50 376 1 9 7 7 8 8 N° d'ordre : 654

50376 1977 88

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Bernard BRUNET

RECHERCHE DE FACTEURS DE PROTECTION DE L'INTESTIN DU NOURRISSON

 ETUDE SUR LE TRANSIT INTESTINAL DES LACTOTRANSFERRINES ET DES IMMUNOGLOBULINES IGA

2. ISOLEMENT ET ETUDE PHYSICO CHIMIQUE DES COPRO-LACTOTRANSFERRINES Section

Soutenue le 13 juillet 1977, devant la Commission d'Examen

Président :

J. MONTREUIL

Rapporteur:

G. SPIK

Examinateur:

A. CHERON

Invité:

J.P. FARRIAUX

Ce travail fait partie des recherches effectuées sur la maternisation des laits et plus précisément sur la recherche des facteurs de protection de l'intestin. Ce thème de recherche a fait l'objet d'un contrat D.G.R.S.T. (n° 75-7-0414, 75-7-0415, 75-7-0416).

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, du Professeur J. MONTREUIL, Directeur du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 (Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués) sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK, Maître de Conférences.

J'adresse mes plus vifs remerciements

- à Mademoiselle BAR ainsi qu'à Monsieur le Professeur FONTAINE, pour les expérimentations effectuées sur les nourrissons de la Pouponnière municipale de Lille,
- à tous les membres du Laboratoire et plus particulièrement à A. CHERON, S. BOUQUELET, C. CARDON dont la collaboration m'a été très précieuse,
- à Messieurs J.P. DECOTTIGNIES et Y. LEROY ainsi qu'à Madame A.F BOUQUELET pour leur collaboration technique,
- à Mademoiselle B. MAHIEU, secrétaire et à Madame CELEN, photographe.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
FACTEURS DE PROTECTION DE L'INTESTIN	4
I - LA PROTECTION MICROBIENNE	4
A - Nature de la flore intestinale	4
B - <u>Rôle de la flore bifide</u>	4
C - <u>Conclusions</u>	5
II - LA PROTECTION CHIMIQUE	5
A - <u>Les Immunoglobulines</u>	5
l - Caractères généraux	5
2 - Rôle biologique	6
a) activité anticorps	6
b) <u>immunité circulante</u>	8
c) protection du tractus digestif	8
B - <u>Les lactotransferrines</u>	11
1 - Caractères généraux	11
2 - Répartition	11
3 - Rôle biologique	12
a) apport du fer au nourrisson	12
b) protection de la muqueuse intestinale	12
C - <u>Le Lysozyme</u>	14
l - Caractère-généraux	14
2 - Rôle biologique	15
D - <u>Les cellules colostrales</u>	18
E - <u>Autres facteurs chimiques</u>	18
l - Le complément	18

2 - La lactoperoxyda	se	•		19
3 - Facteur antistap	nylocoque			19
	•			
MATERIEL ET METHODES	,			20
PRE	PARATION DES PROTE	INES		21
I - PREPARATION DE L	A LACTOTRANSFERRIN	E HUMAINE		21
II - PREPARATION DE	LA LACTOTRANSFERRI	NE DU LAIT DE	VACHE	21
III - PREPARATION DE	LA SEROTRANSFERRI	NE HUMAINE		22
IV - PREPARATION DES	IMMUNOGLOBULINES	IgA D'EXCRETIO	<u>N</u>	22
A -	A partir du lacto	sérum total		22
В -	A partir du préci	pité P ₂		22
PRE	PARATION DES IMMUN	ISERUMS		23
TRA	ITEMENT DES SELLES	G DE NOURRISSON	S	23
	HODES D'ANALYSES I SENTS DANS LES SEI		DES CONSTITUAN	rs 24
I - IMMUNODIFFUSION	SIMPLE			24
	•		•	
II - IMMUNOELECTROPH	ORESE			24
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0.4
III - DOSAGE DES ANT	'IGENES			24
A -	<u>Principe</u>			24
В -	Mode opératoire			25
С -	Expression des r	<u>ésultats</u>		25
1 - Expression mathé	matique précise			25
2 - Utilisation prat	ique			26
	,			
	THODES D'ANALYSE P S SELLES	HYSICOCHIMIQUE	DES CONSTITUAN	TS 26
T - DETERMINATION DI	E LA MASSE MOLECUL	ATRE		26

•	A - <u>Tamisage moléculaire</u>	26
7 .	B - Electrophorèse en gel de polyacrylamide	27
II - DOSAGE DU F	<u>ER</u>	27
III - COMPOSITION	N CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES	27
	A - Composition centésimale en glucides	27
1 - Monosaccharie	des neutres	28
2 - Hexosamines		28
3 - Acides sialio	ques	28
	B - Composition molaire en glucides	28
IV - COMPOSITION	MOLAIRE EN ACIDES AMINES	28
V - <u>IDENTIFICATI</u>	ON DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX	28
	A - Technique des dansyl amino-acides	28
1 - Réaction de	dansylation	29
2 - Identificati	on des dansyl amino-acides	29
	B - Méthode de dégradation récurrente d'EDMAN	29
1 - Etape de cou	plage	29
2 - Clivage		30
3 - Conversion		30
4 - <u>Identificati</u>	on des PTH amino-acides	30
TRAVAUX PERSONNE	LS	31
	ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES CONSTITUANTS DE NATURE PROTEIQUE PRESENTS DANS DIFFERENTS LAITS ET DANS LES SELLES DE NOUVEAUX-NES	32
I - ETUDE IMMUNO	ELECTROPHORETIQUE DES LAITS	32
	A - Etude du lait Gloria	32
	B - Etude du lait en poudre Nativa	32
	C - Conclusion	32

	DELECTROPHORETIQUE DES SELLES DE NOURRISSONS EN LEUR ALIMENTATION	34
	A - Alimentation au lait de femme	34
	B - Alimentation au lait Gloria seul et complémenté en protéines	34
	C - <u>Conclusions</u>	39
	DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE DES "COPRO-PROTEINES" PAR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION RADIALE	40
I - MISE EN EVID D'ORIGINE EN	ENCE ET DOSAGE DE LA COPROLACTOTRANSFERRINE HUMAINE DOGENE	40
	A - Caractéristiques du nourrisson	40
	B - <u>Résultats</u>	40
	C - Conclusions	40
II - DOSAGE DES	COPROLACTOTRANSFERRINES SUIVANT LE MODE D'ALIMENTATION	41
	A - Alimentation au lait de Femme frais	41
l - <u>Résultats</u>		41
2 - Conclusion		41
	B - Alimentation au lait de vache frais	44
1 - Protocole ex	périmental	44
2 - Résultats		44
3 - Discussion e	t conclusion	46
	C - Alimentation au lait Gloria complémenté en protéines	46
1 - Complémentat	ion en lactotransferrine humaine	46
	a) lactotransferrine humaine native	46
	- protocole expérimental	46
	- résultats	46
	- discussion et conclusion	47
	b) lactotransferrine humaine saturée en fer	47
·	- protocole expérimental	47

- résultats	47
- discussion et conclusion	50
2 - Complémentation en lactotransferrine isolée du lait de vache	50
a) <u>lactotransferrine native</u>	50
- protocole expérimental	50
- résultats	51
- discussion et conclusion	51
b) <u>lactotransferrine saturée en fer</u>	51
- protocole expérimental	51
- résultats	55
- discussion et conclusion	55
3 - Complémentation en sérotransferrine humaine native et saturée en fer	55
a) protocole expérimental	55
b) <u>résultats et conclusion</u>	56
III - DOSAGE DES COPRO-IMMUNOGLOBULINES A SUIVANT L'ALIMENTATION	56
A - Alimentation au lait maternel	56
B - Alimentation au lait Gloria complémenté en Immunoglobulines A de secrétion	59
1 - Protocole expérimental	59
2 - <u>Résultats</u>	59
3 - Discussion et conclusion	59
IV - DOSAGE DE LA COPROLACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET DES COPRO IMMUNO- GLOBULINES LORS DE COMPLEMENTATION MIXTE IMMUNOGLOBULINES A, LACTO- TRANSFERRINE	62
A - <u>Protocole expérimental</u>	62
B - <u>Résultats et conclusions</u>	62
ISOLEMENT ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUES DES COPROLACTO- TRANSFERRINES	65
T - ISOIFMENT DES COPROIACTOTRANSFERRINES	65

•

A - <u>Mode opératoire</u>	65
B - <u>Résultats</u>	65
1 - Coprolactotransferrine humaine	65
2 - Coprolactotransferrine de vache	65
a) complémentation en lactotransferrine de vache native	66
b) <u>complémentation en lactotransferrine de vache saturée</u> <u>en fer</u>	66
C - <u>Conclusions</u>	66
II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES COPROLACTOTRANSFERRINES	66
A - <u>Critères électrophorétiques</u>	66
1 - Coprolactotransferrine humaine	66
2 - Coprolactotransferrine de vache	. 69
B - <u>Masse moléculaire</u>	69
C - <u>Dosage du fer</u>	73
1 - Sur la coprolactotransferrine humaine	73
2 - Sur les coprolactotransferrines de vache	73
D - Essais de saturation et de désaturation en fer	75
1 - Saturation en fer des coprolactotransferrines	75
2 - Désaturation en fer et resaturation des coprolactotransferrines	75
E - <u>Composition centésimale et molaire en glucides</u> <u>des coprolactotransferrines</u>	
1 - Coprolactotransferrine humaine	76
2 - Coprolactotransferrine de vache	76
3 - Conclusion	79
F - Composition molaire en acides aminés	79
G - <u>Identification des acides aminés N terminaux</u>	82
III - CONCLUSIONS	82

CONCLUSIONS GENERALES	85
I - ASPECT QUANTITATIF	85
II - ASPECT QUALITATIF	87
1 - Coprolactotransferrine humaine	87
2 - Coprolactotransferrine de vache	88
BIBLIOGRAPHIE	89

INTRODUCTION

Parmi les travaux entrepris au Laboratoire sur la maternisation des laits, nous nous sommes attaché au problème de la défense du tractus gastrointestinal du nourrisson en orientant nos recherches vers les facteurs responsables de la protection locale de l'intestin. Il est bien démontré que les enfants alimentés au lait maternel ne présentent qu'exceptionnellement des diarrhées infectieuses et que d'autre part en Pédiatrie le lait de femme sert de base thérapeutique à ce genre de diarrhées. A l'heure actuelle, les facteurs préventifs ou curatifs de la diarrhée du nourrisson présents dans le lait de femme ne sont pas connus. Toutefois il apparait que le mécanisme protecteur soit très complexe et fasse intervenir essentiellement deux types de facteurs:

- des facteurs microbiens représentés par les Lactobacillus qui sont des germes qui vivent en symbiose avec l'individu mais qui de plus lui sont utiles.
- des facteurs chimiques dont les plus importants sont les Immunoglobulines A d'excrétion, la lactotransferrine et le lysozyme. Ces facteurs chimiques semblent d'ailleurs agir en étroite association.

Parmi ces différents facteurs chimiques nous nous sommes plus particulièrement intéressé à la lactotransferrine qui, par sa propriété de fixer réversiblement le fer, doit présenter 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 métabolisme, et aux IgA de sécrétion qui jouent un rôle très important dans la défense intestinale en inhibitant l'adhérence à la muqueuse intestinale de différentes souches pathogènes.

Une première série de travaux effectués par MAZURIER-DEHAINE (!) a montré que, chez le nourrisson, la lactotransferrine apportée par le lait

maternel, résistait aux conditions physiologiques de la digestion.

Dans le présent travail, nous décrirons les résultats des dosages des transferrines, des Immunoglobulines IgA de secrétion, dans les selles de nourrissons alimentés avec du lait complémenté avec ces différents constituants, puis les résultats du dosage de la lactotransferrine humaine et des IgA lors de complémentations mixtes IgA lactotransferrine afin de savoir si les immunoglobulines A exercent un effet protecteur sur la lactotransferrine humaine.

Nous avons ensuite isolé la lactotransferrine humaine et la lactotransferrine de vache des selles de nourrisson et nous en avons fait une étude
physicochimique afin de voir si ces glycoprotéines conservent leur totale intégrité à la sortie du tube digestif.

GENERALITES

FACTEURS DE PROTECTION DE L'INTESTIN DU NOURRISSON

I - LA PROTECTION MICROBIENNE

Le nouveau-né est incapable de coexister avec un grand nombre de microorganismes, de bactéries pathogènes. Cependant le nourrisson vit en communauté étroite et plus ou moins harmonieuse avec de nombreux autres germes. De plus il maintient ce commensalisme pendant toute sa vie.

A - Nature de la flore intestinale

Chaque enfant, à condition qu'il soit nourri au sein, héberge dans son tube digestif une flore prédominante de Lactobacillus bisidus. Ceci avait été mis en évidence par les travaux de TISSIER (2), MORO (3), GYLLENBERG (4), SMITH et al. (5). Il ne s'agit pas d'une culture pure de Lactobacillus bisidus. Beaucoup d'autres germes sont présents tels que Lactobacillus acidophilus, les entérocoques, les colibacilles mais en faible quantité. L'enfant nourri artificiel lement ne possède pas de Lactobacillus bisidus; son tube digestif contient d'autres lactobacilles, des colibacilles, des clostridies et surtout des coques de natures diverses {MAYER et KESCHAWARZI (6)}. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de BULLEN et WILLIS (7).

B - Rôles de la flore bifide

Le Lactobacillus bifidus métabolise une grande variété de sucres en produisant de grandes quantités d'acides lactique, acétique, formique, succinique et propionique {SMITH et al. (8)}, {MOORE et al. (9)}, {DITTMANN et al. (10)}. Cette production d'acides abaisse le pH des selles d'enfants nourris au sein {NORTON et al. (11)} et stimule le péristaltisme dans les différentes formes de constipation. Cet environnement acide inhibe in vitro la croissance des Shigella, des Escherichia coli, des bacilles typhiques et paratyphiques ainsi

que des levures {HENTGES (12)}, {BERGHEIM (13)}. Ceci a été vérifié in vitro par TASSOVATZ (14) et SCHNEEGANS (15). Ces auteurs ont soigné des gastroentérites par implantations de bifides chez des malades.

BULLEN, ROGERS, LEIGH (16) ont bien mis en évidence la différence de comportement de jeunes animaux alimentés au lait artificiel ou tétant leur mère à la suite d'ingestion d'une quantité donnée d' Escherichia coli. 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 intestins ont permis de montrer que les bactéries pathogènes ingérées s'y multiplient pendant quelques temps. Au contraire tous les jeunes animaux nourris par leur mère ont bien supporté l'expérience, leur milieu intestinal n'est pratiquement pas colonisé par les germes pathogènes.

Ce processus d'autonettoyage correspond pratiquement à une stérilisation du tractus par des méthodes biologiques.

C - Conclusions

L'alimentation au sein assure l'hygiène du nourrisson sur le plan de la flore intestinale. Toutefois le problème reste entier quant à savoir si les germes de Lactobacillus bifidus interviennent directement en inhibant la prolifération des germes pathogènes où s'ils sont simplement le reflet d'un état satisfaisant de l'intestin du à l'action bactéricide ou bactériostatique de composés lactés.

II - LA PROTECTION CHIMIQUE

A - Les Immunoglobulines

1 - Caractères généraux

La présence de différentes classes d'Immunoglobulines IgA, IgG et IgM a été mise en évidence par ROWE, FAHEY (17), ISHIZAKA et al. (18)

mais les globulines immunes du colostrum et du lait de femme appartiennent surtout à la classe des IgA {MONTREUIL, CHOSSON, HAVEZ (19)}, {MURALT et al. (20)}. Leur différence de structure par rapport aux immunoglobulines IgA sériques fut mise en évidence par TOMASI et al. (21) et SOUTH et al. (22): figure (1) p. (7).

Dans le colostrum, les concentrations en IgA de sécrétion et en IgM sont respectivement de 17g/1 et 1,6g/1 le premier jour, et atteignent respectivement lg/1 et 0,1g/1 le quatrième jour {AMMAN et STIEHM (23)}. Des taux différents furent trouvés dans le colostrum et le lait des femmes indiennes MAYAN par MATA et WYATT (24). Le taux d'IgA atteint 4,1g/1 dans le colostrum et diminue jusqu'à 1,8g/1 deux semaines après l'accouchement.

Les variations qualitatives et quantitatives des protéides du lait de femme au cours de la lactation ont été bien étudiées et les analyses électrophorétiques ont montré la rapide diminution des globulines immunes du lait dont la "stabilisation" est réalisée vers le sixième jour {BISERTE et MASSE (25)}, {BISERTE et al. (26)}, {DEUTSCH (27)}, {FONTAINE (28)}, {MONTREUIL et al. (29)}.

2 - Rôle biologique

Pendant longtemps le rôle biologique des immunoglobulines du lait n'a été étudié qu'en fonction de la place qu'elles représentent dans l'immunité circulante acquise du nourrisson. Nous étudierons l'aspect de la question puis nous aborderons le problème de la participation des immunoglobulines dans la protection intestinale.

a) activité anticorps

Toutes les classes d'immunoglobulines exercent une activité anticorps. Cette activité anticorps est très importante pour le veau, ce dernier ne
possède à la naissance aucun anticorps sérique et c'est en ingérant le colostrum

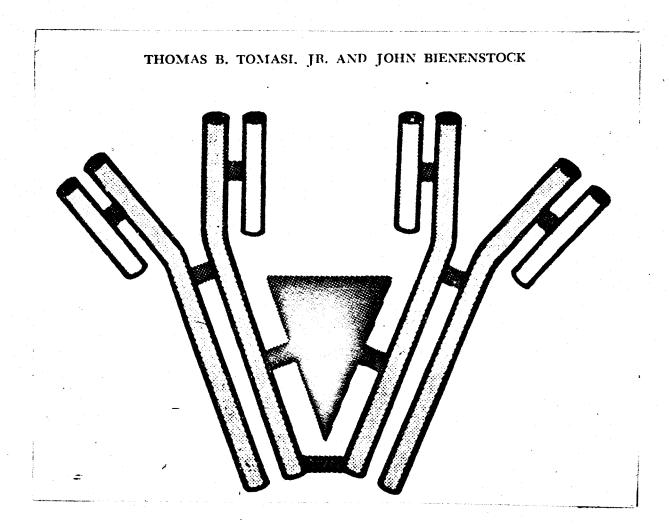




Figure 1 : Structure schématique des IgA de secrétion selon TOMASI et al. (21

pourvu d'anticorps dirigés contre de nombreux virus ou bactéries qu'il les acquiert Au contraire à la naissance, le sérum du nourrisson possède un taux d'anticorps déjà très élevé que ne font pas varier les ingestions de colostrum. Les immunoglobulines du lait de femme et du colostrum sont également le support de diverses activités anticorps. Les travaux rapportés à ce sujet par PAUPE et MEYER (30) sont résumés dans le tableau (I) p. (9).

b) immunité circulante

α - chez le veau : l'immunisation est réalisée par le colostrum de la mère car les IgG sont capables de franchir la barrière intestinale du nouveau né CHERON (31) présente dans son mémoire les différentes hypothèses de l'absorption des globulines colostrales de vache.

 β - chez l'homme : certains anticorps sont transmis de la mère à l'enfant per utero. Ceux qui traversent aisément le placenta appartiennent à la classe des IgG et une faible quantité aux classes des IgM et des IgA. Normalement les anticorps du colostrum ne sont pas absorbés par la muqueuse gastrointestinale humaine {NORDBRING (32)} et ont ainsi un rôle important dans l'immunité locale.

c) protection du tractus digestif

L'action des anticorps du lait humain semble être limitée au tractus digestif du nouveau-né. Ces anticorps sont plus résistants à la pepsine et à la digestion acide que ceux du sérum {KENNY et al. (33)}

Les IgA du colostrum sont intrinséquemment résistants à la digestion par la trypsine {SHIM et al. (34)}, de plus {LAKOWSKI et al. (35)} ont trouvé la présence d'un inhibiteur trypsique dans le colostrum pendant les cinq jours suivant l'accouchement. Le fait que les enfants nourris au sein présentent une plus grande résistance à la vaccination orale antipoliomyélitique, montre que les anticorps du lait humain agissent au niveau du tractus digestif {WARREN et al. (36)}. La persistance des anticorps du colostrum et du lait humain et leur activité dans le tractus intestinal ont été démontrées par SCHUBERT et GRUNBERG (37),

TABLEAU I : Anticorps présents dans le colostrum et le lait humain d'après

PAUPE - MEYER (30)

Anticorps	Référenc	ces
Antitoxime tétanique	DEBRE et al. LEMETAYER et al.	1930 1950
Anticorps coquelucheux	ADAMS et al.	1947
Anti D pneumoniae	MOUTON et al.	1970
Antistaphylolysines	NORDBRING	1952
Antistreptolysines	NORDBRING	1952
Antidiphtériques	LEMETAYER et al. VON GENDERSEN	1950 1934
Anticorps colibacillaires	ARNON et al. KENNY et al.	1959 1966
Anticorps typhiques 0 et M	TIMMERMAN SCHUBERT et al.	1931 1949
Agglutinines dysentériques	WONG et WONG	1930
Anticorps poliomyélitiques	MATA et WYATT KENNY et al. SABIN et al. MICHAELS	1971 1967 1962 1965
Anticorps ECHO virus 6 et 9	MICHAELS	1965
Anticorps virus de l'Influence A	SCHMIDT	1960
Anticorps coxsakie B, B ₃ , B ₅	DEBRE et al. MICHAELS	1930 1965
Anticorps ourliens	HUMMELER	1953
Anticorps grippaux	HUMMELER	1953
Anticorps vaccinaux	WEISS	1939

KENNY et al. (38), MICHAEL et al. (39), GINDRAT et al. (40), KATZ et PLOTKIN (41). Les IgA, par rapport aux autres classes d'anticorps, ne sont pas opsonisant, n'activent pas le système complémentaire, du moins, par la voie classique, ne possèdent pas d'activités homocytotropiques pour les mastocystes, présentent une faible activité pour les antigènes et sur le plan biochimique ne sont pas de bons anticorps précipitants.

Les IgA exercent leur rôle par des fonctions mécaniques. Des préparations d'IgA secrétoires obtenues à partir de la salive humaine inhibent de manière spécifique l'adhérence de différentes souches de streptocoques aux cellules épithéliales {WILLIAMS et GIBBONS (42)}. De même, les anticorps anti Escherichia coli gram + souche Kgg produitschez la truie par vaccination et transmis par le colostrum à l'intestin grèle du porcelet réduisent l'attachement de la souche K₈₈ à la muqueuse intestinale et rendent les bactéries moins virulentes. Cependant les taux élevés d'agglutinines K_{88} dans les sécrétions mammaires de truies non vaccinées suggérent qu'une partie de l'activité agglutinante du colostrum et du lait ne peut être attribuée entièrement aux anticorps {RUTTER et al. (43)}. Cette inhibition de l'adhérence, donc de l'invasion, prévient la colonisation de la muqueuse par les bactéries. Un processus similaire est mis en oeuvre pour empêcher l'intrusion d'antigènes non réplicatifs tels que les antigènes alimentaires, ceci in vitro {WALKER et al. (44)} et in vivo {ANDRE et al. (45)} L'IgA intestinale engagée dans des complexes antigènes-anticorps circulants se comporte comme un facteur de régulation des réponses immunes {ANDRE (46)}, (ANDRE et al. (47)). Cette fonction empêche l'appareil immunologique de s'épuiser dans une lutte inutile contre les bactéries et antigènes alimentaires et banaux mais elle peut s'avérer néfaste en favorisant la croissance d'un cancer {0'NEIL et al. (48)} en entravant la lutte antibactérienne dans une maladie infectieuse

grave {Mc LEOD GRIFISS (49)}.

B - Les lactotransferrines

1 - Caractères généraux

La lactotransferrine a été trouvée dans le lait humain par SHAFER (50) et isolée et caractérisée simultanément par MONTREUIL et al. (51) JOHANSON (52), BLANC et ISLIKER (53).

Une protéine rouge dans le lait de vache avait été signalée dès 1939 par SØRENSEN (54). Elle fut véritablement purifiée en 1960 par GROVES (55) à partir de la fraction caséinique, puis en 1965 par GROVES (56) à partir du lactosérum.

Les principales caractéristiques physicochimiques des lactotransferrines isolées du lait de femme et de vache ont fait l'objet d'un mémoire de
SPIK (57). Ces deux glycoprotéines possèdent en commun la propriété de fixer
réversiblement deux atomes de fer en deux sites spécifiques mais diffèrent par
leur masse moléculaire, leur point isoélectrique, leur pourcentage en oses. Le
lait de femme renferme un taux de lactotransferrine qui évolue au cours de la
lactation. Ce taux se stabilise à 1 à 2 g/1 de lait {MONTREUIL et al. (58)}.

Le lait de vache n'en contient que 20 à 200 mg/1 MASSON (59) mais.

ORAM-REITER (60) signalent une forte augmentation de cette glycoprotéine en fin de lactation.

2 - Répartition

La lactotransferrine longtemps considérée comme une protéine spécifique du lait a été mise en évidence dans les larmes, le liquide séminal, la salive, les sécrétions nasales, bronchiques et intestinales {BISERTE et al. (61)}, {MASSON et al. (62)}, {MASSON et al. (63)}, les cellules épithéliales, des glandes sous maxillaires {MASSON, HEREMANS (64)}, des glandes de l'endomètre {FRANKLIN et al. (65)} ainsi que dans les muqueuses de l'endomètre {TOURVILLE et al. (66)} du rectum et de l'utérus {MASSON et al. (67)}. LOISELIER et al. (68) ont démontré la présence de cette lactotransferrine dans les tissus sains

d'origine gastrique et colique.

MORISSON et ALLEN (69) ont révélé la présence de cette glycoprotéine dans les glandes salivaires et lacrimales de la vache.

3 - Rôle biologique

Pendant longtemps cette glycoprotéine fut considérée comme une source de fer pour le tout jeune enfant. Nous envisagerons l'intervention de la lactotransferrine dans l'apport du fer au nourrisson, puis nous aborderons la question de l'activité intestinale de cette métalloprotéine et plus particulièrement son rôle dans la protection de la muqueuse.

a) apport du fer au nourrisson

BLANC et ISLIKER (70) 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 (71), la lactotransferrine aurait un rôle primordial car elle permettrait l'introduction directe du fer dans le lait et le "taux" en fer du lait maternel serait en relation directe avec le taux de lactotransferrine synthétisée. MASSON (72) met en doute l'intervention directe de la lactotransferrine dans l'apport de fer par la secrétion mammaire. Il n'existe aucune relation entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine dans les laits de différents mammifères. Selon MASSON (73) la lactotransferrine serait captée par les cellules épithéliales de la glande mammaire et le fer serait alors repris par la ferritine dans des granules de nature lipidique. La secrétion du fer par le lait correspondrait à l'élimination de ces granules. Il n'est pas encore prouvé que la lactotransferrine favorise de façon importante l'apport de fer au nourrisson, mais selon BLANC (74) l'anémie par ferriprivation est plus marquée chez les nourrissons alimentés au lait de vache plutôt qu'au lait de femme.

b) protection de la muqueuse intestinale

La première barrière de protection est constituée par la surface de la muqueuse où sont localisés les sites d'invasion des germes pathogènes. Les moyens de défense les plus connus sont les IgA, le lysozyme: la lactotransferrine pourrait donc agir par un mécanisme analogue {MASSON et al. (75)}

α - lactotransferrine seule

L'activité bactériostatique de la lactotransferrine humaine fut démontrée in vitro pour Staphilococcus aureus {BLANC (76)}, pour Staphilococcus albus et Pseudomonas aeruginosa {MASSON-HEREMANS (77)} pour Staphilococcus epidermis {MASSON et al. (78)} pour Candida albicans {KIRKPATRICK et al. (79)}.

Les expérimentations de ORAM REITER (80) avec des lactotransferrines de lait de femme, de vache, de chèvre sur Bacillus stearothermophilus et Bacillus subtilis montrent que ces glycoprotéines possèdent toutes une activité bactériostatique à condition qu'elles ne soient que partiellement saturées en fer. Ceci a été démontré par BULLEN et al. (81). Ces auteurs ont constaté que la prolifération des Escherichia coli 0 111 B₄ était ralentie par la lactotransferrine humaine isolée, par le lait humain et le colostrum de vache. Cet effet est aboli par addition de fer. REITER et al. (82) ont étudié l'action de la lactotransferrine du colostrum de vache. Ces auteurs démontrent le rôle important du pH. Ceci avait déjà été signalé par BULLEN et al. (83). L'effet inhibiteur s'exerce sur la croissance des Escherichia coli à condition que le milieu soit tamponné à un pH supérieur à 7,5 par du bicarbonate de sodium. Au desssous de pH 6,95 il n'y a plus d'activité. Les mêmes effets avaient été observés avec le sérum et Clostridium welchii {BULLEN, DOBSON, WILLIS (84)}, le sérum et Pasteurella septica {BULLEN, ROGERS, LEWIN (85)}.

Le bicarbonate augmente la fixation de fer par la lactotransferrine MASSON, HEREMANS (86). REITER, BROOK, STEEL (87) ont montré qu'en absence d'un excés de bicarbonate, le citrate interfère dans la fixation du fer et supprime l'activité bactériostatique. Ces auteurs expliquent ce phénomène en admettant que la bactérie utilise plus facilement le fer complexé au citrate que le fer

fixé par la lactotransferrine.

L'expérimentation in vivo de BULLEN et al. (88) sur le cochon d'Inde dont le lait est riche en lactotransferrine montre l'importance du rôle joué in vivo par la lactotransferrine. Une surcharge en fer due à l'ingestion d'hématine par l'animal est suivie d'une augmentation du nombre des Escherichia coli au niveau de l'intestin. La lactotransferrine agirait donc en captant le fer du milieu qui conditionne en grande partie le métabolisme bactérien.

β - la lactotransferrine associée aux anticorps

Les résultats obtenus par BULLEN et al. (89) démontrent que l'activité bactériostatique de la lactotransferrine envers Escherichia coli 0111 B₄ H₂ est fortement augmentée en présence d'anticorps spécifiques. Il était facile de penser que les effets de la lactotransferrine et des anticorps étaient additifs, or, en saturant la lactotransferrine, toute activité inhibitrice disparaît. BULLEN, ROGERS, LEWIN (90) indiquent que la bactériostase résulte de l'action combinée de la transferrine, des anticorps et du complément. Le rôle des anticorps et du complément serait de neutraliser l'activité d'un produit bactérien chélateur de fer qui transporterait le fer de la transferrine vers la cellule bactérienne. Il semble donc qu'il y ait une synergie entre transferrine et anticorps. De même cet effet bactériostatique lié aux anticorps et à la lactotransferrine a été récemment confirmé par REITER et al. (91).

L'activité bactériostatique de la lactotransferrine semble être en relation directe avec son aptitude à fixer le fer, qu'elle agisse seule ou en synergie avec d'autres composés tels que les IgA, le lysozyme.

C - Le lysozyme

1 - Caractères généraux

Le lysozyme est une glycosidase qui est capable d'hydrolyser la muréine, principal élément pariétal des bactéries, en coupant les liaisons glycosi-

diques de l'acide N-acétyl muramique. Il s'agit d'une N-acétyl muramidase. Cette protéine isolée du blanc d'oeuf existe également dans les cellules, le sérum et les secrétions {GLYNN (92)} incluant le lait {CHANDAN et al. (93)} et parfois les selles {BRAUN (94)}, {GOLDBACH et al. (95)}.

Le lysozyme du lait humain est thermostable (100°C) à pH acide et de plus est aussi actif que le lysozyme de blanc d'oeuf {JOLLES et JOLLES (96)] La concentration dans le lait humain est 300 fois supérieure à celle du lait de vache. BRAUN (97), CHANDAN (98) ont montré que sa concentration était de 290 à 390 mg par litre.

2 - Rôle biologique

ROSENTHAL et al. (99) HAENEL et al. (100) prouvent que le lysozyme se retrouve plus fréquemment dans les selles de nourrissons alimentés au sein que dans les selles de nourrissons alimentés au lait de vache.

In vitro, les bactéries pathogènes sont lysées par le lysozyme après action de la chaleur, des acides et des alcalis {COLEMAN et al. (101)}, {COLOBERT (102)}, {NEU et al. (103)}, {PETERSON et al. (104)}.

HANEBERG et FINNE (105) ont mesuré l'activité du lysozyme dans les extraits de méconium, de selles provenant de nourrissons et d'enfants en bonne santé, ainsi que dans le lait de femme en bonne santé. Ces résultats sont donnés dans le tableau II p. (16).

Ces mêmes auteurs ont mesuré l'activité du lysozyme dans les selles de prématurés en fonction du type d'alimentation. Ils ont constaté une plus grande activité du lysozyme dans les extraits de selles de nourrissons alimentés au lait maternel que dans les extraits de selles de nourrissons alimentés au lait de vache. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III p. (17). Le lysozyme du lait humain semble donc mieux résister au tractus gastrointestinal puisque ce lysozyme se retrouve à des taux élevés dans les selles de prématurés recevant ce lait.

TABLEAU II : Activité du lysozyme dans le sérum et les extraits de méconium et de selles de nourrissons et d'enfants en bonne santé ainsi que dans le lait de femme en bonne santé, mesurée par diffusion l'agar : méthode utilisant le lysozyme de blanc d'oeuf comme témoin.

Matériel	Age des individus	Nombre total d'individus lors	Nombre total d'in- dividus ayant du	lysozyme	en µg/ml	
		de l'expérimentation	lysozyme détectable	Valeur moyenne	Ecart	
sérum	0-13 ans	95	95	152	62-400	
méconium	1-3 jours	10	0			
selles	1-12 mois	17	10	2,5	0-13	
selles	12-36 mois	18	10	1,9	0-8	
selles	3-13 ans	15	3	0,7	0-6	• .
lait humain	3 jours à 6 mois	73	73	556	84-400	

Lysozyme mesurable $\geq 1,2 \,\mu\text{g/ml}$ Lysozyme non mesurable 0



TABLEAU III : Activité du lysozyme dans les extraits des selles, et pH des selles de prématurés nourris soit au lait humain, soit avec une formule de lait de vache ordinaire, soit avec une formule supplémentée en lysozyme de blanc d'oeuf 400 µg/ml.

	Nombre total Nombre d'échantil- d'échantillons lons dans lequel le		Lysozyme en µg/ml	рН	
	•	lysozyme est mesurable	Taux moyen Ecart Vale	urs moyennes	Ecart
Lait humain	58	58	757 2–3500	5	4-5,5
Formule de lait de vache ordinaire	102	54	1,8 0-45	6,4	5,5-8
Formule du lait de vache supplémenté avec du lysozyme de					
blanc d'oeuf de poule	84	22	23,6 0-600	6,1	5-8



Ainsi les lysozymes pourraient jouer un rôle actif dans la défense contre l'infection en intervenant dans un système de régulation de l'équilibre entre les différentes espèces pathogènes ou non de bactéries.

D - <u>Les cellules colostrales</u>

Les travaux de DIAZ-JOUANEN et WILLIAMS (106) indiquent que le colostrum contient des macrophages 1459/mm³ et des lymphocytes 211/mm³. Parmi ces lymphocytes, environ 50 p. 100 sont des lymphocytes T et 34 p. 100 des lymphocytes B. Les cellules colostrales, probablement des macrophages, synthétisent le facteur C³ du complément {MURILLO et al. (107)}. GOLDBLUM et al. (108) ont montré qu'elles produisent aussi du lysozyme, le facteur C⁴ du complément et la lactotransferrine. MURILLO et al. (109) ont montré que ces cellules synthétisent des immunoglobulines de type IgG et IgM mais surtout des IgA de secrétion, la forme la plus abondante dans le colostrum. La pièce de secrétion attachée aux IgA a d'ailleurs été trouvée dans les cultures de cellules colostrales {MURILLO et al. (110)}. DIAZ-JOUANEN et WILLIAMS (111) ont montré que la moitié des B lymphocytes sont des cellules portant des IgA à leur surface.

Les lymphocytes colostraux sont stimulés in vitro par la phytohémagglutinine et la concanavaline A (SMITH et GOLDMANN (112)) (SMITH et al. (113)). Le colostrum humain contient un facteur d'inhibition de la réponse des lymphocytes à la PHA. Les cellules T présentes dans le colostrum humain seraient capables de transférer des molécules de médiateur tel qu'un facteur de transfert ou un facteur d'inhibition de migration au nouveau né (MOHR et al. (114)).

E - Autres facteurs chimiques

1 - Le complément

MATA et WYATT (115) ont découvert dans le colostrum le composant C'.
du complément important dans la lyse des bactéries. D'autres auteurs, ANDRE et al.

(116), BALLOW et al. (117) ont mis en évidence les composants C_3 et C_4 du complément dans le lait humain, mais en moins grande concentration que dans le sérum. Il semble paradoxal que les composants C_4 et C_5 soient présents dans le lait puisque les immunoglobulines IgG et IgM qui activent le complément en fixant le composant C_1 , sont en faible concentration. Récemment un C_3 proactivateur a été décrit. GOTZE et al. (118) ont montré qu'il était stimulé par les IgA, et par les IgE {ISHIZAKA et al. (119)}. La présence de ce C_3 proactivateur dans le lait a été démontrée par immunochimie {ANDRE et al. (120)}.

Le composant C₃ semble être activé in vivo par les IgA du colostrum ou par les IgE {GOLDMAN et SMITH (121)}. Le C₃ activé dans le lait pourrait être important puisqu'il est connu pour ses propriétés opsonisantes, anaphilactiques et chimiotactiques.

2 - La lactoperoxydase

THEORELL et al. (122), STEELE et al. (123) ont trouvé dans le lait et la salive une peroxydase unique favorisant la destruction des streptocoques in vitro. Cette enzyme associée aux ions thiocyanate et à l'eau oxygénée constitue un système antibactérien dans le lait in vitro {PORTMANN et AUCLAIR (124)}, {ORAM et REITER (125)} {STEELE et al. (126)}.

3 - Facteur antistaphylocoque

A partir d'observations cliniques GYORGY et al. (127) étudient les propriétés antistaphylocoques du lait humain. Ces auteurs démontrent la présence d'un facteur thermostable antistaphylocoque dans le lait humain en expérimentant in vivo sur des jeunes souris. Ce facteur semble être un acide gras en C_{18:2} différent de l'acide linoléique.

MATERIEL ET METHODES

PREPARATION DES PROTEINES

I - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

La lactotransferrine humaine est préparée selon le procédé mis au point par CHERON (128) pour l'isolement de la lactotransferrine du lait de vache. Le lait maternel délipidé et décaséiné est passé sur une colonne d'échangeur d'ions de type SP-Sephadex stabilisée dans un tampon acétate de sodium 0,22 M. La lactotransferrine se fixe sur l'échangeur. Ce dernier est lavé par un tampon de force ionique plus élevé 0,265 M. L'élution de la lactotransferrine s'effectue ensuite avec une solution d'acétate de sodium l M. L'éluat est dialysé puis lyophilisé. Le lyophilisat redissous dans un tampon acétate de sodium 0,22 M est rechromatographié sur une colonne de SP-Sephadex stabilisée dans un tampon acétate de sodium 0,22 M. L'élution de la lactotransferrine s'effectue avec un gradient discontinu de force ionique, d'acétate de sodium 0,4 M puis 0,5 M. L'éluat est concentré sur Hallow Fiber (HIDP 10 10000 Mw) dialysé puis lyophilisé.

II - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DU LAIT DE VACHE

Nous avons utilisé le procédé mis au point au Laboratoire par CHERON (129). Le lait de vache délipidé et décaséiné est chromatographié sur une colonne d'échangeur d'ions type S.E Sephadex, stabilisé dans un tampon acétate de sodium 0,22 M. L'élution de la lactoperoxydase s'effectue avec de l'acétate de sodium 0,265 M. L'élution de la colonne se poursuit avec un tampon acétate de sodium 1 M. La fraction acétate de sodium 1 M est dialysée, liophylisée puis redissoute dans de l'acétate de sodium 0,22 M puis rechromatographiée sur une nouvelle colonne de SE-Sephadex stabilisée dans un tampon acétate de sodium 0,22 M. L'élution de la lactotransferrine s'effectue par un gradient discontinu de force ionique, d'acétate de sodium 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M. La lactotransferrine ainsi éluée est dialysée puis lyophilisée.

III - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

La transferrine sérique est préparée selon le procédé de ROOP et al. (130). Le principe de cette méthode est fondé sur la précipitation au rivanol des constituants de la fraction IV de COHN.

Les immunoglobulines IgG sont ensuite éliminées, par précipitation au sulfate d'ammonium à 55 p. 100 de saturation et à pH 6,5. La sérotransferrine précipite à 70 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et à pH 6,5. La dernière étape de purification consiste en un fractionnement sur colonne de DEAE Sephadex A 50 stabilisée dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8. L'élution de la sérotransferrince s'effectue par un gradient de force ionique en Tris de 0,05 M à 0,3 M.

IV - PREPARATION DES IMMUNOGLOBULINES IGA D'EXCRETION

Nous avons utilisé deux techniques pour préparer les IgA du lait de femme.

A - A partir du lactosérum total

Nous utilisons la méthode employée par DESCAMPS (131). Nous effectuons une filtration sur gel de Sephadex G-200 (5 x 100 cm) du lactosérum humain concentré par dialyse contre du polyéthylène glycol 20 000 Mw. L'élution par du tampon Tris 0,1 M - NaCl I M nous fournit plusieurs pics. Le second est constitué d'IgA. Cette fraction est dialysée puis lyophilisée.

B - A partir du précipité P₂

Le précipité P₂ obtenu au cours du fractionnement du lactosérum par un gradient de concentration en sulfate d'ammonium, associé à un gradient de pH, selon le procédé de MONTREUIL (132), modifié par DESCAMPS (133) est redissous dans l'eau distillée. Nous utilisons ensuite la technique préconisée par MAENO et al. (134) pour précipiter l'α-lactalbumine. La solution est acidifiée à pH 4,8. Ce pH correspond au point isoélectrique de l'α-lactalbumine qui, de ce fait, précipite et la solution s'enrichit en IgA.

Cette solution est alors chromatographiée sur gel de Sephadex G-150 (5 x 100 cm) ou sur gel de Sephadex G-200 (5 x 100 cm). L'élution de la colonne s'effectue avec du tampon Tris 0,1 M NaCl 1 M. Nous obtenons plusieurs pics dont l'un renferme des IgA souillées par la chaîne de secrétion.

PREPARATION DES IMMUNSERUMS

Nous avons employé la technique de VAITUKATIS et al. (135). Deux milligrammes d'antigène solubilisés dans un millilitre de sérum physiologique sont additionnés à deux millilitres d'adjuvant complet de FREUND (Difco Laboratories Detroit Michigan) puis injectés sous forme d'une quarantaine d'injections sur le dos d'un lapin. Ces injections sont suivies d'une injection de vaccin anticoquelucheux par voie sous cutanée. Après trois semaines, un premier prélèvement de sang est effectué dans la veine marginale de l'oreille. Après un repos d'1 à 37°C, le sang est centrifugé 10 mm à 2000 tours/mm. Il se forme alors un culot d'hématies Le sérum, contenant les anticorps est prélevé, puis congelé à - 20°C.

TRAITEMENT DES SELLES DE NOURRISSONS

Les selles sont reprises par environ 300 ml d'eau permutée, additionnée de quelques gouttes de toluène et soumises à une agitation pendant une heure. Les selles sont dialysées contre de l'eau pendant trois jours, puis centrifugées une heure à 4000 tours/mn; filtrées sur papier Whatman 3 et lyophilisées Une partie des selles reprises par de l'eau permutée a été amenée à pH 8 par de l'ammoniaque afin de mieux resolubiliser les différents constituants.

METHODES D'ANALYSES IMMUNOLOGIQUES DES CONSTITUANTS PRESENTS DANS LES SELLES

I - IMMUNODIFFUSION SIMPLE

Nous avons utilisé la technique d'OUCHTERLONY (136). Dans ce cas la diffusion de l'échantillon à analyser et de l'immunsérum a lieu sans électrophorèse préalable. Nous coulons à la surface d'une lame de microscope (75 x 25 mm) 3 ml d'agar à 0,75 p. 100 dans du tampon veronal pH 8,2. Puis nous découpons à l'emporte pièce des petits trous autour d'un trou central : le trou central est rempli d'immunsérum, les trous latéraux sont remplis avec l'antigène.

II - IMMUNOELECTROPHORESE

Nous utilisons la technique d'immunoélectrophorèse de GRABAR et WILLIAMS (137) surgélose en suivant la technique de SCHEIDEGGER (138). Nous déposons sur des lames de verre de la gélose à 0,75 p. 100 dans un tampon véronal pH 8,2. La quantité d'antigène déposée est de 2 µl. La durée de migration est de deux heures sous une tension de 25 volts. Nous découpons ensuite à l'emporte pièce une fente que nous remplissons d'immunsérum. La diffusion s'effectue pendant 48 heures en chambre humide et à température ambiante.

Nous avons également utilisé une méthode légèrement modifiée. Nous avons raccourci la fente en longueur et nous avons creusé dans le prolongement de la fente courte un autre petit puits que nous avons rempli après électrophorèse d'antigène. Ceci nous permet de mieux visualiser les raccordements d'arcs.

III - DOSAGE DES ANTIGENES

Nous avons utilisé la technique d'immunodiffusion radiale ou technique de MANCINI (139).

A - Principe

L'antigène est déposé dans un puits creusé dans le gel renfermant.

l'anticorps correspondant à une concentration constante. La diffusion de l'antigène autour de son point d'ensemencement réalise un gradient de concentration décroissant en antigène. Quand le rapport optimum antigène est atteint, il se forme un anneau de précipitation. Au delà, il y a excés d'anticorps; en deça excés d'antigène donc inhibition de la précipitation.

B - Mode opératoire

Nous coulons à la surface d'une lame de verre (10 x 10 cm) un volum fixe du mélange gélose-antisérum (15 ml). Le volume d'antisérum incorporé est fonction du titre de l'immunsérum. Nous découpons à l'emporte pièce des puits de même diamètre que nous remplissons, à la seringue Hamilton, de 2 µl de solutions d'antigène étalon (0,25 à 10 p. 100) et de 2 µl des solutions à analyser. Après 48 h de diffusion à température ambiante en chambre humide nous mesurons les diamètres des anneaux de diffusion.

C - Expression des résultats

1- expression mathématique précise

Nous savons que la surface ¶R² de la base du cylindre de précipitation formé est directement proportionnelle à la quantité d'antigène Q Ag déposée.

$$Q Ag = V Ag \times C Ag$$

 $\Re^2 = KV Ag \times C Ag + K'$

V Ag = volume d'antigène

C Ag = concentration en antigène

Expérimentalement ce sont les diamètres des zones de précipitation qui sont mesurés.

$$D^{2} = K Q Ag + K_{2}$$
ou
$$D^{2} = \frac{4K}{\pi} V Ag \times C Ag + K_{2}$$

P = pourcentage d'immunsérum dans le gel

Le facteur K s'identifie à 1/Pht

h = épaisseur du gel

t = titre de l'immunsérum

Le facteur K_2 s'égalise à d^2 si d est le diamètre du trou d'ensemencement. Nous pouvons donc écrire que

$$D^2 = \frac{4}{9 \text{ Pht}}$$
 V Ag C Ag + d^2

Cette relation montre que D^2 est proportionnel à la concentration en antigène C Ag2 - utilisation pratique

Nous traçons la courbe D = f (log C Ag) à partir des solutions antigéniques étalon. Nous obtenons une droite qui s'infléchit pour des concentrations supérieures à 2 p. 1000 en antigène. Par lecture directe nous obtenons la concentration en une protéine donnée. La valeur de l'ordonnée à l'origine correspond au diamètre du trou d'ensemencement. La pente de cette droite est inversement proportionnelle à la concentration du gel en anticorps.

METHODES D'ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE DES CONSTITUANTS DES SELLES

I - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

A - Tamisage moléculaire

Nous avons utilisé une colonne d'Ultrogel AC₄₄ (125 x 1,6 cm) stabilisée dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Nous avons tout d'abord procédé à un étalonnage de cette colonne en masse moléculaire. Nous avons injecté des témoins de masse moléculaire connue tels que les immunoglobulines IgG de masse moléculaire 320.000 et 160.000, de la lactotransferrine humaine de masse moléculaire 76.000, de l'ovalbumine de masse moléculaire 43.000.

B - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Nous utilisons la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide de NEVILLE (140) en présence de SDS, en présence et en absence de mercaptoéthanol. Nous avons étalonné le gel avec des protéines et des glycoprotéines de mas moléculaire connue telles que la lactotransferrine humaine et la lactotransferrine de vache, des immunoglobulines IgG et de la RNase pancréatique. La courbe d'étalonnage est tracée en reportant la valeur du Rf de chaque substance et le logarithme de sa masse moléculaire selon SHAPIRO et al. (141).

II - DOSAGE DU FER

Le dosage du fer a été effectué selon la méthode à la ferrozine de CARTER (142).500 μl de la solution à doser sont additionnés à 500 μl d'acide ascorbique à 0,02 p. 100 dans de l'acide chlorhydrique 0,2 N. Après un repos de 5 mn à température ambiante nous ajoutons 500 μl d'acide trichloroacétique à 11,3 p. 100. Le tube est ensuite bouché puis centrifugé. Nous prélevons alors l ml du surnageant auquel sont ajoutés 400 μl d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 10 p. 100 et 100 μl du réactif à la ferrozine (75 mg dans 25 ml d'eau). Après agitation nous effectuons la lecture à 562 nm contre de l'eau. De la même façon nous faisons un témoin blanc ainsi qu'un témoin fer à l μg/ml.Le calcul de la concentration en fer s'effectue de la façon suivante:

 $\frac{A_{\text{solution inconnue}} - A_{\text{témoin blanc}}}{A_{\text{témoin à lµg/ml}} - A_{\text{témoin blanc}}} = \mu g \text{ de fer/ml d'échantillon}$

III - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN GLUCIDES

A - Composition centésimale en glucides

Nous avons déterminé la composition centésimale en glucides par calorimétrie à l'aide des techniques suivantes : (voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK (143)).

1 - Monosaccharides neutres

Nous avons utilisé la technique à l'orcinol sulfurique de TILMANS et PHILIPPI (144) modifiée par RIMINGTON (145).

2 - Hexosamines

Nous appliquons la technique d'ELSON MORGAN (146) modifiée par BELCHER et al. (147). Les composés sont tout d'abord hydrolysés par l'acide chlorhydrique 4 N redistillé et exempt de fer, à 105°C pendant 4 h en tube scellé sous vide.

3 - acides sialiques

Nous employons la technique à la diphénylamine de WERNER et ODIN (148).

B - Composition molaire en glucides

La composition molaire en glucides a été déterminée après méthanolyse par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de ZANETTA et al. (149) adaptée au Laboratoire par FOURNET (150).

IV - COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINES

La composition molaire en acides aminés est déterminée après hydrolyse pendant 24 h par l'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé, sous vide, à 105°C. Le dosage des amino-acides est effectué à l'auto analyseur BECKMAN suivant le principe général de SPACKMAN et al. (151).

V - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par deux techniques : la technique des dansyl amino-acides de PERSY et BUCHWALD (152) et la technique des PTH amino-acides.

A - Technique des dansyl amino-acides

Le chlorure de dansyl réagit avec le groupement NH2 de l'acide

aminé N-terminal. L'identification des dansyl amino-acides s'effectue en chromatographie sur couche mince.

1 - Réaction de dansylation

Cinq nanomoles de protéines sont dissoutes dans un tampon pH 9,2 (urée 8 M, bicarbonate 0,2 M) auquel est ajouté la diméthyl formamide. Après agitation nous ajoutons le chlorure de dansyl à 5 p. 100. Le pot de centrifugation est couvert de parafilm et abandonné l h à 37°C. Les protéines sont ensuite précipitées par de l'acide trichloroacétique. Après centrifugation le précipité est lavé par de l'acétone afin d'éliminer l'excés de chlorure de dansyl. Le résidu est séché sous vide puis hydrolysé par l'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 16 h en tube scellé. La solution est évaporée à l'abri de la lumière. Le résidu sec est repris par de l'acétate d'éthyle saturé d'eau.

2 - Identification des dansyl amino-acides

La séparation des dansyl amino-acides s'effectue en chromatographie bidimentionnelle sur couche mince de polyamide {WOODS et WANG (153) et HARTLEY (154)}. La première migration s'effectue dans de l'acide formique 1,5 p. 100 (v/v) la seconde dans le mélange solvant benzène ; acide acétique 9/1 (v/v). Il est possible d'effectuer une troisième migration dans le même sens que la seconde dans le système solvant acétate d'éthyle ; méthanol ; acide acétique 20/1/1 (v/v/v). Grâce à leur fluorescence en lumière ultraviolette les dansyl amino-acides sont identifiés par comparaison avec des cartes "Témoins".

B - Méthode de dégradation récurrente d'EDMAN (155)

Le procédé utilisé est celui mis au point par HAN et al. (156).

1 - Etape de couplage

Deux micromoles de protéines sont dissoutes dans un minimum de tampon n-propanol/eau/diméthylallylamine 15/10/1,2 (v/v/v) ajusté à pH 9,5 avec

de l'acide trifluoroacétique. Après addition du phénylisothiocyanate à raison de 10 μl pour 100 μl de tampon nous plaçons le tube sous atmosphère d'azote. La réaction s'effectue à 50°C pendant 40 mm en agitant toutes les 5 mm. Après refroidissement du tube nous extrayons les diphénylthiourées par le benzène. La phase aqueuse est séchée sous azote puis sous vide au dessicateur à 50°C pendant 30 mm.

2 - Clivage

Le résidu sec redissous dans l'acide trifluoroacétique anhydre est placé pendant 7 mm à 50°C sous atmosphère d'azote. L'acide est alors éliminé par un courant d'azote. La thiazolinone est extraite par du chlorobutane renfermant 0,1 p. 100 de dithioérythritol.

3 - Conversion

La phase organique est séchée sous azote. La conversion s'effectue par de l'acide chlorhydrique additionné d'acide ascorbique, à 80°C pendant 10 mn sous atmosphère d'azote. La phase organique est séchée sous azote puis le résidu est repris par un petit volume d'acétate d'éthyle.

4 - Identification des PTH amino-acides

Les PTH amino-acides sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le système solvant est le système H₁ d'EDMAN et BEGG (157); chlorure de méthyléne : acide acétique 60; 14 (v/v). L'identification des PTH amino-acides s'effectue à l'aide de témoins latéraux.

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES CONSTITUANTS DE NATURE PROTEIQUE PRESENTS DANS DIFFERENTS LAITS ET DANS LES SELLES DE NOUVEAUX-NES

I - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES LAITS

Nous avons utilisé des laits en poudre et le lait Gloria pour la plupart de nos expériences de complémentation. Il était donc important d'identifier la nature des protéines présentes dans ces laits.

A - Etude du lait Gloria: Figure (2) p. (33)

L'immuno-électrophorèse a été réalisée en utilisant le lait Gloria non dilué, dilué au 1/4 et au 1/10 en présence d'un sérum de lapin anti protéides de lait de Vache. Dans ces conditions nous n'avons pas observé d'arc de précipitation. Les protéines semblent donc être fortement dénaturées et pourtant ce lait est très bien digéré par l'organisme du nourrisson. Ce lait qui ne contient pas de protéines réagissant avec les immunsérums utilisés, et qui d'autre part est très bien assimilé sera donc un support de choix pour nos expérimentations.

B - Etude du lait en poudre Nativa: Figure (2) p. (33)

L'analyse immunoélectrophorétique de ce lait en poudre en solution à 5 p. 100 révèle la présence de deux protéines qui s'apparentent à celles présentes dans le lait de vache. Il s'agit de l' α -lactalbumine qui présente une bifidité et de la β -lactoglobuline.

C - Conclusion

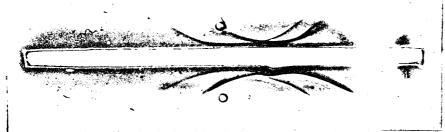
L'étude de ces deux laits montre tout d'abord la pauvreté en substances de nature protéique et surtout l'absence de la lactotransferrine. Ce dernier facteur étant trés important pour nos expérimentations ultérieures.



Lait de vache Sérum anti lait de vache Lait Gloria concentré

Lait Gloria (1/4)
Sérum anti lait de vache
Lait Gloria (1/10)





Lait en poudre Nativa Sérum anti lait de vache Lait de vache

Figure 2: Etude immunoélectrophorétique du lait Gloria (concentré dilué, au 1/4, au 1/10) et du lait Nativa en solution à 5 p. 100

II - <u>ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES SELLES DE NOURRISSONS EN FONCTION DE LEUR</u> ALIMENTATION

Cette étude a été réalisée en utilisant des immunsérums spécifiques et des sérums anti protéines totales.

A - Alimentation au lait de Femme

Les résultats sont reportés sur les figures {(3) (4) (5) (6)} p. {(35), (36), (37), (38)}

- avec le sérum anti protéines sériques humaines (A S H), nous obtenons en général deux arcs de précipitation analogues à ceux correspondant aux immunoglobulines IgA et à $1'\alpha_1$ -antitrypsique.
- avec le sérum anti-lait de Femme (AS LF) nous avons obtenu plusieurs arcs de précipitation que nous avons tenté d'identifier en utilisant des sérums monospécifiques.
- avec le sérum anti-IgA de secrétion (AS IgA) nous voyons apparaître deux arcs de précipitation, le premier correspond aux IgA et le second de très faible intensité, correspondant à la chaîne de secrétion.
- avec le sérum anti lactotransferrine humaine (AS LTF) nous obtenons un arc de précipitation très net.
- B Alimentation au lait Gloria seul et complémenté en protéines

 Les résultats sont reportés sur les figures {(3) (4) (5) (6)} p.

 {(35), (36), (37), (38)}
- avec le sérum anti protéines sériques humaines (A S H), l'immunoélectrophorèse révèle la présence de trois ou quatre arcs de précipitation suivant les selles étudiées. L'un se situe dans la zone des immuno-globulines IgG, un autre dans la zone des albumines, les deux autres arcs que nous avons rencontréssemblent s'identifier au IgA et à l'α₁-antitrypsique.
 - avec le sérum anti-lait de Femme (AS LF) nous obtenons un arc

Selles 4% ANOUK S

Alimentée au lait maternel Anti sérum humain

Selles 4% JOHNNY C

Alimenté au lait Gloria complémenté en sérotransferrine

Alimentée au lait maternel Anti sérum humain

> Alimentée au lait Gloria complémenté en sérotransferrine

Selles 4% AUDREY B

ASH

Selles 4% VALERIE B

. Selles 4% HUGUES . C

A.SH

Selles 4 % SAÏDA B

Alimenté au lait maternel

Anti sérum humain

Alimenté au lait Gloria complémenté en sérotransferrine

Figure 3 : Etude immunoélectrophorétique des selles de nourrissons alimentés au lait maternel ou au lait Gloria complémenté



Selles 4% HUGUES C

Alimenté au lait maternel

A.LF

Anti lait de femme

Selles 4% SAÏDA B

Alimenté au lait Gloria complémenté en sérotransferrine

Anti lait de vache

Alimenté au lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache

Anti lait de femme

A.LV

Selles 4% PATRICK D

A.LF

A.LTV

Selles 4% PATRICK D

A.LTF

Anti lactotransferrine de vache
Alimenté au lait Gloria complémenté
en lactotransferrine de vache

Anti lactotransferrine humaine

Figure 4 : Etude Immunoélectrophorétique des selles de nourrissons alimentés au lait maternel ou au lait complémenté

A.lg A

Anti Imunoglobulines A

Alimenté au lait Gloria complémenté **PATRICK**

en lactotransferrine de vache

A.SH

Anti sérum humain

Anti Immunoglobulines A Alimenté au lait maternel Anti lactotransferrine humaine

Selles 4% HUGUES C

A.LTF

A.lg A

Figure 5 : Etude immunoélectrophorétique des selles de nourrissons alimentés au lait maternel ou au lait Gloria complémenté

Selles 4% ANOUK S

A.TS

Selies 4% JOHNNY C

Alimentée au lait maternel
Anti transferrine sérique
Alimenté au lait Gloria
complémenté en sérotransferrine

Alimenté au lait maternel Anti transferrine sérique

> Alimenté au lait Gloria complémenté en sérotransferrine

Selles 4 % HUGUES, C

A.TS

Selles 4 % SAÏDA . B

Figure 6 : Etude immunoélectrophorétique des selles de nourrissons alimentés au lait maternel ou au lait Gloria complémenté

de très faible intensité dans la région anodique.

- avec le sérum antilactotransferrine humaine (AS LTF), dans le cas d'une alimentation au lait Gloria seul nous n'obtenons pas d'arc de précipitation.
- avec le sérum anti protéines de lait de vache (AS LV) nous avons pu confirmer l'absence de la lactotransferrine de Vache dans les selles de nourrissons alimentés au lait Gloria, par contre, nous obtenons un arc de précipitation dans le cas d'une complémentation avec de la lactotransferrine de Vache. Ceci a été vérifié en utilisant un sérum anti lactotransferrine de Vache (AS LTV). La forme de l'arc de précipitation montre que cette protéine a été modifiée.
- avec le sérum anti Immunoglobulines A de secrétion (AS IgA) nous obtenons un arc de précipitation correspondant aux IgA ainsi qu'un arc de faible intensité correspondant à la chaîne de secrétion.

C - Conclusions

Nous confirmons les résultats de MAZURIER-DEHAINE (158) concernant la présence de la lactotransferrine humaine dans les selles de nourrissons alimentés au lait maternel.

La lactotransferrine de Vache absente dans les selles de nourrissons alimentés au lait Gloria seul se retrouve dans les selles de nourrissons ayant reçu une alimentation complémentée en lactotransferrine de Vache.

Aussi bien chez les enfants alimentés au lait maternel que chez ceux alimentés au lait Gloria les immunoglobulines A de secrétion, la chaîne de secrétion et $1'\alpha_1$ -antitrypsique sont présentes.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE DES "COPRO-PROTEINES" PAR LA TECHNIQUE DE L'IMMUNODIFFUSION RADIALE

I - MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE LA COPROLACTOTRANSFERRINE HUMAINE D'ORIGINE ENDOGENE

A - Caractéristiques du nourrisson

Le nourrisson Laurent C. âgé de quinze jours a été alimenté au lait maternel pendant la première semaine suivant la naissance puis exclusivement au lait en poudre Nativa.

B - Résultats

Nous avons dosé, d'une part la coprolactotransferrine de Vache, et d'autre part la coprolactotransferrine humaine dans les selles de trois jours consécutifs. Les résultats montrent la présence de 0,15; 0,83 et 0,64 mg de coprolactotransferrine humaine au 15ème, 16ème et 17ème jour de vie du nourrisson. Le dosage de la coprolactotransferrine de Vache ne nous donne aucun résultat ceci est normal puisque lors de l'étude immunologique de ce lait, nous avons noté l'absence de cette glycoprotéine.

C - Conclusions

La lactotransferrine humaine décelée dans les selles du nourrisson provient donc d'une synthèse endogène. Le nouveau-né est donc capable de synthétiser cette glycoprotéine mais certainement en quantité insuffisante ce qui justifie la présence de cette protéine dans le lait maternel. Les travaux de {DE LAYE et al. (159)} ont montré que des préparations d'intestin de cochon d'Inde étaient capables de synthétiser cette glycoprotéine. De plus {MASSON et al. (160)} retrouvent de la lactotransferrine marquée au C¹⁴ dans le milieu de culture lorsqu'ils cultivent de la muqueuse rectale en présence d'acides aminés marqués au C¹⁴.

II - DOSAGE DES COPROLACTOTRANSFERRINES SUIVANT LE MODE D'ALIMENTATION

A - Alimentation au lait de Femme frais

Nous avons effectué ce dosage dans les selles provenant d'une vingtaine de nourrissons, mais les résultats les plus intéressants ne concernent que trois nourrissons pour lesquels nous avons eu les selles régulièrement. Les prélèvements de selles les plus précoces ont eu lieu trois jours après la naissance et les plus tardifs treize jours après la naissance. Ces trois nourrissons ont en commun le fait qu'ils prennent six tétées par jour.

1 - Résultats

Les résultats des dosages sont rassemblés dans le tableau (IV) p. (42) et reportés sur la figure (7) p. (43).

Nous ne connaissons, ni la quantité de lait absorbée, ni le taux de lactotransferrine présente dans les laits, il nous sera donc impossible de dresse un bilan concernant les quantités de lactotransferrine à l'entrée et à la sortie du tube digestif. Nous ne nous attacherons qu'à la quantité de coprolactotransferrine éliminée journellement pour chaque nourrisson.

Les quantités de lactotransferrine dosées dans les selles des nourrissons sont très variables mais nous en retrouvons chez chaque nourrisson. Ces quantités journalières s'échelonnent de 0,5 à 61 mg.

Si nous nous reportons à la figure (7) p. (43) nous remarquons que le nourrisson Hughes C élimine des quantités importantes de lactotransferrine pendant les premiers jours d'alimentation au lait maternel de 5,7 à 25,1 mg. Le 13ème jour l'élimination atteint encore 9,2 mg puis semble se stabiliser.

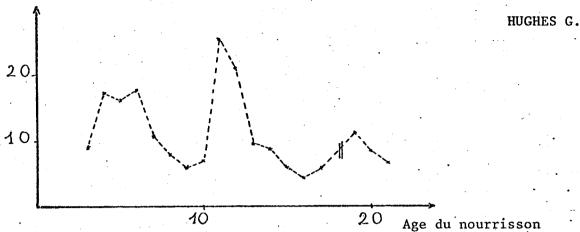
2 - Conclusion

Comme dans le lait la teneur en lactotransferrine dans les selles est maximale pendant les premiers jours d'alimentation puis diminue de façon non régulière.

TABLEAU IV : Quantité journalière de coprolactotransferrine éliminée par trois nourrissons alimentés au lait de femme frais, exprimée en mg.

Age des	Quantité de coprolactotransferrine humaine exprimée en mg par jour				
en jours	Audrey B	/ Anouk S	Hughes C		
3			8,7		
4			17		
5			16		
6		12,9	17,4		
7			10,4		
8		5,4	7,5		
9		1,5	5,7		
10		8,9	6,6		
11 .		3,5	25,1		
12		3,7	20,6		
13	3,6	-	9,2		
14	29,5	- .	8,5		
15	9,9	6,5	5,7		
16	61	<u>-</u>	4,1		
17	6,7	8,4	5,3		
18	5,7	3,6	-		
19	2,4	-	10,9		
20	1,6		7,9		
21	3	6,3	6,3		
22	2	2,3			
23	2,6				
24	-				
25	3,7				
26	0,5		The state of the s		
27	3,1		to the second		
28	3,5				
29	4,1				
. 30	3,9		1		

Quantité de coprolactotransferrine humaine journalière en mg



Quantité de coprolactotransferrine humaine journalière AUDREY B. 60 50 40 30 20. . 10. 10 30

Figure 7 : Cinétique d'élimination de la coprolactotransferrine humaine chez deux nourrissons alimentés au lait maternel

20

Les quantités élevées de lactotransferrine dans les selles du nourrisson : Audrey B reportées sur la figure (7) p. (43) sont peut être relatives au fait que la maman était anémiée, et devait de ce fait absorber du fer. L'hypothèse que nous pouvons émettre est que ; l'absorption massive de fer peut saturer la lactotransferrine qui dans ce cas est mal métabolisée et rejetée dans les selles.

Il nous faut souligner que ces résultats de dosage correspondent non seulement à l'élimination de lactotransferrine d'origine lactée mais en plus endogène. Il faut donc retrancher de ces valeurs la quantité de coprolactotransferrine d'origine endogène, pour connaître l'élimination de coprolactotransferrine purement lactée.

B - Alimentation au lait de vache frais

1 - Protocole expérimental

Trois nourrissons ont été alimentés de la manière suivante : ils ont reçu les jours J_1 et J_2 du lait Gloria puis les jours J_3 et J_4 du lait de vache frais et enfin les jours J_5 et J_6 du lait Gloria. Les âges des nourrissons et les quantités de lait ingérées varient suivant les nourrissons. Yasmin Z âgé de deux mois reçoit 70 g de lait de vache frais pendant les jours d'alimentation au lait de vache frais, alors que Caroline W âgée de quatre mois en reçoit 80 g par jour et Rachid H âgé de trois mois en reçoit 90 g par jour.

2 - Résultats

Nous ne nous sommes attaché qu'au dosage de la lactotransferrine de vache présente dans les selles. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (V) p. (45). Après examen de ce tableau nous voyons que la lactotransferrine de vache est absente dans les selles correspondant aux jours J₁ et J₂. Par contre, lorsque l'on remplace le lait Gloria par du lait de vache frais, nous trouvons des quantités de lactotransferrine de vache de 0,5 à 11,7 mg par jour. Nous remarquons

TABLEAU V : Quantité journalière de coprolactotransferrine de vache éliminée par trois nourrissons alimentés au lait de vache frais, exprimée en mg.

Quantité	de	coprolactotransferrine					de	vache
	ez	kprimée	en	mg	par	jour		

	Yasmin Z	Rachid H	Caroline W
J _l Lait Gloria	0	0	o
J ₂ Lait Gloria	0	o	o
J ₃ Lait de vache frais	3,23	5,6	0,5
J ₄ Lait de vache frais	11,7	0,6	0,53
J ₅ Lait Gloria	6,5	3,4	0,65
J ₆ Lait Gloria	1,4	0	0,54
			•



que cette glycoprotéine persiste encore dans les selles correspondant aux jours J_5 et J_6 .

3 - Discussion et conclusion

Les quantités de coprolactotransferrine de vache éliminées sont très variables pour ces trois nourrissons. Il semble que la quantité rejetée soit fonction de la quantité de lait de vache absorbée et, de l'âge du nourrisson. Chez le nourrisson âgé de deux mois les quantités de coprolactotransferrine de vache sont plus importantes que chez les deux autres nourrissons alors qu'il a absorbé une plus faible quantité de lait. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que le jeune nouveau-né hydrolyse plus difficilement la lactoransferrine, soit par le fait que la quantité de lactotransferrine de vache était plus importante dans le lait qui l'a alimenté puisque nous ne connaissons pas la teneur en lactotransferrine de ces différents laits.

C - Alimentation au lait Gloria complémenté en protéines

1 - Complémentation en lactotransferrine humaine

a) lactotransferrine humaine native

- protocole expérimental

L'expérimentation a été effectuée sur le nourrisson Jimmy F âgé de 3 mois. Celui-ci reçoit l g de lactotransferrine humaine native réparti dans ses cinq biberons, les jours J_3 , J_4 et J_5 . Les deux jours suivant il est réalimenté au lait Gloria seul.

- résultats

Les résultats des dosages sont donnés dans le tableau (VI) p. (48). Ces résultats sont assez surprenants puisque nous retrouvons de faibles quantités de lactotransferrine de l à 2 mg par jour. Il faut cependant préciser que ces valeurs correspondent à l'anneau de diffusion le plus concentrique et le plus net. Nous avons obtenu un second anneau de précipitation beaucoup plus grand et très

diffus, que nous n'avons pas pu mesurer et par conséquent nous n'avons pu l'exprimer en poids.

- discussion et conclusion

L'hypothèse que nous pouvons émettre est que l'anneau de diffusion le plus petit correspond à la lactotransferrine humaine native peu ou même non dégradée par les enzymes digestives alors que l'anneau de précipitation le plus externe correspond à de la lactotransferrine qui est très dégradée. Si notre hypothèse est vérifiée ceci signifie que la lactotransferrine dans le lait maternel se trouve protégée, et de ce fait est moins sensible aux enzymes digestive. Le fait de complémenter des laits artificiels avec de la lactotransferrine humaine seule n'est donc pas satisfaisant excepté si cette glycoprotéines conserve son activité biologique.

b) lactotransferrine humaine saturée en fer

- protocole expérimental

Nous avons expérimenté sur trois nourrissons ; le premier Cathy B âgé de 8 semaines reçoit 800 mg de lactotransferrine humaine saturée en fer, répartis dans ses cinq biberons ceci pendant deux jours J_3 et J_4 , le second Karine F âgé de 2 Mois et le troisième Dominique C âgé de 4 mois reçoivent 1 g de lactotransferrine saturée en fer par jour et ceci pendant trois jours J_3 , J_4 et J_5 .

- résultats

Les résultats des dosages sont rassemblés dans le tableau (VI) p. (48). Nous constatons que les nourrissons recevant une plus grande quantité de lactotransferrine humaine saturée en ferenéliminent une plus grande quantité dans le selles; mais si nous faisons le bilan entrée sortie de lactotransferrine nous constatons que celui-ci est de 2,7 p. 100 pour le nourrisson absorbant la plus faible quantité de lactotransferrine alors qu'il n'est que de 1,66 p. 100 pour les deux autres nourrissons.

TABLEAU VI : Quantité journalière de coprolactotransferrine humaine éliminée par des nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en lactotransferrine humaine native et saturée en fer.

	Quantité de coprolactotransferrine humaine exprimée en mg par jour				
•	Cathy B ⁽¹⁾	Karine F	Dominique C	Jimmy F	
J _l Lait Gloria	0	2	5,4	0,18	
J ₂ Lait Gloria	0	3,3	0,5	0,64	
J ₃ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine	9	23	18,9	1,93**	
J ₄ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine	27,5	20,2	* -*	1,31**	
J ₅ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine	8	5,7	37	1,42**	
J ₆ Lait Gloria	0	1	8	0,25	
J ₇ Lait Gloria	0	0,36	0,9	0	
J ₈ Lait Gloria	0	0,20	3,3		

⁽¹⁾ Cathy B n'a reçu de la lactotransferrine de vache saturée en fer que les jours J_3 et J_4



^{*} Absence de selles ce jour

^{**} Ces valeurs correspondent à l'anneau de précipitation le plus interne

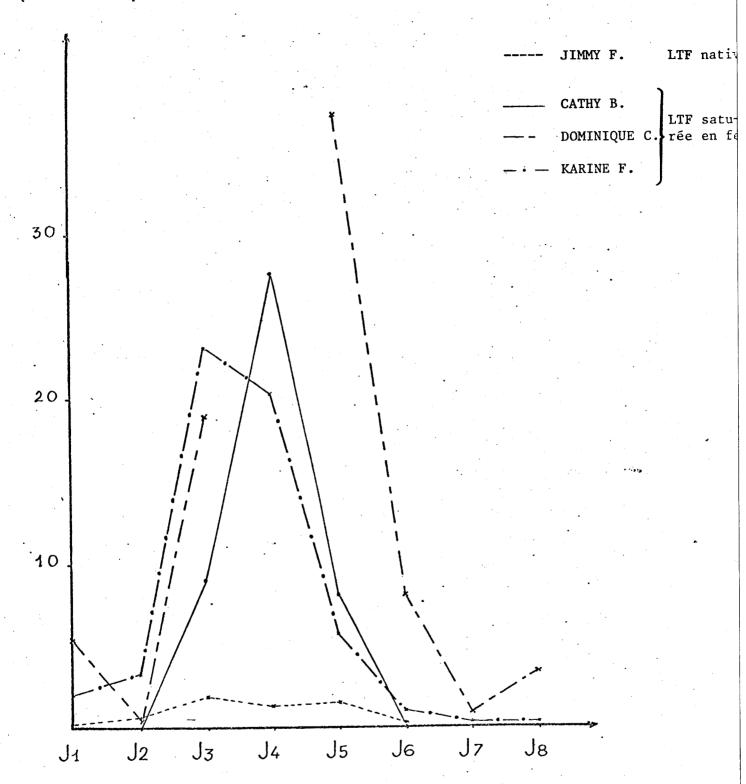


Figure 8 : Cinétique d'élimination de la coprolactotransferrine humaine chez des nourrissons alimentés au lait complémenté en lactotransferrine humaine native (LTFN) et saturée en fer (LTFS)

- discussion et conclusion

Les quantités de coprolactotransferrine rejetées lors d'une complémentation en lactotransferrine humaine saturée en fer de 5,7 à 23 mg par jour sont plus importantes que lors d'une complémentation en lactotransferrine humaine native; de 1 à 2 mg par jour, figure (8) p. (49), et sont à rapprocher de celles correspondant à une alimentation au lait maternel de 5,7 à 25,1 mg par jour. Figure (7) p. (43).

- Les quantités de coprolactotransferrine semblent être en rapport avec le degré de saturation de la lactotransferrine. Lorsque la lactotransferrine se trouve saturée en fer elle devient moins vulnérable aux enzymes digestives et de ce fait est rejetée dans les selles.
- La lactotransferrine dans le lait maternel ne se trouve pas à l'état saturé en fer et pourtant elle se retrouve en grande quantité à la sortie du tube digestif ceci confirme le fait que la lactotransferrine dans le lait doit être protégée d'où la notion de synergie.
- Il reste à présent à savoir si sous cette forme saturée en fer cette protéine peut, perdre son fer dans l'estomac, puis passer dans le tractus intestinal sous forme apolactotransferrine, et récupérer le fer dans l'intestin afin de jouer son rôle ferriprivateur, avant d'être éliminée.

2 - Complémentation en lactotransferrine isolée du lait de vache

a) lactotransferrine native

- protocole expérimental

Cette étude a été faite sur deux nourrissons ; Evelyne F \hat{a} gé de 1 mois et Claude C \hat{a} gé de 2 mois. L'expérimentation se déroule pendant 7 jours consécutifs. Ces enfants ingèrent 1 g de lactotransferrine de vache pendant trois jours consécutifs J_3 , J_4 et J_5 .

- résultats

Les résultats des dosages immunochimiques sont rassemblés dans le tableau (VII) p. (52) et sur la figure (9) p. (54). Nous voyons que les quantités de coprolactotransferrine de vache sont plus importantes chez le nourrisson âgé de 2 mois ; 87 à 251 mg par jour contre 36 à 51 mg par jour. Le bilan entrée sortie de lactotransferrine est de 4,5 p. 100 chez le nourrisson âgé de 1 mois alors qu'il atteint 19 p. 100 chez celui âgé de 2 mois.

Le dosage en parallèle de la lactotransferrine humaine endogène montre une nette augmentation de l'élimination de la lactotransferrine correspondant à la synthèse endogène lors de la complémentation. La quantité de coprolactotransferrine humaine passe de 0,4 mg à 1,4 mg par jour.

- discussion et conclusion

Les quantités de lactotransferrine de vache rejetées sont plus importantes lors d'une complémentation ; 36 à 251 mg par jour que lors d'une alimentation au lait de vache frais ; 0,5 à 11,7 mg par jour. Ceci nous fait penser que la lactotransferrine de vache doit être également protégée par les autres éléments protéiques présents dans le lait de vache.

L'élimination de coprolactotransferrine humaine d'origine endogène est augmentée lors d'une complémentation en lactotransferrine de vache. L'hypothèse que nous pouvons envisager est la suivante : il n'y aurait pas une augmentation de la synthèse mais cette lactotransferrine humaine adsorbée sur la paroi intestinale serait alors, entrainée avec la lactotransferrine de vache et de ce fait éliminée en plus grande quantité.

b) lactotransferrine saturée en fer

- protocole expérimental

L'expérimentation a été réalisée sur deux nouveaux-nés ; Eric C âgé de deux mois reçoit 1 g de lactotransferrine par jour, ceci pendant trois

TABLEAU VII : Quantités journalières de coprolactotransferrine de vache et de coprolactotransferrine humaine éliminées par deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache native.

Jours d'expérimentation	transferri	ransferrine de vache en mg par jour en mg par jou		
	Claude C	Evelyne F	Claude C	Evelyne F
J ₁ Lait Gloria	0	0	0,43	0,39
J ₂ Lait Gloria	0	0	0,56	0,70
J ₃ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache native	87,1	36,2	0,68	0,66
J ₄ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache native	251	41,8	1,17	0,56
J ₅ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache native	221	51	1,44	1,53
J ₆	11,2	4,1	0,42	0,40
J ₇	0,9	0,3	0,10	0,33

TABLEAU VIII : Quantités journalières de coprolactotransferrine de vache et de coprolactotransferrine humaine éliminées par deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache saturée en fer.

Jours d'expérimentation	transferri	e coprolacto- ne de vache par jour	Quantité de coprolacto- transferrine humaine en mg par jour				
	Eric C	Patrick D	Eric C	Patrick D			
J _l Lait Gloria	o	o	0,28	0,19			
J ₂ Lait Gloria	0	o	0,16	1,13			
J ₃ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache saturée en fer	190	34,2	1,02	0,57			
J ₄ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache saturée en fer	364	183	1,15	1,07			
J ₅ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine de vache saturée en fer	121	25,6	0,36	0,54			
J ₆ Lait Gloria	o	0,3	0,88	0,96			
J ₇ Lait Gloria	0	o	1,05	0,15			



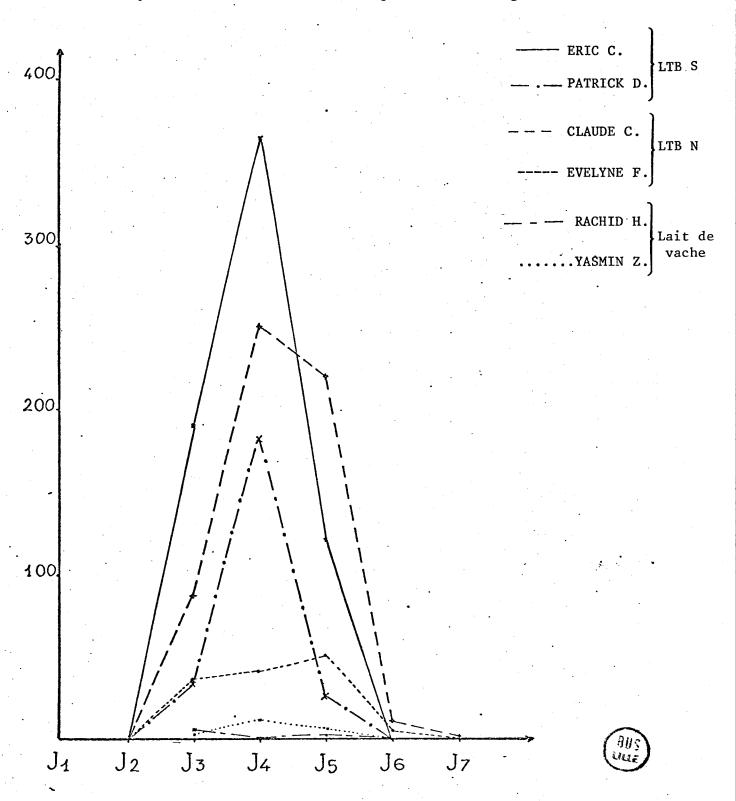


Figure 9 : Cinétique d'élimination de la coprolactotransferrine de vache chez des nourrissons alimentés au lait de vache frais, au lait Gloria complémenté, en lactotransferrine de vache native (LTB N), en lactotransferrine de vache saturée en fer (LTB S)

jours J_3 , J_4 et J_5 ; Patrick D âgé de trois semaines n'en reçoit que 800 mg par jour.

- résultats

Nous avons rassemblé les résultats des dosages dans le tableau (VIII) p. (53) et sur la figure (9) p. (54). Les quantités de coprolactotransferrine de vache, éliminées sont variables suivant les nourrissons et oscillent entre 25 et 364 mg par jour.

Si à présent, nous comparons les bilans entrée sortie de lactotransferrine de vache nous voyons que le bilan atteint 22,5 p. 100 pour le nourrisson Eric C le plus âgé, recevant la plus grande quantité de lactotransferrine de vache alors qu'il n'est que de 10 p. 100 chez l'autre nourrisson Patrick D.

L'élimination de la coprolactotransferrine humaine d'origine endogène est augmentée pendant les jours de complémentation.

- discussion et conclusion

Les quantités de lactotransferrine de vache éliminées lors d'une complémentation en lactotransferrine de vache, saturée en fer ; (25 à 364 mg par jour), sont supérieures à celles éliminées lors d'une alimentation complémentée en lactotransferrine de vache native (36 à 251 mg par jour). Ces variations semblent être dues au taux de saturation en fer de la lactotransferrine de vache. Le fait de saturer cette glycoprotéine en fer aurait pour effet de la protéger de l'action des enzymes digestives. D'autre part comme lors d'une complémentation avec de la lactotransferrine de vache native, la complémentation en lactotransferrine, de vache, saturée en fer stimule l'élimination de la lactotransferrine humaine d'origine endogène.

3 - Complémentation en sérotransferrine humaine native et saturée en fer

a) protocole expérimental

Nous avons complémenté le lait de trois nourrissons pendant deux jours consécutifs J_3 et J_4 . Saïda B âgée de l mois et Johnny C âgé de 3 mois

reçoivent 1 g de sérotransferrine native par jour alors que Valérie B âgée de 2 mois reçoit 1 g de sérotransferrine saturée en fer par jour.

b) résultats et conclusion

Le dosage des sérotransferrines humaines aussi bien natives que saturées par la technique d'immunodiffusion radiale ne nous a fourni aucun résultat. Dans le tableau (IX) p. (57) ne figurent que les résultats concernant l'élimination de la lactotransferrine humaine endogène. Nous n'avons pu déterminer la quantité de lactotransferrine endogène éliminée par Saïda B âgée de 1 mois que le 6ème jour d'expérimentation. Cette quantité est de 1 mg. Chez les deux autres nourrissons nous constatons que ces quantités sont variables mais ne sont nullement influencées par de la complémentation.

D'autre part l'absorption de ces protéines a provoqué des troubles physiologiques qui se sont manifesté par une constipation pendant les deux jours de complémentation et ensuite par une diarrhée et une déformation du siège.

Il est donc impossible de remplacer la lactotransferrine humaine dans des laits artificiels par de la sérotransferrine puisque cette dernière provoque des effets contraires à ceux souhaités.

III - DOSAGE DES COPRO-IMMUNOGLOBULINES A SUIVANT L'ALIMENTATION

A - Alimentation au lait maternel

Ces dosages ont été réalisés dans une vingtaine de selles provenant de nouveaux-nés dont l'âge s'échelonne de 3 à 8 jours. Il nous manque pour chaque nourrisson deux paramètres importants qui sont : la quantité de lait maternel absorbée et le taux d'immunoglobulines A de sécrétion de ces différents laits.

Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans le tableau (X) p. (58). Ces résultats ne sont pas interprétables et il nous est impossible de donner un taux moyen d'élimination d'IgA. Ces quantités varient de 0,6 à 56 mg par jour.

TABLEAU IX : Quantité de coprolactotransferrine humaine éliminée par deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en transferrine sérique native et saturée en fer

Jours d'expérimentation	Quantité de coprolactotransferrine humaine en mg par jour			
Jours a experimentation	Johny C	Valérie B		
J _l Lait Gloria	1,1	0,76		
J ₂ Lait Gloria	0,8	0,40		
J ₃ Lait Gloria complémenté en sérotransferrine	0,9	0,30		
J Lait Gloria complémenté en sérotransferrine	, 0,8	0,13		
J ₅ Lait Gloria	0,8	0,12		
J ₆ Lait Gloria	0,72	0,18		



TABLEAU X : Quantité de copro-immunoglobulines A éliminées par 24 nourrissons alimentés au lait de Femme frais.

Nourrissons			Age en	n jours		
NOULLISSONS	.3	4	5	6	7	8
1	10,6					
2			18,1			
3 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		38,8				
4		15,7	16,8	•		
5		81	46,9			
6			0,85	4,7		
7		42,6		-		
. 8			28,5			
9				0,6	2,1	
10			20,3	25,7		
11			1,2			
12		20,2	1,2			
13	12			•		
14		4,7			6,1	
15	12,7	24,6	56		8,7	
16		5				
17			2			
18		1,3		•		
19						8,4
20		1,4				
21	8,4	37			-	
22		I	30,1			
23		25,9				
24			18,2			



B - Alimentation au lait Gloria complémenté en Immunoglobulines A

de secrétion

1 - Protocole expérimental

Deux nourrissons Valérie P et Jérémy F âgés de 1 mois ont reçu 800 mg d'immunoglobulines A de secrétion pendant trois jours consécutifs ${\bf J_3}$, ${\bf J_4}$ et ${\bf J_5}$.

2 - Résultats

Nous avons dosé parallélement la quantité de Copro Immunoglobulines IgA et la coprolactotransferrine d'origine endogène. Les résultats figurent sur le tableau (XI) p. (60) et sur la figure (10) p. (61). Les quantités de copro IgA sont variables suivant les nouveaux-nés et varient entre 95 et 280 mg par jour. De même les quantités de coprolactotransferrine passent de 0,4 mg par jour à plus de 2 mg par jour.

Le bilan entrée sortie d'Immunoglobulines A est de 15 p. 100 pour Valérie B et de 17 p. 100 pour Jérémy F.

3 - Discussion et conclusion

Les quantités d'immunoglobulines A de secrétion éliminées lors d'une alimentation complémentée avec cette glycoprotéine sont beaucoup plus importantes que lors d'une alimentation au lait maternel.

Ceci peut résulter du fait, que, les immunoglobulines A présentes dans le lait maternel sont protégées de l'action enzymatique et restent dans le tractus digestif du nourrisson.

Nous remarquons également lors de la complémentation en Immunoglobulines A une augmentation très nette de l'élimination de la lactotransferrine endogène. Comme la lactotransferrine de vache, les immunoglobulines A de secrétion semblent avoir une action au niveau de l'élimination de la lactotransferrine humaine endogène.

TABLEAU XI : Quantité de copro immunoglobulines A et de coprolactotransferrine éliminées par deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en immunoglobulines A de secrétion.

Jours d'expérimentation				cité de coprolacto- ferrine exprimée en mg	
	Jérémy F	Valérie B	Jérémy F	Valérie B	
J _l Lait Gloria	17,3	2,6	0,40	Traces	
J ₂ Lait Gloria	30,4	98,6	0,87	0,63	
J ₃ Lait Gloria complémenté en immunoglobulines A	*	95	*	1,16	
J ₄ Lait Gloria complémenté en immunoglobulines A	146,1	158,4	2,68	1,03	
J ₅ Lait Gloria complémenté en immunoglobulines A	279,6	96,2	2,56	0,81	
J ₆ Lait Gloria	46,1	7,8	0,77	0,17	
J ₇ Lait Gloria	*	27,2	*	0,19	

^{*} Absence de selles

Quantité de coproimmunoglobulines A journalière en mg

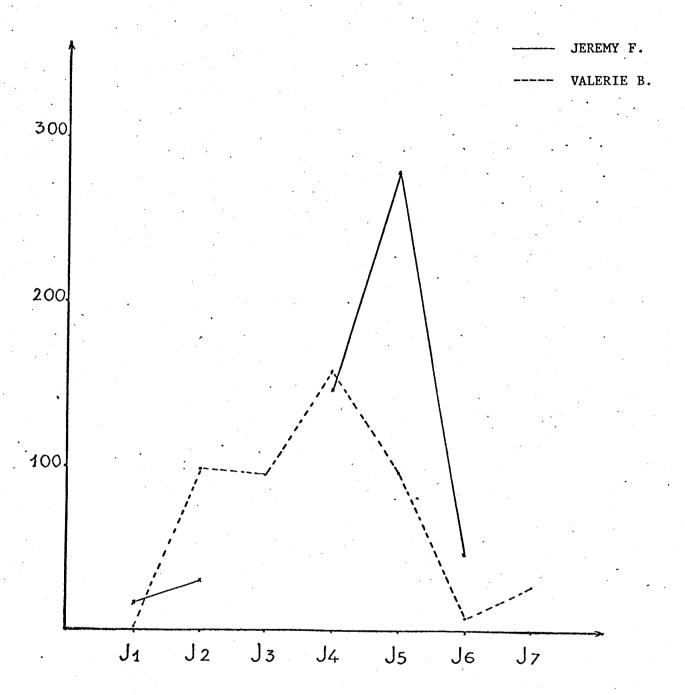


Figure 10 : Cinétique d'élimination des coproimmunoglobulines A chez les deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en immunoglobulines A



IV - DOSAGE DE LA COPROLACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET DES COPRO IMMUNOGLOBULINES LORS DE COMPLEMENTATION MIXTE IMMUNOGLOBULINES A, LACTOTRANSFERRINE

Nous avons remarqué lors des expérimentations précédentes que l'élimination de la lactotransferrine humaine et des Immunoglobulines A était plus importante dans le cas d'une alimentation complémentée, que dans le cas d'une alimentation au lait maternel. Nous avons pensé qu'il pouvait exister un effet protecteur de la lactotransferrine sur les immunoglobulines A et vice versa. C'est pourquoi nous avons effectué des complémentations mixtes lactotransferrine Immunoglobulines A.

A - Protocole expérimental

L'expérimentation a été effectuée sur deux nourrissons ; Karine B âgée de trois mois et David K âgé de deux mois reçoivent 800 mg d'immunoglobulines A et 1 g de lactotransferrine native par jour et ceci pendant trois jours J_3 , J_4 et J_5 .

B - Résultats et conclusions

Comme lors de la complémentation en lactotransferrine humaine native nous avons obtenu deux anneaux de précipitation, et les résultats figurant sur le tableau (XII) p. (63) concernent uniquement l'anneau de précipitation le plus interne. Cet anneau correspondrait à de la lactotransferrine peu ou même pas du tout dégradée et l'anneau le plus externe et très flou serait dû à de la lactotransferrine humaine dégradée par les enzymes digestives. Celle-ci serait moins adsorbée dans la gélose et de ce fait migrerait plus loin.

Quant aux immunoglobulines IgA les résultats sont encore plus surprenants puisque nous n'avons obtenu aucun résultat par la technique de l'immunodiffusion radiale. Trois hypothèses sont à envisager

- elles ont été complétement détruites par les enzymes digestives et ne répondent plus avec l'immunsérum.
- elles sont tellement modifiées qu'elles diffusent très loin dans la gélose et

TABLEAU XII : Quantité de coprolactotransferrine éliminée par deux nourrissons alimentés au lait Gloria complémenté en lactotransferrine native et en immunoglobulines A de secrétion.

Jours d'expérimentation	Quantité de coprolactotransferrine exprimée en mg par jour		
oddis u experimentation	Karine B	David K	
J _l Lait Gloria	0,6	Traces	
J ₂ Lait Gloria	0,51	0,16	
J ₃ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine et en Immunoglobulines A	1,23 *	3,06 *	
J ₄ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine et en Immunoglobulines A	0,7 *	_ * (1)	
J ₅ Lait Gloria complémenté en lactotransferrine et en Immunoglobulines A	0,56 *	1,51 *	
J ₆ Lait Gloria	0,60	- (1)	
J ₇ Lait Gloria	0,66	0,19	

^{*} Ces valeurs correspondent à l'anneau de diffusion le plus interne



⁽¹⁾ Absence de selles ce jour

répondent très mal avec l'immunsérum en donnant des anneaux de précipitation énormes et tellement diffus qu'il est impossible de les voir.

- elles sont adsorbées sur la muqueuse intestinale.

Il ne semble donc pas y avoir d'effet protecteur des immunoglobulines A sur la lactotransferrine. Par contre nous ne pouvons conclure sur l'influence de la lactotransferrine sur les Immunoglobulines A puisque nous n'avons pas pu redoser ces Immunoglobulines dans les selles.

La complémentation mixte Immunoglobulines A, lactotransferrine n'est donc pas satisfaisante puisque nous ne retrouvons pas de résultats analogues à ceux trouvés lors d'une alimentation au lait maternel. L'effet protecteur est donc dû à d'autres composés présents dans le lait maternel.

ISOLEMENT ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUES DES COPROLACTOTRANSFERRINES

I - ISOLEMENT DES COPROLACTOTRANSFERRINES

A - Mode opératoire

Nous avons utilisé la même méthode de fractionnement pour isoler la coprolactotransferrine humaine et les coprolactotransferrines de vache. La première étape du fractionnement consiste en une chromatographie des selles traitées sur colonne d'échangeur d'ions de SE-Sephadex, stabilisée au préalable dans un tampon acétate de sodium 50 mM. L'élution s'effectue par un gradient discontinu de force ionique d'acétate de sodium 50 mM puis 0,2 M. Les fractions 50 mM et 0,2 M sont ensuite dialysées, lyophilisées puis redissoutes dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M et chromatographiées séparément sur une colonne de tamisage moléculaire d'Ultrogel AC 44 stabilisée dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M.

B - Résultats

1 - Coprolactotransferrine humaine

Seule la fraction acétate de sodium 0,2 M (F_{II}) renferme de la coprolactotransferrine humaine. Après chromatographie sur colonne d'Ultrogel AC 44 nous obtenons de la coprolactotransferrine humaine qui a gardé la coloration lypique de la lactotransferrine.

2 - Coprolactotransferrine de vache

Lors de l'isolement des coprolactotransferrines de vache nous avons utilisé les selles obtenues, lors de la complémentation en lactotransferrine de vache native, et lors de la complémentation en lactotransferrine saturée en fer.

a) complémentation en lactotransferrine de vache native

Seule la fraction acétate de sodium 0,2 M (F_{II}) renferme de la coprolactotransferrine que nous avons purifiée par chromatographie sur Ultrogel AC 44, et qui présente la coloration rose saumon. Nous l'appellerons coprolactotransferrine A.

b) <u>complémentation en lactotransferrine de vache saturée en fer</u>

Le lavage de la colonne de SE-Sephadex par du tampon acétate de sodium 50 mM nous fournit une fraction F_I qui est légèrement colorée en rose. Nous éluons la fraction fixée au sommet de la colonne de SE-Sephadex par du tampon acétate de sodium 0,2 M (F_{II}).

La chromatographie sur Ultrogel AC 44 des fractions $\mathbf{F_I}$ et $\mathbf{F_{II}}$ nous fournit deux coprolactotransferrines que nous appellerons B et C.

C - Conclusions

Nous utilisons la même technique de fractionnement pour l'isolement des coprolactotransferrines que pour l'isolement des lactotransferrines. Ce qui diffère c'est la force ionique du tampon acétate de sodium utilisé lors de la chromatographie sur SE-Sephadex. Ceci nous indique que ces coproprotéines ont perdu leur intégrité et notemment une partie de leur charge.

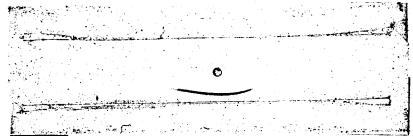
II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES COPROLACTOTRANSFERRINES

A - Critères électrophorétiques

1 - Coprolactotransferrine humaine

Les immunoélectrophorèses ont été effectuées avec différents immunsérums ; anti lait total, anti lactotransferrine, anti lait épuisé en lactotransferrine figures (11), (12) p. (67) et p. (68).

Après observation des immunoélectrophorèses nous voyons que la mobilité électrophorétique en tampon véronal pH 8,2 est modifiée en comparaison



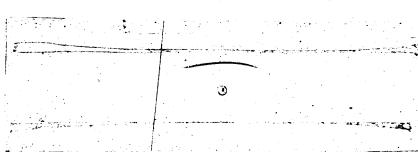
Anti lait humain épuisé en lactotransferrine

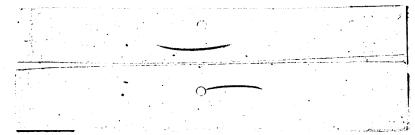
Coprolactotransferrine humaine
Anti lactotransferrine humaine

Anti lait humain

Coprolactotransferrine humaine

Anti lait humain épuisé en lactotransferrine humaine





Coprolactotransferrine humaine

Anti lactotransferrine humaine

Lactotransferrine humaine

Figure 11: Etude immunoélectrophorétique de la coprolactotransferrine humaine





Lactotransferrine humaine
Coprolactotransferrine humaine
Coprolactotransferrine humaine

Anti lactotransferrine humaine

Lactotransferrine humaine

Anti lactotransferrine humaine

Coprolactotransferrine humaine





Figure 12: Etude immunologique de la coprolactotransferrine humaine



de la mobilité électrophorétique de la lactotransferrine humaine. D'autre part la technique d'OUCHTERLONY (161) et la technique des fentes courtes : figure (12) p. (68) montrent qu'il existe un raccordement partiel des arcs de précipitation donnés par la lactotransferrine et la coprolactotransferrine. Ceci indique que la coprolactotransferrine est de la lactotransferrine qui a perdu certains de ses déterminants antigéniques.

2 - Coprolactotransferrine de vache

Les résultats des immunoélectrophorèses sont reportés sur les figures (13), (14), (15) p. (70), (71), (72). Nous voyons que l'arc de précipitatation donné par les coprolactotransferrines est devenu plus important que celui donné par la lactotransferrine de vache à même concentration. L'arc de précipitation est devenu moins cathodique. D'autre part, par la technique d'OUCHTERLONY (162) et par celle des fentes courtes nous constatons qu'il existe un raccordement partiel des arcs de précipitations engendrés d'un part par la lactotransferrine de vache et les différentes coprolactotransferrines : figure (15) p. (72).

L'immunoélectrophorèse en fente courte des deux coprolactotransferrines de vache ayant pour origine la lactotransferrine de vache saturée en fer montre un raccordement parfait des arcs de précipitation ceci indique qu'elles possèdent les mêmes déterminants antigéniques : figure (15) p. (72).

B - Masse moléculaire

Les masses moléculaires des coproprotéines avaient été déterminées approximativement lors du passage des fractions $\mathbf{F_I}$ et $\mathbf{F_{II}}$ sur la colonne d'Ultrogel AC 44. La coprolactotransferrine humaine avait une masse moléculaire comprise entre 30 000 et 40 000 et les coprolactotransferrines de vache A, B et C avaient des masses comprises entre 40 000 et 50 000. Nous avons déterminé ces masses moléculaires en disc électrophorèse en gel de polyacrylamide en SDS en présence et en absence de β -Mercaptoéthanol. Cette technique nous a prouvé la pureté de nos coprolactotransferrines et permis d'attribuer les masses moléculaires suivantes

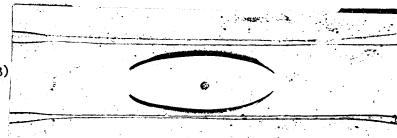
Anti lactotransferrine de vache

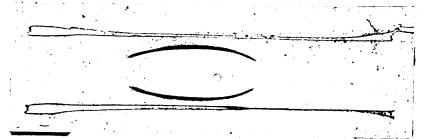
Lactotransferrine de vache

Anti lait de vache

Coprolactotransferrine de vache (B)

Anti lactotransferrine de vache





Anti lait de vache

Coprolactotransferrine de vache (c)

Anti lactotransferrine de vache



Figure 13: Etude immunoélectrophorétique des coprolactotransferrines de vache A, B, C.



Anti lait de vache

Coprolactotransferrine de vache A

Anti lait de vache épuisé en lactotransferrine

Anti lait de vache

Coprolactotransferrine de vache C

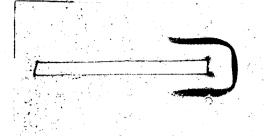
Anti lait de vache épuisé en lactotransferrine de vache



Coprolactotransferrine de vache C
Anti lactotransferrine de vache
Coprolactotransferrine de vache B



Figure 14: Etude immunoélectrophorétique des coprolactotransferrines de vache A, B, C.



Anti lactotransferrine de vache

Coprolactotransferrine de vache B Coprolactotransferrine de vache B

Coprolactotransferrine de vache C

Anti lactotransferrine de vache

lactotransferrine de vache



Coprolactotransferrine de vache B



Coprolactotransferrine de vache C



Anti lactotransferrine de vache

Coprolactotransferrine de vache B Coprolactotransferrine de vache B Lactotransferrine de vache



Figure 15: Etude immunologique des coprolactotransferrines de vache B et C

aux différentes coprolactotransferrines.

Protéines		Masse moléculaire
Coprolactotransferrine humaine		34 000 - 37 000
Coprolactotransferrine de vache	A	41 000 - 44 000
de vache	В	50 000 - 52 000
	C	37 000 - 39 000

Si nous comparons ces masses moléculaires à celles des lactotransferrines humaines et de vache qui sont respectivement de 76 000 et de 77 000 nous constatons une diminution importante de la masse moléculaire. De ce fait nous avons alors voulu connaître la nature des amino-acides qui avaient disparu, la composition centésimale et molaire en glucides et enfin le taux de fer, de ces coprotéines.

C - Dosage du fer

1 - Sur la coprolactotransferrine humaine

Le dosage du fer par la méthode à la ferrozine nous donne un taux de fer de 0,66 p. 1000 pour la coprolactotransferrine humaine alors qu'il n'est que de 0,17 p. 1000 pour la lactotransferrine native. Si nous tenons compte des masses moléculaires de ces protéines nous pouvons exprimer ces résultats en gramme de fer par molécule; ce qui nous donne 24,4 g de fer par molécule de coproprotéines 13,09 g de fer par molécule de lactotransferrine. Ceci indique qu'au cours du passage de la lactotransferrine dans le tube digestif, elle s'enrichit en fer. Elle est donc capable de jouer in vivo son rôle chélateur de fer.

2 - Sur les coprolactotransferrines de vache

Nous obtenons les taux de fer suivants : pour la protéine C de masse moléculaire 37 000, 0,92 p. 1000 ; pour la protéine B de masse moléculaire 52 000, 1,92 p. 1000 et 0,92 p. 1000 pour la protéine A de masse moléculaire 44 000.

Nous pouvons exprimer ces résultats en gramme de fer par molécule, nous obtenons respectivement 37 g, 102 g et 37 g par molécule de coprolactotransferrine. Le taux de saturation de la lactotransferrine de vache native est de 0,195 soit 15,01 g de fer par molécule et celui de la lactotransferrine de vache saturée en fer est de 1,34 p. 1000 soit 103 g par molécule. De ce dosage nous pouvons tirer les conclusions suivantes. La protéine B de masse moléculaire 52 000 est totalement saturée en fer. Ceci semble normal puisqu'elle a pour origine la lactotransferrine saturée en fer. Par contre la protéine C de masse moléculaire 39 000 a un taux de fer inférieur à celui de la lactotransferrine saturée en fer ; elle a perdu du fer lors du passage dans le tractus digestif du nourrisson. Nous pouvons donc conclure que : lors du passage dans le tractus digestif la lactotransferrine saturée en fer subit une attaque enzymatique mais celle-ci s'opère de deux façons différentes.

- l'attaque a lieu mais respecte les deux sites de fixation du fer puisque nous retrouvons la protéine saturée à la sortie du tube digestif.
- l'attaque a lieu mais la coupure s'effectue entre les deux sites de fixation du fer ou alors la coupure s'effectue à l'extérieur des sites de fixation du fer mais la protéine est désaturée en fer au cours du transit dans le tube digestif.

La protéine A de masse moléculaire 44 000 contient 37 g de fer par molécule alors qu'elle a pour origine la lactotransferrine de vache native ne renfermant que 15,01 g de fer par molécule. Ceci nous montre que la lactotransferrine de vache a capté du fer lors de son passage dans le tractus digestif. Elle est donc capable tout comme la lactotransferrine humaine native de chélater le fer in vivo.

D - Essais de saturation et de désaturation en fer

1 - Saturation en fer des coprolactotransferrines

Nous avons dissous les coprolactotransferrines humaines ou de vache dans du tampon citrate bicarbonate 0,1 M pH 8,6 et nous avons ajouté des quantités croissantes de FeCl₃. Nous suivons les variations de la densité optique à 465 nm; mais quelle que soit la quantité de fer ajoutée la densité optique reste constante. Nous avons ensuite fait la contre expérience. Nous injectons les solutions de coprolactotransferrine "saturées" en fer sur Sephadex G-25 afin d'éliminer le fer en excès. Nous redosons ensuite le fer et nous retrouvons les mêmes taux de fer qu'avant saturation. Ceci indique que le fer ne fixe plus : ceci peut s'expliquer de plusieurs façons.

- les coprolactotransferrines sont saturées en fer ce qui signifie que la coprolactotransferrine humaine et les coprolactotransferrines de vache A et C ne possèdent plus qu'un seul site de fixation du fer.
- les coprolactotransferrines ne sont pas saturées en fer mais leur deuxième site de fixation du fer est masqué par de profondes modifications de structure.

2 - Désaturation en fer et resaturation des coprolactotransferrines

Les coprolactotransferrines sont solubilisées dans de l'eau distillée puis nous amenons le pH entre 1,5 et 2 avec de l'acide chlorhydrique N. Après dialyse contre de l'éthylène diamine tétracétique EDTA, puis contre de l'eau distillée nous constatons que les protéines ont précipité dans le boudin de dialyse. Après lyophilisation nous avons redissous ces protéines dans du tampon citrate bicarbonate 0,1 M pH 8,6 et ajouté des quantités croissantes de FeCl₃ en suivant les variations de la densité optique à 465 nm. La densité optique est restée constante à sa valeur initiale. La protéine est devenue incapable de refixer le fer. Nous pouvons conclure que les coproprotéines sont devenues très sensibles au traitement en milieu acide et nous les avons complètement dénaturées lors de la désaturation en fer.

E - <u>Composition centésimale et molaire en glucides des coprolacto</u>-<u>transferrines</u>

1 - Coprolactotransferrine humaine

Les compositions centésimales et molaires comparées de la lactotransferrine humaine et de la coprolactotransferrine humaine sont rassemblées dans
le tableau (XIII) p. (77). Nous voyons qu'il n'existe pas de différence dans le
taux d'oses neutres, mais que les taux d'acides sialiques et d'hexosamines sont
fortement diminués. Nous constatons que les compositions molaires correspondent
pratiquement à un glycanne de la lactotransferrine humaine excepté pour la N-acetylglucosamine. Les rapports molaires nous donnaient 2,3 osamines pour 3 mannoses et
3 galactoses. Ceci nous laisse déjà supposer que le dosage colorimétrique n'est
pas bon. Nous pouvons envisager que les osamines n'ont pas été libérées lors de
l'hydrolyse ou alors qu'elles ont été désacétylées et dans ce cas ne sont pas dosables
par la technique d'ELSON MORGAN (166). Si tout ceci est vrai la coprolactotransferrine ne possède plus qu'un seul groupement glycannique.

2 - Coprolactotransferrine de vache

Nous avons rassemblé dans le tableau (XIV) p. (78) les compositions centésimales et molaires de la lactotransferrine de vache et des trois coprolactotransferrines. Nous voyons que la composition centésimale en oses neutres a diminuée pour les trois glycoproteines; la composition centésimale en acides sialiques est identique à celle de la lactotransferrine de vache pour la coprolactotransferrine B alors qu'elle est différente pour les deux autres.

Il est difficile de comparer le taux d'hexosamines puisque nous n'avons obtenu un résultat que pour la protéine B par la technique d'ELSON MORGAN (167).

Nous ne pouvons conclure en ce qui concerne les compositions molaires. Toutefois il faut remarquer que seule la protéine A possède de la

TABLEAU XIII : Composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine du lait humain et de la coprolactotransferrine humaine

Composition centésimale	Lactotransferrine humaine **	Coprolactotransferrine humaine
Oses neutres	3,11	3
Hexosamines	2	0,6
Acides sialiques	1,22	0,6

Composition molaire	Lactotransferrine humaine **	Coprolactotransferrine humaine	
D Man	. 5	2,8	
D Gal	6	3	
L Fuc	3	1,15	
D GlcN	8	1,09	
Anan	3	0,7	

^{**} DEBRAY VANDERSYPPE (164)

TABLEAU XIV : Composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine de vache et des coprolactotransferrines de vache

Composition centésimale	Lactotransferrine de vache **	Coprolactotransferrine de vache		
		A	В	C
Oses neutres	5,6	1,94	2,6	3,82
Hexosamines	2,7	*	0,85	* .
Acides sialiques	0,6	0,15	0,62	0,30
Composition centésimale Lactotransferrine de vache **		Coprolactotransferrine de vache		
		A	В	. С
D Man	24,4	1,26	6,45	6,10
D Gal	2,0	4,0	1,45	3,06
L Fuc	0,4	· -	0,43	
D GlcN	8,3	_*	2,17	_*
D GalN	1,2	_*	-	-
Anan	0,7	0,2	1	0,4



^{*} Non dosées

^{**} CHERON et al. (165)

N-acetylgalactosamine. Ceci a été confirmé à l'auto analyseur BECKMAN. Les compositions molaires pour cette glycoprotéine ont été calculées en prenant la galactosamine comme référence.

La coprolactotransferrine B est la seule a posséder du fucose et ne semble pas avoir perdu d'acide sialique.

Nous constatons que les coproprotéines A, B, C ont toutes perdu des quantités importantes de mannose, et qu'il apparait des quantités anormales de galactose pour les glycoprotéines A et C.

3 - Conclusion

Ceci nous indique que lors du passage dans le tube digestif il peut y avoir coupure des chaînes glycanniques, ou coupure de la chaîne peptidique et départ d'un glycopeptide.

F - Composition molaire en acides aminés

Nous avons rassemblé dans les tableaux (XV) p. (80) et (XVI) p. (81) respectivement les compositions molaires de la lactotransferrine humaine et de la coprolactotransferrine humaine, et les compositions molaires de la lactotransferrine de vache et des coprolactotransferrines de vache. Les résultats sont exprimés en mole d'amino-acides pour 100 résidus.

Après examen de ces tableaux nous constatons que la coprolactotransferrine humaine doit être plus acide que la lactotransferrine humaine. Les acides aminés basiques représentent 8 p. 100 des résidus d'amino-acides dans le cas de la coprolactotransferrine alors qu'ils représentent 13,4 p. 100 des résidus d'amino-acides dans le cas de la lactotransferrine humaine. Il n'y a pas eu de modification du taux d'acides aminés, acides.

De même pour les coprolactotransferrines de vache nous voyons une nette diminution de la charge électrique. Les acides aminés basiques représentent

TABLEAU XV : Composition en amino-acides de la lactotransferrine humaine et de la coprolactotransferrine, exprimeée en mole pour 100 résidus

Acides aminés	Lactotransferrine humaine *	Coprolactotransferrine humaine		
Asp	10,6	11,1		
Thr	5,06	8,6		
Ser	5,66	. 8,4		
G1u	10	9,3		
Pro	5,06	7,9		
G1y	8,52	7,6		
Ala	8,2	6,9		
Cys	5,36	3,8		
Va1	5,84	5,6		
Met	0,51	1,5		
Ileu	2,39	2,8		
Leu	8,39	9		
Tyr	3,06	3,3		
Phe	4,2	3,7		
Lys	6,9	5,2		
His	1,46	1,4		
Arg	6,52	3		

* SPIK (168)

TABLEAU XVI : Composition en amino acides de la lactotransferrine de vache et des coprolactotransferrines de vache exprimée en moles pour 100 résidus

Acides aminés	Lactotransferrine de vache *		Coprolactotransferrine de vache		
		A	. В	С	
Asp	9,8	8,7	9,7	9,9	
Thr	5,50	8,1	7,8	8,5	
Ser	7,15	11,7	10,7	10,8	
G1u	10,2	10,5	10,1	10,0	
Pro	4,2	7,3	6	4,9	
G1y	7	8,7	8,4	8,3	
Ala	9,7	7,3	8,2	8,7	
Cys	4,4	2,9	4,2	3,9	
Val	6,3	6,1	5,8	6,2	
Met	0,63	0,5	3,3	0,9	
I1eu	2,4	1,5	1,4	1,7	
Leu	9,7	8,1	8,4	8,6	
Tyr	2,8	4,9	3,9	3,9	
Phe	3,7	3,4	3,4	3,5	
Lys	7,4	5,1	5,5	5,8	
His	1,4	1,3	1,3	1,4	
Arg	5,04	3	3,2	3	

^{*} CHERON et al. (169)



12,4 p. 100 des résidus d'amino acides pour la lactotransferrine de vache alors qu'ils ne représentent que de 8,4 à 8,8 p. 100 des résidus d'amino acides pour les coprolactotransferrines de vache. Nous n'observons qu'une faible différence de 0,4 à 0,8 p. 100 en ce qui concerne les acides aminés acides.

Les résultats des dosages d'amino acides sont en accord avec les critères immunoélectrophorétiques de ces différentes coprolactotransferrines. Nous avions observé un caractère plus anodique des coprolactotransferrines par rapport aux lactotransferrines. Le dernier point qu'il nous restait à élucider était la détermination des acides aminés N et C terminaux, mais par manque de produit nous n'avons pu déterminer que le N terminal.

G - Identification des acides aminés N terminaux

L'identification des acides aminés N terminaux sur les différentes coprolactotransferrines a été effectuée par la méthode des dansyl amino-acides et contrôlée par la technique de dégradation récurrente d'Edman. Pour chaque copro-lactotransferrine nous trouvons comme acide aminé N terminal la leucine. Pour la lactotransferrine humaine il s'agit du glycocolle, pour la lactotransferrine de vache, de l'alanine.

Les lactotransferrines humaines ou de vache subissent donc une attaque du côté N terminal mais nous ne savons pas si celle-ci s'effectue du côté C terminal.

Nous avons rassemblé dans le tableau (XVII) p. (83) les principales caractéristiques de la coprolactotransferrine humaine et des coprolactotransferrines de vache.

III - CONCLUSIONS

Les lactotransferrines subissent lors de leur passage dans le tube digestif une dégradation enzymatique qui se traduit, par une perte de masse

TABLEAU XVII : Principales propriétés physico chimiques de la coprolactotransferrine humaine et des coprolactotransferrines de vache

	Coprolactotransferrine humaine	Coprolactotransferrine de vache		
		, , A	В	С
Masse moléculaire	37 000	44 000	52 000	39 000
Taux de Fer p. 1000	0,66	0,92	1,92	0,92
Composition centésimale				
Oses neutres	3	1,94	2,6	3,82
Hexosamines	0,6	*	0,85	*
Acides sialiques	0,6	0,15	0,62	0,30
	•			
Composition molaire				
Man	2,8	1,26	6,45	6,10
Ga1	3	4	1,45	3,06
Fuc	1,15	.	0,43	_
G1cN	1,09	*	2,17	*
GalN	· .	*	-	- ,
Anan	0,7	0,2	. 1	0,4
N Terminal	Leucine	Leucine	Leucine	Leucine

^{*} Non dosé



moléculaire correspondant non seulement à une perte d'acides aminés mais en plus à une perte en sucres, et par une modification de la charge électrique ce qui entraine une modification de leurs mobilités électrophorétiques. Le taux de saturation en fer est variable selon les coprolactotransferrines, mais nous pouvons néanmoins remarquer que les lactotransferrines sont capables de jouer in vivo leur rôle chélateur de fer.

Nous savons d'autre part que la coupure enzymatique s'effectue d'une façon certaine du côté N terminal mais nous ne pouvons rien dire quant au côté C terminal.

Si nous prenons le cas de la coprolactotransferrine humaine il semble que celle-ci corresponde à une lactotransferrine coupée en deux si nous nous reportons aux principales caractéristiques données dans le tableau (XVII) p. (83). Le problème est beaucoup plus difficile à résoudre pour les coprolactotransferrine de vache puisqu'elles ne présentent aucune analogie entre elles excepté l'amino acide N terminal et le taux de fer pour les protéines A et C (Tableau (XVII) p. (83)).

CONCLUSIONS GENERALES

Le but primordial de la maternisation des laits de vache est la protection intestinale du nouveau né. Celle-ci repose essentiellement sur deux types de facteurs; des facteurs microbiens et des facteurs chimiques. Nous nous sommes limités à l'étude de ces facteurs chimiques et plus particulièrement à deux types de glycoprotéines : les transferrines et les anticorps (IgA humaines).

Nous avons abordé cette étude sous deux aspects :

- un aspect quantitatif : il s'agit des bilans "entrées-sorties" des transferrines (sérotransferrine humaine, lactotransferrine humaine, lactotransferrine de vache) et des immunoglobulines A de secrétion.
- un aspect qualitatif : nous avons isolé la lactotransferrine humaine et les lactotransferrines de vache à la sortie du tube digestif.

Les résultats que nous avons obtenus se résument de la façon suivante :

I - ASPECT QUANTITATIF

- l Les transferrines humaines natives ou saturées en fer sont totalement dégradées et en outre elles provoquent des diarrhées. La sérotransferrine ne ne peut donc en aucun cas remplacer la lactotransferrine.
- 2 La présence de lactotransferrine humaine (élimination journalière ; 0,6 ± 0,2 mg) dans les selles d'enfants alimentés avec des laits artificiels révèle l'existence d'une synthèse endogène.
- 3 L'étude des selles de nouveaux nés alimentés au lait maternel, du 3ème au 30ème jour montre que l'élimination de la coprolactotransferrine humaine est maximale pendant les premiers jours d'alimentation au sein (9 à 30 mg) puis décroit progressivement et se stabilise à 4 mg ± 1 mg à partir du 20ème jour. Nous retrouvons le même phénomène lors du dosage de la lactotransferrine dans le lait maternel.

Le lait de femme compense donc la faible synthèse intestinale de la lactotransferrine puisqu'il en apporte 1 à 2 g par litre de lait.

4 - La lactotransferrine humaine native ajoutée à des laits artificiels pendant 3 jours se retrouve dans les selles en faible proportion de 1,4 à 1,9 mg par jour mais il faut préciser que ces valeurs ne correspondent qu'à l'anneau de diffusion le plus petit. L'anneau de diffusion le plus grand correspond à de la lactotransferrine qui a été fortement dégradée, donc moins absorbée dans la gélose.

5 - La lactotransferrine humaine saturée en fer ajoutée à des laits artificiels pendant 3 jours se retrouve dans les selles à raison de 6 à 37 mg par jour. Ces valeurs sont assez comparables au taux d'élimination de la lactotransferrine humaine lors d'une alimentation au lait maternel.

Ces résultats permettent de poser en hypothèse que la lactotransferrine présente dans le lait maternel doit être protégée par d'autres composés.

6 - La lactotransferrine de vache donne des résultats analogues; l'absorption de lait de vache frais se traduit par une élimination journalière de 3,5 à 11,7 mg de lactotransferrine de vache, celle de 1 g de ce protéide à l'état natif, par une élimination journalière de 40 à 250 mg, celle de 1 g de ce protéide saturée en fer, par une élimination journalière de 30 à 360 mg. La saturation en fer semble avoir une influence sous l'élimination des lactotransferrines.

7 - Les immunoglobulines A se retrouvent dans les selles lors d'une alimentation au lait maternel en quantité très variable. Ceci est du au fait que nous ne connaissons ni la quantité de lait ingérée ni le taux d'immunoglobulines de ces différents laits. Par contre lors d'une complémentation en immunoglobulines A nous trouvons des quantités journalières de 95 à 280 mg mais les anneaux de précipitation obtenus suggèrent une dégradation.

8 - La complémentation mixte Immunoglobulines A, lactotransferrine humaine native se révèle assez décevante puisque d'une part nous ne retrouvons plus

les immunoglobulines dans les selles et d'autre part, les quantités journalières de coprolactotransferrine sont de 0,7 à 1,51 mg.

Il ne semble donc pas y avoir d'effet protecteur des immunoglobulines A sur la lactotransferrine humaine et vice versa.

II - ASPECT QUALITATIF

L'isolement des coprolactotransferrines nous permet de mieux interpréter les résultats des dosages.

1 - Coprolactotransferrine humaine

La coprolactotransferrine humaine est une forme partiellement dégradée de la lactotransferrine humaine ; la masse moléculaire passe de 76 000 à 37 000 ; la mobilité électrophorétique est modifiée elle devient plus anodique. Elle présente néanmoins une réaction d'identité partielle avec la lactotransferrine ce qui indique qu'elle a perdu certains déterminants antigéniques.

La composition molaire en glucides nous fait penser que la lactotransferrine a été coupée entre les glycannes puisque nous ne retrouvons pratiquement qu'un seul glycanne par molécule de coprolactotransferrine.

L'acide aminé N terminal est à présent la leucine alors qu'il s'agit du glycocolle pour la lactotransferrine.

Néanmoins, cette coprolactotransferrine fixe toujours du fer puisque nous le retrouvons plus saturée à la sortie du tractus digestif. Elle peut donc même sous une forme dégradée continuer à jouer un rôle ferri-privateur, préjudiciable au développement de certaines bactéries pathogènes. Nous avons pu démontrer que la protéolyse intestinale s'était portée uniquement sur la partie de la molécule qui ne renferme pas les sites de fixation des deux atomes de fer. En effet, la coprolactotransferrine est dans les selles, saturée par deux atomes de métal.

2 - Coprolactotransferrine de vache

Les coprolactotransferrines de vache sont également des formes partiellement dégradées de la lactotransferrine de vache.

Les masses moléculaires respectives sont 44 000, 52 000 et 39 000. Les mobilités électrophorétiques sont également modifiées, elles sont plus anodiques.

Par la technique d'OUCHTERLONY (170) et des fentes courtes nous constatons qu'elles ont perdu certains déterminants antigéniques.

Nous avons trouvé que le N terminal de ces 3 glycoprotéines était : la leucine. Ceci indique qu'il y a bien eu une coupure du côté N terminal puisque l'acide aminé N terminal est l'alanine pour la lactotransferrine de vache. Ces trois glycoprotéines sont toujours capables de fixer du fer puisque les taux de fer respectifs sont 0,92, 1,92 et 0,92 p. 1000. Il est difficile de conclure que ces glycoprotéines sont saturées en fer excepté pour une. Pour les deux autres le fait de ne pouvoir resaturer en fer ne nous indique pas qu'elles soient saturées mais elles peuvent avoir subi une telle modification de leur structure que le deuxième site de fixation est inaccessible au fer. Il nous faut souligner que la proteine de masse moléculaire 44 000 ayant pour origine la lactotransferrine de vache native s'est enrichie en fer au cours du transit dans le tube digestif. Elle joue donc elle aussi un rôle chélateur de fer in vivo. La protéine de masse moléculaire 39 000 a par contre perdu du fer.

Si nous comparons les coprolactotransferrines humaine et de vache ayant pour origine les lactotransferrines natives nous constatons que toutes deux sont dégradées par les enzymes digestives mais ce qui est beaucoup plus important, elles ont capté du fer dans l'organisme du nourrisson. Il serait donc possible de complémenter les laits industriels avec de la lactotransferrine de vache puisqu'elle est capable *in vivo* de jouer un rôle ferri-privateur préjudiciable au développement de certains germes pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

AMMAN A.J., STIEHM E.R., Soc. Exptl. Biol. Med., 1966, 122, 1098 (23)

ANDRE C., Lancet ii, 1974, 782 (46)

ANDRE C., HEREMANS J.F., VAERMAN J.P., CAMBIASO C.L., J. Exp. Med., 1975, 142, 1509 (47)

ANDRE C., BAZIN H., HEREMANS J.F., Europ. J. Immunol., 1974, 4, 701 (45)

ANDRE A., PEETOM F., RONDMAN K.W., Vox Sang., 1964, 8, 99 (116,120)

BALLOW M.N., DAY K.B., GOOD R.A., Unpublished Results (117)

BELCHER R., NUTTEN A.J., SAMBROOK C.M., Analyst, 1954, 79, 201 (147)

BERGHEIM O., J. infect. Dis., 1940, 66, 222 (13)

BISERTE G., BRETON A., FONTAINE G., Arch. Franc. Ped., 1955, 12, 20 (26)

BISERTE G., HAVEZ R., CUVELIER R., Exp. Ann. Biochim. Med., Masson ed., Paris, 1963, 24, 85 (61)

BISERTE G., MASSE L., C.R. Soc. Biol., 1948, 142, 664 (25)

BLANC B., Thèse Doct. ès Sci., Lausanne, Suisse, 1962 (71-74)

BLANC B., in PEETERS H., Protides of the biological fluids, Elsevier, Amsterdam, 1966, 14, 125 (76)

BLANC B., ISLIKER H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 929 (53)

BLANC B., ISLIKER H., Helv. Chim. Acta, 1963, 322, 2905 (70)

BRAUN O.H., Z. Kinderheilkd., 1958, 81, 742 (94)

BRAUN O.J., Z. Kinderheilkd., 1960, 83, 690 (97)

BULLEN J.J., DOBSON A., WILSON A.B., J. Gene. Microbio1.,1964, 35, 175 (84)

BULLEN J.J., LEIGH L.C., ROGERS H.J., Immunology, 1968, 15, 581 (88)

BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L.C., Brit. Med. J., 1972, 1, 69 (16,81,83,89)

BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEWIN J.E., Immunology, 1971, 20, 391 (85,90)

BULLEN C.L., WILLIS A.T., Brit. Med. J., 1971, 3, 338 (7)

CARTER P., Anal. Biochem., 1971, 40, 450 (142)

CHANDAN R.C., SHAHANI K.M., Nature, 1964, 204, 76 (93,98)

CHERON A., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 135 (31)

CHERON A., C.R. Acad. Sci., 1977, 284, 585 (128,129,163,165,169)

COLEMAN S.E., VAN DE RIJN J., BLEISWEIS A.S., Infect. Immunity, 1970, 2, 563 (101)

COLOBERT L., Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 156 (102)

DEBRAY-VANDERSYPPE R., Thèse Doct. 3ème Cycle, Lille, France, 1975 (164)

DE LAYE P., MASSON P.L., HEREMANS J.F., In Protides of the biological Fluids.

Proceedings of the 16th Colloquium Bruges, 1968, 16, 627 (159)

DESCAMPS J., Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1974 (131,133)

DEUTSCH H.E., J. Biol. Chem., 1947, 169, 437 (27)

DIAZ-JOUANEN E., WILLIAMS R.C., Clin. Immunol. and Immunol. Path., 1974, 3, 248 (106-111)

DITTMANN J., HOLM-ANDERSEN I., LIEM G., MAYER J.B., Zschr, Kinderheilkd, 1967, 101, 305 (10)

EDMAN P., BEGG G., Eur. J. Biochem., 1967, 1, 80 (155,157)

ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 (146,166,167)

FONTAINE G., Thèse Med., Lille, France, 1954 (28)

FOURNET B., Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1973 (150)

FRANKLIN M.R., KENYON K.R., TOMASI T.B., J. Immunol., 1973, 110, 984 (65)

GINDRAT J.J., GOTHEFORS L., HANSON L.A., WINBERG J., Acta. Pediatr. Scand., 1972, 61, 587 (40)

GLYNN A.A., Annual. Rev., 1968 (92)

GOLDBACH W., HAENEL H., GRUTTE F.K., Ernahr. Forsch., 1964, 9, 295 (95)

GOLDBLUM W., SMITH C.W., GOLDMAN A.S., Unpublished Results (108)

GOLDMAN A.S., SMITH C.W., J. Pediatr., 1973, 82, 1082 (121)

GOTZE O., MULLER-EBERHARD H.J., J. Exp. Med., 1971, 134, 90 (118)

GRABAR P., WILLIAMS C.A., Biochim. Biophys. Acta, 1933, 10, 193 (137)

GROVES M.L., J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 3345 (55)

GROVES M.L., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 154 (56)

GYLLENBERG H., ROINE P., Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 1957, 41, 144 (4)

GYORGY P., DHANAMITTA S., STEERS E., Science., 1962, 137, 338 (127)

HAENEL H., GOLDBACH W., GRUTTE F.K., Ernähr. Forsch., 1963, 8, 282 (100)

HAN K.K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M., BISERTE G., Ann. Pharmaceutiques, France, 1973, 31, 539 (156)

HANEBERG B., FINNE P., Acta. Pediatr. Scand., 1974, 63, 588 (105)

HARTLEY R.S., Biochem. J., 1970, 119, 805 (154)

HENTGES D.J., J. Bacteriol., 1967, 93, 2029 (12)

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORNBROOK M.M., J. Immunol., 1966, 97, 840, (18)

ISHIZAKA T., SIAN C.M., ISHIZAKA K., J. Immunol., 1972, 108, 848 (119)

JOHANSON B.G., Acta. Chem. Scand., 1960, 14, 510 (52)

JOLLES P., JOLLES J., Nature, 1961, 192, 1187 (96)

KATZ M., PLOTKIN S.A., J. Pediatr., 1968, 73, 207 (41)

KENNY J.F., BOESMAN M.I., MICHAELS R.H., Pediatrics, 1967, 39, 202 (33,38)

KIRKPATRICK C.H., GREEN I., RICH P.R., SCHADE A.L., J. Infect. Dis., 1971, 124, 539 (79)

LAKOWSKIM.Jr., LAKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1951, 190, 653 (35)

LOISELIER F., GOT R., BURTIN P., GRABAR P., In PEETERS H., Protides of the biologica fluids. Elsevier, Amsterdam, 1966, 14, 133 (68)

MAENO M., KIYOSAWA J., Biochem. J., 1962, 83, 271 (134)

MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., Immunochemistry, 1965, 2, 235 (139)

MASSON P.L., In "la lactoferrine", Ed., Arscia, Bruxelles, 1970 (59,72,73)

MASSON P.L., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 485 (6

MASSON P.L., HEREMANS J.F., Europ. J. Biochem., 1968, 6, 579 (86)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., In PEETERS H., Protides of the biological fluids.

Elsevier, Amsterdam, 1966, 14, 115 (64,67,77)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., DIVE C.H., Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 735 (63,75)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., PRIGNOT J.J., WAUTERS G., Thorax, 1966, 21, 538 (78)

MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E., CRABBE P.A., In Protides Biol. Fluids. Proc. Colloq. Bruges, 1968, 16, 633 (160)

MATA L.J., WYATT R.G., Am. J. Clin. Nutr., 1971, 24, 976 (24,115)

MAYER J.B., KESCHAWARZI S., Med. u. Ernähr., 1970, 11, 279 (6)

MAZURIER-DEHAINE., Thèse Doctorat de 3e Cycle, Lille, France, 1973, (1,158)

Mc LEOD GRIFISS J., J. Immuno1., 1975, 114, 1779 (49)

MICHAEL J.G., RINGENBACK R., HOTTENSTEIN S., J. Infect. Dis., 1971, 124, 445 (39)

MOHR J.A., LEU R., MABRY W., J. Surg. Oncol., 1970, 2, 163 (114)

MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 732 (19,29,132)

MONTREUIL J., MULLETS S., C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376 (58)

MONTREUIL J., SPIK G., Microdosage des glucides. Monographie n° 1, Lille, 1963 (143)

MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (51)

MOORE C.E.W., CATO E.P., CUMMINS C.S., HOLDEMAN L.V., SMIBERT R.M., SMITH L.D.S., In Outline of Clinical methods in anaerobic Bacteriology, 1970 (9)

MORRISSON M., ALLEN P.Z., Science, 1970, 152, 1627 (69)

MORO E., Wien. Klin. Wochenschr., 1900, 15, 144 (33)

MURALT G., GUGLER E., ROULET D.L., In PEETERS H. Protides of the Biological fluids, Elsevier, Amsterdam 1961, 8, 166 (20)

MURILLO G.J., GOLDMAN A.S., Pediat. Res., 1970, 4, 71 (107,109,110)

NEU H.C., DREYFUS J., CANFIELD R.E., In Antimicrob. Agents. Chemother., 1968, 1969, 442 (103)

NEVILLE D.M., J. Biol. Chem., 1971, 246, 6328 (140)

NORDBRING F., Acta Pediatr., 1957, 46, 569 (32)

NORTON R.G., SHOHL A.T., Am. J. Dis. Child., 1926, 32, 183 (11)

O'NEIL P.A., ROMSDAHL M.M., Immuno1, Commun 1974, 3, 427 (48)

ORAM J.D., REITER B., Biochem. J., 1966, 10, 373 (125)

ORAM J.D., REITER B., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 170, 351 (60,80)

OUCHTERLONY O., Progress in allergy, 1958, 5, 1 (136,161,162,170)

PAUPE J., MEYER B., Path. Biol., 1960, 17, 87 et 191 (30)

PERCY M.E., BUCHWALD B.M., Anal. Biochem., 1972, 45, 60 (152)

PETERSON R.G., HARTSELL S.E., J. Infect. Dis., 1957, 96, 75 (104)

PORTMANN A., AUCLAIR J.E., Relation entre la lacténine L₂ et la lactoperaxydase, Lait, 1959, 39, 147 (124)

REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D., Immunology, 1975, 28, 83 (82,87,91)

RIMINGTON C., Biochem, J., 1931, 25, 1062 (145)

ROOP W.E., PUTNAM F.W., J.B.C., 1967, 242, 2507 (130)

ROSENTHAL L., LIBERMAN H., J. Infect. Dis., 1931, 48, 226 (99)

ROWE D.S., FAHEY J.L., J. Exp. Med., 1965, 121, 171 (17)

RUTTER J.M., JONES G.W., BROWN G.T.H., BURAOWS M.R., LUTHER P.D., Infect and Immunity, 1976, 13, 667 (43)

SCHAFER K.H., Monatsschr. Kinderheilkd., 1951, 99, 69 (50)

SCHEIDEGGER J.J., Inter. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 1955, 7, 103 (138)

SCHNEEGANS E., HAARSCHER A., LUTZ A., SCHMITTBUHL J., Soc. Pediatr., 1964, (15)

SCHUBERT J., GRUNBERG A., Med. Wochenschr., 1949, 79, 1007 (37)

SHAPIRO A.L., VINUELA E., MAIZEL J.V., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 28, 815 (141)

SHIM B.S., KANG Y.S., KIM W.J., CHO S.H., Nature, 1969, 222, 787 (34)

SMITH H.W., CRABB W.E., J. Pathol. Bacteriol., 1961, 82, 53 (5)

SMITH C.W., GOLDMAN A.S., J. Reticuloendothel. Soc., 1970, 8, 91 (112)

SMITH C.W., GOLDMAN A.S., YATES R.D., Exp. Cell. Res., 1971, 69, 409 (113)

SMITH L., HOLDEMAN L.V., In Pathogenic. Anecrobic. Bacteria., 1968, 17, 423 (8)

SØRENSEN M., SØRENSEN S.P.L., C.R. Lab. Carlsberg. Ser. Chim., 1939, 23, 55 (54)

SOUTH M.A., COUPER M.D., WOLLHEIM F.A., GOOD R.A., J. Explt. Med., 1966, 123, 615 (2)

SPACKMAN D.H., STEIN W.A., MOORE S., Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (151)

SPIK G., Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1968 (57, 168)

STEELE W.F., MORRISSON M., J. Bacteriol., 1969, 97, 635 (123-126)

TASSOVATZ B., Sem. Hop. Ann. Ped., 1964, 1315, 291 (14)

THEORELL H., AKESON A., Arkie. Kemi. Mineral. Geol., 1943, 13, 17 (122)

TILLMANS J., PHILIPPI K., Biochem. J., 1929, 215, 36 (144)

TISSIER H., Recherche sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson 1900 (2)

TOMASI T.B., BIENENSTOCK J., Adv. Immunol., 1968, 9 (21)

TOURVILLE D.R., OBRA S.S., LIPPES J., TOMASI T.B., Am. J. Obstet. Gynec., 1970, 108, 1103 (66)

VAITUKATIS., ROBBINS., NIESCHLAG., ROSS., J. Clin. Endocr., 1971, 33, 988 (135)

WALKER W.A., ISSELBAKER K.J., BLOCH K.J., Science, 1972, 177, 608 (44)

WARREN R.J., LEPOW M.L., BARTSCH G.E., ROBBINS F.C., Pediatrics, 1964, 34, 4 (36)

WERNER I., ODIN L., Acta. Soc. Med. Upsaliensis., 1952, 57, 230 (148)

WILLIAMS R.C., GIBBONS R.J., Science, 1972, 177, 697 (42)

WOODS K.R., WANG K.T., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 133, 369 (153)

ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G., J. Chromatog., 1972, 69, 291 (149)

