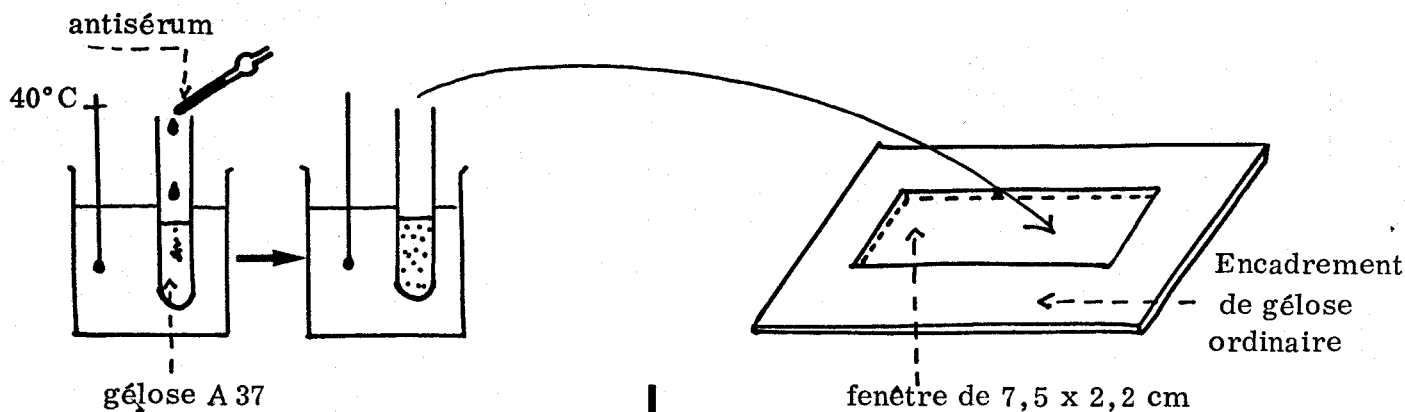
Dix trous de 1,5 mm de diamètre distancés de 7 mm et alignés au centre de la plaque sont effectués à l'emporte-pièce ; on y introduit, à l'aide d'une seringue précise, 2  $\mu$ l de chaque solution d'une gamme étalon de lactotransferrine aux concentrations variant de 0,25 à 2 p. 1000.

### c - Mesures

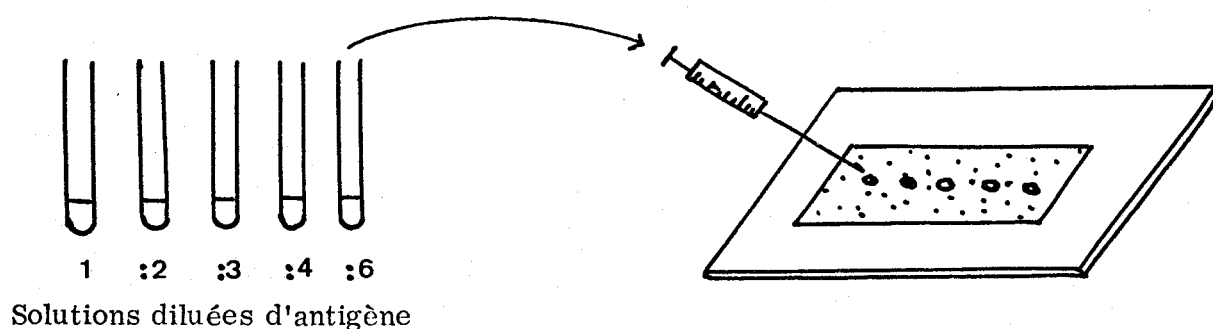
Les mesures des diamètres des anneaux de précipitation sont effectuées précisément au lecteur de profil Nikon après 24 heures, 48 heures et 72 heures.

### d - Electro-immunodiffusion

La diffusion peut être remplacée par une électrophorèse sous 25 V pendant 2 heures à + 4° C ; en tampon véronal de pH 8,6 la lactotransferrine étant chargée négativement la migration se fait de la cathode à l'anode. Les lignes de précipitation sont visibles, on peut donc faire immédiatement les mesures de hauteur des pics pour tracer la courbe.

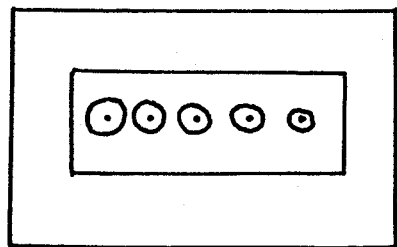


2 - Addition des solutions d'antigène



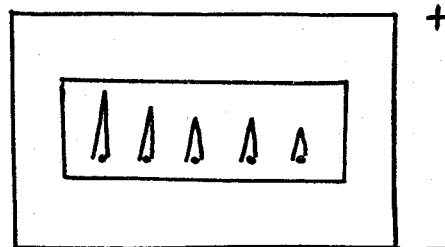
3 - Diffusion

48 h, 20°C



3' - Electrophorèse

2 h, 25 V, pH 8,6



4 - Mesures

Figure 6 :

Schéma des différentes étapes du dosage des protéines par immunodiffusion radiale et électro-immunodiffusion.





## RESULTATS

### I - TRAITEMENTS DES SELLES

Nous ne donnerons dans ce paragraphe, que les valeurs pondérales obtenues par traitement ou par tamisage moléculaire des selles ; l'analyse qualitative et quantitative des fractions SF et SG obtenues sera abordée dans les paragraphes suivants.

#### A - TRAITEMENT

Nous avons, à partir d'un poids donné de selles brutes, obtenu des rendements variables en fractions S . Le pourcentage d'eau dans les selles n'est pas constant. Nous pouvons dire néanmoins, que les fractions S (selles traitées) représentent 3,5 à 8 p. 100 du poids brut des selles.

Lorsque le traitement des selles est complété par une dialyse, nous obtenons des fractions SD qui représentent environ 1 à 2,5 p. 100 du poids des selles brutes. Environ 60 à 75 p. 100 des fractions S sont dialysables.

#### B - TAMISAGE MOLECULAIRE

Par tamisage moléculaire sur divers types de Séphadex, nous avons séparé deux fractions absorbant à 253 mn : SG 1 et SG 2.

La fig. 7 (p. 47) représente le diagramme obtenu sur Séphadex G 150.

Pour 1 g de fraction SF injectée, on obtient en moyenne sur Sépha-

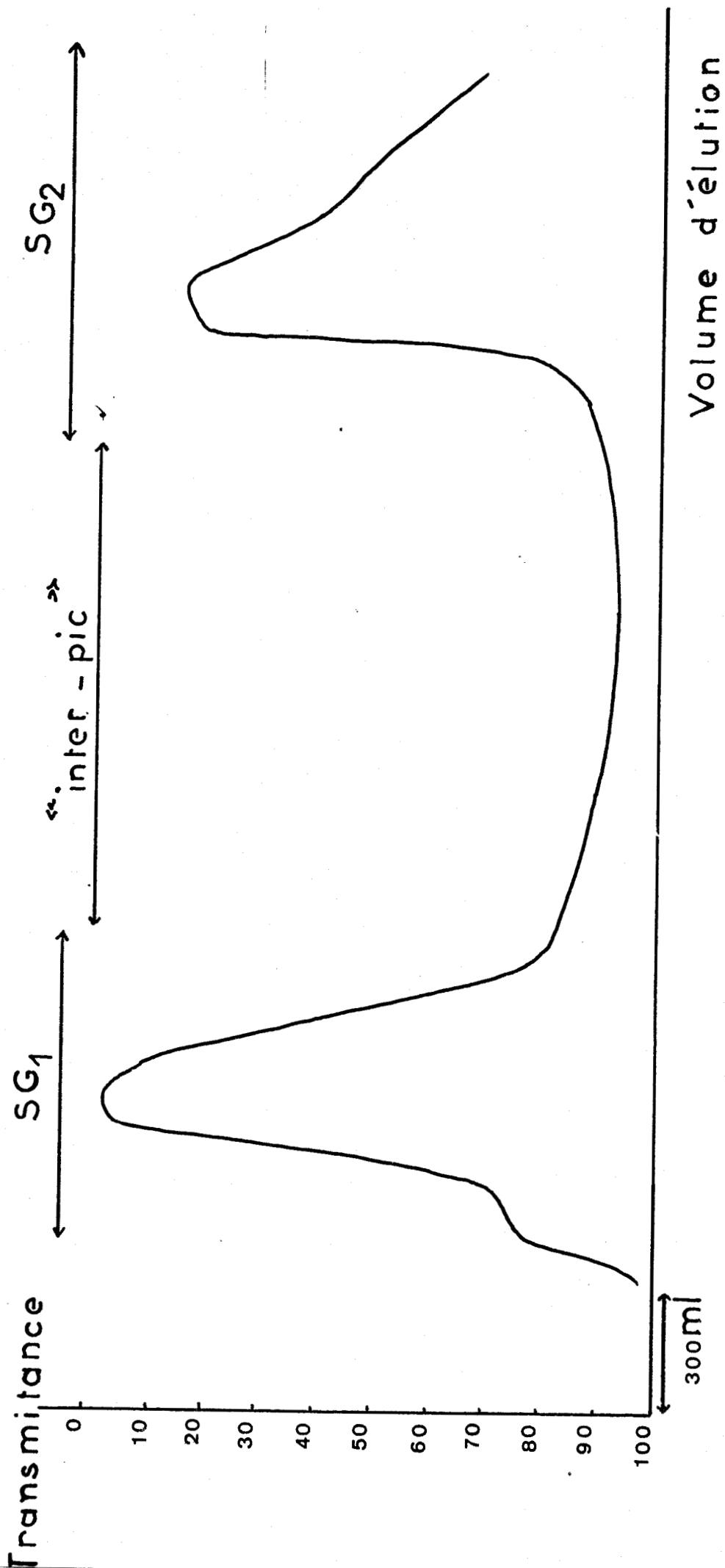


Figure 7 :

Fractionnement des selles de nourrissons alimentés au lait de Femme (SF), sur Séphadex SG 150.



dex SG 150, 240 mg de fraction SG 1, 130 mg de fraction appelée "interpic" car elle correspond aux éluats compris entre les fractions SG 1 et SG 2, et environ 450 mg de fraction SG 2. Le poids de SG 2 est approximatif car cette fraction se lyophilise mal, elle donne un matériel très coloré en brun verdâtre. Les fractions SG 1 et "inter pic", elles, donnent une poudre presque blanche.

## II - MISE EN EVIDENCE D'OLIGOSACCHARIDES

Nous avons recherché des oligosaccharides spécifiques du lait de Femme dans les selles de nourrissons allaités par leur mère (SF).

### A - CHROMATOGRAPHIE

Le chromatogramme I de la fig. 8 (p. 49) montre que, parmi tous les oligosaccharides neutres dialysables du lait de Femme, certains sont absorbés par le nourrisson alors que d'autres sont rejetés, tout au moins en partie, dans les selles. En particulier, les constituants de masse moléculaire élevée tels les lacto-N-difucohexaoses (LNDH), les lacto-N-fucopentaoses (LNP) et le lacto-N-tétraose et/ou lacto-N-néotétraose (LNT) sont rejetés. Les osides de masse moléculaire faible comme les fucosido-lactoses (FL) et le lactose (Lac) sont, par contre, absorbés par le nourrisson.

### B - ELECTROPHORESE

L'électrophoregramme II de la fig. 8 (p. 49) permet de repérer, dans les fractions SF, certains oligosaccharides du lait. On peut noter l'absence de lactaminyl-lactose et de pentasaccharides a - b et c qui sont présents dans l'adialysat de la fraction S<sub>9</sub> du lait de Femme ; ils sont donc absorbés par les nourrissons. On retrouve essentiellement dans la fraction adialysable des selles, des oligosaccharides neutres (I) et, dans la fraction dialysable du neuraminyl-lactose (NL) qui donne une tache rose

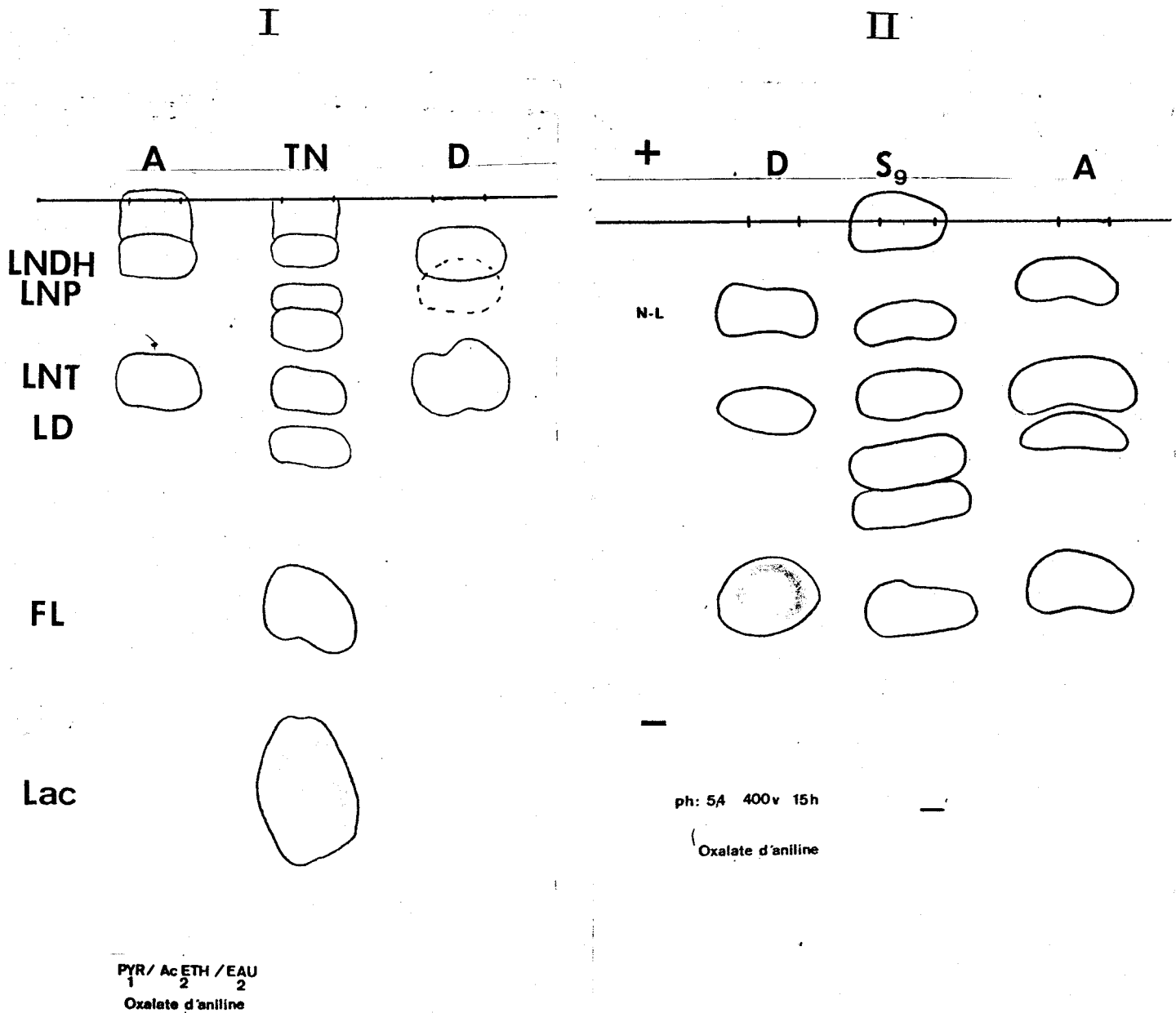


Figure 8 :

Chromatographie (I) et électrophorèse (II) sur papier des oligosaccharides libres, dialysables (D) et adialysables (A), des selles de nourrissons alimentés du lait de Femme.

TN = mélange des oligosaccharides, neutres et dialysables, au lait de Femme.

LNDH = lacto-N-difucohexaose ; LNP = lacto-N-pentaoses ; LNT = lacto-N-tétraose et/ou lacto-N-nététraose ; LD = lacto-difucotétraose ; FL = fucosido-lactoses ; Lac = lactose ;

S<sub>9</sub> = adialysat de la fraction S<sub>9</sub> du lait de Femme ; NL = neuraminyl-lactose.



à l'oxalate d'aniline.

### III - MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES

Nous donnerons successivement les résultats obtenus par électrophorèse ou par des méthodes immunologiques, lorsque nous avons analysé les selles de nourrissons alimentés au lait artificiel ou maternel.

#### A - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

Dans la fig. 9 (p. 51) nous avons schématisé les électrophorégrammes obtenus, sur cellogel, lorsque nous avons fait migrer les fractions SDF et SDV. Nous voyons que nous n'avons pu obtenir de bonnes séparations mais que les fractions SDF donnent une bande supplémentaire, "C", du côté de l'anode. Cette protéine migre cependant plus vite que la lactotransferrine humaine.

DESCAMPS (122) ayant démontré que la lactotransferrine, associée à des glycopeptides, possède un comportement plus anodique sur cellogel, que la LTF pure, nous avons pensé que la bande supplémentaire obtenue avec les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme pouvait être due à la présence de lactotransferrine. Les résultats obtenus lorsque nous avons fait migrer des fractions SDV additionnées de 1 p. 100 de lactotransferrine semblent étayer cette hypothèse car l'électrophorégramme obtenu permet de distinguer la présence d'une bande supplémentaire migrant au même niveau que la bande "C".

#### B - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

##### 1 - CHEZ LES NOURRISSONS ALIMENTES AU LAIT MATERNEL

a - Avec le sérum anti-protéines sériques humaines, ASH,  
(fig. 10 p. 52) :

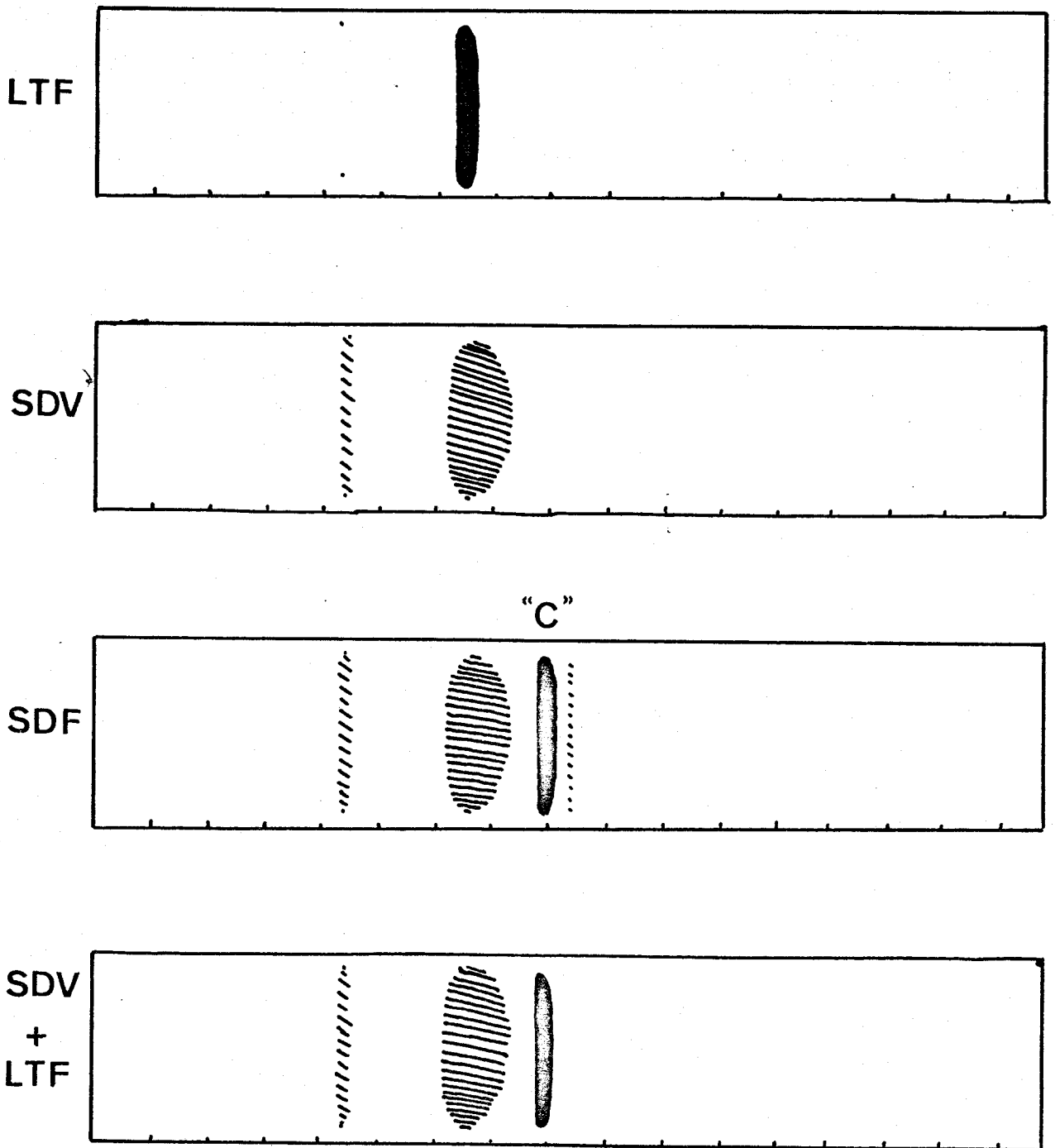


Figure 9 :

Electrophorèses sur acétate de cellulose de la lactotransferrine (LTF), de fractions de selles de nourrissons alimentés au lait de Vache (SDV) ou au lait de Femme (SDF) et de fractions SDV additionnées de 1 p. 100 de lactotransferrine humaine (SDV + LTF). Tampon véronal de pH 8,6 ; 110 V pendant 1 h 30 ; Révélation par l'Amidoschwarz.

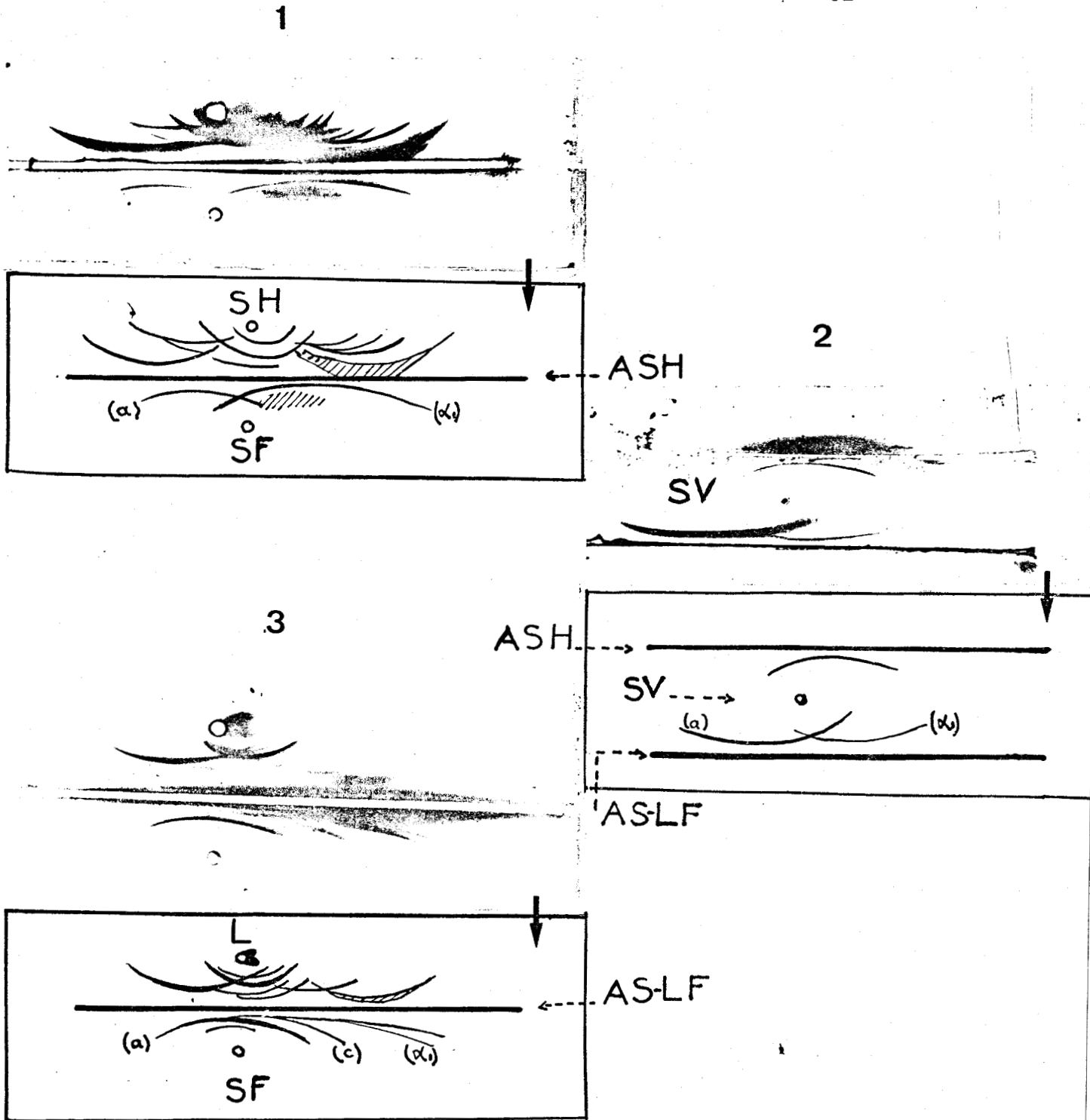


Figure 10 :

Mise en évidence des constituants sériques et lactés des selles de nourrissons alimentés au lait maternel (SF) ou artificiel (SV).

ASH = sérum anti-protéines sériques humaines

AS-LF = sérum anti-lait de Femme

SH = sérum humain - L = lactosérum humain.



Nous obtenons en général, deux arcs semblables aux arcs donnés par les Ig A (a) et l' $\alpha$  1-antitrypsine ( $\alpha$ 1).

b - Avec le sérum anti-lait de Femme : AS-LF (fig. 10 p. 52).

Un mélange de fractions SF donne plusieurs arcs dont (a), (c) et ( $\alpha$  1) que nous avons tenté d'identifier avec des antisérums spécifiques.

c - Avec le sérum anti Ig A, AS-Ig A

Nous obtenons en immunoélectrophorèse, un arc identique à l'arc (a) avec tous les échantillons SF analysés. La présence d'Ig A dans toutes les féces de nourrissons alimentés naturellement est confirmée par la technique d'immunodiffusion double.

d - Avec le sérum anti- $\alpha$  1 antitrypsine (AS- $\alpha$ 1) :

Un mélange de fractions SF forme un arc de précipitation ( $\alpha$  1) dans la zone  $\alpha$ , lorsqu'il est analysé en immunoélectrophorèse contre l'anti-sérum AS- $\alpha$ 1.

e - Avec le sérum anti-lactotransferrine humaine, AS-LTF :

$\alpha$ - En immunoélectrophorèse

. Sur gélose (fig. 11, p. 54) :

Nous obtenons un arc identique à l'arc (c) formé avec l'antisérum ASLF. Cet arc présente quelquefois une bifidité.

La technique de fente courte nous a permis de montrer qu'il y a raccordement entre l'arc bifide obtenu avec les fractions SG1 et la ligne de précipitation formée par la lactotransferrine du lait.

. Sur cellogel (fig. 12, p. 55) :

L'immunoélectrophorèse donne deux arcs nets. L'un se forme au niveau de la bande "C" que nous révélons par une électrophorèse parallèle,



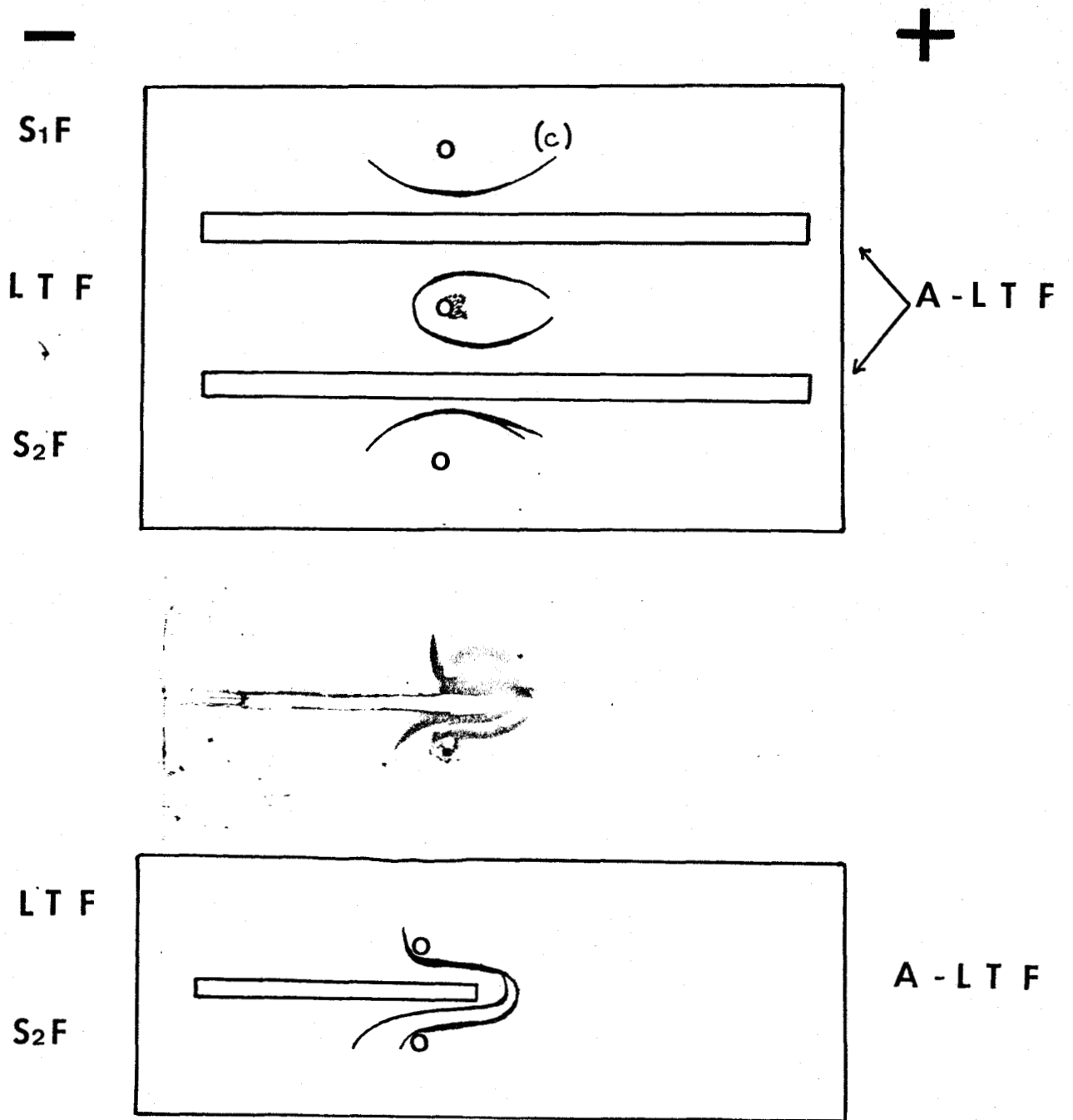


Figure 11 :

Immunoélectrophorèses en gélose :

- Mise en évidence de la lactotransferrine dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme (SF<sub>1</sub>, SF<sub>2</sub>).

- Identité avec la lactotransferrine isolée du lait de Femme (LTF).

A - LTF = Sérum anti-lactotransferrine humaine.



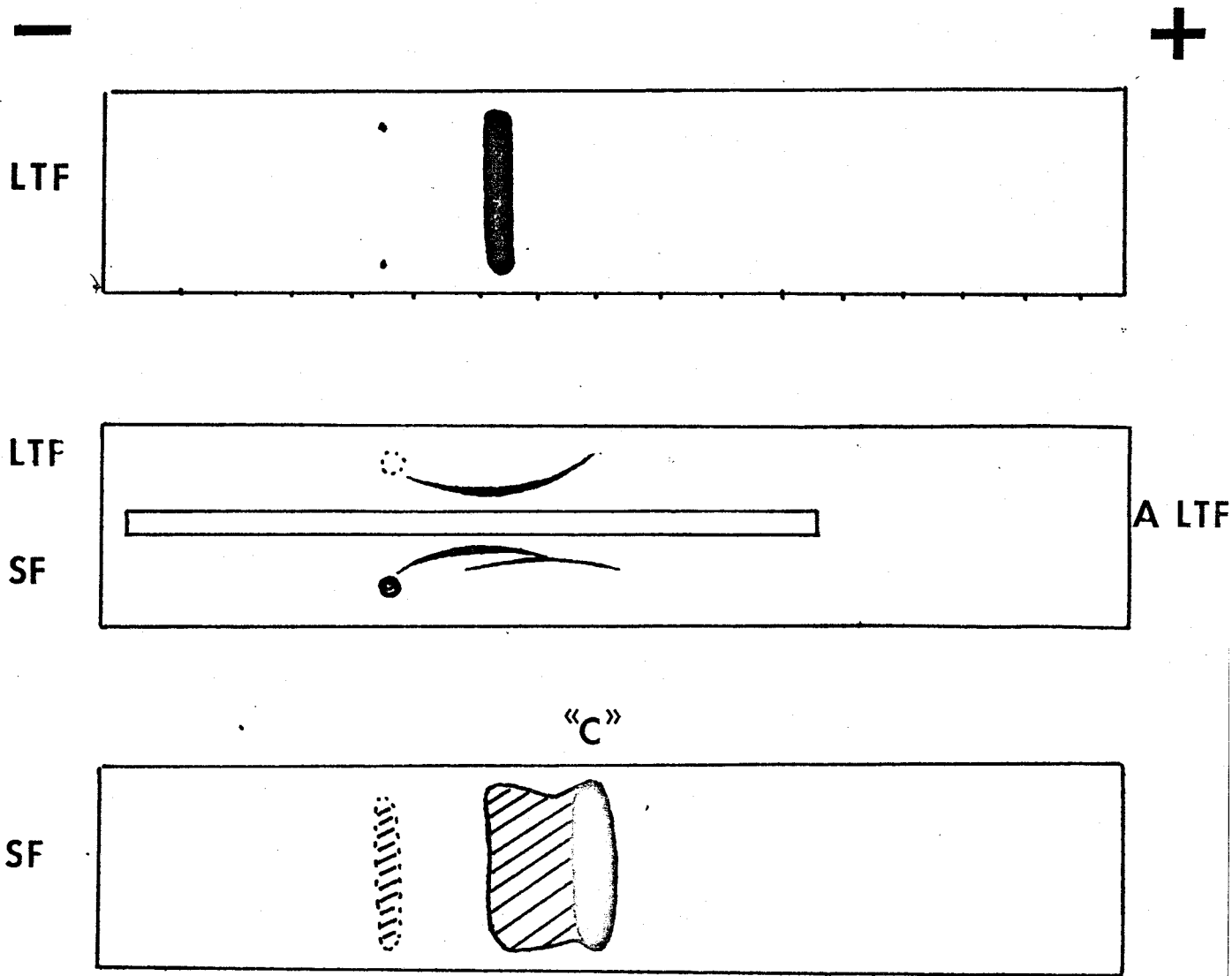


Figure 12 :

Electrophorèse et immunoélectrophorèse, sur acétate de cellulose, de la lactotransferrine isolée du lait de Femme (LTF) et de fraction (SF) de selles de nourrissons allaités par leur mère.



l'autre migre moins rapidement et se situe au niveau de la lactotransferrine pure.

### $\beta$ - En immunodiffusion double (fig. 13 p. 57)

Nous avons pu constater que certaines fractions donnent un seul arc quand elles diffusent à la rencontre de l'antisérum A. LTF, alors que d'autres forment deux lignes de précipitation. Les fractions SG1 obtenues à partir de ces deux types de selles nous ont permis d'obtenir des arcs de précipitation très nets. Les images d'immunodiffusion double montrent qu'un des constituants des selles donne un arc qui se raccorde exactement avec celui obtenu avec la LTF. Il y a donc réaction d'identité totale de type I selon OUCHTERLONY (123). L'autre composant donne une réaction de type IV ; on voit en effet qu'il se forme, au niveau du raccordement, un éperon qui indique, par sa position, que ce deuxième composant des selles a perdu un déterminant antigénique de la lactotransferrine du lait, mais possède encore au moins un déterminant commun avec cette glycoprotéine.

### $\gamma$ - Etude statistique

L'analyse d'échantillons SF provenant de 25 nourrissons différents allaités par leur mère, a toujours permis de mettre en évidence un seul ou deux constituants réagissant avec le sérum AS-LTF.

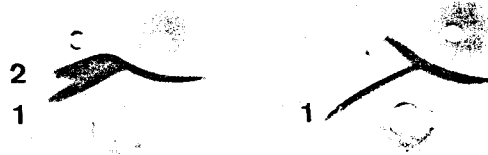
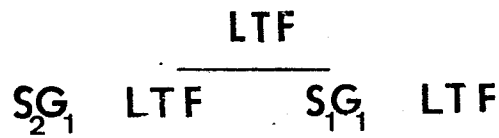
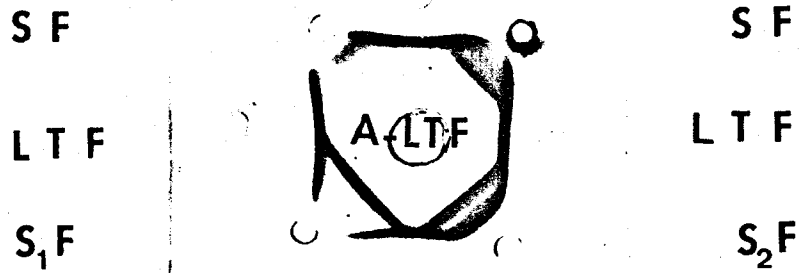
## 2 - CHEZ LES NOURRISSONS ALIMENTES AU LAIT DE VACHE

a - Avec le sérum anti-protéines sériques humaines, ASH,  
(fig. 10 p. 52) :

L'immunoélectrophorèse ne permet de mettre en évidence qu'un seul arc qui doit être dû à l' $\alpha$  1-antitrypsine.

### b - Avec le sérum anti-lait de Vache (ASLV)

Les fractions SV et SDV (selles simplement traitées ou dialysées)



A-LTF

A-LTF

Figure 13 :

Immunodiffusion double en gélose, de la lactotransferrine humaine (LTF) et de fractions (SF ou SG1) de selles de nourrissons alimentés au lait de Femme.

- Mise en évidence d'un seul (S<sub>1</sub>F et S<sub>1</sub>G<sub>1</sub>) ou de deux arcs (S<sub>2</sub>F et S<sub>2</sub>G<sub>1</sub>) de précipitation avec un sérum anti-lactotransferrine (A-LTF).

- Réaction d'identité, partielle (1) ou totale (2), entre les constituants des selles et la lactotransferrine isolée du lait de Femme.

n'ont donné aucun arc de précipitation, en immunoélectrophorèse comme en immunodiffusion.

c - Avec le sérum anti-lactotransferrine de Vache

Nous avons pu confirmer l'absence de cette lactotransferrine dans les selles de nourrissons alimentés au lait en poudre. Ce résultat nous a amené à rechercher la lactotransferrine bovine dans le lait en poudre et nous avons remarqué que des solutions concentrées de fractions protéiques de lait Galliazyme n'ont pas donné d'arc de précipitation avec cet anti-sérum.

d - Avec le sérum anti-lait de Femme

Un mélange de fractions SV donne deux arcs de précipitation (fig. 10 p. 52) ; l'arc (a) et l'arc appelé ( $\alpha$  1). L'absence de l'arc C de la lactotransferrine est confirmée par l'analyse contre l'antisérum spécifique de cette protéine.

e - Avec le sérum anti Ig A

$\alpha$  - En immunoélectrophorèse

Certains échantillons SV donnent un arc de précipitation ; d'autres ne donnent pas de réaction de précipitation.

$\beta$  - En immunodiffusion double

10 échantillons différents de selles (SV) ont été analysés. Ils donnent une réaction de précipitation, mais les images obtenues sont plus ou moins nettes ; il semble donc que les fèces des nourrissons alimentés artificiellement contiennent des taux variables d'Ig A.

f - Avec le sérum anti- $\alpha$  1 anti-trypsine

Un mélange de fractions SV a donné un arc de précipitation semblable à l'arc ( $\alpha$  1).

### 3 - CONCLUSIONS

La principale conclusion que nous pouvons tirer à la suite de l'analyse immunologique des selles de nourrissons, est qu'il existe, chez les enfants nourris au lait maternel, de la lactotransferrine humaine, alors qu'on ne peut déceler cette glycoprotéine chez les nourrissons alimentés au lait artificiel.

Dans les selles de nourrissons alimentés artificiellement et naturellement, on retrouve de l' $\alpha$  1 antitrypsine et des Ig A. Il semble néanmoins que le taux d'Ig A est moindre dans les fèces de nourrissons alimentés au lait en poudre.

### IV - ETUDE QUANTITATIVE DE LA "COPROLACTOTRANSFERRINE"

Après avoir mis en évidence l'existence de lactotransferrine dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme, nous avons voulu doser ce composé, appelé "coprolactotransferrine".

1 - Pour déterminer la teneur en lactotransferrine de divers échantillons de selles d'enfants nourris au lait de Femme.

2 - Pour suivre les enrichissements en "coprolactotransferrine" lors des différents fractionnements effectués sur les fractions SF.

3 - Pour pouvoir déterminer s'il y a un rapport entre lactotransferrine ingérée et "coprolactotransferrine".

## A - MISE AU POINT DU DOSAGE PAR IMMUNODIFFUSION DOUBLE

### 1 - VERIFICATION DE LA PROPORTIONALITE

Les mesures des anneaux de précipitation obtenus à partir de diverses solutions (0,25 à 2 p. 1000) de lactotransferrine humaine après 24 h, 48 h et 72 h de diffusion, ont permis de montrer qu'après 48 h, les diamètres des cercles obtenus pour les solutions les plus concentrées ne varient plus.

La courbe étalon représentée sur la fig. 14 (p. 61) montre que la technique de dosage est satisfaisante car nous obtenons une droite en notant le carré du diamètre mesuré en ordonnée et en abscisse, la concentration de la solution d'antigène. Il y a donc bien proportionnalité entre l'aire déterminée par l'anneau de précipitation et la concentration en lactotransferrine.

La fig. 14 (p. 61) permet également de voir que les plaques d'anticorps que nous préparons peuvent être également utilisées pour un dosage par électro-immunodiffusion car, là aussi, nous avons vérifié la proportionnalité de la méthode. Néanmoins, cette technique étant plus longue, nous avons préféré utiliser par la suite l'immunodiffusion simple.

### 2 - APPLICATION AU P7 - P8.

Nous avons employé la méthode de dosage par immunodiffusion simple pour déterminer, à titre d'essai, le pourcentage de lactotransferrine dans une fraction du lactosérum appelée P7 - P8. Cette fraction donne un rendement d'environ 60 p. 100 en lactotransferrine lorsqu'elle est purifiée sur CM-cellulose. Le pourcentage en lactotransferrine de la fraction P7 - P8 que nous avons déterminé par immunodiffusion simple est de 62 p. 100, ce qui nous permet de dire que cette méthode est fiable.

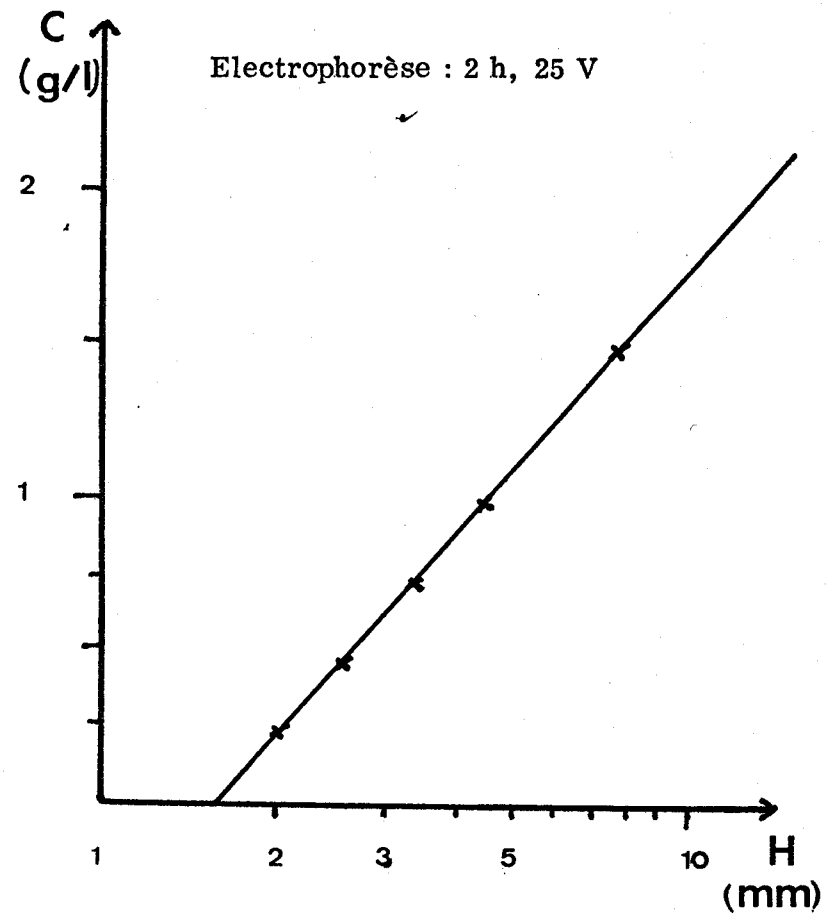
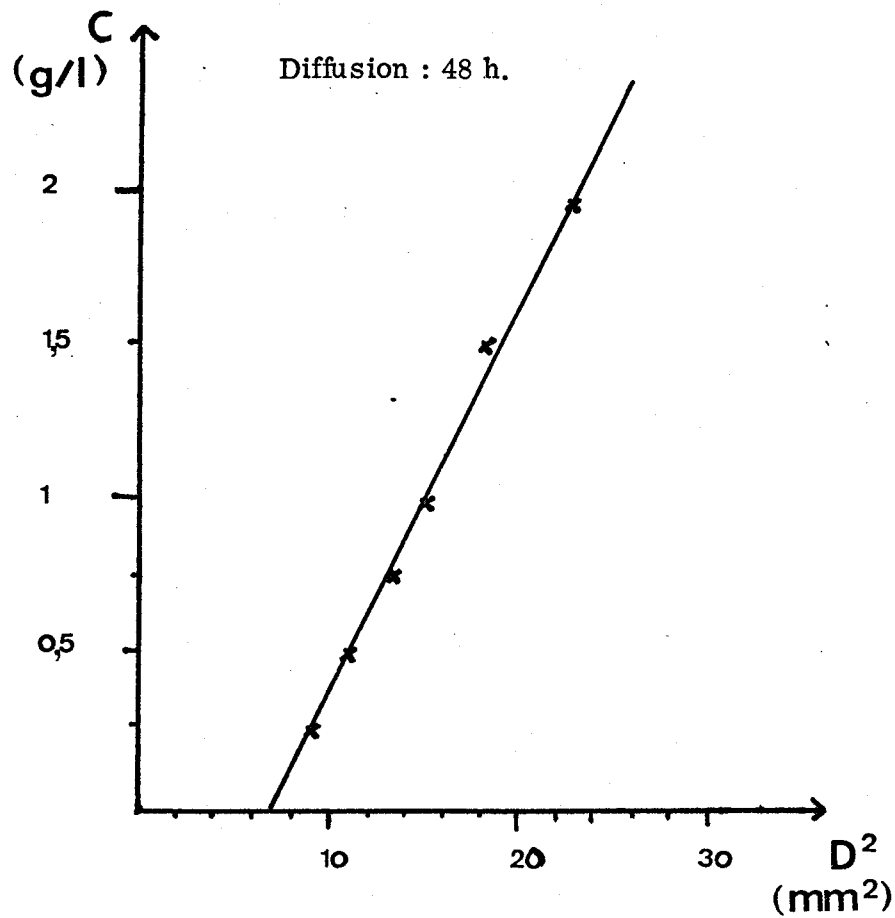


Figure 14 :

Courbe d'étalonnage pour le dosage immunologique de la lactotransferrine .

A - proportionnalité entre la concentration en lactotransferrine (C) et le carré du diamètre ( $D^2$ ) de l'anneau de précipitation obtenu par immunodiffusion radiale simple.

B - proportionnalité entre (C) et le logarithme de la hauteur (H) du pic de précipitation obtenu par électro-immunodiffusion.





## B - APPLICATIONS

### 1 - ANALYSE DES SELLES TRAITÉES (SF)

Lorsque nous avons analysé des solutions à 10 p. 100 de fractions SF par la méthode de MANCINI (124), nous avons souvent constaté l'apparition de deux anneaux de précipitation. Seule la mesure du diamètre de l'anneau interne (qui est toujours plus net) a été prise en considération afin d'éviter les erreurs de dosage par excès.

#### a - Etude statistique

Dans un premier temps, nous avons déterminé le pourcentage en "coprolactotransferrine" de vingt échantillons provenant de différents nourrissons alimentés au lait maternel. Comme nous l'indique la fig. 15 B (p. 63), les pourcentages en "coprolactotransferrine", exprimés par rapport à un poids sec de fraction SF, varient de 0,2 à 2 p. 100. Nous voyons que la majeure partie des échantillons analysés (70 p. 100) donne un pourcentage de  $1 \pm 0,3$  p. 100. Les valeurs les plus faibles (0,2 et 0,4 p. 100) correspondent à 3 échantillons de nouveaux-nés âgés de 2 à 4 jours, qui ne prennent guère plus de 20 à 50 g de lait maternel par tétée.

#### b - Etude cinétique

Nous avons dosé la "coprolactotransferrine" d'un nourrisson alimenté au sein en recueillant hebdomadairement ses selles. La fig. 15 A (p. 63) montre que le pourcentage en "coprolactotransferrine" qui est de 0,4 p. 100 pour la première semaine, augmente jusqu'à 2,4 p. 100 la 11ème semaine. La valeur moyenne obtenue est de 1 p. 100.

### 2 - ANALYSE DES FRACTIONS OBTENUES PAR TAMISAGE MOLECULAIRE (SG)

Dans le tableau VI (p. 64) nous avons fait figurer les rendements et enrichissements en "coprolactotransferrine" déterminés en analysant, par

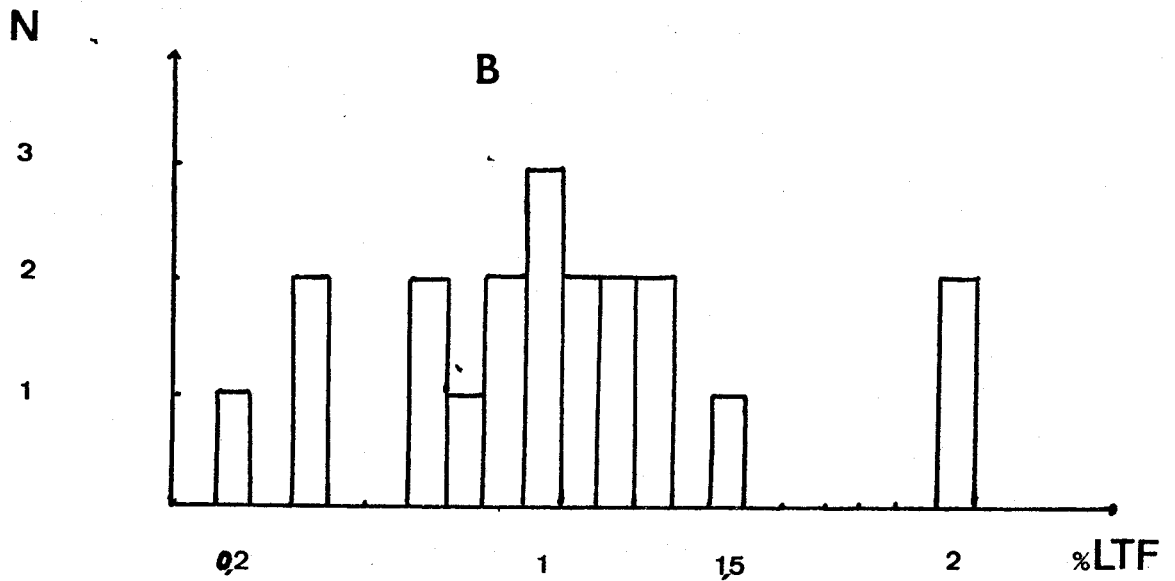
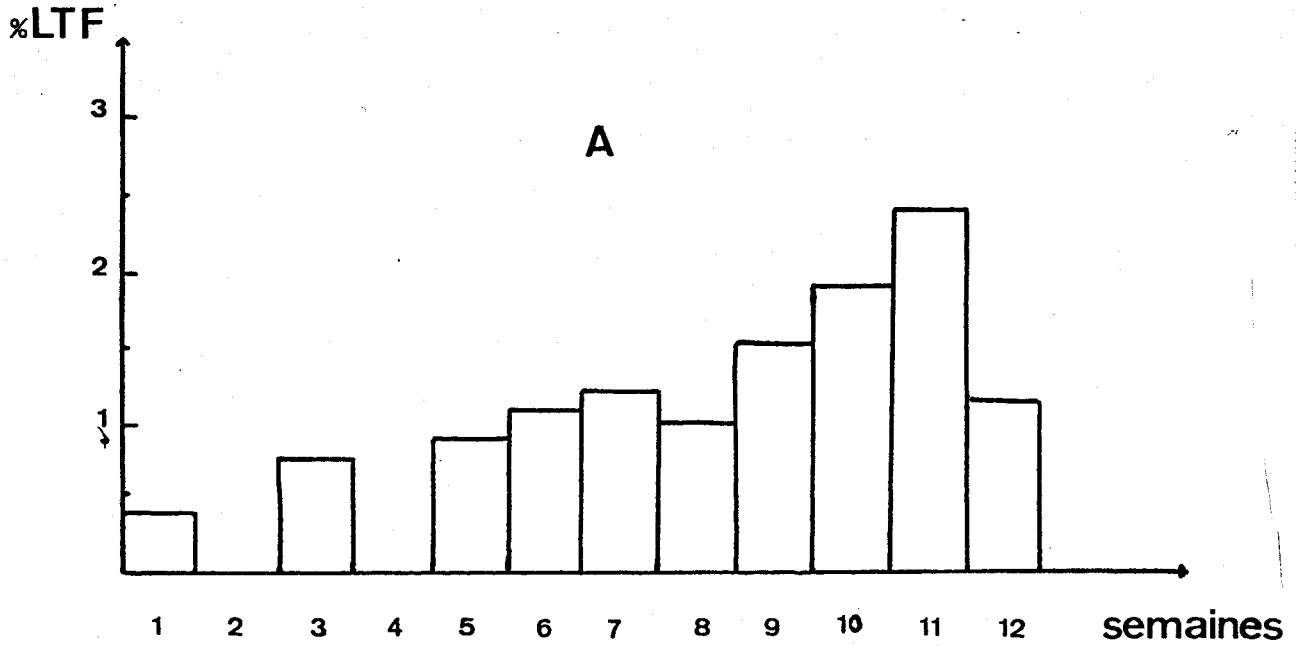


Figure 15 :

A - Pourcentage de lactotransferrine dans les fractions SF des selles d'un nourrisson âgé de 1 à 12 semaines.

B - Etude statistique du pourcentage de lactotransferrine dans les selles de vingt nourrissons alimentés au lait maternel (en ordonnée N = nombre d'échantillons SF ayant la teneur en lactotransferrine figurée en abscisse).



TABLEAU VI

Fractionnements de 1 g de fraction SF de selles sur divers types de Séphadex.

: Type de : Séphadex : utilisé	: Pourcentage : de "coprolac- : tototransferrine!"	: Poids (en mg) des fractions éluées			: Enrichissement : en "coprolac- : tototransferrine!"	: Rendement : en "coprolac- : tototransferrine!"
		: SG 1	: "Inter-pic"	: SG 2		
	: dans la frac- : tion injectée :	:	:	:	: (pic 1/ frac- : tion injectée) :	: pour la frac- : tion SG <sub>1</sub> (p. 100)
: SG 75	: 1	: 300	: 20	: 400	: x 1,5	: 45
: SG 100	: 1,25	: 260	: 135	: 360	: x 3,2	: 89
: SG 150	: 1	: 240	: 130	: 400	: x 4,1	: 98
	:	:	:	: à 500	:	:



immunodiffusion radiale, les fractions SG1 obtenues en fractionnant les selles SF sur divers types de Séphadex.

Les rendements sont respectivement de 45, 89 et 98 p. 100 pour les Séphadex de type G75, G100, G150. Ces valeurs, nous permettent de dire que le Séphadex G150 est le mieux adapté à ce type de fractionnement. Cependant, ces rendements déterminés à partir des dosages immunologiques sont erronés ; en effet, la fraction appelée "inter-pic" renferme, elle aussi, de la "coprolactotransferrine", il est donc impossible d'obtenir un rendement avoisinant 100 p. 100 pour le pic 1.

La méthode immunologique nous permet néanmoins de noter un enrichissement net en "coprolactotransferrine", que nous évaluons à 400 p. 100, puisque la fraction SG1 obtenue sur Séphadex G150 donne, en solution à 2,5 p. 100, un anneau de précipitation de diamètre voisin de celui obtenu avec une solution à 10 p. 100 de fraction S.

### 3 - RAPPORT ENTRE LACTOTRANSFERRINE INGEREE ET "COPROLACTOTRANSFERRINE"

Nous avons essayé de déterminer le pourcentage de lactotransferrine présente dans les selles d'un jeune enfant nourri au sein, et d'un nourrisson alimenté avec un biberon de lait en poudre additionné de lactotransferrine humaine.

#### a - Chez un nourrisson alimenté au sein

Deux séries d'expériences ont été effectuées sur 3 jours ; l'une lorsque le nourrisson était âgé de 7 semaines, l'autre lorsqu'il avait 11 semaines. Pendant 3 jours, la quantité de lactotransferrine ingérée par l'enfant est déterminée en totalisant la prise de lait de chaque tétée et en nous fondant sur un taux de 1,5 g de lactotransferrine par litre de lait. La quantité

de "coprolactotransferrine" est, elle, calculée à partir du poids de la totalité des selles et du pourcentage, déterminé par immunodiffusion, de "coprolactotransferrine" dans les fractions SF.

Le tableau VII (p. 67) rassemble les diverses valeurs obtenues lors de la première expérience. Nous voyons qu'une faible partie de la lactotransferrine ingérée est rejetée dans les selles ; on peut évaluer ce pourcentage à 2,2 p. 100 lorsque le nourrisson est âgé de 7 semaines.

Nous avons refait cette expérience chez le même bébé, mais un mois plus tard. La quantité de lait ingérée durant 3 jours atteint alors 2 195 g, soit 2,7 g de lactotransferrine ingérée. La quantité de "coprolactotransferrine", 23 mg, est moindre que dans la première expérience malgré la teneur assez élevée en lactotransferrine des fractions SF recueillies, car les selles sont beaucoup moins abondantes (= 2 g). Le pourcentage de lactotransferrine retrouvée dans les selles, est calculé à partir de ces valeurs, il est de 0,8 p. 100.

b - Chez un nourrisson alimenté au lait artificiel additionné de lactotransferrine humaine.

Un enfant de 3, 650 kg, âgé de 8 semaines, et alimenté au lait Gloria depuis sa naissance, a reçu pendant deux jours consécutifs (J1 et J2) 800 mg de lactotransferrine humaine. Cette ration de lactotransferrine a été simplement répartie et dissoute dans chacun de ses biberons.

La totalité des selles du nourrisson est recueillie la veille de l'expérience, au jour J1 et J2 et les deux jours suivants l'ingestion de lactotransferrine (J3 et J4).

Dans le tableau VIII (p. 68) nous avons reporté les résultats obtenus lorsqu'on a dosé la "coprolactotransferrine" des fractions SD. On peut voir que, si les selles de nourrisson ne contiennent habituellement pas de

TABLEAU VII

Bilan sur la quantité de lactotransferrine (LTF) ingérée et de "coprolactotransferrine" ("CLTF") rejetée par un nourrisson âgé de 7 semaines et alimenté au sein.

Jour	Poids de lait ingéré (en g)	Quantité de LTF ingérée (en g)	Poids des fractions SF (en g)	Pourcentage de "CLTF" dans les fractions SF (en p. 100)	Quantité de "CLTF" dans les fractions SF (en mg)
J1	830	1	2,4	1	24
J2	805	1	2,6	0,8	20,8
J3	1 025	1,2	3,6	0,7	25,2
Total	2 660	<u>3,2</u>	8,6		<u>70</u>

Rapport "CLTF"/LTF = 2,2 p. 100



TABLEAU VIII

Quantité de coprolactotransferrine ("CLTF") rejetée par un nourrisson, âgé de 8 semaines, alimenté au lait artificiel additionné de lactotransferrine humaine (LTF).

Quantité de LTF ingérée (en g)	Poids des fractions SD (en g)	Pourcentage de "CLTF" dans les fractions SD (en p. 100)	Quantité de "CLTF" dans les fractions SD (en mg)
J 0 : 0	: 0,3	: 0	: 0
J 1 : 0,8	: 0,27	: 3,2	: 9
J 2 : 0,8	: 0,43	: 6,4	: 27,5
J 3 : 0	: 0,37	: 2	: 8
J 4 : 0	: 0,38	: 0	: 0
<b>Total : 1,6</b>			<b>44,5</b>



Rapport "CLTF"/LTF = 2,7 p. 100

"coprolactotransferrine" (J 0), on retrouve ce composé dans les selles de l'enfant le jour où il absorbe de la lactotransferrine (J 1 et J 2) et le lendemain. Au jour J 4, soit 48 h après la dernière ingestion de LTF on ne trouve plus de traces de "coprolactotransferrine". Lorsqu'on calcule le pourcentage de lactotransferrine rejetée par rapport à la dose ingérée, on trouve une valeur de 2,7 p. 100 qui est proche de celle que nous avons déterminée chez un nourrisson de 7 semaines allaité par sa mère (tableau VII, p. 67).



CONCLUSIONS

1 - Les résultats que nous avons acquis lors de la recherche, dans les selles du nourrisson, de constituants lactés pouvant jouer un rôle dans sa protection intestinale nous amènent à souligner les points suivants :

- Dans les selles de nourrissons alimentés au lait artificiel

Les méthodes immunologiques que nous avons utilisées, ne nous ont permis de mettre en évidence aucune protéine spécifique du lait de Vache. Cette absence d'arc de précipitation avec un anti-lactosérum de Vache a déjà été constatée par ROULET et Von MURALT (125). En recherchant dans un lait en poudre, des protéines du lait de Vache, nous n'avons pu, d'ailleurs, identifier que l' $\alpha$ -lactalbumine par immunoélectrophorèse. D'autres protéines telles que la lactotransferrine bovine, semblent perdre, au cours des procédés de préparation des laits en poudre (dilution, atomisation, lyophilisation. . . ) leur capacité de réagir avec les anticorps correspondants. Il serait intéressant de voir si cette transformation, qui se traduit sans doute par la perte des sites spécifiques de la fixation antigène-anticorps, ne s'accompagne pas d'une dégradation du site de fixation du fer dans le cas de la lactotransferrine de Vache.

Les seules protéines que nous ayons pu identifier dans un mélange de selles de nourrissons alimentés artificiellement sont les Ig A et l' $\alpha$ 1-antitrypsine. L'analyse de plusieurs échantillons de ces selles nous a montré que le taux d'Ig A est variable ; cette conclusion est en accord avec les constatations de MURALT et ROULET (126) qui n'ont pu mettre en évidence l'arc des immunoglobulines Ig A que dans 7 cas sur 13, avec la

technique d'immunoélectrophorèse. Ces auteurs ont révélé également, dans 3 échantillons de fèces, 3 arcs de précipitation dus à des protéines sériques qu'ils n'ont pu identifier.

- Dans les selles de nourrissons alimentés au lait maternel.

Il existe, dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme, des oligosaccharides spécifiques de ce lait. On sait que ces oligosaccharides sont des "L B Factors", c'est-à-dire qu'ils ont la propriété de favoriser la croissance des Lactobacillus bifidus. La présence de certains de ces oligosaccharides dans les selles permet d'affirmer qu'ils ne sont pas, en totalité, attaqués par des glycosidases des sucs digestifs, ni absorbés au niveau de la paroi intestinale et qu'ils peuvent, à priori, exercer in vivo leur activité LBF au niveau de l'intestin.

Les protéines que nous avons mises en évidence dans les selles de nourrissons alimentés par leur mère, sont les Ig A, l' $\alpha$  1-antitrypsine, et la lactotransferrine.

Nous avons remarqué que la présence des Ig A est facilement mise en évidence, aussi pensons-nous qu'il y a, dans les selles d'enfants nourris au lait maternel, une plus grande quantité d'Ig A que dans les fèces de nourrissons alimentés artificiellement. Une partie de ces Ig A, qu'on retrouve également dans les selles d'enfants nourris au biberon, aurait une origine endogène (sécrétion intestinale du nourrisson, ou, comme le pensent MURALT et ROULET -127-, passage des Ig A du sang au travers de la paroi intestinale) et une autre partie, spécifique des nourrissons alimentés au sein, serait d'origine exogène car elle proviendrait du lait maternel ingéré.

La présence de lactotransferrine humaine dans les selles d'enfants nourris au lait maternel a retenu notre attention. L'analyse qualitative et

quantitative des selles nous permet de noter certains éléments concernant le taux, l'origine et les méthodes de purification de ce composé.

2 - L'étude quantitative de la "coprolactotransferrine" nous permet de préciser les points suivants :

La Lactotransferrine a pu être mise en évidence dans tous les échantillons des selles que nous avons analysés. Le taux de "coprolactotransferrine" dans les fractions S des selles, varie de 0,7 à 1,3 p. 100 chez des nourrissons âgés de 4 à 7 jours.

Malgré les difficultés rencontrées pour déterminer précisément la quantité de LTF ingérée par un nourrisson alimenté au sein et pour recueillir quantitativement ses selles, nous avons pu calculer le rapport entre la quantité de lactotransferrine absorbée et rejetée. Ce rapport est le même chez un nourrisson du même âge, dont on a additionné le biberon de lait en poudre d'une quantité donnée de lactotransferrine. Ce résultat nous permet de confirmer l'origine lactée de la "coprolactotransferrine".

On peut enrichir les fractions S, obtenues à partir de fèces de nourrissons alimentés au lait de Femme, par passage sur Séphadex G 150. Cette méthode permet d'obtenir des fractions contenant environ 4 p. 100 de "coprolactotransferrine". Le fait qu'on caractérise par des techniques immunologiques, la lactotransferrine dans tout le premier pic de gel filtration, mais également dans les éluats précédant la sortie du second pic, nous fait penser que la "coprolactotransferrine" n'est pas une entité très homogène, mais qu'elle est constituée d'un mélange de constituants dérivants de la lactotransferrine du lait. C'est en partie pour vérifier cette hypothèse qui se fonde également sur la mise en évidence de deux composés réagissant avec les anticorps anti-lactotransferrine, que nous avons tenté d'isoler la coprolactotransferrine.

IIème PARTIE

---

ISOLEMENT DE LA " COPROLACTOTRANSFERRINE "

PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

## MATERIEL ET METHODES

La méthode de tamisage moléculaire nous permet d'obtenir des fractions ne contenant que 4 p. 100 de "coprolactotransferrine". Les autres techniques que nous avons utilisées pour purifier la "coprolactotransferrine" telles le passage sur C. M. et D. E. A. E. -Sephadex, la précipitation au sulfate d'ammonium, ou l'électrophorèse préparative en veine liquide, ne nous ont pas donné de meilleurs résultats. Nous avons alors utilisé une méthode fondée sur sa propriété de former des complexes avec les anticorps anti-LTF. Cette méthode est la chromatographie d'affinité.

Après l'énoncé du principe de la chromatographie d'affinité, nous décrirons le matériel, les techniques d'insolubilisation des anticorps, et les conditions de fixation et d'élution de l'antigène.

### I - PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La chromatographie d'affinité est une méthode d'isolement de molécules biologiques fondée sur l'affinité qui existe entre certaines molécules qui peuvent s'unir par des liaisons ioniques, hydrogène ou de type Van Der WAALS. Cette affinité réversible est dite "biospécifique" ; elle ne se manifeste qu'entre composants ayant une structure tertiaire rigoureusement complémentaire comme un antigène et un anticorps, l'analogue d'un substrat une enzyme, et une enzyme et son effecteur.

Utiliser la chromatographie d'affinité consiste à tirer partie de cette union spécifique et réversible entre deux molécules pour isoler l'une d'elles. En effet, comme nous le voyons fig. 16 (p. 76), si on insolubilise un anticorps, par exemple, on obtient un matériel capable de fixer spécifiquement l'antigène correspondant. On peut, par lavage, éliminer les protéines du mélange à purifier, alors que l'antigène reste fixé au support insoluble ; il n'est élué que dans une étape ultérieure, dans des conditions de pH ou de force ionique permettant de dissocier le complexe antigène-anticorps.

## II - MATERIEL

Nous décrirons successivement les fractions contenant l'antigène (la "coprolactotransferrine"), les méthodes de préparation des anticorps, et les agents insolubilisants que nous avons utilisés.

### A - FRACTIONS CONTENANT L'ANTIGENE

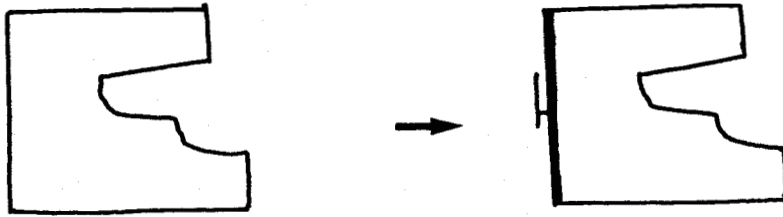
Le matériel utilisé pour isoler la "coprolactotransferrine" consiste en un mélange de fractions SG1 ou "inter-pic" contenant environ 4 p. 100 de "coprolactotransferrine". La préparation de ces fractions, obtenues par tamisage moléculaire, a été décrite précédemment (p. 38 ).

### B - PREPARATION DES FRACTIONS ENRICHIES EN ANTICORPS

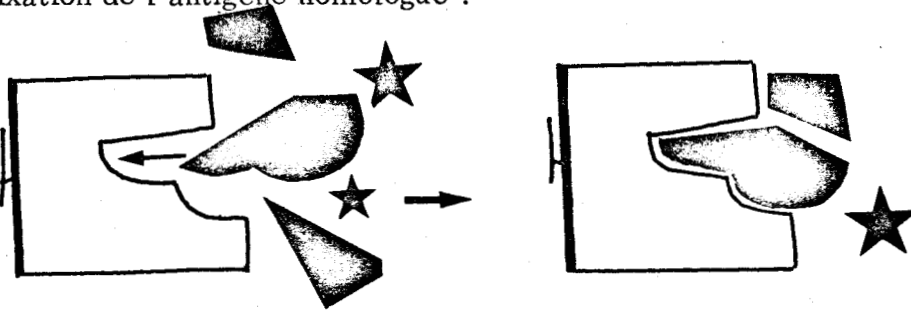
Les immuno-adsorbants sont préparés généralement à partir de fractions enrichies en anticorps. En effet, l'insolubilisation d'un sérum complet peut amener des fixations non spécifiques sur des protéines autres que les anticorps.

Pour préparer, à partir d'antisérums de Lapin, des fractions riches en anticorps anti-lactotransferrine, nous avons employé deux méthodes différentes : l'une d'elles est classique, c'est la précipitation au sulfate d'ammonium des immunoglobulines, l'autre est fondée sur la chromatographie

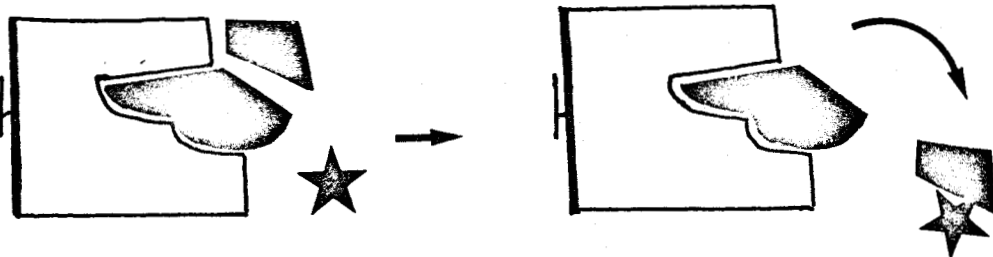
1 - Insolubilisation de l'anticorps :



2 - Fixation de l'antigène homologue :



3 - Lavage de l'immunoabsorbant :



4 - Elution de l'antigène :

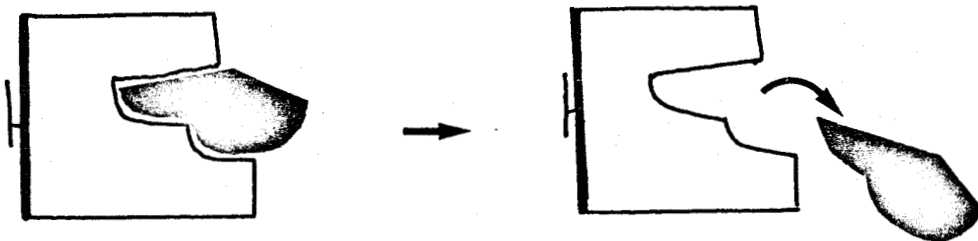


Figure 16 :

Schémas représentant les différentes étapes de l'immuno-adsorption.



d'affinité puisqu'elle fait appel à l'emploi d'antigène insolubilisé pour isoler les anticorps homologues.

### 1 - PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

Nous avons appliqué la méthode de CAMPBELL (128) pour obtenir des fractions riches en anticorps. A 50 ml de sérum nous avons ajouté, goutte à goutte et sous agitation, 25 ml d'une solution saturée en sulfate d'ammonium. Le pH est ajusté à 7,8 avec de la soude 2 N et l'agitation est poursuivie, à température de la pièce, pendant 2 h. Nous laissons le précipité se déposer pendant une nuit à + 4°C, puis nous le recueillons après une centrifugation de 30 mn à 3 000 t/mn. Ce précipité, dissous dans 25 ml de sérum physiologique, est purifié par une ou deux autres précipitations au tiers de saturation en sulfate d'ammonium.

### 2 - IMMUNO-ADSORPTION

Pour essayer d'isoler des anticorps anti-lactotransferrine, nous avons utilisé la technique de WESTON et AVRAMEAS (129).

Nous avons préparé un immuno-adsorbant constitué de 60 mg de lactotransferrine greffée sur du Biogel P-300 par l'intermédiaire du glutaraldehyde selon le protocole décrit p. 88. Cet immuno-adsorbant est ensuite mis en présence de 20 ml de sérum anti-lait (AS-LF), pendant 30 minutes à la température ambiante. Les eaux de lavage sont rassemblées, elles constituent la fraction LI ; les éluats obtenus dans les conditions décrites p. 90 sont rassemblés, ils forment la fraction EI.

### 3 - CONTROLE DES ANTICORPS OBTENUS

Pour contrôler que les fractions obtenues par ces deux méthodes contiennent des anticorps anti-lactotransferrine, nous les avons tout d'abord analysées en électrophorèse sur acétate afin de voir si elles sont riches en



protéines migrant dans la zone des immunoglobulines.

Ensuite, nous avons vérifié, par la méthode de OUCHTERLONY, que ces fractions contiennent des anticorps possédant la propriété de précipiter, en milieu gélosé, avec la lactotransferrine.

Enfin, nous avons voulu déterminer le rendement de la méthode au sulfate d'ammonium et avons été amenée à doser les anticorps anti-lactotransferrine dans les sérums de départ et dans les culots de précipitation. Nous avons alors employé une méthode de dosage d'anticorps dérivée de celle de HEIDELBERG et KENDALL (130) en déterminant les points d'équivalence par pesée des précipités antigène-anticorps ou par mesure, en ultra-violet, des solutions, dans la soude 0,1 N, des complexes formés. Les titres (que nous exprimerons en mg de lactotransferrine fixée par ml d'antisérum ou de solution d'anticorps) sont en relation directe avec le taux d'anticorps, puisqu'ils sont déterminés dans la zone d'équivalence où tous les sites de fixation des anticorps sont liés à un déterminant antigénique et réciproquement.

#### C - UN AGENT INSOLUBILISANT : LE GLUTARALDEHYDE

Les différentes méthodes d'insolubilisation que nous avons utilisées sont décrites dans le paragraphe suivant. Deux d'entre elles nécessitent l'emploi de glutaraldehyde ( $\text{CHO} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CHO}$ ). Comme l'insolubilisation des anticorps dépend de la qualité de la préparation du glutaraldéhyde, nous décrirons, dans ce paragraphe, le moyen de caractériser et d'éliminer les produits de dégradation de l'aldéhyde glutarique.

##### 1 - ETUDE DU GLUTARALDEHYDE COMMERCIAL

Le glutaraldéhyde que nous avons employé provenait de chez MERCK. Comme toutes les préparations commerciales, cette solution à 25 p. 100

se conserve mal même en flacon brun à + 4° C ; elle se colore rapidement en jaune.

Afin de caractériser la dégradation des solutions de glutaraldéhyde, nous en avons tracé le spectre d'absorption entre 210 et 320 mm car, selon FAHIMI et DROCHMANS (131), le glutaraldéhyde absorbe à 280 mm alors que ses produits de dégradation photochimique et d'oxydation donnent un maximum d'absorption à 235 mm.

La fig. 17 (p. 80) montre les courbes d'absorption dans l'ultra-violet de deux lots de glutaraldéhyde commercial <sup>(x)</sup>. Ces courbes montrent deux maxima d'absorption : l'un à 235 mm, l'autre à 280 mm. Nous voyons que l'importance relative des deux sommets dépend de la durée de conservation du glutaraldéhyde. La préparation la plus ancienne (B) donne, en effet, un pic majeur à 235 mm qui traduit un état de dégradation prononcé.

## 2 - LE GLUTARALDEHYDE TRAITÉ AU CHARBON ACTIF

Nous avons ajouté 20 g de charbon actif <sup>(xx)</sup> à 200 ml de solution commerciale à 25 p. 100 de glutaraldéhyde. Après un contact de quelques minutes, la solution est filtrée sur Büchner.

La courbe d'absorption de la solution obtenue (courbe C, fig. 17, p. 80) montre que la plupart des substances étrangères absorbant à 235 mm sont éliminées.

## III - INSOLUBILISATION DES ANTICORPS

Nous avons employé, pour insolubiliser les anticorps anti-lactotransferrine, une méthode physique et des méthodes chimiques permettant de lier, par covalence, les protéines :

soit entre elles avec le glutaraldéhyde (protéines réticulées),

soit sur un support de polyacrylamide ou de Sépharose (protéines greffées).

---

(x) Glutaraldéhyde à 25 p. 100 - MERCK - Réf. 4 239.

(xx) Charbon actif MERCK - Réf. 2 186.

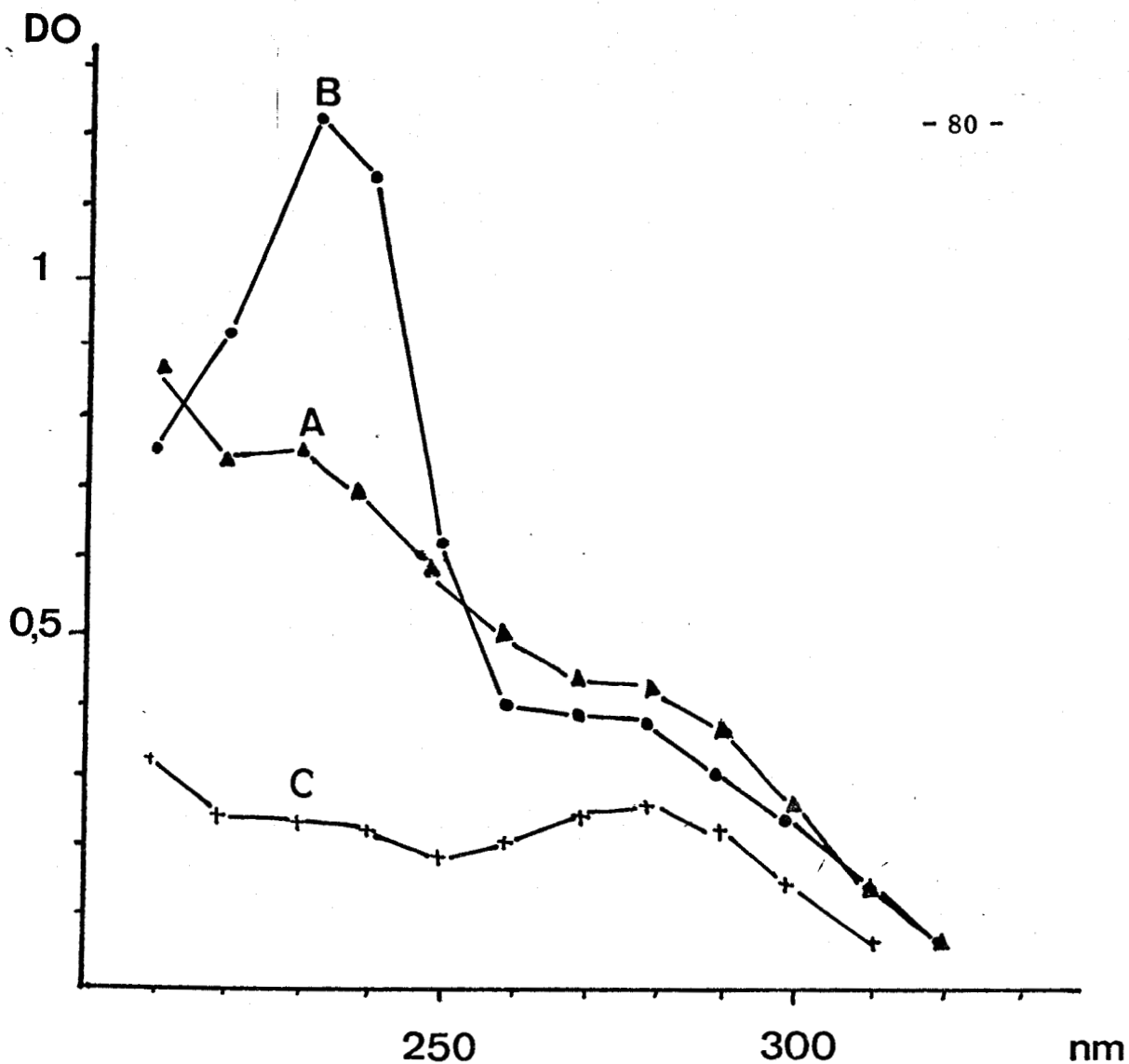


Figure 17 :

Courbes d'absorption dans l'ultra-violet :

A : ▲-▲ : du glutaraldéhyde commercial MERCK, juste après réception.

B : ●-● : du glutaraldéhyde commercial MERCK conservé plus d'un mois à + 4°C

C : +-+ : du glutaraldéhyde traité au charbon actif.

## A - METHODE PHYSIQUE

### 1 - PRINCIPE

CARREL et BARANDUN (132) ont récemment obtenu un immuno-adsorbant convenable en enserrant des anticorps dans un gel de polyacrylamide. Ils ont établi les pourcentages d'acrylamide et de N-N' méthylène-bis-acrylamide qu'il faut respecter pour obtenir des mailles assez lâches pour permettre la formation du complexe antigène-anticorps durant l'étape de fixation.

### 2 - MODE OPERATOIRE

A 30 mg d'anticorps, on ajoute 5 ml d'une solution composée comme suit :

Acrylamide <sup>(x)</sup>	7,5 g
Bis (N, N'-Méthylène bisacrylamide) <sup>(xx)</sup>	2,5 g
Eau	qsp 100 ml.

. Après addition de 0,2 ml d'une solution aqueuse de riboflavine <sup>(xxx)</sup> à 0,03 p. 100, on laisse le mélange sous azote pendant 10 mn, puis on le place 2 h devant une lampe fluorescente. La polymérisation peut également être activée par addition d'un grain de persulfate d'ammonium. Le gel obtenu est dispersé en petites particules, puis lavé avec du tampon Tris-Na Cl, 0,1 M, pH 7,5 avant d'être monté en colonne pour l'étape de fixation et d'élution décrite p.91

## B - METHODES CHIMIQUES

### 1 - PROTEINES RETICULEES

(x) Acrylamide : EASTMAN ORGANIC CHEMICALS (en France chez TOUZART et MATIGNON).

(xx) Bis : EASTMAN ORGANIC CHEMICALS.

(xxx) Riboflavine (Vitamine B2) : TOUZART et MATIGNON - 3 rue Amyot - Paris Vème.

### a - Principe

Par formation de liaison covalente entre molécules de protéines on peut obtenir un réseau insoluble. L'emploi de réactifs bifonctionnels permet de former facilement des immuno-adsorbants propices à la chromatographie d'affinité. Parmi ces réactifs, le glutaraldéhyde est le plus souvent employé, notamment selon le protocole décrit par AVRAMEAS et al. (133).

### b - Mode opératoire

A 250 mg d'anticorps dissous dans 5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7, on ajoute, sous agitation magnétique, 1 ml de glutaraldéhyde à 2,5 p. 100 dans ce tampon. La polymérisation commence instantanément, elle est complète après un repos de 3 h à la température du laboratoire. La préparation de l'immuno-adsorbant se poursuit en le dispersant dans 5 ml d'eau puis en l'homogénéisant dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7,3. Les fines particules obtenues sont ensuite lavées avec une solution tampon glycine-HCl 0,1 M pH 2,8, puis par 500 à 750 ml de tampon phosphate. L'immuno-adsorbant est prêt à l'emploi lorsque le surnageant obtenu après centrifugation lors du dernier lavage, a une densité optique à 280 nm, inférieure à 0,04.

## 2 - PROTEINES GREFFÉES

Les immuno-adsorbants de ce type sont constitués d'un support variable, sur lequel on greffe, par liaison covalente, la protéine à insolubiliser. Contrairement à ce qui se passe dans le cas des protéines réticulées, la protéine insolubilisée est homogène et l'immuno-adsorbant obtenu peut être utilisé en colonne. De plus, la protéine n'est impliquée que par une seule liaison dans la structure qui permet son insolubilisation. Elle constitue donc un meilleur "appât" pour la protéine complémentaire qui doit se fixer sur elle lors de l'immuno-adsorption proprement dite.

Personnellement, nous avons utilisé trois supports différents ; nous

décrivons successivement la préparation de ces trois types d'immuno-adsorbants.

#### a - L'Enzyacryl-polythiolactone

##### $\alpha$ - Principe

L' "Enzyacryl polythiolactone" <sup>(x)</sup> dont la formule est donnée fig. 18 (p. 84) est un polymère qui, sur ses groupements thiolactone, peut fixer des protéines, soit par leurs groupements hydroxyls aliphatiques ou phénoliques, soit par leurs groupements aminés (fig. 19 - p. 85).

Ce polymère a l'avantage de ne pas nécessiter de préactivation ; nous décrivons donc brièvement le mode d'emploi que nous avons suivi en soulignant que ce support a été commercialisé pour insolubiliser des enzymes, mais qu'il n'a pas encore été employé en vue d'une fixation réversible d'un antigène.

##### $\beta$ - Mode opératoire

30 milligrammes d'anticorps dissous dans 40 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 6 sont ajoutés à une suspension de 80 mg d'Enzacryl-Polythiolactone dans 10 ml du même tampon. La suspension est laissée 5 h sous agitation à 0°C, puis est centrifugée. Le précipité est lavé 3 fois par 10 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5, puis avec le même tampon additionné de saccharose et de chlorure de sodium 1 M. Après les différents lavages, le précipité est suspendu dans 10 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,6.

#### b - Le Sépharose activé par le bromure de cyanogène

##### $\alpha$ - Principe

Le Sépharose qui est un dextrane, une fois activé par le bromure de cyanogène, peut, comme nous le voyons sur la fig. 20 (p. 86), acquérir des groupements amines où vont se lier, par covalence, les fonctions hydroxyles de la protéine à insolubiliser.

---

(x) Enzacryl - Polythiolactone : KOCH - LIGHT Laboratoires LTD (en France SOCHIBO, 3 rue Carnot - 92 - BOULOGNE)

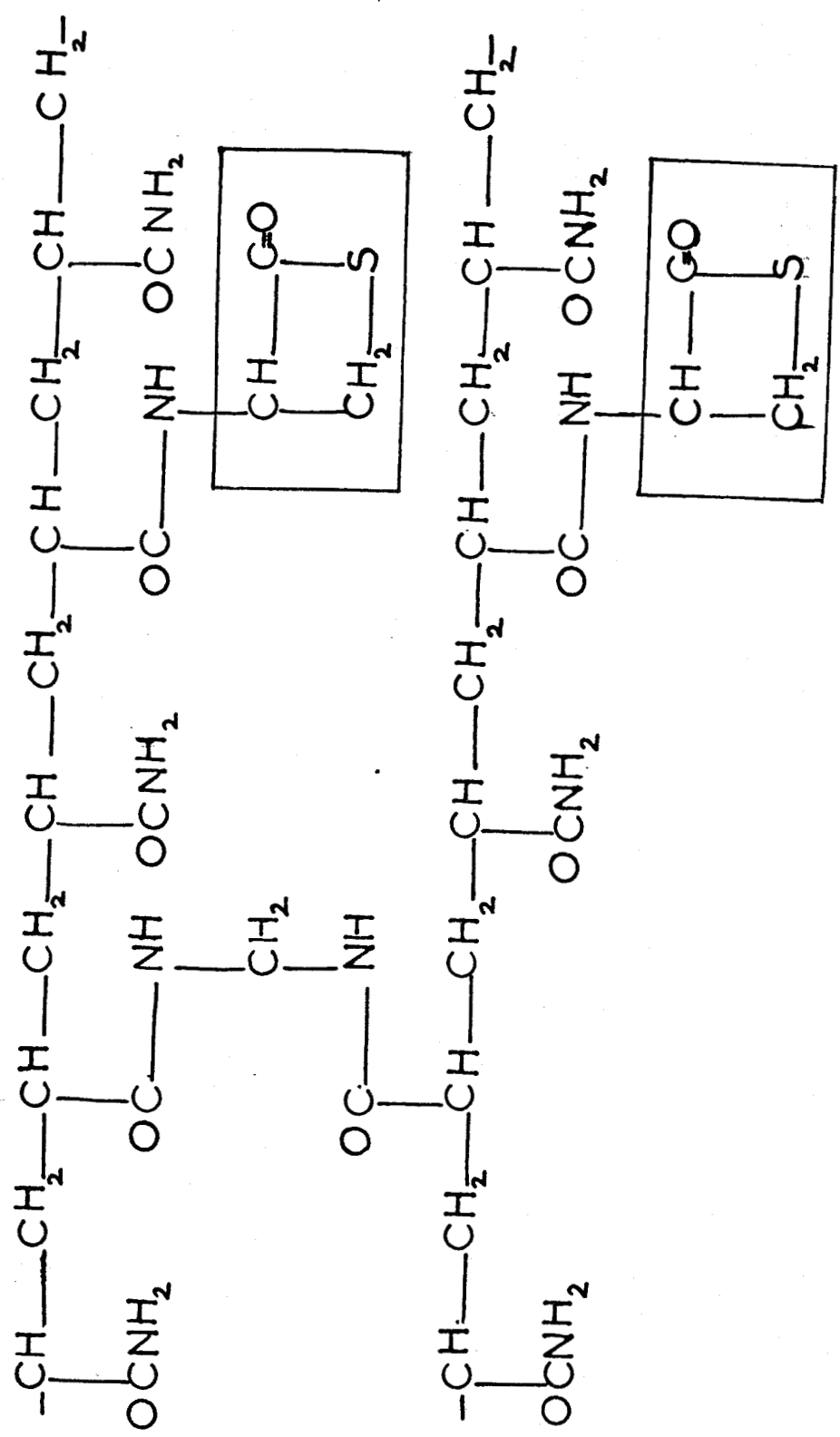


Figure 18 :

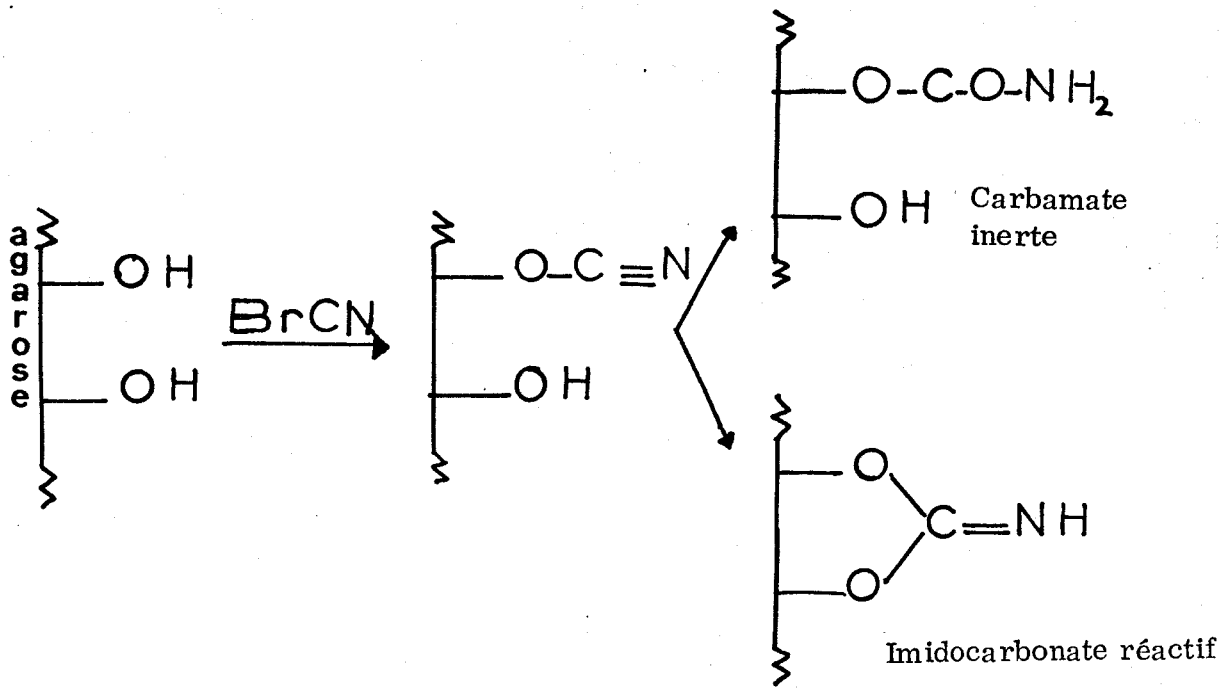
Structure de l'Enzacyl- Polythiolactone.







Activation :



Couplage :

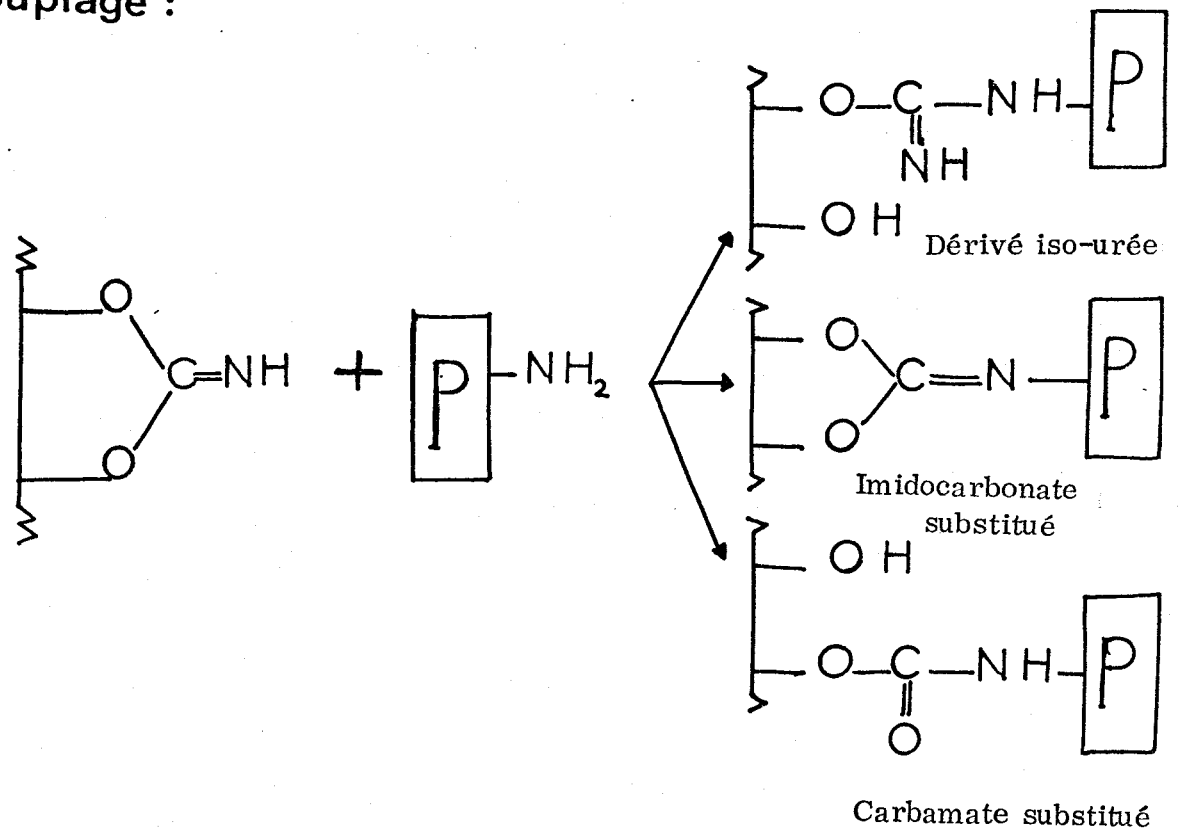


Figure 20 :



Mécanisme de l'activation d'un support d'agarose par le bromure de cyanogène et du couplage d'une protéine (P) (d'après AXEN et ERNBACK - 134 -).

Nous avons employé la méthode préconisée par CUATRECASAS (135) pour fixer des anticorps anti-lactotransferrine à du Sépharose 4 B. Nous décrirons successivement les différentes étapes de cette technique :

- (1) - Activation du Sépharose par le bromure de cyanogène
- (2) - Fixation de la protéine
- (3) - Contrôle de la substitution du support.

### $\beta$ - Mode opératoire

#### (1) - Activation

Sous une hotte bien ventilée, on ajoute à une suspension de 10 ml de Sépharose 4B dans 10 ml d'eau, 1,5 g de bromure de cyanogène. La réaction doit se faire à 20°C et à pH 11. De la soude 4 N est ajoutée, sous le contrôle d'un pH-stat, pour neutraliser le dégagement de l'acide bromhydrique produit par la condensation des ions cyanure sur les fonctions -OH du Sépharose. Au bout de 10 mn, la réaction est terminée ; on verse le Sépharose activé dans un petit Büchner contenant de la glace pilée.

#### (2) - Fixation

Avant de fixer la protéine, on lave le Sépharose par 150 ml de tampon borate 0,1 M pH 6,5 froid. On mélange ensuite la protéine, dissoute dans 10 ml de ce même tampon, au Sépharose lavé. Ce mélange est transféré dans un bécher pour pouvoir le mettre ensuite sous agitation, pendant toute une nuit à 4°C. Il est à noter que cette étape (lavage et fixation) doit être la plus courte possible ; il ne doit pas se dérouler plus de 90 sec. entre le moment où la réaction d'activation s'arrête, et celui où le Sépharose, mélangé à la protéine, est mis à 4°C. Le Sépharose est ensuite lavé sur Büchner, puis en colonne suivant le protocole de la p.92

#### (3) - Contrôle de substitution

CUATRECASAS (136) préconise un contrôle simple pour vérifier si la protéine additionnée au Sépharose a bien été fixée. A 0,5 ml d'une suspen-

sion de Sépharose dans de l'eau distillée, on ajoute 1 ml d'une solution saturée de borate et 3 gouttes d'une solution aqueuse de T N B S (2, 4, 6 trinitrobenzène sulfonate) à 3 p. 100. La coloration que prend le Sépharose après deux heures indique s'il est substitué par la protéine et quel est le type de fonction de cette protéine qui a réagi.

### c - Le Biogel activé par le glutaraldéhyde

#### $\alpha$ - Principe

Nous avons employé le procédé de TERNYNCK et AVRAMEAS (137). La première étape consiste en une activation du Biogel par le glutaraldéhyde. Une des fonctions aldéhydiques de cet agent bifonctionnel est liée par covalence aux billes de polyacrylamide. Sur l'autre pourra être fixée la protéine qu'on veut insolubiliser ainsi que le montre la figure 21 (p. 89).

#### $\beta$ - Mode opératoire

##### (1) - Activation

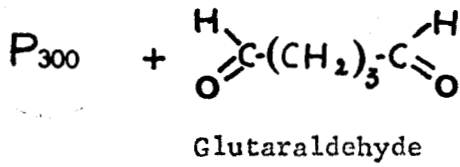
20 ml de Biogel P 300 hydraté et lavé sont suspendus dans 100 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 6 p. 100 dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7. Après un contact d'une nuit à 37° C, on lave abondamment le mélange avant d'y fixer la protéine.

##### (2) - Fixation de la protéine

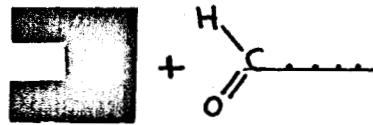
On ajoute par ml de gel activé 1 à 2 mg de protéine dissoute dans 1 ml de tampon phosphate. Après agitation à la température du laboratoire pendant une nuit, le gel est de nouveau lavé jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm des eaux de lavage soit inférieure à 0,05.

Pour éviter que les fonctions aldéhydiques du glutaraldéhyde qui ne seraient pas bloquées, puissent contracter des liaisons de covalence avec les protéines du mélange à purifier, on suspend le gel dans un volume de solution de lysine à 0,1 M et à pH 7,4, pendant 18 heures. Après lavage par du sérum physiologique, quelques ml de tampon glycolle-HCL

1. Activation

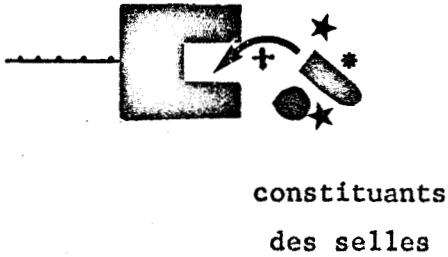


2. Insolubilisation

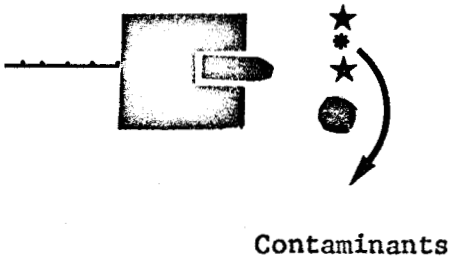


anticorps  
anti-LTF

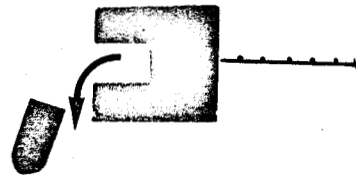
3. Fixation



4. Lavage



5. Elution



LTF

Figure 21 :

Schémas représentant le principe de l'isolement de la lactotransferrine (LTF) des selles, par chromatographie d'affinité sur des anticorps homologues insolubilisés par la méthode de TERNYNCK et AVRAMEAS (138).



0,2 M et pH 2,8 et d'une solution de phosphate disodique 0,2 M, le gel est prêt pour la chromatographie d'affinité.

#### IV - FIXATION ET ELUTION DE L'ANTIGENE

L'étape de fixation spécifique de l'antigène sur l'immuno-adsorbant est réalisée soit en "batch" (pour les protéines insolubilisées par le glutaraldéhyde et sur l'Enzacryl), soit en colonne (pour les protéines enchassées dans un gel de polyacrylamide ou insolubilisées par la méthode au bromure de cyanogène).

##### A - PROCÉDES EN "BATCH"

###### 1 - FIXATION

10 ml de tampon phosphate 0,2 M contenant l'antigène à fixer sont ajoutés à 200 mg ou 10 ml d'immuno-adsorbant. Le mélange est placé sous agitation douce pendant 30 mn à la température du laboratoire pour permettre la formation de liaisons entre l'antigène et l'anticorps insolubilisé.

###### 2 - LAVAGE

L'immuno-adsorbant est ensuite lavé par du tampon phosphate additionné de chlorure de sodium (4,25 g/l) afin d'éliminer tous les composés qui ne sont pas fixés spécifiquement aux anticorps. Toutes les eaux de lavage sont rassemblées, dialysées et lyophilisées ; elles constituent la fraction appelée LI (lavage immuno-adsorbant).

###### 3 - ELUTION

Pour détacher les antigènes de l'immuno-adsorbant on le met 5 mn sous agitation en présence de 5 ml de tampon glyco-colle-HCl 0,1 M pH 2,8. Une centrifugation de 15 mn à 10 000 t/mn permet de récupérer l'immuno-adsorbant qui est traité une seconde fois par le tampon d'éluion. Les deux éluats rassemblés et neutralisés sont passés sur un filtre millipore de 0,45 µ.

Dialysés et lyophilisés, ces éluats forment la fraction EI 1. Le deuxième éluat EI 2 est obtenu en lavant plusieurs fois l'immuno-adsorbant par 10 ml de la solution de chlorure de sodium tamponnée. Ce tampon permet de poursuivre l'élution sans dégrader l'immuno-adsorbant qui est de nouveau prêt à l'utilisation lorsque la densité optique du surnageant de l'ultime centrifugation est nulle à 280 nm.

## B - PROCÉDES EN COLONNE

### 1 - COLONNE DE POLYACRYLAMIDE

#### a - Fixation de l'antigène

La colonne (29 x 1 cm) de chromatographie, que nous avons montée avec l'immuno-adsorbant constitué du gel de polyacrylamide (p. 82) mélangé à 1 g de Biogel P2 (50 - 100 meshes), permet d'obtenir un débit de 35 ml/h. Pour réaliser la fixation, on injecte la solution contenant l'antigène à isoler au sommet de la colonne.

#### b - Lavage de l'immuno-adsorbant

On lave ensuite la colonne avec du tampon TRIS-NaCl 0,1 M pH 7,5 jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm des eaux de lavage soit inférieure à 0,01.

#### c - Elution de l'antigène

Un éluant préconisé par de SAUSSURE et DANDLIKER (139) est utilisé pour décrocher l'antigène ; il s'agit d'une solution 3 M de thiocyanate de sodium qui permet la dissociation du complexe antigène-anticorps à pH 6.

### 2 - COLONNE DE SEPHAROSE

#### a - Fixation de l'antigène

10 ml de Sépharose 4B substitué (p. 88) sont introduits dans une colonne de 15 x 1 cm. Le débit étant réglé à 16 ml/h, on lave le Sépharose

pendant une nuit avec du tampon borate 0,1 M pH 8,5 NaCl 1 M, pendant 24 h avec un tampon acétate pH 4,1 molaire en NaCl, puis avec de l'acétate de sodium 0,01 M. Après ce lavage intensif l'effluent doit avoir une densité optique de 0 à 280 nm. On peut alors ajouter l'antigène (dissous dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,5) au sommet de la colonne.

#### b - Lavage de l'immunoadsorbant

Le lavage par du tampon phosphate 0,1 M pH 6,5 est poursuivi jusqu'à ce que les eaux récupérées (LI) n'absorbent plus à 280 nm.

#### c - Elution de l'antigène

On élue les protéines fixées par une solution d'acide acétique à pH 3 ou par un tampon glyco-colle-HCl pH 2,8. Les éluats dialysés et lyophilisés constituent la fraction EI.

## RESULTATS

Nous exposerons successivement :

I - Les résultats concernant la préparation de fractions enrichies en anticorps.

II - L'étude critique des différentes techniques d'immuno-adsorption utilisées.

III - L'application de la chromatographie d'affinité à l'isolement de la "coprolactotransferrine".

### I - PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN ANTICORPS

#### A - PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

##### 1 - RENDEMENT PONDERAL

En suivant le protocole décrit p. 78 , nous obtenons, à partir de 50 ml de sérum anti-lactotransferrine (A<sub>1</sub>-LTF) deux fractions (C) et (S). La fraction (C) est constituée du précipité obtenu au tiers de saturation en sulfate d'ammonium, elle pèse 575 mg. La fraction (S) représente le surnageant.

##### 2 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

La fig. 22 (p. 94) représente les électrophorégrammes obtenus lorsqu'on fait migrer les fractions (C) et (S), diluées dans 50 ml d'eau, sur ban-



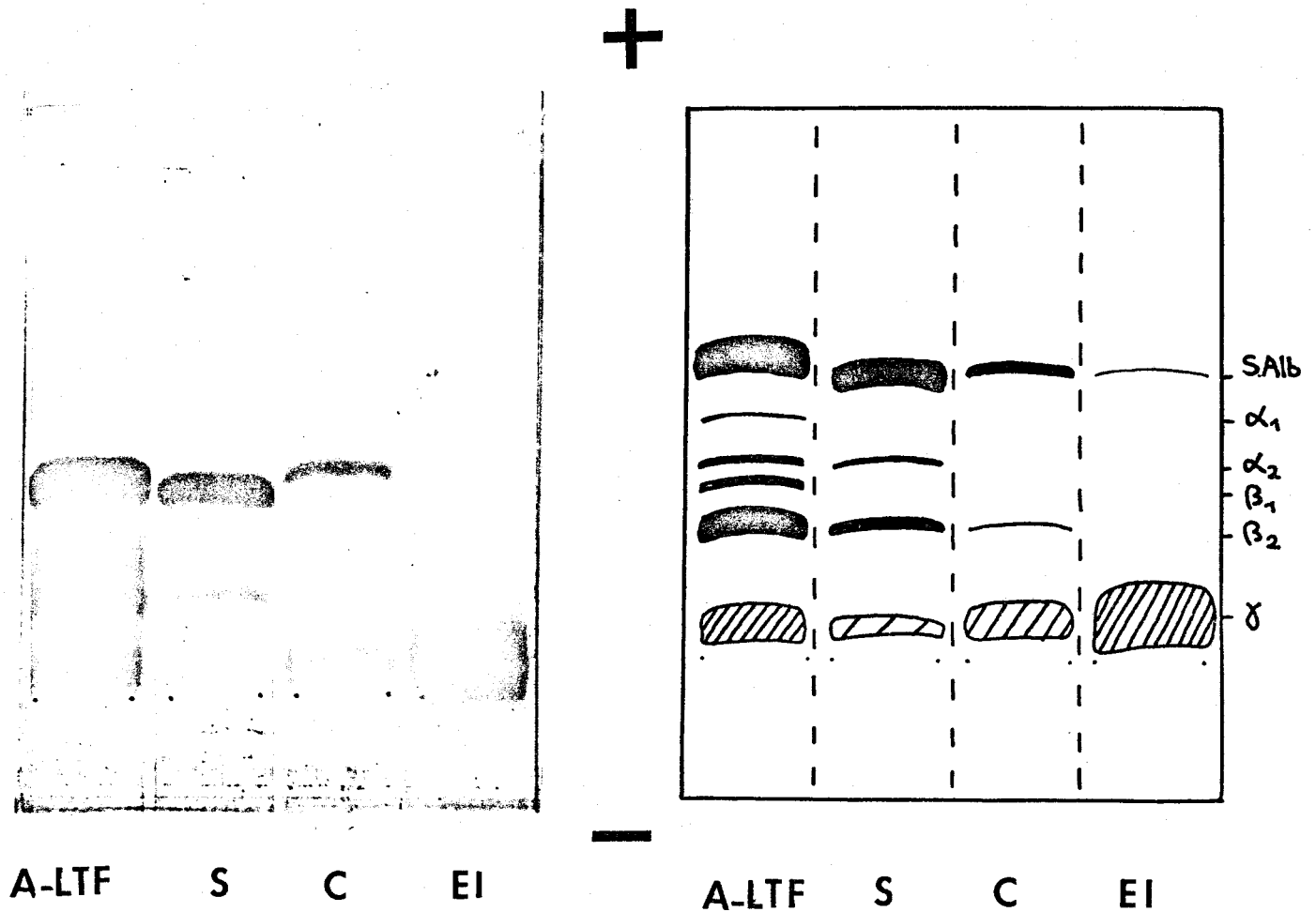


Figure 22 :

Electrophorèses sur acétate de cellulose (1 h 30, 7 V/cm, tampon Lauvell, pH 8,6)

- du sérum de lapin anti-lactotransferrine humaine (A-LTF)
- des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium  
(S = surnageant ; C = culot, p. 93)
- de la fraction isolée par immunoadsorption (EI, p. 97) à partir d'un sérum anti-lait de Femme.

de d'acétate de cellulose. On peut constater que la fraction (S) est très riche en albumine, elle ne contient pratiquement pas d'immunoglobulines. La fraction (C) est composée surtout de protéines migrant au niveau des immunoglobulines ; on trouve également un peu d'albumine et des  $\gamma_2$  globulines.

### 3 - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

#### a - Immunodiffusion double

Les fractions (C) et (S) sont mises à diffuser contre une solution de lactotransferrine. La fraction (C) donne un arc net, tandis que le surnageant de centrifugation (S) ne donne qu'un arc très faible. Le surnageant semble donc ne contenir que peu d'anticorps capables de précipiter avec la lactotransferrine.

#### b - Dosage des anticorps

La fig. 23 (p. 96) représente les courbes de précipitation obtenues, selon le procédé décrit p. 79, lorsque nous avons déterminé le titre du sérum A<sub>LTF</sub> et de la fraction (C). Nous voyons, sur la courbe A, que 1 ml d'antisérum peut précipiter au maximum 2,5 mg de LTF. La totalité de l'antisérum précipité au sulfate d'ammonium aurait donc pu s'unir à 125 mg de lactotransferrine.

La courbe B permet de dire que 5 mg de la fraction (C) peuvent précipiter 1 mg de lactotransferrine, les 575 mg de fraction (C) pourraient donc précipiter 115 mg de lactotransferrine.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que, par précipitation au sulfate d'ammonium, nous obtenons une fraction qui renferme pratiquement tous les anticorps anti-lactotransferrine.

### B - IMMUNOADSORPTION

#### 1 - RENDEMENT PONDERAL

En appliquant la méthode d'immuno-adsorption selon le procédé décrit

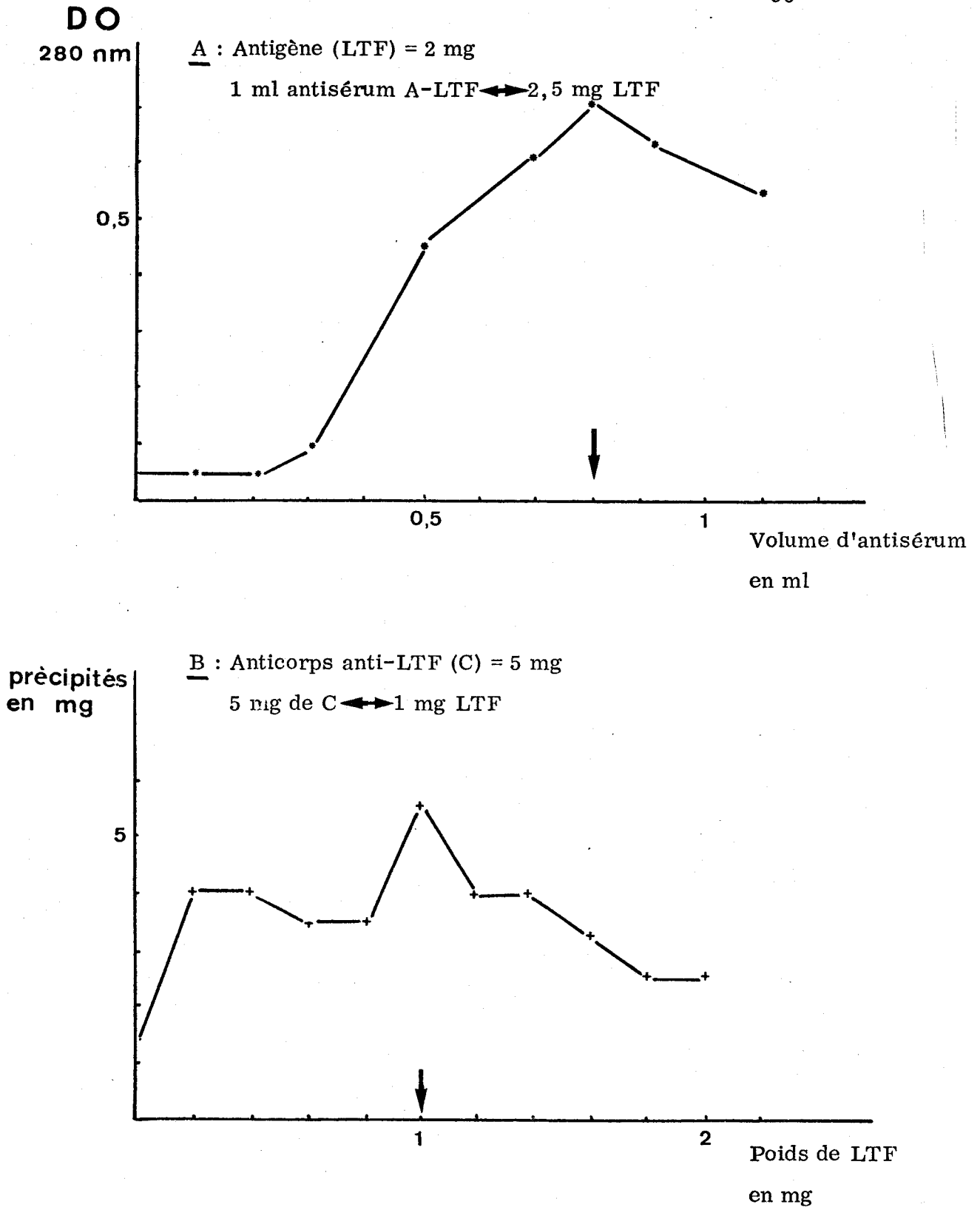


Figure 23 :



Dosage des anticorps

A - dans un sérum de lapin anti-lactotransferrine humaine (A -LTF)

B - dans une fraction obtenue par précipitation, au sulfate d'ammonium, du sérum A-LF (C : p. 93).

p. 78 , pour isoler les anticorps anti-LTF d'un antisérum anti-lait de Femme (AS-LF), nous avons obtenu deux fractions. L'une est appelée LI, elle représente la fraction d'antisérum qui ne s'est pas fixée sur la lactotransferrine insolubilisée ; l'autre dénommée EI est constituée du matériel fixé sur l'immunoabsorbant.

Nous avons récupéré 19 mg de fraction EI et 310 mg de fraction LI, à partir de 20 ml d'AS-LF.

## 2 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

La fraction EI est étudiée en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose. Elle est constituée en majeure partie de protéines migrant dans la zone des immunoglobulines et, comme on peut le voir sur la fig. 22 (p. 94) elle est beaucoup plus pure que la fraction (C) obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium. L'absence de lactotransferrine dans la fraction EI nous permet de dire que, lors de l'éluion des immunoglobulines, la lactotransferrine ne se décroche pas du Biogel ; l'immunoabsorbant peut donc être réutilisé.

## 3 - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

Les deux fractions LI et EI, dissoutes dans 20 ml de NaCl 0,15 M, sont analysées selon la technique de d'OUCHTERLONY ; elles donnent les images de précipitation schématisées sur la fig. 24 (p. 98).

En présence d'une solution de lactotransferrine à 1 p. 100, la fraction EI donne un arc de précipitation tandis que la solution LI ne donne aucun arc. Ceci indique que les eaux de lavage LI, contrairement à l'éluat EI, ne contiennent pas d'anticorps anti-lactotransferrine.

La fraction LI, mise à diffuser contre une solution de lactosérum à 7,5 p. 100, donne plusieurs arcs de précipitation dont aucun ne se raccorde avec l'arc spécifique de la lactotransferrine obtenu, dans les mêmes conditions, avec la fraction EI.

Nous pouvons donc dire que la fixation des anticorps anti-lactotrans-

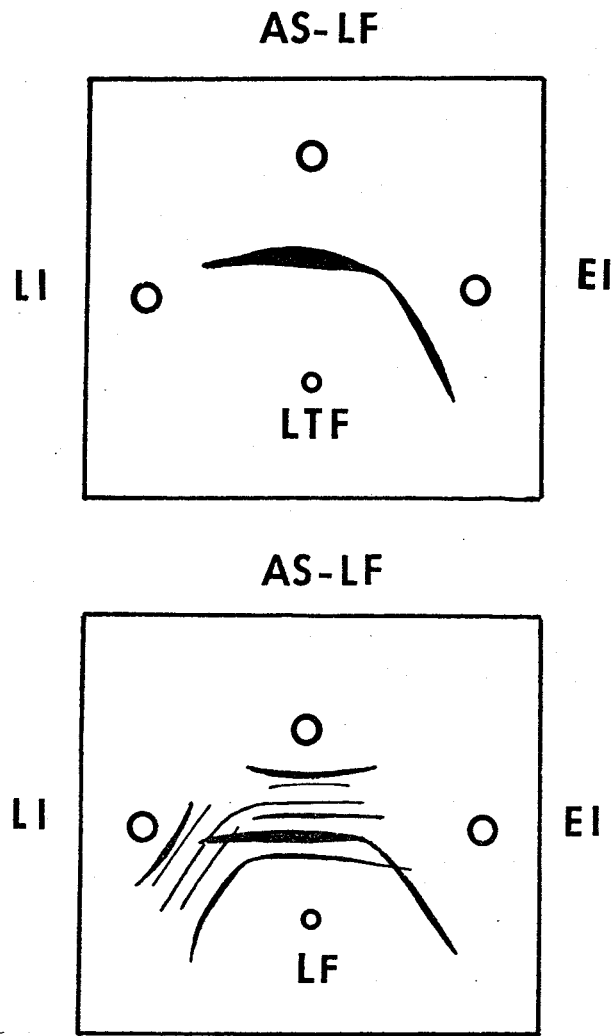


Figure 24 :

Etude, en immunodiffusion radiale, des eaux de lavage (LI) et de l'éluat (EI) lors du passage d'un sérum anti-lait de Femme (AS-LF) sur un immunoadsorbant constitué de lactotransferrine insolubilisé

LTF = lactotransferrine

LF = lactosérum de lait de Femme.



ferrine sur le Biogel est bien spécifique et totale puisque la fraction LI ne contient pas de lactotransferrine alors que dans la fraction EI on caractérise cette glycoprotéine.

### C - CONCLUSIONS

Les immunoadsorbants préparés par greffage de protéine sur le Biogel, par l'intermédiaire de glutaraldéhyde, sont satisfaisants car nous avons pu isoler des anticorps presque purs. Néanmoins, cette technique est assez longue, délicate, et, en outre, elle ne permet pas d'obtenir de grandes quantités d'anticorps; aussi, nous avons préféré utiliser les fractions (C) obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium, pour préparer nos immunoadsorbants.

## II - ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMUNOADSORPTION



Nous avons effectué une étude critique des différentes techniques de chromatographie d'affinité. Nous rapportons les résultats obtenus :

A - Lors de l'étape d'insolubilisation des anticorps,

B - Lors de la chromatographie d'affinité proprement dite, en étudiant la fixation de la lactotransferrine,

C - Lors de l'application à l'isolement de la "coprolactotransferrine" à partir de la fixation SG1 des selles.

### A - ETUDE DE L'INSOLUBILISATION DES ANTICORPS

#### 1 - ETUDE QUANTITATIVE

Des quantités de 30 à 250 mg d'immunoglobuline anti-lactotransferrine préparées selon le protocole décrit p. 78, sont insolubilisées par les 5 techniques décrites précédemment.

Dans le tableau IX (p. 101), nous avons rassemblé les pourcentages d'IgG insolubilisées par les différentes techniques. Ce pourcentage peut être facilement calculé en connaissant la quantité de fractions (C) qu'on utilise lors de l'insolubilisation et le poids des fractions SI (surnageant d'immunoabsorbant) qui restent en solution lors de cette étape.

Nous pouvons remarquer que l'insolubilisation sur l'Enzyacryl-Polythiolactone et sur le Biogel activé par le glutaraldéhyde est totale. Les trois autres méthodes utilisées nous donnent des taux d'insolubilisation voisins de 65 p. 100, lorsque nous respectons les proportions (quantité de protéines/quantité d'agent d'insolubilisation) préconisées par les auteurs.

## 2 - ETUDE QUALITATIVE

### a - Le gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide qui enchasse les anticorps peut être facilement dispersé. On le découpe en morceaux qu'on place dans une seringue, puis on le fait passer au travers d'une aiguille de 0,5 mm de diamètre.

### b - L'Enzaeryl-Polythiolactone

Le précipité insoluble obtenu par action de l'Enzyacryl-Polythiolactone forme des grains qui s'agglomèrent, durcissent et sont difficilement remis en suspension.

### c - Le Sépharose activé par le bromure de cyanogène

Cet immunoabsorbant se travaille aussi bien que le Sépharose. Il se prête à une chromatographie d'affinité en colonne.

### d - Les immunoabsorbants formés par action du glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde, employé seul, donne un gel qu'on doit réduire en fines particules à l'aide d'un homogénéiseur de POTTER.

TABLEAU IX

Essais de fixation de lactotransferrine pure (LTF) sur des immunoadsorbants préparés, selon différentes techniques,  
à partir de fractions riches en anticorps anti-lactotransferrine.

Méthode d'insolubilisation utilisée	Quantité d'anticorps anti-LTF utilisée (en mg)	Quantité d'anticorps insolubilisés (en mg)	Pourcentage d'anticorps insolubilisés (en p. 100)	Quantité de LTF ajoutée (en mg)	Quantité de LTF fixée et élue (en mg)	Quantité (en mg) d'anticorps utilisés pour isoler 1 mg de LTF
Enchassement dans un gel de polyacrylamide (p. 82)	30	19	62	15	2,5	7
Fixation sur l'Enzaeryl-Polythiolactone (p. 84)	30	30	100	15	4	7,5
Fixation sur du Sépharose activé au Br CN (p. 88)	150	100	66	50	1,5	66
Insolubilisation : - seul au glutaraldéhyde (p. 83)	250	180	72	50	7	25
Insolubilisation : - fixé au Biogel (p. 89)	30	29	100	15	5	5,7





Le Biogel P 300 activé par le glutaraldéhyde a l'avantage d'être très homogène et de ne nécessiter aucune préparation avant d'être utilisé pour l'immunoabsorption proprement dite.

## B - ETUDE DE L'AFFINITE DES IMMUNOABSORBANTS

Pour vérifier que les anticorps insolubilisés par différentes techniques sont encore capables de fixer la lactotransferrine de façon spécifique, nous avons étudié l'affinité de ces divers immunoabsorbants obtenus :

1 - En présence d'une solution de lactotransferrine pure isolée du lait ;

2 - En présence d'une solution de lactosérum humain.

### 1 - AFFINITE POUR LA LACTOTRANSFERRINE PURE

#### a - Etude qualitative

Dans la fig. 25 (p. 103) nous donnons, à titre d'exemple, la courbe obtenue en mesurant la DO à 280 nm des différentes fractions obtenues lors du lavage et de l'élution d'un immunoabsorbant. Cet immunoabsorbant, formé d'Enzacryl-Polythiolactone substitué avec des anticorps anti-lactotransferrine, a été mis en contact pendant 30 mn avec une solution de lactotransferrine pure pour permettre la fixation de l'antigène homologue. Nous voyons qu'on peut séparer deux fractions ; l'une, appelée LI car elle est constituée des eaux de lavage, l'autre EI car elle est éluee de l'immunoabsorbant par passage d'un tampon acide.

Pour les 5 types d'immunoabsorbants étudiés, le profil d'élution, après contact avec une solution de lactotransferrine pure, permet de séparer deux fractions : LI et EI, mais l'importance relative des deux pics est différente. Nous verrons, dans le paragraphe consacré à l'étude quantitative, qu'il y a en effet, variation de la quantité de lactotransferrine fixée, selon la nature de l'immunoabsorbant utilisé.

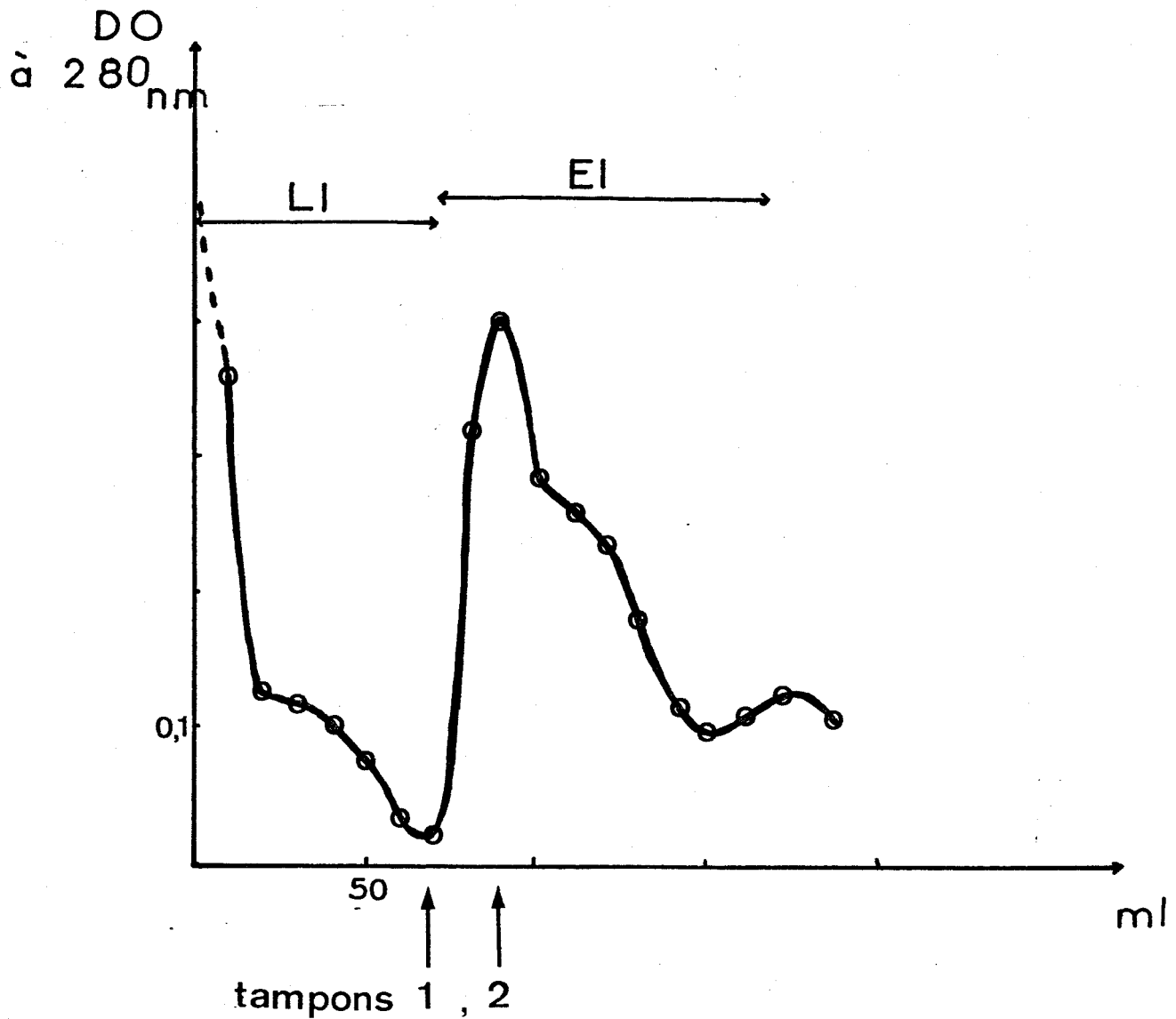


Figure 25 :

Profil d'éluat d'un immunoadsorbant, formé d'Enzacryl-Polythiolactone substitué par des anticorps anti-lactotransferrine, après contact avec une solution de lactotransferrine pure :

LI : eaux de lavage de l'immunoadsorbant

EI : éluat de l'immunoadsorbant

Tampon 1 : tampon de glycocolle-HCl pH 2,8

Tampon 2 : tampon de phosphate additionné de Na Cl (voir p. 90).

### b - Etude quantitative

Nous avons rassemblé dans la deuxième partie du tableau IX (p. 101) les poids de lactotransferrine mis en contact avec les divers immunoabsorbants et de lactotransferrine fixée et éluée (fractions EI). Nous avons calculé également, la quantité d'anticorps utilisés pour isoler 1 mg de lactotransferrine en faisant le rapport entre le poids de la fraction EI et la quantité d'anticorps insolubilisée pour préparer les différents immunoabsorbants. Ce rapport doit en effet nous permettre de préciser la valeur des immunoabsorbants puisque la méthode d'insolubilisation et d'immunoabsorption idéale serait celle qui permettrait d'isoler 1 mg de lactotransferrine à partir de 5 mg d'anticorps (C) insolubilisés (voir p. 96 et 97).

### $\alpha$ - Enchassement dans un gel de polyacrylamide

Cette méthode d'insolubilisation chimique nous a permis d'avoir un immunoabsorbant valable, puisque à l'aide de 19 mg de fraction (C) insolubilisée nous avons pu isoler 2,5 mg de lactotransferrine.

### $\beta$ - Fixation sur l'Enzacryl-Polythiolactone

L'immunoabsorbant obtenu par cette technique a sensiblement la même affinité pour la lactotransferrine pure que les anticorps enchassés dans du polyacrylamide. En effet, il permet d'isoler 1 mg de lactotransferrine à partir de 7,5 mg d'anticorps insolubilisés.

### $\gamma$ - Fixation sur du Sépharose activé par le Br CN

Bien que nous ayons fait plusieurs essais d'insolubilisation, et utilisé différentes conditions de fixation et d'éluion, c'est avec ce type d'immunoabsorbant que nous avons eu les plus mauvais résultats. En effet, nous avons utilisé, par cette méthode, 100 mg d'anticorps pour ne récupérer que 1,5 mg de lactotransferrine. Lors de l'insolubilisation des anticorps, il y a certainement eu blocage des sites F-ab sur lesquels devrait se fixer la lactotransferrine.

### § - Insolubilisation par le glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde employé seul nous donne un immunoadsorbant d'activité moyenne. En effet, nous n'avons pu par cette méthode isoler, en moyenne, que 1 mg de lactotransferrine, à partir de 25 mg de fractions (C). Les anticorps réticulés perdent donc les 4/5 de leur capacité de fixer la lactotransferrine. La plupart de leurs sites F-ab sont, soit impliqués dans les liaisons avec le glutaraldéhyde, soit masqués à la suite des changements de configuration spatiale entraînés par la réticulation. En outre, les différentes préparations d'immuno-adsorbants que nous avons obtenues par réticulation des anticorps ne nous ont pas donné des résultats reproductibles. Nous pensons que cela peut être dû au fait que, lors de nos premiers essais, nous n'avons pas vérifié l'état de conservation de la solution de glutaraldéhyde utilisée pour l'insolubilisation (voir p. 80 et 81).

Le Biogel P 300 activé par le glutaraldéhyde nous a donné des résultats très satisfaisants. Comme nous le voyons sur le tableau IX (p. 101), nous avons pu isoler, grâce à cet immunoadsorbant, 1 mg de lactotransferrine en n'utilisant que 5,7 mg de fraction (C) enrichie en anticorps. Il est à noter que le glutaraldéhyde utilisé lors de cette manipulation a été débarrassé de nombreuses impuretés par passage sur charbon actif.

### 2 - AFFINITE POUR LA LACTOTRANSFERRINE DU LACTOSERUM

Cette affinité des anticorps insolubilisés pour la lactotransferrine du lactosérum a été étudiée en présence de l'immunoadsorbant réticulé par le glutaraldéhyde.

Après avoir mis en présence de l'immunoadsorbant formé de 180 mg d'anticorps, 120 mg de lactosérum renfermant environ 35 mg de lactotransferrine, nous avons obtenu deux fractions appelées LI et EI. L'étude de ces fractions est réalisée par immunoélectrophorèse et par immunodiffusion radiale simple.

#### a - La fraction LI

Cette fraction constituée des eaux de lavage, contient toutes les protéines du lactosérum et révèle en particulier, l'arc de la lactotransferrine (fig. 26 - p. 107).

En immunodiffusion radiale simple, elle donne un anneau de précipitation de diamètre inférieur à celui que forme la même quantité de lactosérum. Il y a donc eu perte de lactotransferrine lors du contact avec l'immunoabsorbant, donc fixation.

#### b - La fraction EI

La fraction EI analysée contre un sérum anti-lait (AS-LF) ne donne qu'un seul arc, comme nous pouvons le voir sur la fig. 26 (p. 107) : c'est l'arc de la lactotransferrine.

Par la méthode de MANCINI, la fraction EI donne, à la concentration de 2 p. 100, un anneau de précipitation de même diamètre qu'une solution de lactotransferrine pure à la même concentration. La fraction EI est donc constituée de 100 p. 100 de lactotransferrine.

Ces résultats nous permettent de dire qu'il y a eu fixation spécifique de la lactotransferrine sur les anticorps homologues insolubilisés par le glutaraldéhyde.

#### C - CONCLUSIONS

Les résultats obtenus lors de l'étude critique de l'insolubilisation des anticorps et de l'affinité des immunoabsorbants obtenus, nous ont amenée à abandonner la méthode au bromure de cyanogène, qui insolubilise très bien les anticorps, mais les rend incapables de fixer la lactotransferrine même pure. Par contre, les essais effectués avec le gel de polyacrylamide, l'Enzacryl-Polythiolactone et surtout avec le glutaraldéhyde (qui n'altère en rien la spécificité des anticorps), nous ont incitée à appliquer ces diverses techniques à l'isolement de la "coprolactotransferrine".

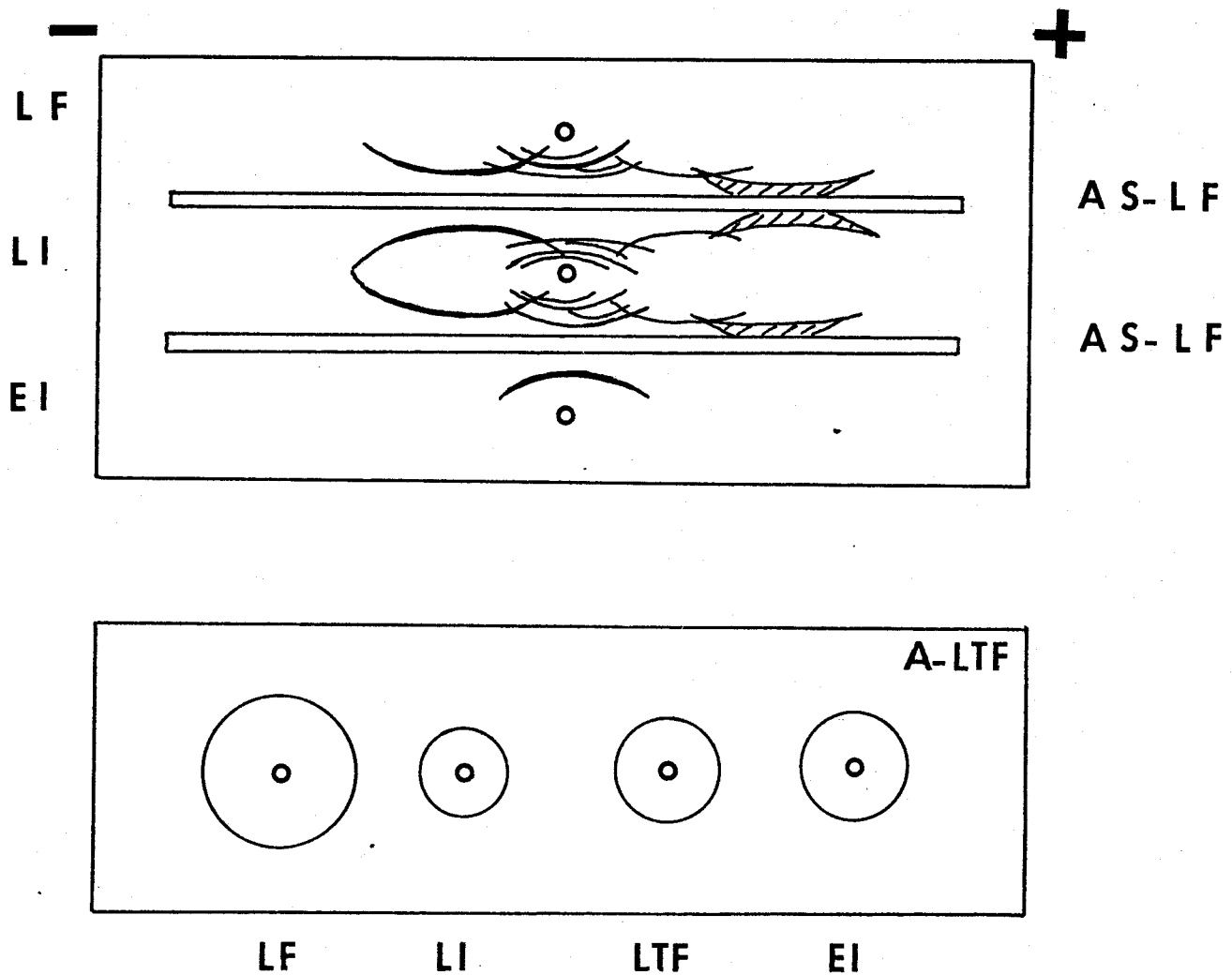


Figure 26 :

Etude immunologique des fractions LI et EI isolées, par immunoadsorption sur des anticorps anti-lactotransferrine insolubilisés par le glutaraldéhyde, à partir de lactosérum du lait de Femme (LF)

A - Immunoélectrophorèse contre le sérum anti-lactosérum du lait de Femme (AS - LF)

B - Immunodiffusion radiale simple de la fraction LI et du lactosérum à 10 p. 100 et de la fraction EI et de la lactotransferrine à 2 p. 100.

### III - APPLICATION A L'ISOLEMENT DE LA COPROLACTOTRANSFERRINE

#### A - ANTICORPS ENCHASSES DANS UN GEL DE POLYACRYLAMIDE

50 mg de fraction SG1 (premier pic obtenu lors du passage de selles traitées, sur du Séphadex SG150) sont injectés au sommet d'une colonne contenant 19 mg d'anticorps. Les mesures de D. O. des différentes fractions collectées permettent de repérer la fin du passage de la fraction LI (non fixée) et, de mettre en route l'élution par le thiocyanate qui décroche la fraction EI; comme nous le voyons sur le tableau X (p. 109), la fraction EI une fois lyophilisée ne nous donne que 1 mg de matériel. Il faut donc, par cette technique, utiliser 19 mg d'anticorps pour isoler 1 mg de fraction EI. Ce résultat, comparé à celui obtenu lors de la fixation de lactotransferrine pure, nous fait penser que les anticorps enchassés dans le polyacrylamide ont moins d'affinité pour la "coprolactotransferrine" des fractions SG que pour la lactotransferrine pure isolée du lait. Néanmoins, à partir d'une plus grande quantité d'anticorps, cette méthode d'isolement pourrait peut-être fournir des quantités de fraction EI suffisantes pour l'étude de la pureté en "coprolactotransferrine" que nous n'avons pu effectuer.

#### B - ANTICORPS INSOLUBILISES SUR L'ENZACRYL-POLYTHIOLACTONE

50 mg de fraction SG1 sont mis en présence de 30 mg d'anticorps insolubilisés par l'Enzacryl-Polythiolactone. Comme nous le voyons p. 109, cet immunoabsorbant qui s'était avéré capable de fixer 5 mg de lactotransferrine pure, ne fixe pas les constituants des selles qui précipitent, en milieu gélosé, avec les anticorps natifs. L'inexistence de fraction EI est bien due à une absence de fixation et non pas à une mauvaise élution car les eaux de lavage LI, analysées en immunodiffusion radiale, donnent le même anneau de précipitation que la fraction SG1 de départ.

TABLEAU X

Essai d'isolement de la "coprolactotransferrine" par immunoabsorption.

Méthode d'insolubilisation utilisée	Quantité d'anticorps insolubilisée (en mg)	Quantité de fraction SG ajoutée (en mg)	Quantité de fraction EI fixée et éluée (en mg)	Quantité d'anticorps utilisée pour isoler 1 mg de EI (en mg)
Enchassement dans un gel de polyacrylamide (p. 82)	19	50	1	19
Fixation sur l'Enzacryl-Polythiolactone (p. 84)	30	50	0	
Insolubilisation au glutaraldéhyde				
- seul (p. 83)	180	150	6	30
- fixé au Biogél (p. 89)	120	500	19	6





C - ANTICORPS INSOLUBILISES PAR LE GLUTARALDEHYDE

1 - ANTICORPS RETICULES PAR LE GLUTARALDEHYDE

a - Séparation des fractions LI et EI

L'immunoabsorbant obtenu en insolubilisant 200 mg d'anticorps, est mis en présence de 150 mg de fraction SG1. Les eaux de lavage, dialysées et lyophilisées, constituent la fraction LI; les éluats obtenus avec le tampon glycofolle-HCl pH 2,8 et avec le tampon PBS (p. 91) forment la fraction EI. La figure 27 A (p. 111) représente la courbe obtenue en notant la D. O. à 280 nm des différentes fractions recueillies lors du lavage et de l'éluion.

b - Analyse immunologique des fractions LI et EI

La fraction LI, en solution à 10 p. 100, ne donne pas d'arc de précipitation contre le sérum AS-LTF avec la technique d'OUCHTERLONY. Comme la fraction SG1, à la même concentration, donne deux arcs nets, on peut dire qu'il y a eu fixation de la "coprolactotransferrine" sur l'immunoabsorbant (fig. 27 B - p. 111).

La fraction EI donne 6 mg de poudre. L'analyse de cette fraction en immunodiffusion radiale double nous montre que la "coprolactotransferrine" est éluee de l'immunoabsorbant par passage du tampon glycofolle-HCl 0,1 M pH 2,8.

c - Bilan

Nous pouvons donc dire que, grâce à cet immunoabsorbant, nous avons éliminé 96 p. 100 de fraction SG1 ne contenant pas de trace décelable de "coprolactotransferrine". La fraction EI est donc sûrement constituée uniquement de "coprolactotransferrine" puisque le taux de lactotransferrine dans la fraction SG1 de départ se situe aux alentours de 4 p. 100. Néanmoins cette méthode a le désavantage de nécessiter beaucoup d'anticorps anti-lactotransferrine. Nous voyons en effet sur le tableau X (p. 109) qu'il faut 30 mg de fraction enrichie en anticorps pour isoler 1 mg de "coprolactotransferrine".

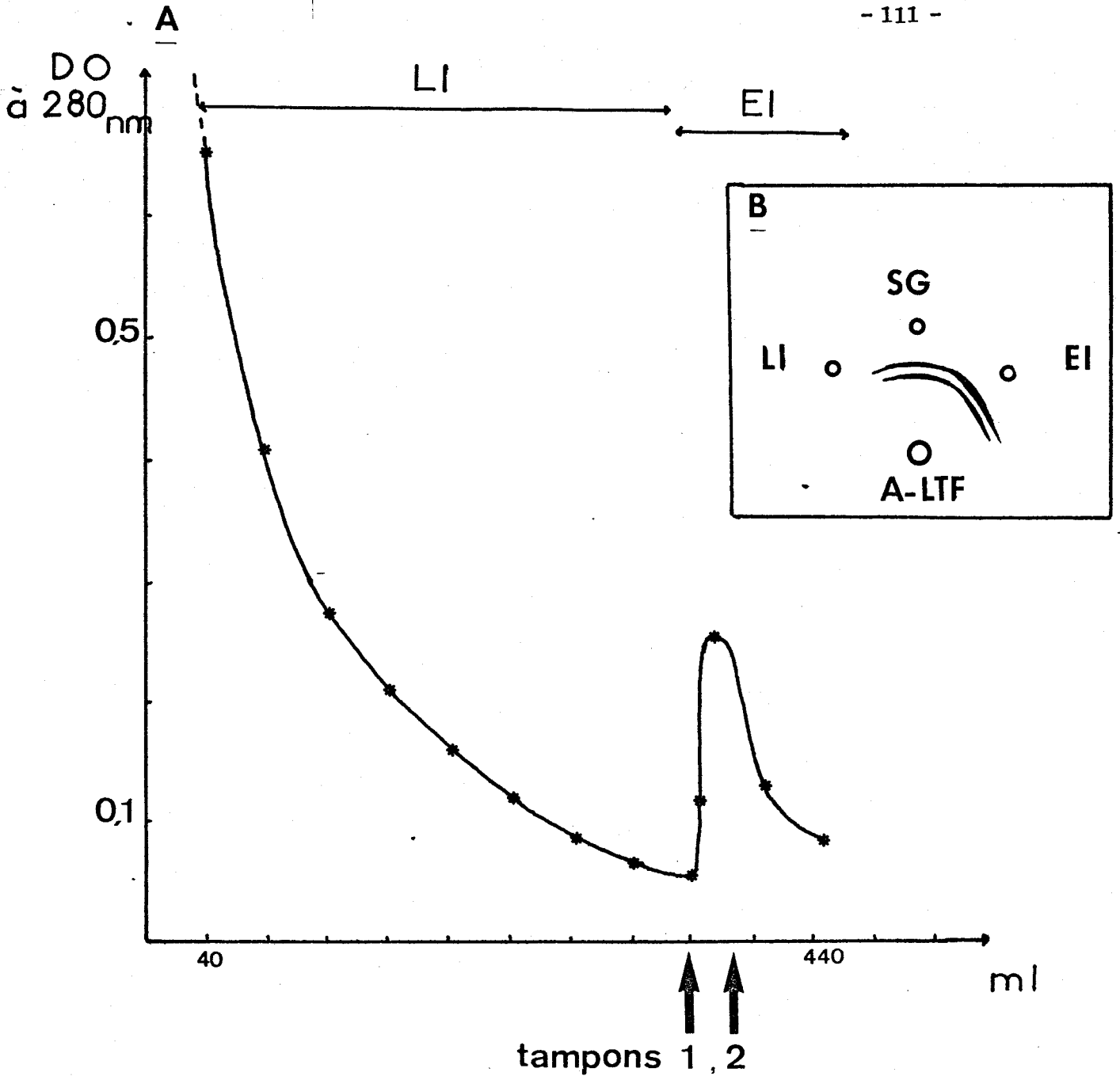


Figure 27 :

A : Profil d'élution d'un immunoadsorbant formé d'anticorps anti-lactotransferrine réticulés par le glutaraldéhyde, après contact avec la fraction SG1 des selles de nourrissons alimentés au lait de Femme (tampons 1, 2 voir p. 90 - 91).

B : Analyse en immunodiffusion double, contre un sérum anti-lactotransferrine (A - LTF), des fractions SG1 et LI à 10 p. 100 et de l'éluat EI à 1 p. 100.



## 2 - ANTICORPS GREFFES SUR DU BIOGEL ACTIVE PAR LE GLUTARALDEHYDE

### a - Séparation des fractions LI et EI.

120 mg d'anticorps insolubles sur du biogel P 300 activé selon la technique décrite p. 89, ont été répartis en quatre fractions. Chacune de ces fractions, mise en contact avec 125 mg de fraction SG1, est lavée soigneusement par centrifugation, puis éluée par le tampon glycolle-HCl 0,1 M pH 2,8. Les eaux de lavage sont rassemblées, elles forment la fraction LI, les éluats passés sur membrane millipore et lyophilisés, constituent la fraction EI.

### b - Analyse immunologique des fractions

Les fractions LI et EI analysées en immunodiffusion radiale double et simple, donnent les mêmes résultats que les fractions séparées sur l'immunoabsorbant formé d'anticorps réticulés par le glutaraldéhyde : il n'y a pas de trace de "coprolactotransferrine" dans la fraction LI, c'est la fraction EI qui contient les constituants des selles capables de précipiter, en milieu gélosé, avec les anticorps anti-lactotransferrine.

### c - Bilan

A partir de 120 mg d'anticorps et de 500 mg de fraction SG1, nous avons isolé 19 mg de fraction EI. La quantité d'anticorps utilisée pour isoler 1 mg de cette fraction est donc, dans ce cas, de 6 mg ; elle est 5 fois moindre que la quantité d'anticorps nécessaire si on utilise le glutaraldéhyde seul, comme nous pouvons le voir sur le tableau X (p. 109).

## CONCLUSIONS

L'étude critique de différentes techniques d'insolubilisation des anticorps anti-lactotransferrine et de l'affinité de ces immunoadsorbants pour la lactotransferrine nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

1 - La précipitation par le sulfate d'ammonium, d'un sérum anti-lactotransferrine est une méthode satisfaisante pour préparer des anticorps devant servir d'immunoadsorbants.

2 - La méthode physique d'insolubilisation par envasement dans un gel de polyacrylamide a permis d'isoler de petites quantités de lactotransferrine. Les résultats obtenus lors de l'isolement de la "coprolactotransferrine" devraient être confirmés et pourraient être intéressants, à condition d'insolubiliser une plus grande quantité d'anticorps.

3 - La méthode de greffage de protéines sur du Sépharose activé par le bromure de cyanogène, ne se prête pas à la préparation d'immunoadsorbants formés d'anticorps anti-lactotransferrine. En effet, les anticorps sont bien insolubles à 100 p. 100 par cette technique, mais ils perdent la propriété de fixer la lactotransferrine.

4 - La méthode d'insolubilisation par greffage sur l'Enzacryl-Polythiolactone a donné des résultats satisfaisants lors des essais avec la lactotransferrine pure, mais les anticorps insolubilisés par cette technique ne fixent pas la "coprolactotransferrine".

5 - La méthode d'insolubilisation par le glutaraldéhyde nous donne un immunoadsorbant moyen car les anticorps réticulés qu'on obtient ont perdu les 4/5 de leur capacité de fixer la lactotransferrine. Néanmoins, cette

méthode simple et rapide, nous a permis d'obtenir des fractions pures de "coprolactotransferrine".

6 - Le mode d'insolubilisation le meilleur est le greffage des anticorps sur du Biogel activé par le glutaraldéhyde, puisqu'il permet d'obtenir 16,6 mg de "coprolactotransferrine" à partir de 100 mg de fraction riche en anticorps alors que le rendement idéal serait de 20 mg. Les anticorps insolubilisés par cette méthode gardent toute leur capacité de fixer la lactotransferrine et se lient également avec la "coprolactotransferrine".

IIIème PARTIE

---

ETUDE DE LA "COPROLACTOTRANSFERRINE"

La chromatographie d'affinité nous a permis d'isoler de la "coprolactotransferrine". L'étude de cette fraction (EI) s'est orientée dans deux voies :

A - L'étude immunologique de la "coprolactotransferrine" et notamment sa comparaison avec les constituants mis en évidence après hydrolyse trypsique de la lactotransferrine du lait.

B - L'étude de la possibilité de fixation du fer sur la "coprolactotransferrine" car cette propriété est très importante pour expliquer la protection intestinale et l'apport du fer au nourrisson.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

A - LA "COPROLACTOTRANSFERRINE"

La "coprolactotransferrine" que nous avons étudiée par des techniques immunologiques a été isolée par immunoabsorption sur des anticorps anti-lactotransferrine insolubilisés par le glutaraldéhyde (p.110)

Les expériences sur la fixation du fer ont été effectuées à partir de "coprolactotransferrine" (EI), mais aussi sur des fractions de selles de nourrissons provenant d'un simple traitement (S, p. 37) ou d'un passage sur Séphadex SG 150 (SG 1, p. 46).

B - HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE LACTOTRANSFERRINE

Nous avons préparé des hydrolysats tryptiques de lactotransferrine native afin de les comparer, par méthodes immunologiques, à la "coprolactotransferrine".

La lactotransferrine est isolée du lait de Femme par le procédé de MONTREUIL et al. (140) modifié par DESCAMPS (141).

Pour hydrolyser cette lactotransferrine, nous avons appliqué le protocole de HIRS, MOORE et STEIN (142) : à 160 mg de lactotransferrine native, en solution dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 7,8, on ajoute de la trypsine incubée une demi-heure dans de l'acétate de calcium 0,01 M (rapport enzyme/substrat:1/50). Le mélange est ajusté à pH 8,5 avec de la soude 0,1 N, puis maintenu à 37°C pendant 24 heures. On



ajoute de l'enzyme après 4 h, 8 h et 12 h d'hydrolyse. Des aliquotes de 5 ml sont prélevées au temps 0, puis après 4, 8, 12 et 24 h d'hydrolyse. Chaque fraction est ensuite lyophilisée et appelée L4, L8, L12 et L24.

## II - METHODES

### A - ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA "COPROLACTOTRANSFERRINE"

Nous avons employé les méthodes immunologiques précédemment décrites : immunoélectrophorèse classique (p. 41) et immunodiffusion double (p. 40). Des solutions à 2 p. 100 de "coprolactotransferrine" sont déposées ; les hydrolysats tryptiques de la lactotransferrine sont analysés en solution à 5 p. 100.

### B - MISE EN EVIDENCE DE LA FIXATION DU FER.

Nous avons utilisé deux types de techniques pour étudier la fixation du fer sur la "coprolactotransferrine" :

1 - Utilisation de fer radioactif suivie de détection des composés radioactifs par comptage en radioactivité ou par auto-radiographie.

2 - Détermination de la variation d'absorbance à 460 nm après addition de sels ferriques.

#### 1 - EMPLOI DE FER RADIOACTIF

##### a - Principe

La lactotransferrine est une métalloprotéine, elle possède un site de fixation spécifique des ions ferriques. Cette glycoprotéine, mise en présence de chlorure ferrique marqué au  $^{59}\text{Fe}$  ou au  $^{55}\text{Fe}$ , devient radioactive. Il suffit donc, pour déterminer si la lactotransferrine des selles fixe le fer, de rechercher si elle est devenue radioactive après la fixation du fer provenant de  $\text{FeCl}_3$ .

### b- Mode opératoire

Nous mentionnerons tout d'abord les conditions employées pour fixer le fer, puis nous décrirons les procédés utilisés en vue de repérer si la "coprolactotransferrine" est radioactive.

#### $\alpha$ - Fixation du fer

Des fractions SF, SG 1 ou EI de selles de nourrissons sont mises en suspension dans une solution de pH 8,6 0,1 M en citrate de sodium et en bicarbonate de sodium ; ces suspensions sont centrifugées à basse vitesse afin d'éliminer le matériel insoluble. Les surnageants sont additionnés de chlorure ferrique ( $^{55}\text{Fe Cl}_3$  ou  $^{59}\text{Fe Cl}_3$ )<sup>(x)</sup>. Le volume de la solution radioactive à ajouter aux fractions contenant un certain pourcentage en "coprolactotransferrine" est calculé en admettant que le composé fixe autant de  $\text{Fe}^{+++}$  que la lactotransferrine (soit 1,47  $\mu\text{g}$  de fer/mg de protéide).

#### $\beta$ - Détection par comptage de radioactivité

Les fractions SF ou SG1 additionnées de fer radioactif sont soumises à des électrophorèses sur acétate de cellulose, dans les conditions mentionnées p. 39. Après électrophorèse les bandes de cellogel sont partagées en deux dans le sens de la longueur. Une des parties est révélée à l'amidoschwarz tandis que l'autre est soigneusement découpée, sur toute sa longueur, en languettes de 0,5 cm de hauteur. On immerge ces languettes dans des piluliers contenant du liquide scintillant. La radioactivité de chaque pilulier est mesurée grâce à un compteur en scintillation liquide (NUCLEAR - CHICAGO - type Unilux). On reporte sur une courbe le nombre de coups de chaque languette en fonction de la place qu'elle occupait sur la bande initiale (exprimée en cm à partir de l'extrémité cathodique).

#### $\gamma$ - Détection par autoradiographie

Les différentes fractions contenant de la "coprolactotransferrine" additionnées de fer radioactif sont soumises à des électrophorèses, ou à des immunodiffusions sur différents sup-

---

(x)  $^{59}\text{Fe Cl}_3$  dans citrate de Na à 1 p. 100 0,66 mc/ml = CEA  
 $^{55}\text{Fe Cl}_3$  en solution dans tampon citrate = CEA

ports (acétate de cellulose pour les fractions SF, gélose et papier pour les fractions SG et EI). Les supports sont ensuite mis en contact étroit avec du papier sensible (Kodak X-Ray). Après 2 à 3 semaines d'exposition, le film est révélé ; la comparaison des images obtenues avec le film et le support coloré à l'amidoschwarz permet de localiser les protéines radioactives.

## 2 - METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE

### a - Principe

Une solution de lactotransferrine, mise en présence d'ions ferriques, prend une couleur rose saumon, elle absorbe la lumière visible avec un maximum d'absorption se situant à 460 nm.

### b - Mode opératoire

On mesure l'absorbance à 460 nm d'une solution à 1 p. 100 de fraction EI ("coprolactotransferrine") dans du tampon citrate-bicarbonate. Après avoir ajouté 5 à 10  $\mu$ l de solution de chlorure ferrique à 0,2 p. 100, on laisse la coloration se développer toute une nuit. Ensuite, on note l'augmentation d'absorbance de la solution à 460 nm.

Afin de voir si la "coprolactotransferrine" perd également son fer en milieu acide, les solutions sont ensuite additionnées d'acide formique jusqu'à pH 2.

RESULTATS

Nous envisagerons tout d'abord l'étude immunologique de la "copro-lactotransferrine" puis, nous aborderons le problème de la fixation du fer.

I - ETUDE IMMUNOLOGIQUE

A - CONFIRMATION DES RESULTATS PRECEDEMMENT OBTENUS AVEC LES FRACTIONS SF ET SG1

1 - IMMUNOELECTROPHORESE

La fraction EI, en solution à 2 p. 100, soumise à des immunoélectrophorèses en gélose contre les antisérums AS-LF et A-LTF, donne deux arcs. L'un se forme près du puits de dépôt, au niveau de la lactotransferrine pure, l'autre se forme plus près de l'anode, comme nous pouvons le voir sur la fig. 28 (p. 122).

2 - IMMUNODIFFUSION DOUBLE

L'immunodiffusion, réalisée selon la technique d'OUCHTERLONY, confirme les résultats obtenus avec les fractions SG1. La "coprolactotransferrine" forme deux arcs avec l'antisérum A-LTF. L'un des arcs se raccorde avec celui de la lactotransferrine, il y a réaction d'identité totale ; l'autre arc ne montre qu'une identité partielle avec la lactotransferrine (voir p. 57 et fig. 28 - p. 122).

B - RAPPORT ENTRE LACTOTRANSFERRINE DEGRADEE ET "COPRO-LACTOTRANSFERRINE"

Nous donnerons tout d'abord les résultats obtenus avec les hydroly-

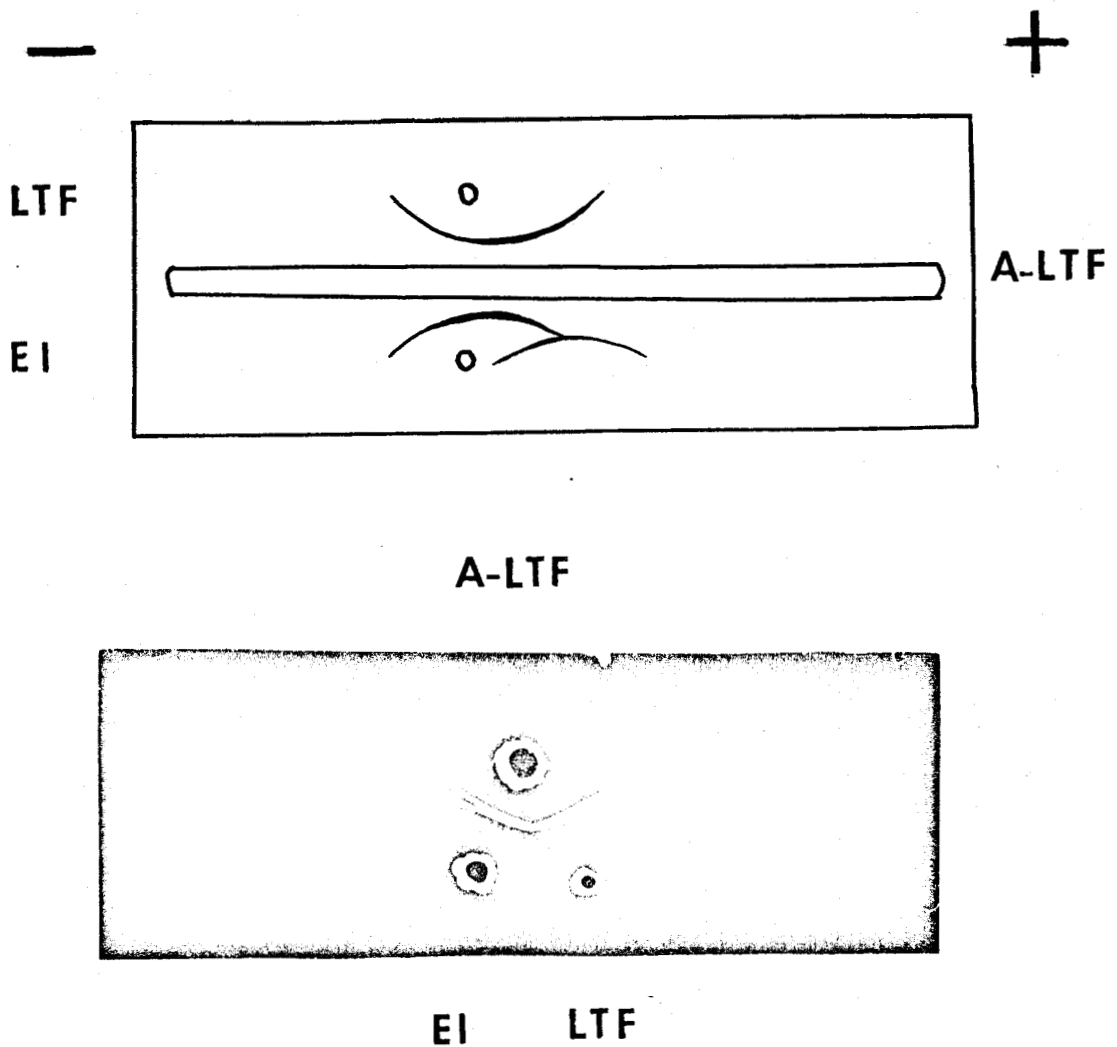


Figure 28 :

Mise en évidence de deux constituants réagissant avec le sérum anti-lactotransferrine humaine (A-LTF) dans la "coprolactotransferrine", (EI), isolée par chromatographie d'affinité, à partir de selles de nourrissons alimentés au lait de Femme.

sats trypsiques de la lactotransferrine, puis avec une préparation de lactotransferrine dénaturée par un séjour de plusieurs jours, en solution à pH 4.

## 1 - HYDROLYSE TRYPSIQUE

### a - Immunoélectrophorèses

Les images obtenues lorsqu'on analyse les hydrolysats trypsiques (L4, L8, L12, L24) de lactotransferrine, ne sont pas toujours nettes, mais subsistent toujours des fractions de la molécule capables de précipiter avec les anticorps anti-lactotransferrine. Une hydrolyse de 12 h donne, par exemple, deux arcs : l'un au niveau de la lactotransferrine native correspondant sans doute à la molécule non dégradée ; l'autre plus près de l'anode qui traduit une attaque protéolytique d'une partie de la lactotransferrine.

### b - Immunodiffusion double

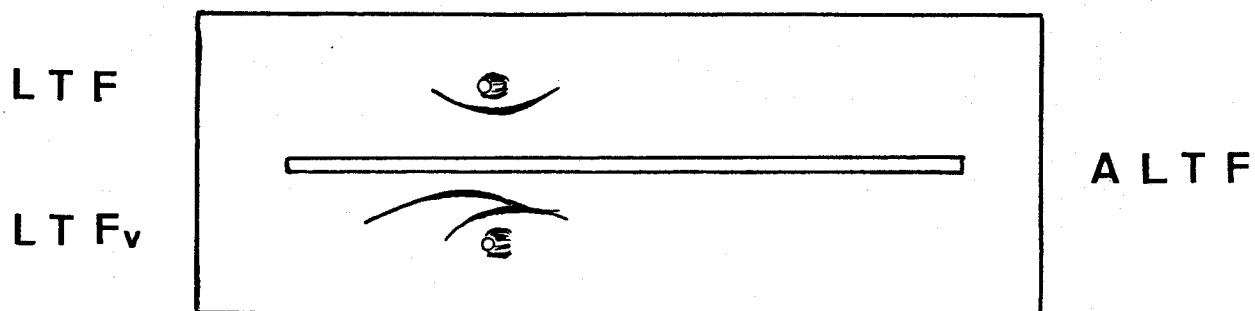
Les arcs obtenus par la méthode d'OUCHTERLONY permettent de suivre, ainsi que nous le voyons fig. 29 B (p. 124), l'apparition d'un arc, donnant une réaction d'identité partielle avec la lactotransferrine native, au fur et à mesure de l'hydrolyse.

La fig. 30 B (p. 125) nous montre que les deux arcs très nets d'un hydrolysats trypsique de 12 h (L12) se raccordent avec les arcs formés par la "coprolactotransferrine" (EI) isolée des selles de nourrissons.

## 2 - LACTOTRANSFERRINE "VIEILLIE"

La fig. 29 A (p. 124) montre les deux arcs formés, en immunoélectrophorèse, par une préparation de lactotransferrine qu'on a laissé vieillir (LTFv).

Ces deux arcs, comme nous le voyons sur la fig. 30 A (p. 125) donnent, en immunodiffusion double, une réaction d'identité totale avec les deux constituants des fractions  $S_2 G_1$  des selles. L'arc le plus externe correspond à la lactotransferrine non dégradée (arc 2 p. 57), il n'existe pas dans certains échantillons de selles ( $S_1 G_1$ ) ; l'arc interne, lui, ne donnant qu'une réaction d'identité partielle avec la lactotransferrine native, est dû à la lactotransferrine dégradée.



## B

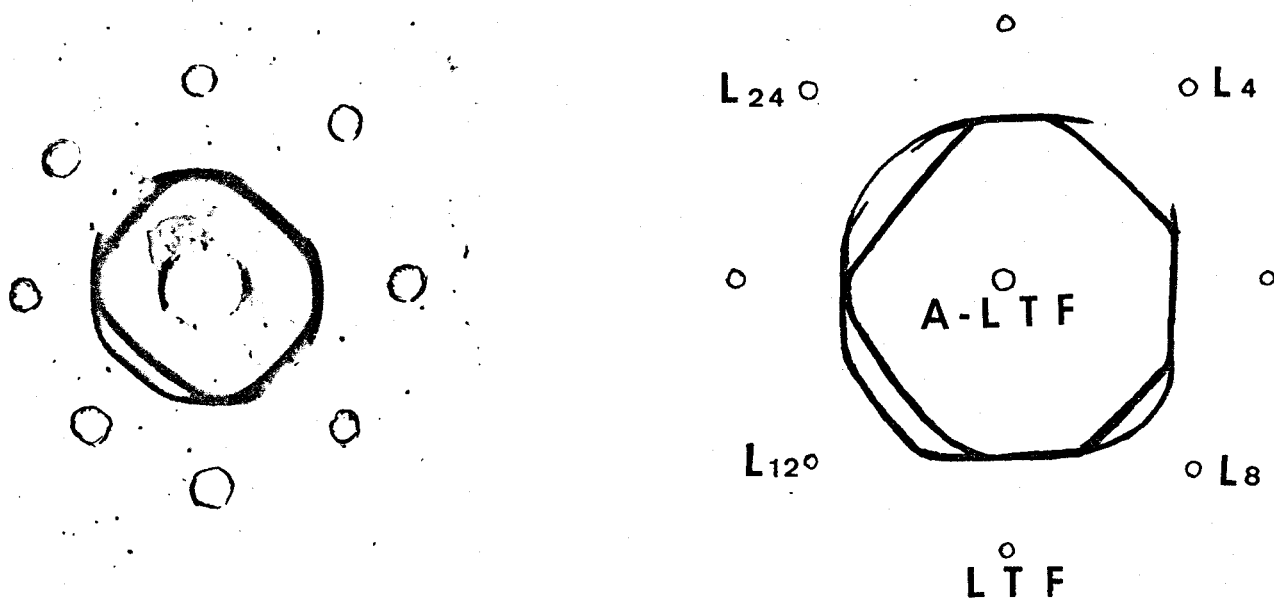
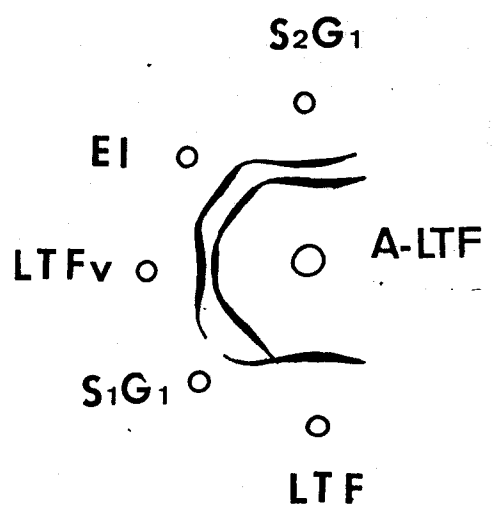
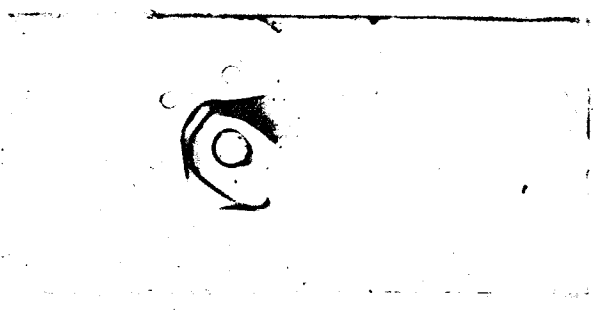


Figure 29 :

A = Mise en évidence, par immunoélectrophorèse, de l'apparition d'un deuxième arc, contre le sérum A-LTF, lors du vieillissement d'une préparation de lactotransferrine (LTF, LTF<sub>v</sub>).

B - Analyse, en immunodiffusion double, des constituants, réagissant avec le sérum A-LTF, après une hydrolyse trypsique de 4, 8, 12 et 24 h (L<sub>4</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>12</sub>, L<sub>24</sub>) de la lactotransferrine du lait de femme (LTF).

A



B

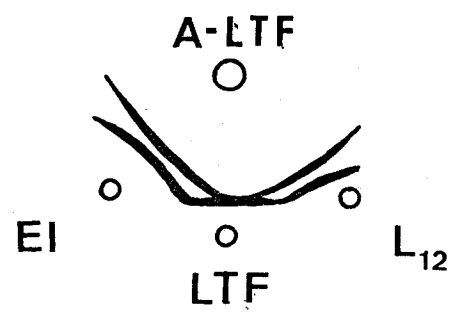


Figure 30 :

A - Réaction d'identité entre les constituants d'une préparation ancienne de lactotransferrine du lait (V.) et la "coprolactotransferrine" (EI) isolée, par chromatographie d'affinité, des selles de nourrissons alimentés au lait maternel.

B - Réaction d'identité entre les deux constituants de la "coprolactotransferrine" (EI) et ceux d'un hydrolysate trypsique de 12 h (L 12) de la lactotransferrine isolée du lait (LTF).



## II - ETUDE DE LA FIXATION DU FER

Nous donnerons tout d'abord, les résultats acquis grâce à l'emploi de fer radioactif ; nous envisagerons ensuite l'analyse spectrophotométrique de la fixation du fer.

### A - EMPLOI DU FER RADIOACTIF

#### 1 - COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE

Sur la fig. 31 (p. 127) nous avons tracé les courbes obtenues lorsqu'on compte la radioactivité en divers points de bandes de cellogel (voir p.119) Sur ces bandes, on a fait migrer différentes solutions auxquelles on a ajouté du fer radioactif : solution de lactotransferrine isolée du lait (LTF), d'albumine (Alb) qui nous sert de témoin pour vérifier la spécificité de la fixation du fer, solutions de fractions SDF provenant de selles de nourrissons alimentés au lait de Femme et de fractions SDV additionnées de LTF. La comparaison de ces courbes avec les électrophorégrammes obtenus après coloration à l'amidoschwarz nous amène à noter les points suivants :

- La lactotransferrine donne un pic radioactif au niveau de la bande 6 - 6,5.

- Le témoin albumine qui migre au niveau de la bande 10, ne fixe pas de fer, car il n'y a pas de maximum de radioactivité dans cette zone.

- Les selles d'enfants nourris au lait de Femme (SDF) donnent 2 pics de radioactivité ; l'un au niveau de la bande 4,5 - 5 correspondant au trait de dépôt où reste une partie, mal solubilisée, des fractions SF ; l'autre au niveau de la bande 7,5 - 8, où se situe la protéine ("C") colorée à l'Amidoschwarz (voir p. 51).

- Les fractions SFV (selles de nourrissons alimentés au lait artificiel), additionnées de 1,2 p. 100 de LTF, donnent, à peu près, la même répartition de radioactivité que les fractions SDF.

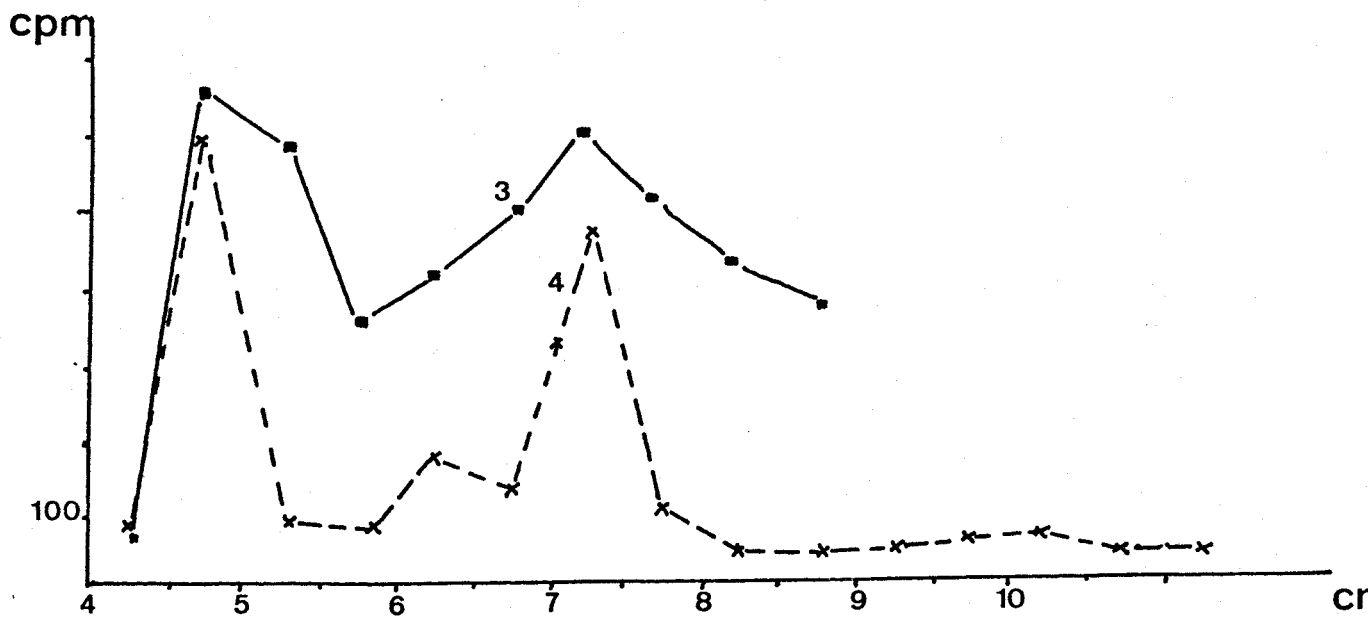
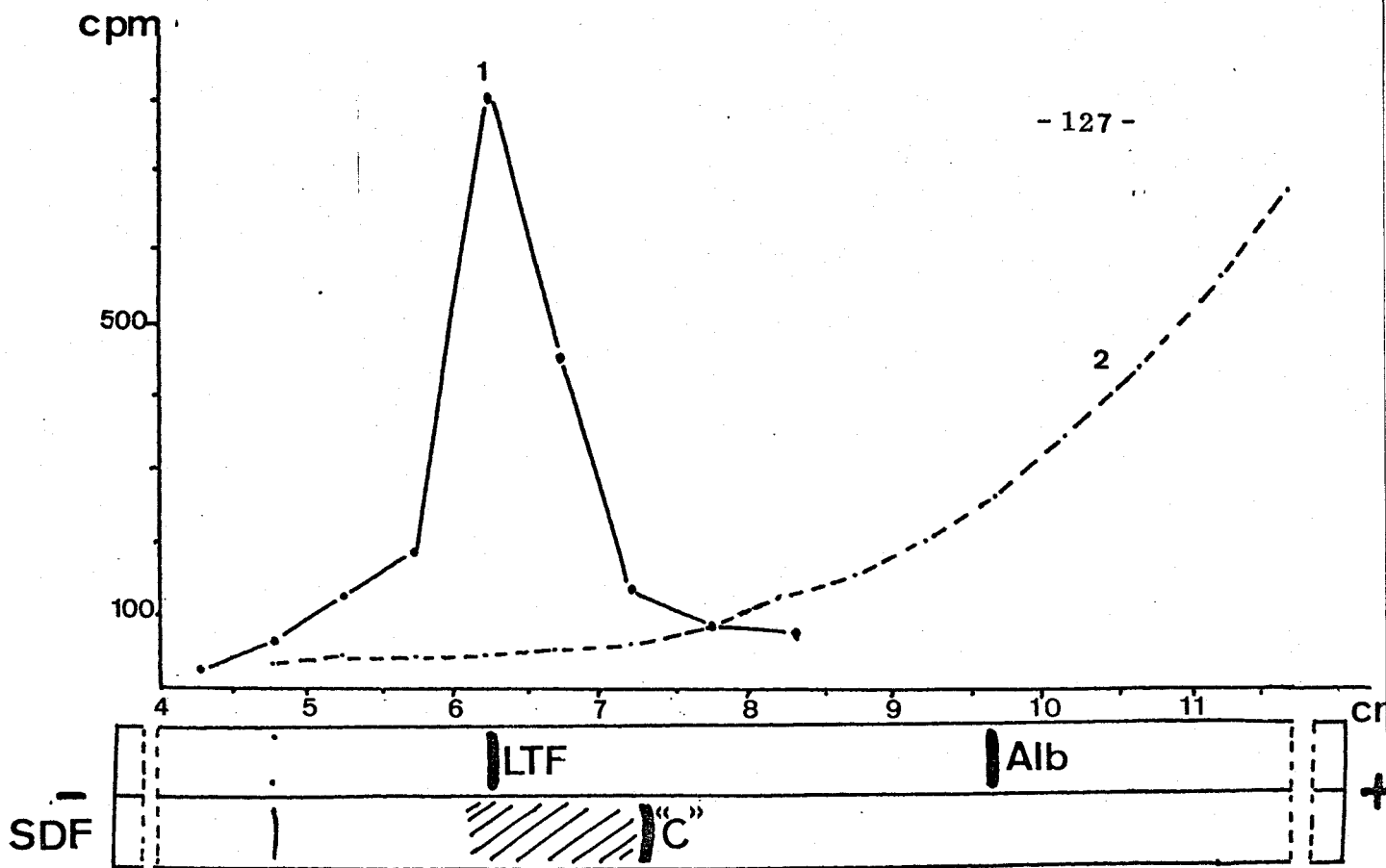


Figure 31 :

Courbes de radioactivité obtenues, après électrophorèse sur acétate de cellulose, de diverses solutions additionnées de chlorure ferrique radioactif.

- 1 - Lactotransferrine isolée du lait de Femme (LTF),
- 2 - Albumine humaine (Alb),
- 3 - Selles de nourrissons, alimentés au lait de Femme, traitées et dialysées (SDF)
- 4 - Selles de nourrissons alimentés artificiellement, additionnées de 1,2 p. 100 de lactotransferrine humaine.

BUS  
LILLE

En ordonnée est reporté le nombre de coups par minute, de chaque bandelette de cello-gel ; en abscisse, la distance (en cm) qui sépare la bandelette de cellogel de la cathode.

On peut donc dire qu'il y a eu fixation de fer sur un constituant "C" mis en évidence spécifiquement dans les selles de nourrissons alimentés au lait de Femme. De plus, la fixation du fer sur ce constituant est spécifique car l'albumine n'est pas radioactive dans les conditions que nous avons employées. Le fait que ce constituant migre de la même façon que la lactotransferrine additionnée de selles d'enfants nourris au lait de Vache, nous fait penser qu'il s'agit de la "coprolactotransferrine" ; les autoradiographies ont été réalisées pour répondre à cette question.

## 2 - AUTORADIOGRAPHIES

### a - Electrophorèses

Les autoradiographies d'électrophorèses sur papier présentées fig. 32(p. 129) montrent qu'il existe, dans les fractions SG1 des selles de nourrissons alimentés au lait de Femme, un constituant qui fixe le fer radioactif. Ce constituant migre plus vite vers l'anode que la lactotransferrine isolée du lait.

### b - Immunoélectrophorèses

Dans la fig. 31 (p. 129), nous avons reporté un exemple parmi les autoradiographies que nous avons obtenues. On peut voir que la lactotransferrine du lait donne un arc radioactif plus ou moins caché par la présence d'une tache au niveau du puits de dépôt. Cette tache correspond sans doute au complexe que forme la lactotransferrine avec la gélose. Les fractions SG1 et EI donnent un arc radioactif identique à l'arc (c) révélé par le réactif à l'Amidoschwarz (voir p. 54)

### c - Immunodiffusion double

Grâce à la technique de OUCHTERLONY nous avons pu montrer que les fractions SG1 et EI forment deux arcs avec un sérum anti-lactotransferrine. L'image obtenue en autoradiographie montre que les deux arcs sont également révélés ; il y a donc eu fixation de fer radioactif sur les deux

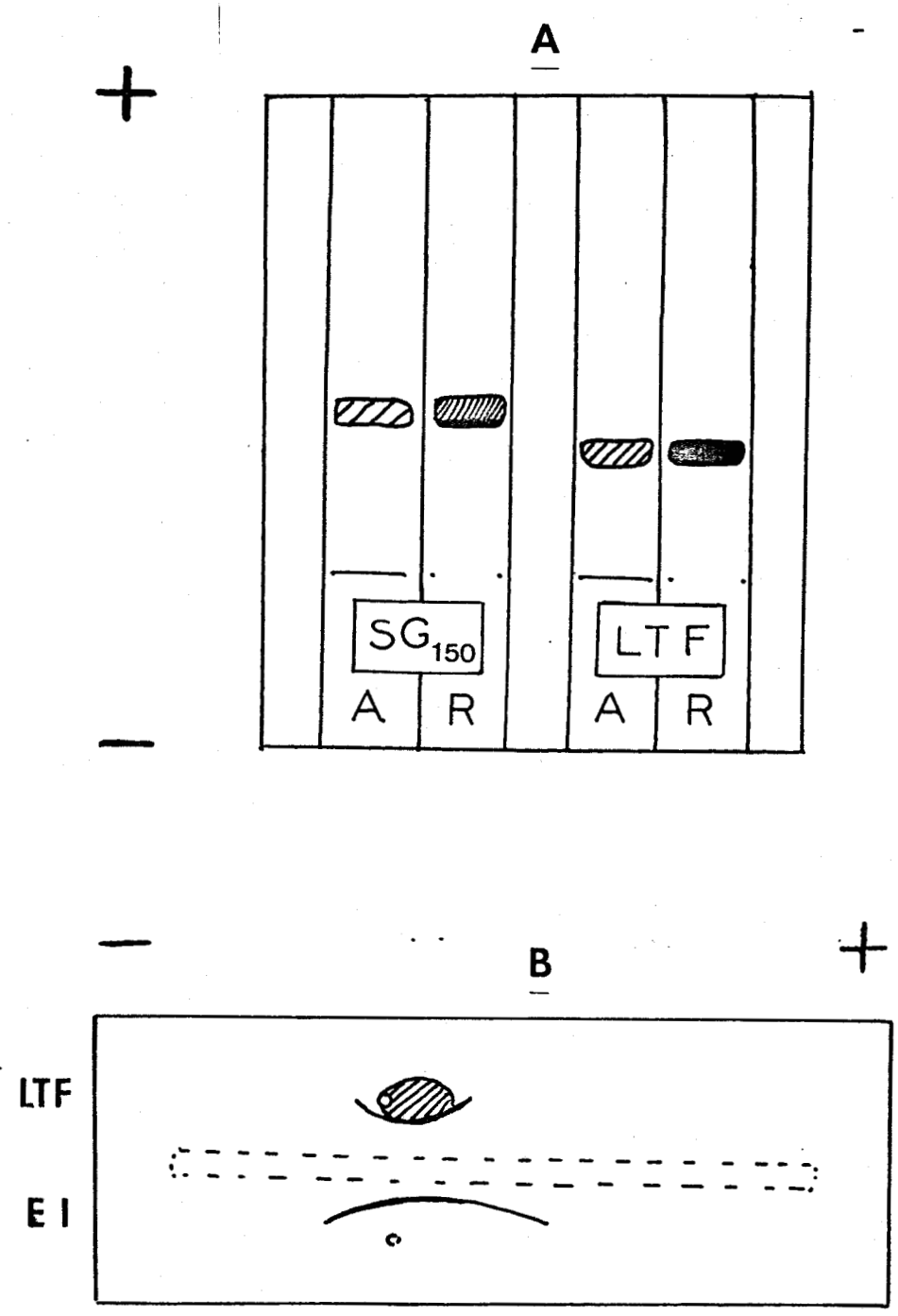


Figure 31

A - Autoradiographie (A) et révélation à l'Amidoschwarz (R), après électrophorèse sur papier, de la lactotransferrine (LTF) et de fractions de selles de nourrissons (alimentés au lait maternel) purifiées sur Séphadex SG 150 et marquées au <sup>59</sup>Fe.

B - Schéma de l'autoradiographie obtenue après immunoélectrophorèse de lactotransferrine (LTF) et de "coprolactotransferrine" (EI) marquées au <sup>59</sup>Fe.



constituants de la "coprolactotransferrine".

#### B - METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE

Les fractions EI ont pu être analysées par cette méthode car elles donnent des solutions incolores.

Nous avons pu constater qu'une solution à 1 p. 100 de "coprolactotransferrine" prend une coloration rosée en présence de chlorure ferrique. Lors de l'addition progressive d'acide, la solution se décolore, puis se trouble vers pH 2,5, car la "coprolactotransferrine" précipite. Cependant, nous n'avons pu tracer le spectre d'absorption car les quantités de "coprolactotransferrine" dont nous disposions étaient trop faibles, et d'autre part, la "coprolactotransferrine" isolée par chromatographie d'affinité, est légèrement insoluble après lyophilisation.

CONCLUSIONS

L'étude de la "coprolactotransferrine" isolée par chromatographie d'affinité nous permet de confirmer les résultats précédemment acquis lors de l'analyse de diverses fractions de selles et de souligner les points suivants :

1 - La "coprolactotransferrine" est immunologiquement semblable à la lactotransferrine du lait soumise à une hydrolyse trypsique ménagée. C'est l'action des enzymes protéolytiques du tube digestif du nourrisson qui transforme in vivo, la lactotransferrine en "coprolactotransferrine".

2 - Malgré la dégradation qu'elle subit in vivo, dans le tractus digestif, et in vitro, dans les selles durant le laps de temps qui s'écoule avant qu'elles ne soient traitées, la lactotransferrine est encore capable de fixer le fer. La fixation d'ions ferriques s'accompagne de l'apparition d'une coloration rosée ; en milieu acide, il y a décoloration des solutions de "coprolactotransferrine".

Ces résultats montrent que la "coprolactotransferrine" est capable de fixer spécifiquement et réversiblement le fer.

CONCLUSIONS GENERALES

---

DISCUSSION

---

1 L'étude des selles de nourrissons nous a permis de caractériser, chez le jeune enfant allaité par sa mère, des constituants auxquels on attribue un rôle dans la protection de la muqueuse intestinale : des oligosaccharides spécifiques du lait de Femme, de la lactotransferrine, des Ig A et de l' $\alpha_1$ - antitrypsine. Ces deux derniers constituants existent également dans les selles de nourrissons alimentés au lait en poudre.

2 Nos résultats nous permettent d'affirmer l'origine exogène et lactée de la "coprolactotransferrine" ; en effet,

$\alpha$  - La "coprolactotransferrine" n'existe pas dans les selles de nourrissons alimentés au lait en poudre.

$\beta$  - La "coprolactotransferrine" se retrouve, en partie, dans les selles de jeunes enfants dont le biberon est supplémenté en lactotransferrine humaine.

$\gamma$  - La "coprolactotransferrine" est immunologiquement identique aux constituants mis en évidence après hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine isolée du lait de Femme.

3 L'application de diverses techniques de chromatographie d'affinité nous a permis d'isoler la "coprolactotransferrine" en utilisant, notamment, des anticorps insolubilisés par le glutaraldéhyde. La "coprolactotransferrine" ainsi obtenue est partiellement dénaturée, mais elle est encore capable de fixer spécifiquement et réversiblement le fer.



4 Nous apportons donc la preuve qu'une partie de la lactotransferrine présente dans le lait de Femme ingéré est capable de résister aux pH et aux enzymes protéolytiques du tractus digestif du nourrisson. En effet, la fraction de la molécule impliquée dans le site de fixation du fer est encore fonctionnelle dans la lactotransferrine isolée des selles. De plus, la dénaturation que nous avons constatée (par modification des vitesses de migration électrophorétique et de diffusion et par la perte d'un déterminant antigénique) est peut être due, en partie, à l'action des enzymes protéolytiques présentes dans les selles ; la lactotransferrine, au niveau de l'intestin, est sans doute moins dégradée que la "coprolactotransferrine". Cette résistance de la lactotransferrine peut s'expliquer de deux façons :

- Le fer fixé sur la lactotransferrine du lait, protège cette glycoprotéine. Ce fait a été démontré in vitro par SPIK (143), notamment, qui a constaté que la lactotransferrine saturée résiste mieux que l'apolactotransferrine, aux hydrolyses protéolytiques.

- La lactotransferrine peut former un complexe avec les Ig A et l' $\alpha_1$  antitrypsine qui inhibent tous deux la trypsine (SHIM et al. - 144 - COUNITCHANSKI et al. - 145). Associée à ces deux protéines, la lactotransferrine qui n'est pas, selon SPIK (146), un inhibiteur tryptique pourrait acquérir une plus grande résistance vis-à-vis des enzymes .

5 Ayant apporté la preuve que la lactotransferrine est présente dans l'intestin du nourrisson et qu'elle y est encore capable de fixer spécifiquement le fer, nous étayons l'hypothèse selon laquelle cette glycoprotéine du lait de Femme joue un rôle biologique important. En effet, on peut concevoir que, tout d'abord, la lactotransferrine abandonne son fer dès son passage dans l'intestin du nourrisson et qu'elle participe, ainsi que d'autres chélates, à l'absorption intestinale du fer. On imagine également qu'elle puisse ensuite, tout au long du tractus digestif, capter le fer du milieu intestinal et exercer,

associée aux immunoglobulines A et à l' $\alpha_1$  antitrypsine qui la protègent, son activité bactériostatique. Lorsque nous avons étudié la réversibilité de la fixation du fer de la "coprolactotransferrine", nous avons obtenu une décoloration. Nous pensons donc qu'il y a réversibilité de la fixation du fer et que la lactotransferrine peut céder le fer qu'elle a capté dans la lumière intestinale à d'autres composants (enzymes ou chélates) qui assurent son absorption.

La nature et le mécanisme d'action des composants lactés qui protègent l'intestin du nourrisson, sont encore bien mal connus; pour éclairer cette question, nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier les associations possibles entre Ig A, lactotransferrine, glycopeptides et oligosaccharides du lait. On peut également envisager, chez les nourrissons diarrhéiques, des expérimentations thérapeutiques fondées sur l'ingestion de lactotransferrine ou de l'ensemble des composants du lait de Femme semblant jouer un rôle dans la protection intestinale du nourrisson. Des expérimentations parallèles, avec addition de lactotransferrine de Vache pourraient, de plus, permettre de parfaire la "maternisation" du lait artificiel.

## R E S U M E

-----

La lactotransferrine humaine, glycoprotéine assurant le transport du fer dans le lait, a été identifiée, - accompagnée de globulines immunes et du facteur alpha-1-antitrypsique-, par immuno-électrophorèse et par immuno-diffusion dans les selles de nourrissons alimentés au lait de femme et dosée par la méthode de LAURELL. Elle est absente, ainsi que la lactotransferrine de vache, dans les selles de nourrissons alimentés au lait de vache. Ces observations permettent d'affirmer l'origine exogène et lactée de la "coprolactotransferrine" humaine.

La "coprolactotransferrine" a été isolée des selles de nourrissons par la méthode d'immuno-absorption spécifique (chromatographie sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine réticulés par le glutaraldéhyde et désorption du protéide par une solution tampon de glyocolle de pH 2,5). Elle garde la propriété de fixer réversiblement le fer bien qu'elle soit en majeure partie dénaturée par l'action des enzymes protéolytiques digestifs.

Ces résultats permettent de poser en hypothèse que la lactotransferrine humaine est capable de jouer, tout au long du tractus digestif, son rôle de fixateur réversible du fer et, par ce mécanisme ferriporteur, d'assurer, - en association avec les IgA et, peut-être aussi, avec des constituants glucidiques présents seulement dans le lait humain -, la protection de l'intestin du nourrisson vis-à-vis de germes pathogènes. L'observation de l'absence de la lactotransferrine de vache dans les selles d'enfants nourris au lait de vache plaide en faveur d'une alimentation à base de lait de femme, au moins chez les enfants en bas-âge.

BIBLIOGRAPHIE

AIKEN F.C. et HYTTEN F.E., Nutritio Abstracts and Reviews, 1960, 30, 341 (3)

ALEXANDER M.B., Brit. Med. J., 1948, 2, 973 (10)

AVRAMEAS S., TERNYNCK T., Immuno-chemistry, 1969, 6, 53 (133)

AXEN R., ERNBACK S., Eur. J. Biochem., 1971, 37, 360 (134)

BELL D.J., CROMBIE L. et GRANT J.K., Ann. Rep. Chem. Soc., 1955, 52, 333 (26)

BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R., Exp. Ann. Biochim. Med., Masson Ed. Paris, 1963, 24, 85 (55)

BLANC B., Thèse Doct. és Sci., Université de Lausanne, Editions Médecine et Hygiène, Genève, 1964 (62, 89, 91)

BLANC B., in "Protides of the Biological Fluids", 1966, PEETERS H. Ed. Elsevier, Amsterdam, 14, 125 (102)

BLANC B. et ISLIKER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 929 (84)

BLANC B. et ISLIKER H., Helv. Chim. Acta, 1963, 322, 2905 (88)

BULLEN J.J., ROGERS H.J. et LEWIN J.E., Immunology, 1971, 20, 381, (107)

BULLEN C. et WILLIS A.T., Brit. Med. J., 1971, 3, 338 (16,17, 20, 22, 25)

BULLEN J.J., ROGERS H.J. et LEIGH L., Brit. Med. J., 1972, 1, 69 (36, 38, 105, 109)

CAMPBELL D. et WELIKY N., in "Methods in Immunology and Immuno-chemistry" 1967, WILLIAMS C.A. et CHASE M.W. Ed., Academic Press New-York, Vol. I p. 368 (128)

CARREL S. et BARANDUN S., *Immunochemistry*, 1971, 8, 39 (132)

CECHOBA D., SVESTKOVA V., KEIL B. et SORN F., *F.E.B.S. Letters*, 1969, 4, 155 (43)

CERF M., HIRSCH-MARIE H., HANSEN M., HUSSON J.M., DEBRAY C., *Arch. Fr. Mal. App. Dig.*, 1972, 61, 641 (78)

CHERON A., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, 135 (59,60)

COUNITCHANSKI Y., BERTHILLIER G., GOT R., *Clin. Chim. Acta*, 1970, 30, 83 (145)

CRABBE P.A., *Revue Médico-chirurgicale*, 1969, 44, 161, (79)

CUATRECASAS P., *J. Biol.Chem.*, 1970, 245, 3065 (135, 136)

DE LAEY P., MASSON P.L. et HEREMANS J.F., in "Protides of the Biological Fluids", 1968, PEETERS H. Ed. Elsevier, Amsterdam, p. 627 (93, 95)

DESCAMPS J., *Thèse Doct. és Sci.*, Lille, 1973 (122, 141)

DESNUELLE P., in "The enzymes", 1960, BOYER P.D., LARDY H., MYRBACK K., Vol. IV, p. 128 (41)

FAHEY J.L. et Mc KELVEY E., *The J. of Immunology*, 1964, 94, 84 (119)

FAHIMI H.D. et DROCHMANS P., *J. Microscopie*, 1965, 4, 725 (131)

FONTAINE G., *Communication personnelle* (15)

GINDRAT J.J., CROTHERFORS L., HANSON I.A. et WINBERG J., *Acta Med. Scand.*, 1972, 61, 587 (72)

GRABAR P., WILLIAMS C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193 (115)

GRIMMONPREZ L., *Thèse Doct. és Sci.*, Lille, 1972 (112)

GROVES M.L., in "Milk Proteins", Vol. II, 1971, Mc KENZIE Ed., Academic Press, New-York, p. 367 (39)

GYORGY P., KUHN R., NORRIS R.F., ROSE C.S. et ZILLIKEN F., Am. J. Diseases Children, 1952, 84, 482 (31)

GYORGY P., C.R. 3e Congrès Intern. Nutrit., Amsterdam, 1964, p. 203 (4,5)

HAENEL H., GOLDBACH W. et GRUTTE F.K., Ernährungsforschung, 1968, 8, 282 (51)

HANSON L.A., BORSSSEN R., HOLMGREN J., JODAL U., JOHANSSON B.G. et KAIJSER E., in "Immunologic Incompetence", 1970, Year Book Med. Publishers, Chicago, Illinois (75)

HANSON L.A. et BRANDTZAEG P., in "Immunologic Disorders in Infants and Children", 1972, Mc KENZIE Ed., Academic Press, New-York (69)

HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E., J. Exp. Med., 1929, 50, 809 (130)

HEINSTEIN M.I., in "Behaviorial correlates of Breast-Bottle Regimes under varying parent-infant relationships", Monographs of Society for research in Child Development, 1963, The Antioch Press Yellow Springs, Ohio, 28, série 88 (1)

HELBOCK H.J., SALTMAN P., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 979 (94, 96, 98)

HEYNDRIKX G.V., Enzymologia, 1964, 27, 209 (44)

HINTON N.A. et Mac GREGOR R.R., Can. Med. Ass. J., 1958, 79, 359 (12)

HIRANO S., HAYASHI H., TERABAYASHI T., ONODERA K., ISEKI S., KOCHIBE N., NAGAI Y., YAGI N., NAKAGAKI T. et IMAGAWA T., J. Biochem., 1968, 64, 563, (34)

HIRS C., MOORE S. et STEIN W., J. Biol. Chem., 1956, 221, 151 (142)

HUET P.M., MODIGLIANI R., BOGNET J.C., RAMBAUD J.C., HIRSCH-MARIE H., RAUTUREAU M., HARTMANN L. et BERNIER J.J., Path. Biol., 1972, 20, 660 (77)

HYANECK J., NOSKOVA R. et CAFOURKOVA Z., Ann. Paediat., 1965, 204, 125 (45)

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T. et HORNBROOK M.M., J. Immunol., 1966, 97, 840 (57)

JERMYN M.A. et ISHERWOOD F.A., Biochem. J., 1949, 44, 402 (110)

JOHNSON R.L., VANARSDEL P.P., TOBE A. et CHING Y., Amer. J. Med., 1967, 43, 935 (80)

KENNY J.F., BOESMAN M.I. et MICHAELS R.H., Pediatrics, 1967, 39, 202 (70)

KIRKPATRICK C.H., GREEN I., RICH P.R. et SCHADE A.L., J. Infect. Dis., 1971, 124, 539 (106)

KUHN R., in "Carbohydrate chemistry of substances of biological interest" Proc. IV Intern. Cong. Biochem. Vienne, 1958, M.L. WOLFROM Ed., 1959, Pergamon Press, Vol. 1, p. 67 (27, 30)

LAKOWSKI M., Jr., MARS P.H. et LAKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1952, 198, 745 (42)

LAURELL C.B., Vox Sanguinis, 1957, 2, 312 (113)

LAURELL C.B., Anal. Biochem. 1965, 10, 358, (118, 121)

LEVESQUE JB, Sem. Hôp. Ann. Ped., 1959, 35, 237/P.5 (28)

MACH J.P., PAHUD J.J. et ISLIKER H., Nature, 1969, 223, 952 (52)

Mc KENZIE H.A., in "Milk Proteins", Vol. II, 1971, Mc KENZIE Ed., Academic Press, New-York, p. 255 (37)

MANCINI G., CARBONARA A.O. et HEREMANS J.F., Immunochemistry, 1965, 2, 235 (117, 120, 124)

MASSON P., in "La lactoferrine", 1970, Arscia Ed., Bruxelles, p. 181 (90)

MASSON P.L., HEREMANS J.F. et DIVE C., Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 735 (97, 100)



MASSON P.L. et HEREMANS J.F., in "Protids of the Biological fluids", 1967, PEETERS H., Elsevier Ed. Amsterdam p. 115 (85,103)

MELCHING L. et VAS S.I., Infection and Immunity, 1971, 3, 107 (108)

MICHAEL J.G., RINGENBACK R. et HOTTENSTEIN S., J. of Infect. Dis., 1971, 124, 445, (71, 81)

MICHL H., Monatsch. Chem. 1951, 82, 489 (111)

MONTREUIL J., Ann. Nutr. Alim. 1971, 25, A<sub>1</sub>-A<sub>37</sub> (2, 9)

MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S., Compt. Rend., 1960, 154, 732 (53,99)

MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (140)

MORO E., Wien Klin. Wachenschr., 1900, 13, 114 (19)

MURALT G., GUGLER E. et ROULET D.L., in "Protides of the Biological fluids : proceedings of the 8th Colloquium, Brugge, 1960, PEETERS H. Ed. Elsevier, Amsterdam, 1961, 8, p. 166 (54)

O'BRIEN P.J., GLICK M.C. et ZILLIKEN F., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 357 (33)

ORAM J.D. et REITER B., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 170, 35 (101, 104)

OUCHTERLONY O., Ark. Kemi., 1949, 261 (114)

OUCHTERLONY Ö, Progr. Allergy, 1958, 5, 1 (123)

PAUPE J. et MEYER B., Path. Biol., 1969, 17, N° 87 et 191 (58,63,67)

PRICKETT P.S., MILLER N.S. et Mc DONALD F.G., J. Bact., 1953, 25, 61 (48,50)

RAYNAUD M., Sem. Hôp., Ann. Ped., 1959, 85, 240/p. 8 (29, 35)

- REITER B. et ORAM J.D., Nature, 1967, 216, 328 (40)
- ROBINSON M., Lancet, 1951, 1, 788 (6, 64)
- ROSENTHAL L. et LIEBERMAN R., J. Infect. Dis., 1931, 48, 226 (47)
- ROSS C.A. et DAWES E.A., Lancet 1954, 1, 994 (11, 21)
- ROULET (Von) D.L. et MURALT (Von) G., Schw. Med. Wochenschrift, 1961, 3, 74 (125, 126, 127)
- ROWE D.S. et FAHEY J.L., J. Exp. Med., 1965, 121, 171 (56)
- SAUSSURE de V., DANGLIKER W., Immunochemistry, 1969, 6, 77 (139)
- SCHEIDEGGER J.J., Inter Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (116)
- SCHNEEGANS E., HAARSCHER A., LUTZ A. et SCHMITTBUHL J., Société de Pédiatrie, 1964 (24)
- SCHUCHET-DERECHIN S., Eur. J. Polymer., 1965, 1, 285 (87)
- SHAHANI K.M., J. Dairy Sci., 1966, 49, 907 (46)
- SHIM B.S., KANG Y.S., KIM W.J., CHO S.H., LEE D.B., Nature, 1969, 222, 787 (144)
- SPIK G., Thèse Doct. és. Sci., Lille, 1968 (86, 92)
- SPIK G., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 81 (83)
- SPIK G., Communication personnelle, (146)

- SPIK G. et MONTREUIL J., C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 94 (143)
- SVIRSKY-GROSS S., Annales Paediatrici, 1958, 190, 109 (14)
- SYDOW (Von) G. et FAXEN N., Acta Paediatrica, 1954, 43, 362 (7,65)
- TASSOVATZ B., Sem. Hôp. Ann. Ped., 1964, 1315, p. 291 (23)
- TASSOVATZ B. et KOTSITCH A., Annales de Pédiatrie, 1961, 8, 285 (13)
- TERNYNCK T. et AVRAMEAS S., F.E.B.S. Letters, 1972, 23, 24 (137, 138)
- TISSIER H., Ann. Inst. Pasteur, 1905, 19, 109 (18)
- TOMARELLI R.M., HASSINEN J.B., ECKHARDT E.R., CLARK R.H. et BERNHART F.W., Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 225 (32)
- TOMASI T.B. et BIENENSTOCK J., Advan. Immunol., 1968, 9, 1 (68)
- TOMASI T.B., Jr. TAN E.M., SOLOMON A. et PRENDERGAST R.A., J. Exp. Med. 1965, 121, 101 (74)
- TOURVILLE D.R., ADLER R.H., BIENENSTOCK J., TOMASI T.B., Jr., J. Exp. Med., 1969, 129, 411 (73)
- VAHLQUIST B., Advan. Pediat., 1958, 10, 305 (61, 82)
- VAKIL J.R., CHANDAN R.C., PARRY R.M. et SHAHANI K.M., J. Dairy Sci., 1969, 52, 1192 (49)
- WARREN R.J., LEPOW M.I. et ROBBINS F.C., Pediatrics, 1964, 34, 4 (76)
- WESTON et AVRAMEAS S., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, 45, 1574 (129, 138)
- WINBERG J. et WESSNER, Lancet, 1971, 1, 1091 (8,66)