

N° d'ordre : 1124

50376
1983
137

50376
1983
137

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE

présenté à l'Université de Lille 1

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité Biochimie

par

Sylvie JORIEUX



**PREPARATION ET ETUDE DU MODE D'ACTION D'UNE
FRACTION ISOLEE DU LAIT DE FEMME
SUSCEPTIBLE D'ETRE UTILISEE DANS LE
TRAITEMENT DES DIARRHEES REBELLES
DU NOURRISSON**



030 032018 4

Soutenu le 2 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineur

M. J. MONTREUIL
Mlle G. SPIK
M. G. ROMOND

Ce travail a été réalisé sous la Direction de
Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire
de Chimie Biologie [Directeur : Professeur Jean Montreuil] de
l'Université des Sciences et Techniques de Lille [Laboratoire
Associé au C.N.R.S. n°217 : Relations structure-fonction des
constituants membranaires].

A ma Maman,

Avec mon affection et ma profonde reconnaissance,
pour son courage et sa détermination qui ont
toujours été pour moi un exemple.

A ma Tante et à mon Oncle,

Avec ma tendresse et ma profonde gratitude, pour
avoir toujours suivi avec intérêt mes études et
avoir participé, financièrement, à la naissance
de ce mémoire.

A mes frères

A Geneviève,

Vous m'avez accueillie avec gentillesse et bienveillance dans votre groupe et guidée tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de votre expérience et compétence scientifiques. Permettez-moi de vous exprimer ma plus vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur MONTREUIL,

Vous avez bien voulu m'accepter dans votre laboratoire et vous m'avez confiée un travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur ROMOND,

Je suis honorée de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie également :

- Catherine ALONSO, qui m'a appris le "B.A.BA" des techniques de laboratoire. Merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur et ton amitié.

- Jean-Pierre DECOTTIGNIES, qui, tout au long de ces trois années, a été un précieux collaborateur et un ami sincère.

- Florence DELPLACE, Annick PIERCE, Jo CELEN et tout ceux qui m'ont apportée aide et conseils.

- le "103" pour son ambiance chaleureuse et amicale.

TABLE DES MATIERES

I N T R O D U C T I O N

G E N E R A L I T E S

I N T R O D U C T I O N

p.3

P H Y S I O P A T H O L O G I E D E S D I A R R H E E S

I- DIARRHÉE DUE A LA TOXINE CHOLÉRIQUE =====	5
II- DIARRHÉE DUE AU ROTAVIRUS =====	6
III- DIARRHÉE DUE A ESCHERICHIA COLI =====	7
A- SOUCHES ENTEROTOXIGÉNIQUES _____	8
1°) <u>Comment les bactéries adhèrent-elles aux cellules ?</u>	9
2°) <u>Action des toxines</u>	9
B- SOUCHES INVASIVES _____	11
IV- CONCLUSIONS =====	13

F A C T E U R S D E D E F E N S E D E L ' I N T E S T I N
D U N O U R R I S S O N

I- LES LIPIDES =====	15
II- LES GLUCIDES =====	16
A- LE LACTOSE _____	16
B- LES OLIGOSACCHARIDES _____	16
1°) <u>Oligosaccharides neutres</u>	17

2°) <u>Oligosaccharides acides</u>	p.19
C- <u>LES FACTEURS BIFIDIGENES</u>	20
D- <u>ACTION DE LA FLORE BIFIDE</u>	22
1°) <u>Caractéristiques de la flore fécale du nourrisson</u>	22
2°) <u>Rôle de la flore bifide</u>	22
3°) <u>Mécanisme d'action du bifide</u>	25
III- LES PROTEINES	25
=====	
A- <u>LE SYSTEME LACTOPEROXYDASE</u>	27
1°) <u>Caractères généraux</u>	27
2°) <u>Localisation</u>	28
3°) <u>Mode d'action</u>	28
B- <u>LE COMPLEMENT</u>	28
C- <u>LES IMMUNOGLOBULINES</u>	29
1°) <u>Caractères généraux des sIgA</u>	30
2°) <u>Localisation</u>	31
D- <u>LE LYSOZYME</u>	31
1°) <u>Caractères généraux</u>	31
2°) <u>Localisation</u>	31
E- <u>LA LACTOTRANSFERRINE</u>	32
1°) <u>Caractères généraux</u>	32
2°) <u>Localisation</u>	33
3°) <u>Comportement électrophorétique</u>	34
IV- CONCLUSIONS	36
=====	

ACTIVITE DES FACTEURS DE DEFENSE DE
L'INTESTIN DU NOURRISSON
CONSERVATION DE CETTE ACTIVITE

I- ACTIVITE SPECIFIQUE DES FACTEURS SOLUBLES	37
=====	

A- LES IMMUNOGLOBULINES sIgA	p.37
<u>1°) Limitation de l'adsorption des bactéries aux muqueuses</u>	37
<u>2°) Neutralisation des virus</u>	38
<u>3°) Agglutination des bactéries</u>	38
<u>4°) Neutralisation des parasites</u>	40
<u>5°) Inhibition de l'absorption digestive des antigènes</u>	40
<u>6°) Activation du complément par la voie alterne</u>	41
B- LE LYSOZYME	41
<u>1°) Action bactéricide</u>	41
<u>2°) Action sur la flore fécale</u>	43
<u>3°) Rôle immunomodulateur</u>	44
<u>4°) Rôle dans l'immunité cellulaire</u>	44
C- LA LACTOTRANSFERRINE	45
<u>1°) Apport du fer au nourrisson</u>	45
<u>2°) Activité bactériostatique</u>	46
<u>3°) Effet bactéricide de l'apo-lactotransferrine</u>	
<u>4°) Activité antibactérienne "in vivo"</u>	49
II- SYNERGIE D'ACTION DES CONSTITUANTS SOLUBLES DU LAIT MATERNEL =====	52
A- <u>SYNERGIE LYSOZYME- sIgA- COMPLEMENT</u>	52
B- <u>SYNERGIE LYSOZYME- LACTOTRANSFERRINE</u>	53
C- <u>SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE- sIgA</u>	53
D- <u>SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE- COMPLEMENT</u>	56
III- CONSERVATION DE L'ACTIVITE DES FACTEURS =====	57

C O N C L U S I O N

B- <u>ACTIVITE BIFIDIGENE</u>	p. 77
III- CONCLUSION =====	79

ETUDE BIOCHIMIQUE DU PRECIPITE P₇₋₈
MISE EN EVIDENCE DE COMPLEXES DE LA
LACTOTRANSFERRINE

I- INTRODUCTION =====	81
II- RESULTATS =====	81
A- <u>COMPOSITION DU PRECIPITE P₇₋₈</u>	81
1°) <u>Analyse biochimique du P₇₋₈</u>	81
2°) <u>Fractionnement du P₇₋₈ sur colonne de SP-Sephadex</u>	82
3°) <u>Analyse biochimique des fractions</u>	82
4°) <u>Analyse électrophorétique</u>	85
a) <u>Acétate de cellulose</u>	85
b) <u>Immunoélectrophorèse</u>	87
c) <u>Electrophorèses bidimensionnelles</u>	
B- <u>MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE LACTOTRANSFERRINE- LYSOZYME</u>	89
1°) <u>Isolement du complexe par gel filtration</u>	89
2°) <u>Analyse du complexe lactotransferrine-lysozyme</u>	91
a) <u>Dosage des protéines</u>	91
b) <u>Ultracentrifugation analytique</u>	91
c) <u>Dichroïsme circulaire</u>	92
d) <u>Immunoélectrophorèses</u>	92
III- CONCLUSIONS =====	96

ACTIVITE BACTERIOLOGIQUE DU P₇₋₈
DANS LE TRAITEMENT DES DIARRHEES

I- INTRODUCTION =====	97
II- PROTOCOLE =====	97
III- RESULTATS =====	99
A- <u>ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE DU P₇₋₈ "in vivo"</u>	99
B- <u>ACTIVITE BACTERIOLOGIQUE DU P₇₋₈ "in vitro"</u>	102
1°) <u>Activité bactériostatique</u>	102
2°) <u>Activité bifidigène</u>	103
IV- CONCLUSION =====	105

CONSERVATION DES PROTEINES DU LAIT
 MATERNEL ET DU P₇₋₈ AU COURS DES
 TRAITEMENTS DE STERILISATION.

I- INTRODUCTION =====	106
II- RESULTATS =====	107
A- <u>PASTEURISATION DU LAIT MATERNEL</u>	107
1°) <u>Tests bactériologiques</u>	107
2°) <u>Dénaturation des protéines</u>	108
3°) <u>Activité bactériostatique du lait après pasteurisation</u>	112
B- <u>DENATURATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DU P₇₋₈</u>	114
<u>PAR LA CHALEUR</u>	
C- <u>ANALYSES PHYSIQUES</u>	115
1°) <u>Dichroïsme circulaire</u>	115
2°) <u>Absorption ultraviolette différentielle</u>	118
III- DISCUSSION =====	120
IV- CONCLUSION =====	123

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU LAIT DE FEMME =====	p. 128
A- <u>INTRODUCTION</u>	128
B- <u>PREPARATION DES LACTOSERUMS</u>	128
1°) <u>Pour un fractionnement classique</u>	128
a) <u>Délipidation</u>	128
b) <u>Dialyse</u>	129
c) <u>Décaséination</u>	129
2°) <u>Pour un fractionnement semi-industriel</u>	129
a) <u>Délipidation</u>	129
b) <u>Concentration et dialyse</u>	130
c) <u>Décaséination</u>	130
C- <u>FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU LACTOSERUM</u>	130
1°) <u>Fractionnement classique</u>	131
2°) <u>Variante du fractionnement classique</u>	133
II- PURIFICATION DES PROTEINES =====	133
A- <u>LA LACTOTRANSFERRINE</u>	133
1°) <u>Purification de la lactotransferrine native</u>	133
2°) <u>Préparation de l'apo-lactotransferrine</u>	134
B- <u>LE LYSOZYME</u>	134
III- DETERMINATION DU DEGRE DE PURETE DES PROTEINES =====	134
A- <u>PREPARATION DES IMMUNSERUMS</u>	134
1°) <u>Sérums de Lapin anti-IgA et anti-lacto-transferrine</u>	134
2°) <u>Sérum de Lapin anti-colostrum</u>	135
3°) <u>Sérums anti-IgG, anti-IgM, anti-lysozyme, anti-pièce de sécrétion</u>	135

B- <u>MARQUAGE D'UN ANTISERUM A LA FLUORESCEINE</u>	p. 135
1°) <u>Précipitation des anticorps</u>	135
2°) <u>Préparation d'anticorps fluorescents</u>	136
C- <u>METHODES ELECTROPHORETIQUES ET IMMUNOELECTROPHORETIQUES</u>	
1°) <u>Acétate de cellulose</u>	136
2°) <u>Immunoélectrophorèse</u>	136
a) <u>Immunoélectrophorèse simple</u>	136
b) <u>Immunoélectrophorèse double</u>	137
D- <u>DOSAGES IMMUNOLOGIQUE ET ENZYMATIQUE</u>	138
1°) <u>Immunodiffusion radiale</u>	133
2°) <u>Dosage du lysozyme</u>	138
IV- <u>ANALYSES CHIMIQUES</u>	139
=====	
A- <u>DOSAGE DES PROTEINES TOTALES</u>	139
B- <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES</u>	
1°) <u>Dosage des oses neutres</u>	140
2°) <u>Dosage des osamines</u>	140
3°) <u>Dosage des acides sialiques</u>	140
C- <u>DETERMINATION DE LA CAPACITE DE FIXATION EN FER</u>	140
1°) <u>Saturation en fer</u>	140
a) <u>Principe</u>	
b) <u>Solutions</u>	
c) <u>Mode opératoire</u>	
2°) <u>Dosage du fer</u>	144
a) <u>Principe</u>	
b) <u>Solutions</u>	
c) <u>Mode opératoire</u>	
V- <u>ACTIVITES BACTERIOLOGIQUES</u>	142
=====	
A- <u>DOSAGE DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE</u>	142
1°) <u>Préparation de l'inoculum</u>	
2°) <u>Mise en culture</u>	

3°) <u>Numération sur boîtes de Pétri</u>	p.143
4°) <u>Milieux de culture</u>	144
<u>B- MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE BIFIDIGENE</u>	144
1°) <u>Souches utilisées</u>	144
2°) <u>Préparation du milieu ensemencé</u>	145
3°) <u>Préparation du substrat à analyser</u>	146
4°) <u>Réalisation du test</u>	146
5°) <u>Milieux de culture</u>	146
<u>VI- PASTEURISATION DES LAITS DE LACTARIUM</u>	147
=====	
<u>A- COLLECTE DU LAIT MATERNEL</u>	147
<u>B- PASTEURISATEURS</u>	148
1°) <u>Pasteurisation à "basse température"</u>	148
a) <u>Pasteurisateur Oxford</u>	
b) <u>CM 80</u>	
c) <u>LYON H.M.</u>	
2°) <u>Pasteurisateur "haute température"</u>	149
<u>C- ANALYSES BACTERIOLOGIQUES</u>	149
1°) <u>Numération des germes</u>	149
a) <u>Avant pasteurisation</u>	
b) <u>Après pasteurisation</u>	
2°) <u>Activité bactériostatique</u>	150
<u>D- ANALYSES PHYSIQUES DE LA DENATURATION DE LA LACTO- TRANSFERRINE</u>	150
1°) <u>Dichroïsme circulaire</u>	
2°) <u>Absorption ultraviolette différentielle</u>	151

INTRODUCTION

Les enfants nourris au sein résistent mieux aux infections que les enfants alimentés avec du lait maternisé. L'augmentation de la résistance de ces nourrissons s'explique par la présence dans le lait de Femme de facteurs anti-infectieux dont les plus importants sont : la lactotransferrine, le lysozyme et les immunoglobulines, en particulier les IgA de sécrétion. Ces facteurs de nature protéique sont fragiles et thermodégradables.

Les banques de lait, qui recueillent des quantités importantes de lait de Femme, doivent le conserver dans les meilleures conditions possibles afin de le redistribuer aux prématurés et aux nourrissons atteints de diarrhée rebelle.

Notre travail, qui s'inscrit dans le cadre d'une étude en vue de l'amélioration des laits "maternisés", a porté :

1) Sur le fractionnement des protéines du lait de Femme en vue du traitement des diarrhées infectieuses chez l'enfant. Le fractionnement a été réalisé selon une méthode semi-industrielle mise au point au cours de notre Diplôme d'Etudes Approfondies.

L'analyse immunochimique et la recherche de l'activité bactériostatique et bifidigène effectuées sur les différents précipités obtenus par relargage au sulfate d'ammonium u lactosérum de lait de Femme, ont montré que, parmi les différents précipités, le P₇₋₈ était le plus actif.

Après une étude détaillée de la composition de ce précipité P₇₋₈ qui nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe lactotransferrine-lysozyme, le P₇₋₈ a été administré à des enfants atteints de diarrhée rebelle. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nous incitent à poursuivre dans la voie d'une mise au point d'une formule de lait pour le traitement des infections.

2) D'autre part, dans le cadre d'un contrat avec le Ministère de la Santé, notre travail a porté sur la mise au point des méthodes de conservation des laits de lactarium. Ce contrat a été réalisé en étroite collaboration avec le lactarium de Paris qui nous a fourni la matière première indispensable.

Nous présenterons, dans un chapitre de généralités, l'état actuel de nos connaissances sur les 2 types de diarrhées infectieuses et sur les mécanismes moléculaires de défense de l'intestin du nourrisson. Nous présenterons ensuite nos travaux personnels relatifs, d'une part, à l'étude détaillée du P₇₋₈ et à l'isolement du complexe lactotransferrine-lysozyme, et d'autre part, à la conservation de l'activité bactériostatique de la lactotransferrine, du lysozyme et des sIgA après pasteurisation des laits de lactarium.

Jusqu'à présent, nos travaux ont fait l'objet de deux communications lors du Colloque "Human Milk Process" placé sous l'égide de la firme Nestlé et qui s'est tenu à Oxford les 2 et 3 Janvier 1983 et des deux publications suivantes :

1- SPIK G., JORIEUX S., MAZURIER J., NAVARRO J., ROMOND C., MONTREUIL J.

"Characterization and biological role of human lactotransferrine complexes" Annales de Nestlé, 1983 (sous presse)

2- BARROIS-LAROUZE V., JORIEUX S., AUBRY S., GRIMMONPREZ L., SPIK G.

"Effects of various types of heat treatment on some human milk constituents" Annales de Nestlé, 1983 (sous presse).

GENERALITES

I N T R O D U C T I O N

La diarrhée infectieuse, reconnue comme l'une des maladies les plus fréquentes dans le monde [SCHREIBER et al., 1977], est la cause principale des décès avant l'âge de 3 ans, en particulier dans les pays en voie de développement où les enfants sont peu médicalisés et souvent malnutris [EDITORIAUX, 1976 ; 1978 ; SCHREIBER et al., 1977]. En 1976, le nombre des épisodes diarrhéiques chez l'enfant était de 500 millions avec un taux de mortalité de 1 à 4% [ROHDE et NORTHROP, 1976]. Bien qu'elle soit en nette diminution en Europe, la diarrhée continue d'être la cause de l'hospitalisation d'un enfant sur quatre [OAKLEY et al., 1976].

Des études cliniques réalisées par GYORGY [1964] révèlent que les nourrissons alimentés au lait maternel souffrent moins de troubles digestifs et de diarrhées infectieuses que les nouveaux-nés nourris au lait artificiel. Des études épidémiologiques rapportées par CHANDRA [1979] confirment le rôle protecteur du lait de Femme vis-à-vis des différentes infections pathogènes qui touchent les nourrissons provenant d'un pays industrialisé ou d'un pays du Tiers-Monde [Tableau I ; p. 4]. La protection du tractus digestif du nourrisson par le lait maternel est un phénomène complexe qui met en jeu des cellules : macrophages et lymphocytes, des facteurs solubles spécifiques : les immunoglobulines de sécrétion, sIgA et sIgM, des facteurs solubles non spécifiques : la lactotransferrine, le lysozyme, la lactoperoxydase, le mucus, le complément et des bactéries saprophytes : les Bifides.

La présentation plus détaillée des facteurs de défense de la muqueuse intestinale du nourrisson présents dans le lait de Femme sera précédée d'un résumé des connaissances actuelles sur les différents types de diarrhées infectieuses.

TABLEAU I

INCIDENCE DU MODE D'ALIMENTATION SUR LE TAUX DES INFECTIONS BACTERIENNES CHEZ DES NOURRISSONS PROVENANT SOIT D'UN PAYS INDUSTRIALISE SOIT D'UN PAYS DU TIERS-MONDE (CHANDRA, 1979).

Désordres	Morbidité au Canada		Morbidité en Inde	
	Nourrissons au sein n = 30	Nourrissons au biberon n = 30	Nourrissons au sein n = 35	Nourrissons au biberon n = 35
Infection respiratoire	42	98	57	109
Otite	9	86	21	52
Diarrhée	5	13	70	211
Déshydratation	0	3	3	14
Pneumonie	-	-	2	8

Les chiffres du tableau représentent le nombre de fois où les enfants d'un même groupe sont malades, ceci sur une période de 2 ans.

n = nombre d'enfants dans chaque groupe.



PHYSIOPATHOLOGIE DES DIARRHEES

La diarrhée résulte d'une augmentation de la fréquence, de la fluidité et du volume des selles. S'accompagnant de déshydratation et de malnutrition, la diarrhée doit être considérée comme une maladie grave nécessitant une thérapie précoce. Il en existe deux types : la diarrhée chronique et la diarrhée infectieuse (ou aiguë). Cette dernière est la seule dont nous parlerons.

De nombreux organismes sont à l'origine des diarrhées infectieuses. Parmi les bactéries, nous pouvons citer : Salmonella, Shigella, Escherichia coli entéropathogéniques (EPEC) et Vibrios. Les protozoaires comme l'amibe, la giardia et les entérovirus peuvent aussi provoquer des entérocrites. Malgré cette liste abondante et néanmoins non exhaustive, il est surprenant que l'agent pathogène ne soit pas identifié dans 80% des cas de diarrhée aiguë [YOW et al., 1970 ; CRAMBLETT et al., 1971 ; SOUTH, 1971].

Les diarrhées ayant pour agents pathogènes Vibrio cholerae ou Rotavirus ont été les mieux étudiées et elles illustrent les deux principaux types de diarrhées aiguës connues actuellement : diarrhée à entérotoxine et diarrhée virale.

I- DIARRHEE DUE A LA TOXINE CHOLERIQUE

=====

Le mécanisme d'absorption intestinale dans la diarrhée due à la toxine cholérique est bien connu.

Le Vibrio cholerae, proliférant dans la lumière intestinale, synthétise une entérotoxine qui pénètre dans les cellules épithéliales et perturbe leur métabolisme.

La sous-unité B de la toxine cholérique se lie étroitement aux récepteurs GM1 de la membrane de l'entérocyte (Van HEYNINGEN, 1973) afin de faciliter l'interaction de la sous-unité active A avec la cellule. La sous-unité A stimule l'adénylcyclase (McGONAGLE et al., 1969 ; GREENOUGH et al., 1970). La production d'AMPcyclique provoque la sécrétion massive d'ion Cl^- et bloque l'absorption des ions Na^+ (FIELD et al., 1969). DESJEUX (1977) montre que la présence de glucose inhibe l'effet sécrétoire de la toxine.

L'utilisation de la toxine cholérique purifiée par FINKELSTEIN (1973) pour réaliser un modèle expérimental chez l'animal a conduit LESTRADET et DESJEUX (1977) à postuler l'existence de 2 systèmes de transport actif du sodium dans l'intestin 1°) un système d'absorption stimulé par le glucose qui nécessite la participation d'une Na-K-ATPase et une structure biologique intacte ; 2°) un système de sécrétion stimulé par la toxine cholérique et par toute augmentation de l'AMPcyclique intracellulaire.

Les patients atteints du choléra présentent une forte acidose métabolique due à la perte de grands volumes de selles alcalines contenant du bicarbonate (MAHALANABIS et al., 1970). Par contre, les anomalies liées à la digestion et à l'absorption sont faibles (HIRSHHORN et MOLLA, 1969). SACK et al. (1980) trouvent peu de carbohydrates non digérés dans les selles.

II- DIARRHÉE DUE AU ROTAVIRUS =====

Actuellement, le Rotavirus est reconnu pour être l'une des principales causes de diarrhée infantile dans le monde (BISHOP et al., 1973 ; FLEWETT et al., 1973 ; KAPIKIAN et al., 1976). L'épisode typique survient chez l'enfant âgé de 3ans, plus communément durant la saison hivernale et débute par des vomissements, de la diarrhée et une légère fièvre (SHEPHERD et al., 1975 ; TALLETT et al., 1977).

La diarrhée provoquée par le Rotavirus entraîne, chez le patient, une déshydratation métabolique due à la présence dans les selles d'une forte concentration en potassium par rapport à la faible teneur en sodium et bicarbonate (TALLETT et al., 1977 ; SACK et al., 1978 ; NALIN et al., 1979 ; MOLLA et al., 1981). De plus, les selles contiennent un taux élevé de carbohydrates non digérés (SACK et al., 1978) et leur coloration au noir Soudan est généralement positive (SACK, non publié).

La diarrhée induite par le Rotavirus n'est due ni à la sécrétion de toxine ni à une modification de la flore intestinale. Il envahit les cellules absorptives matures de l'intestin grêle qui, lésées, desquament dans la lumière intestinale, provoquant ainsi des lésions de la muqueuse caractérisées par un raccourcissement partiel, voire total, des villosités et une hypertrophie des cryptes. La diarrhée ne survient que lorsque les cellules desquamées sont remplacées par des cellules immatures ayant migré à partir des cryptes à une vitesse accélérée (KELLY et al., 1972 ; HAMILTON, 1975 ; DESJEUX, 1976 ; SCHREIBER et al., 1977 ; MOON, 1978 ; DESJEUX et al., 1979 ; SHEPHERD et al., 1979 ; SNODGRASS et al., 1979). Les entérocytes immatures sont incapables de remplir leur fonction d'absorption et de digestion. Ils présentent une diminution de leur activité d'absorption du sodium et de l'eau, couplée à celle du glucose (DAVIDSON et al., 1977).

III- DIARRHÉE DUE A ESCHERICHIA COLI

=====

Les premiers rapports sur les diarrhées épidémiques de l'enfant et qui mettent en cause certaines souches d'E. coli reconnues comme entéropathogènes (EPEC) (TAYLOR, 1959), datent des années 1940 (BRAY, 1945 ; GILES et SANGSTER, 1948 ; TAYLOR et al., 1949 ; KIRBY et al., 1950). Jusqu'à cette époque, E. coli était considérée comme pathogène seulement à l'extérieur du tractus digestif.

Après des études épidémiologiques, des auteurs ont fait ingérer à des volontaires adultes en bonne santé (KIRBY et al., 1950 ; FERGUSON et JUNE, 1952 ; JUNE et al., 1953) et à un enfant (NETER et SHUMWAY, 1950) des doses importantes d'E. coli O111 B4 et O55 B5, impliquées dans les diarrhées infantiles, pour confirmer l'entéropathogénicité de ces souches tant chez l'enfant que chez l'adulte.

Découvertes en 1967 chez de jeunes animaux atteints de diarrhée aiguë (SMITH et HALLS, 1967 ; KOHLER, 1968), les E. coli productrices d'entérotoxines (ETEC) ont été mises en évidence un an plus tard (en 1968 à Calcutta) chez des patients adultes souffrant d'un syndrome semblable au choléra mais chez lesquels, la présence de V. cholerae n'avait pu être faite (GORBACH et al., 1971 ; SACK et al., 1971).

Cette distinction entre E. coli entéropathogènes et E. coli entérotoxigéniques fut très controversée. En 1956, DE et al. montrent que certaines souches d'E. coli entéropathogènes O111 provoquent une réponse sécrétoire de l'anse iléale de Lapin, identique à celle de la toxine cholérique. Les symptômes des diarrhées induites par les ETEC B2C et B7A, isolées des selles de 2 soldats américains revenant du Vietnam et par les EPEC O111 et O55 B5 sont similaires (DUPONT et al., 1971). En outre, BACK et al. (1980) trouvent que 7 souches d'EPEC sont capables de synthétiser des toxines.

Suite à des observations réalisées par SAKAZAKI et al. (1967), DUPONT et al. (1971), SACK (1975) propose de classer les E. coli "diarrhéagéniques" en : a) souches entérotoxigéniques ; b) souches invasives.

A- SOUCHES ENTEROTOXIGENIQUES

Les E. coli entérotoxigéniques sont capables de produire deux toxines dont l'une est thermostable (ST) et l'autre thermolabile (LT) (SMITH et GYLES, 1970 ; GYLES, 1971 ;

SACK et al., 1971 ; 1975]. Pour être pathogènes, les bactéries doivent, dans un premier temps, adhérer à la muqueuse intestinale.

1°) Comment les bactéries adhèrent-elles aux cellules ?

L'adhérence, dans la plupart des cas, met en jeu des adhésines présentes à la surface des bactéries, dans les appendices de types fibrilles, pili ou flagelles (DUGUID et GILLIES, 1957) qui reconnaissent spécifiquement les glycoconjugués membranaires des tissus de l'hôte (OFEK et al., 1977 ; SHARON et al., 1981). Cette adhérence est inhibée par addition du monosaccharide reconnu (Fig. I ; p. 10) ; il s'agit d'un mannose dans le cas de nombreuses Entérobactéries (ESHDAT et al., 1978).

2°) Action des toxines

Les gènes codant pour les toxines sont portés par un plasmide. Certaines souches d'E. coli produisent les 2 exotoxines et d'autres ne produisent que ST ou LT (MERSON et al., 1976 ; SACK et al., 1977 ; MERSON et al., 1979 ; BACK et al., 1980).

Lorsqu'elles sont excrétées, les toxines se fixent à la membrane de la cellule cible et déclenchent un syndrome "cholera-like" (ou colite) chez leur hôte.

L'entérotoxine ST est une petite molécule (P.M. 9000), non immunogénique, relativement stable à la chaleur dont l'action est immédiate et courte (1 h.). Bien que le mécanisme exact de son action demeure obscur , il semble qu'elle agirait en stimulant la production de GMPcyclique.

La protéine LT a été bien étudiée ; elle est très semblable à la toxine cholérique tant par sa morphologie que son mode d'action. Formée de 2 sous-unités, l'exotoxine LT est immunogénique et les travaux de GYLES et BARNUM (1969) indiquent l'existence d'analogies immunologiques entre les

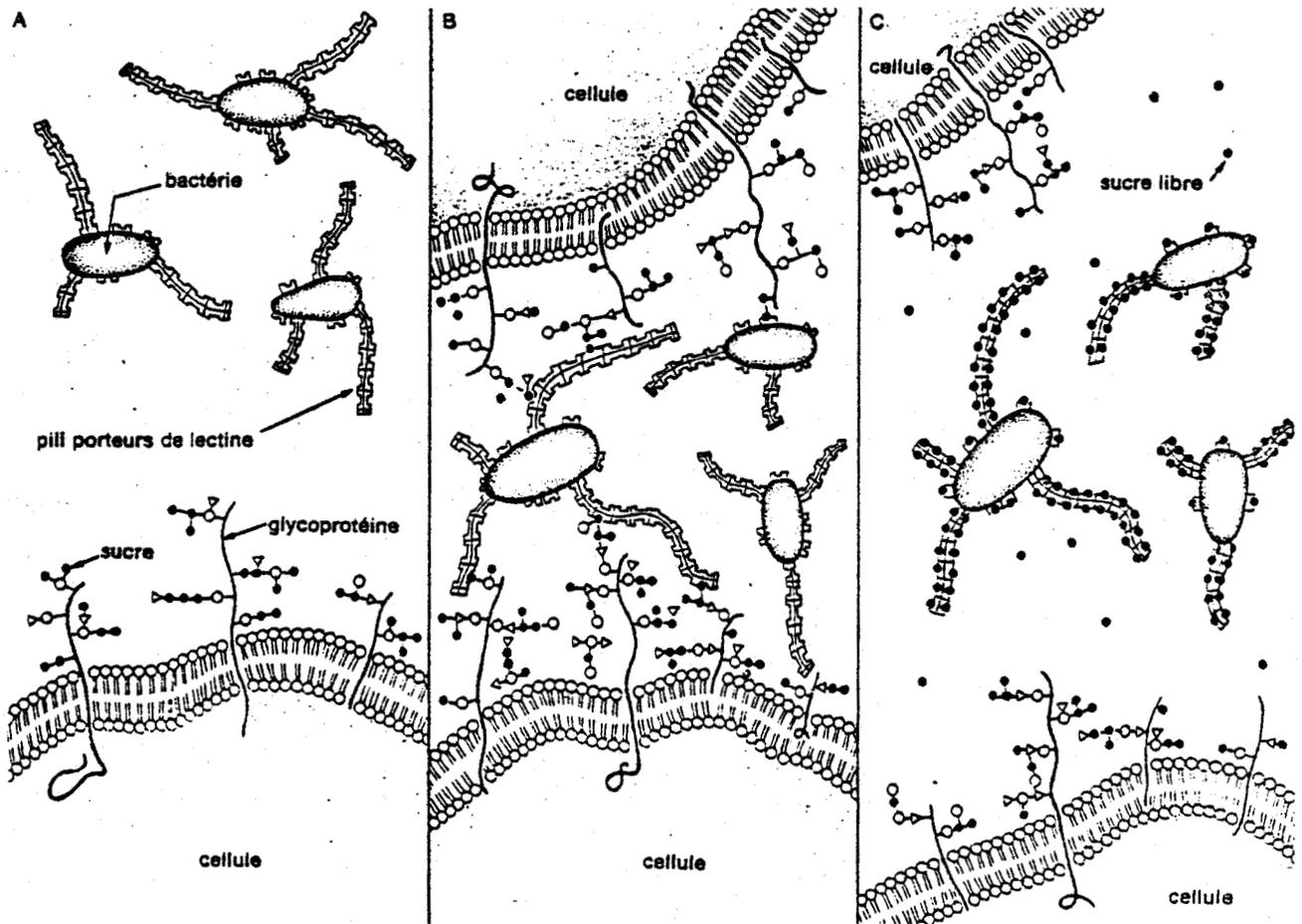


Figure 1 : L'adhérence bactérienne (OFEK et SHARON, 1983)

A : La bactérie, ici E. coli, porte en surface des pili porteurs de lectines, agents de la fixation du micro-organisme aux récepteurs de la cellule hôte. Ces récepteurs sont des unités glucidiques (de type oligomannosidique) liées aux glycoprotéines membranaires.

B : La reconnaissance par les lectines bactériennes des unités de mannose provoque l'adhérence et l'infection.

C : La présence de mannose libre dans le milieu entraîne la saturation des sites de reconnaissance de la lectine bactérienne et empêche le phénomène d'adhérence.

GIS
LILLE

entérotoxines d'E. coli infestant les animaux et la toxine cholérique. Maintenant, il a été clairement démontré que l'antitoxine dirigée contre la toxine de V. cholerae neutralise non seulement l'antigène homologue, mais aussi la LT d'E. coli [EVANS et al., 1973 ; HOLMGREN, 1973 ; HOLMGREN et al., 1973 ; SMITH et SACK, 1973 ; GUERRANT et al., 1974 ; KWAN et WISHNOW, 1974 ; ZENSER et METZGER, 1974]. De même, l'antitoxine dirigée contre la LT produite par une souche d'E. coli, peut neutraliser non seulement l'antigène homologue mais aussi toutes les LT synthétisées par des souches différentes [ETKIN et GORBACH, 1971 ; EVANS et al., 1973 ; HOLMGREN et al., 1973 ; GYLES, 1974] et l'entérotoxine cholérique à un degré moindre [SACK et al., 1971 ; EVANS et al., 1973 ; HOLMGREN et al., 1973 ; ZENSER et METZGER, 1974].

La fixation de la toxine LT à la cellule cible est très rapide : une minute suffit [DONTA et SMITH, 1974 ; GUERRANT et al., 1974 ; KANTOR et al., 1974]. Une fois fixée à la membrane cellulaire, la LT stimule l'activité de l'adényl-cyclase [EVANS et al., 1972 ; HEWLETT et al., 1974 ; KANTOR et al., 1974 a, b] ; elle stimule l'accumulation d'AMPcyclique dans les cellules ovariennes [GUERRANT et al., 1974], les cellules des glandes surrénales [KWAN et WISHNOW, 1974] et les cellules épithéliales de l'intestin [FIELD, 1979 ; MOSS et VAUGHAN, 1980].

La production accrue d'AMPcyclique au niveau de l'entérocyte provoque des troubles dans les mécanismes sécrétoires [Fig. 2 ; p. 12], troubles qui sont identiques à ceux provoqués par la toxine cholérique.

B- SOUCHES INVASIVES

SAKAZAKI et al. (1967) ont observé, sur le plan clinique, un syndrome "salmonella-like" ou entérite, provoqué par certaines souches d'E. coli. Ce syndrome est caractérisé par des frissons, de la fièvre [jusqu'à 40°C], des maux de tête, des crampes abdominales et une sévère diarrhée, les selles

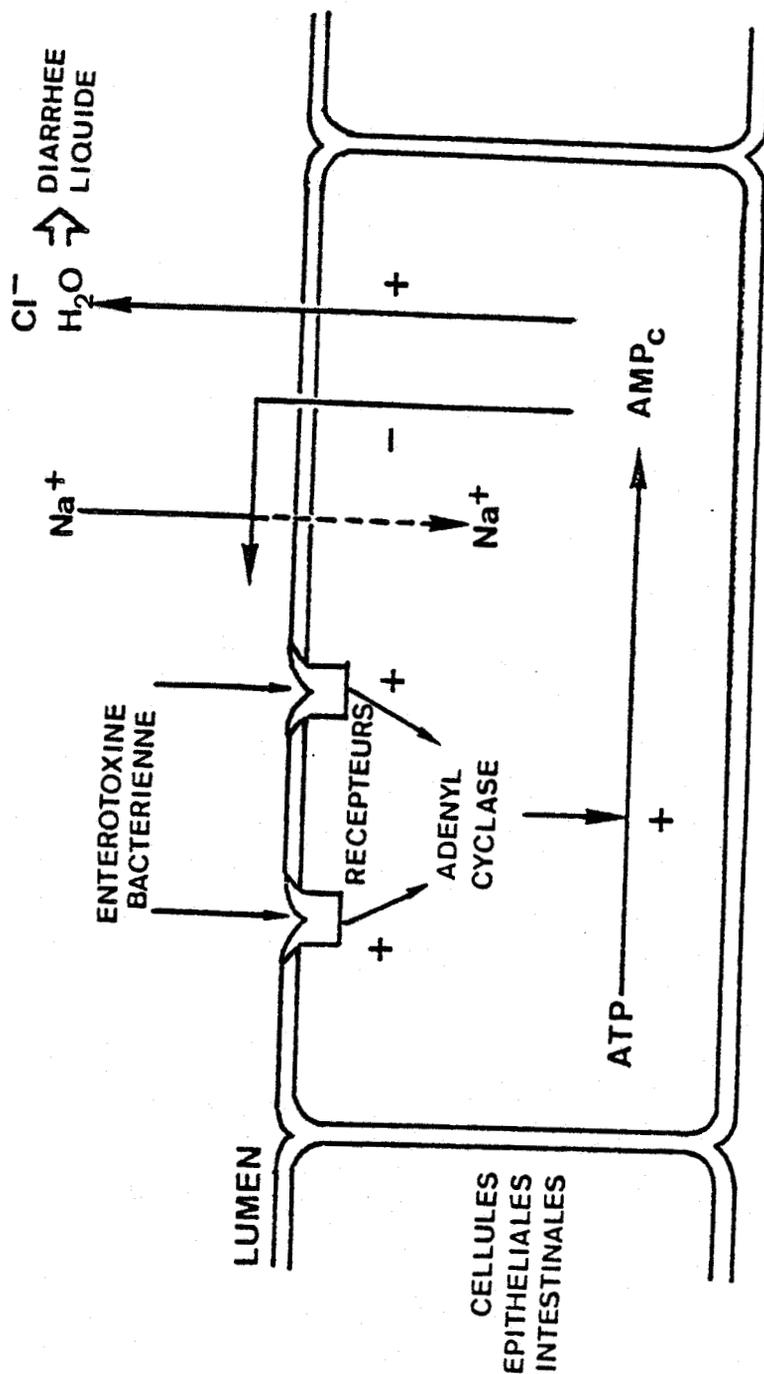


Figure 2 : Mécanisme de la diarrhée due à la présence d'entérotoxines bactériennes (KRONBORG et HOWARD, 1980)

pouvant contenir du pus et du sang [SAKAZAKI et al., 1967 ; DUPONT et al., 1971]. L'examen d'une biopsie d'un iléon infesté montre que la muqueuse est atteinte ; la muqueuse intestinale est le siège d'une infiltration inflammatoire aiguë, il y a une réduction des villosités et un allongement des cryptes. Le nombre des cellules absorbatives est très diminué.

La pénétration de l'épithélium par un germe invasif n'est pas suffisante pour causer une maladie déclarée. L'organisme pathogène doit être capable de se multiplier dans les tissus de l'hôte [FORMAL et al., 1965].

De nombreuses études sont réalisées sur les animaux [CANTEY et BLAKE, 1977 ; FRISK et WAGNER, 1977 ; FRISK et al., 1978 ; 1981] mais les mécanismes d'adhérence et de pénétration de la bactérie pathogène dans la muqueuse intestinale ne sont pas encore connus. Les désordres physiologiques engendrés par ces souches d'E. coli de type invasif sont bien connus et ressemblent à ceux provoqués par le Rotavirus.

IV- CONCLUSION

=====

Nous pouvons classer les diarrhées infectieuses en 2 grands groupes :

- les diarrhées à exotoxines qui provoquent un déséquilibre du cycle entérosystémique de l'eau (ex : V. cholerae, E. coli entérotoxigéniques).

- les diarrhées à germes invasifs, viraux ou bactériens, qui détruisent la muqueuse intestinale et perturbent la fonction digestive (ex : Rotavirus, E. coli, Shigella, Salmonella...).

Pour éviter que l'intestin du nourrisson ne soit le siège d'un conflit bactérien, le lait maternel contient des éléments dont les propriétés physiques, chimiques ou immunologiques permettent d'assurer la protection de la muqueuse intestinale.

FACTEURS DE DEFENSE DE L'INTESTIN
DU NOURRISSON

A la naissance, le tractus digestif de l'enfant est immature. La barrière intestinale est très perméable car des anticorps dirigés contre certaines protéines bovines, notamment la β -lactoglobuline qui est la plus allergénique (LEBENTHAL, 1978), sont retrouvés chez les nourrissons alimentés au lait de vache.

Le système immunitaire intestinal poursuit son développement dès les premiers jours de la vie. Cependant, il faut attendre la fin du premier mois pour voir apparaître les IgA dans la salive. De plus, il manque au système immunitaire du nourrisson l'expérience des divers agents pathogènes, expérience qui surviendra au cours des premières années, au fur et à mesure que l'enfant sera en contact avec de nouveaux agents infectieux.

Le lait maternel apporte, à la naissance, les facteurs de défense qui manquent au nourrisson pour lutter efficacement contre les germes pathogènes auxquels il est confronté. Le colostrum et le lait maternel renferment des facteurs solubles: sIgA, IgM, IgG et en plus petites quantités IgD et IgE, les composants majeurs du complément (C_3 , C_4), lactotransferrine, lactoperoxydase, lysozyme, facteurs bifides, facteurs de résistance contre Saphylococcus, monoglycérides possédant une activité antivirale, inhibiteurs protéasiques et α -antitrypsiques. Un grand nombre de cellules sont aussi présentes dans le lait : monocytes, macrophages, lymphocytes T et B, leucocytes polymorphonucléaires et cellules épithéliales (McCLELLAND et al., 1978 ; PITT, 1979).

Dans ce chapitre, nous aborderons les trois principaux groupes de substances qui constituent le lait (glucides, protides, lipides) et nous décrirons brièvement les différents facteurs solubles de défense qui s'y trouvent.

I- LES LIPIDES

=====

Les laits maternel et de Vache sont riches en lipides et ne présentent, quantitativement, que peu de différences puisqu'ils renferment respectivement 4% et 3,8% de lipides totaux. Toutefois, les différences qualitatives sont extrêmement importantes.

La fraction lipidique du lait de Femme est constituée de triglycérides, acides gras, phospholipides, stéroïls et gangliosides, en proportions variables.

Outre leurs rôles nutritionnels et métaboliques importants, certains lipides du lait humain ont une activité anti-virale et anti-bactérienne.

GYORGY et al. (1962) observent que le lait humain a un effet thérapeutique sur les infections à Staphylocoques chez de jeunes Souris. Ils démontrent la présence dans le lait d'un facteur thermostable antistaphylococcique. Ce facteur semble être un acide gras en C_{18:2}, différent de l'acide linoléique. En outre, la couche lipidique ou "crème" de lait humain a une activité anti-virale contre plusieurs souches : Alphavirus, Flavivirus et virus de l'Herpès [SABIN et FIELDSTEEL, 1962]. Des études récentes ont montré que les lipides du lait réduisaient l'infection in vivo [FIELDSTEEL, 1974] et in vitro [FALKER et al., 1975 ; WELSH et al., 1978] des Alphavirus et des Flavivirus entourés d'une couche lipidique. D'autres virus ont également été inactivés après traitement avec de la "crème" de lait humain [FIELDSTEEL, 1974 ; SARKAR et al., 1973]. Une étude des composants lipidiques de la "crème" montre qu'il s'agit surtout d'acides gras insaturés et de monoglycérides responsables de cet effet non spécifique [WELSH et al., 1978].

En 1980, OTNAESS et HALVORSEN mettent en évidence dans le lait humain, une fraction de masse moléculaire élevée qui inhibe l'entérotoxine thermolabile d'E. coli. Ce composé

inhibiteur n'est pas associé aux immunoglobulines, il est extractible par le chloroforme et le méthanol, indiquant sa nature lipidique [OTNAESS et ØRSTAVIK, 1981]. Des expériences réalisées in vivo sur l'anse iléale de Lapin, montrent que ce composant lipidique inhibe la sécrétion induite par la toxine cholérique et par la toxine thermolabile [LT] d'E. coli [OTNAESS et SVENNERHOLM, 1982]. Des études chromatographiques indiquent que l'inhibiteur des entérotoxines est de nature gangliosidique et ressemble au GM1, connu pour être le récepteur membranaire de la toxine cholérique [CUATRECASAS, 1973 ; HOLMGREN et al., 1973 b] et de la LT d'E. coli [ZENSER et METZGER, 1974].

II- LES GLUCIDES

=====

A- LE LACTOSE

Le lactose [O- β -D-galactopyrannosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranose] est, quantitativement, le constituant dominant dans le lait.

La teneur en lactose du lait maternel varie entre 6 et 7 g/100 ml ; dans le lait de Vache, le taux de lactose est égal à 4,7 g/100 ml [JENNESS, 1974 ; HAMBRAEUS, 1977 ; VORHERR, 1978].

C'est la synthèse du lactose par la glande mammaire qui, associée à un mouvement d'eau et d'électrolytes, détermine le volume de lait produit [LINZELL et PEAKER, 1971]. De ce fait, le taux de lactose présent dans le lait est très stable ; 3 ou 4 jours après la parturition, le taux de lactose augmente [LONNERDAL et al., 1976 a, b ; LAUBER et REINHARDT, 1979] puis reste stable pendant toute la durée de la lactation.

B- LES OLIGOSACCHARIDES

Entre 1928 et 1933, POLONOVSKY et LESPAGNOL [1933]

isolaient du lait de Femme, une fraction oligosaccharidique qu'ils appelaient "gynolactose". Des études reprises par KUHN, MONTREUIL et GRIMMONPREZ, et KOBATA ont montré que le gynolactose est un mélange très complexe de nombreux oligosaccharides.

La composition en oligosaccharides du lait de Femme et du lait de Vache est très différente. Le colostrum et le lait de Vache contiennent respectivement, 0,25 et 0,1 g d'oligosaccharides par 100 ml (MONTREUIL et KOBUS, 1960) alors que le lait maternel referme des oligosaccharides de types variés, 2,4 g/100 ml dans le colostrum et environ 1,2 -1,3 g/100 ml dans le lait mature (MONTREUIL et MULLET, 1960).

Les oligosaccharides sont classés en 2 familles : oligosaccharides neutres, qui renferment en quantités variables du D-glucose, du D-galactose, du L-fucose et de la N-acétylglucosamine, et oligosaccharides acides qui contiennent en plus de l'acide sialique. Ils sont rassemblés dans la revue générale de KOBATA [1977].

1°) Oligosaccharides neutres

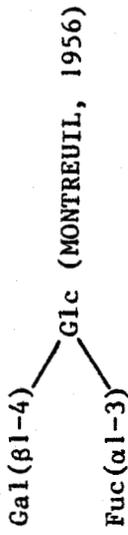
La structure des oligosaccharides neutres a été déterminée grâce aux recherches de GRIMMONPREZ et MONTREUIL (1968 a), GRIMMONPREZ [1971 ; 1972] et KOBATA et al. [1978]. Ils peuvent être classés en oligosaccharides neutres non azotés et oligosaccharides neutres azotés suivant qu'ils renferment ou non de la N-acétylglucosamine [Fig. 3 ; p. 18].

Il convient de noter que tous ces sucres possèdent dans leur molécule un résidu de lactose en position terminale réductrice. De plus, le reste de leur molécule est formé soit d'une unité de la N-acétyllactosamine, soit de la N-acétyl-isolactosamine, soit de la répétition de ces deux oligosaccharides.

A cause de la présence d'un résidu de lactose dans chaque oside, MONTREUIL et MULLET [1959 ; 1960] formulèrent l'hypothèse d'une relation métabolique entre ces 2 groupes

Oligosaccharide neutre non azoté

Lacto- fuco-tétraose



Oligosaccharides neutres azotés

Lacto-N-tétraose



Lacto-N-néo-tétraose



Oligosaccharide acide

Disialyl-lacto-N-tétraose

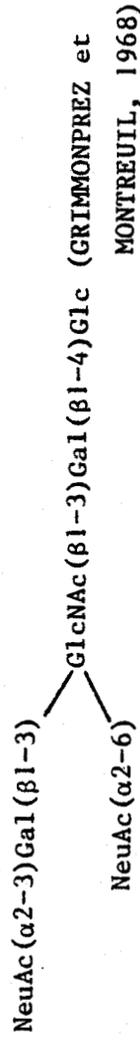


Figure 3 : Structures caractéristiques de quelques oligosaccharides libres du lait humain.



de substances. Les auteurs démontrèrent que les taux de lactose et de "gynolactose" varient en sens inverse et atteignent une valeur limite vers le 5ème jour. En outre, la quantité de fucosido-lactose et de lacto-difucotérase, très élevée dans les laits colostraux, décroît rapidement tandis que les taux de lactose et de polyosides supérieurs augmentent dans le lait mature.

2°) Oligosaccharides acides

La présence d'acide sialique dans le lait de Femme a été démontré par HOOVER, BRAUN et GYORGY [1953] et par ZILLIKEN, BRAUN et GYORGY [1956] qui l'appelèrent acide gynaminique. KUHN et BROSSMER [1956] l'identifièrent ultérieurement à l'acide N-acétylneuraminique.

Ces résultats devaient conduire à l'isolement de nombreux sialosides du lait de Femme. KUHN [1958 ; 1959] isola du lait de Femme deux formes combinées de l'acide N-acétylneuraminique et du lactose : le 3' et le 6'-lactaminyllactose, puis trois pentoses acides, les pentoses a, b, c dont la structure fut élucidée [KUHN et GAUHE, 1965]. Les études poursuivies au laboratoire par GRIMMONPREZ [1966], GRIMMONPREZ et MONTREUIL [1968 a, b] ont permis l'isolement de 6 nouveaux oligosaccharides dont les unités structurales sont constituées de lacto-N-tétraose ou de lacto-N-neotétraose (Fig. 3 ; p. 18). Plus récemment, STRECKER a isolé 5 nouveaux oligosaccharides acides [sous presse].

La présence de ces oligosaccharides variés et abondants dans le lait de Femme, a conduit certains auteurs à en rechercher l'origine et la signification physiologique. L'origine de ces composés reste encore énigmatique bien que l'hypothèse ait été émise selon laquelle, il existerait une activation, par le lactose, des systèmes glycosyltransférases de la glande mammaire [GRIMMONPREZ et MONTREUIL, 1975].

Le rôle biologique des oligosaccharides a fait l'objet de nombreuses études et il semble maintenant acquis qu'ils

ont un rôle dans la croissance de la flore bifide, la flore étant composée de germes saprophytes qui colonisent l'intestin du nourrisson alimenté au lait maternel.

C- LES FACTEURS BIFIDIGENES

Dès 1926, SCHOENFELD montra que les facteurs responsables de la croissance de la flore bifide ne sont de nature ni minérale, ni lipidique, ni protidique, mais se trouvent à côté du lactose, dans la fraction non protéique du lactosérum.

GYORGY et al. (1954 a, b) ont isolé une souche mutante de Bifidobacterium bifidum la variété Pennsylvaniens ayant la propriété de ne proliférer qu'en présence de lait maternel (GYORGY et ROSE, 1955). Malheureusement, la souche B. bifidus var. Penn. n'est pas celle qui prolifère dans l'intestin des enfants alimentés au lait de Femme. Grâce aux travaux de NEUT et al. (1981), il a pu être démontré que les facteurs de croissance de B. bifidus var. Penn. étaient identiques à ceux de B. bifidum, hôte prédominant de l'intestin du nourrisson au sein.

Le facteur de croissance de B. bifidus var. Penn. se rencontre dans les oligosaccharides azotés du lait humain. Les oligosaccharides non azotés n'ont aucune activité bifidigène (GAUHE et al., 1954), de même que les composés azotés sialylés. L'élimination des résidus d'acide sialique par la neuraminidase de Vibrio comma régénère cette activité (GYORGY et al., 1974). KUHN et KIRSCHENLOHR (1956) parviennent à synthétiser un composé très actif ; il s'agit de la N-acétyllactosamine [Gal(β 1 \rightarrow 4)GlcNac]. Ceci explique que le lacto-N-neotétraose possède une activité supérieure à celle du lacto-N-tétraose.

Les récents travaux de ROMOND et al. et de BEERENS et al., en 1980, ont confirmé que seul le lait maternel frais permettait la croissance de B. bifidum, que le "gynolactose" était une source de facteurs bifidigènes et que la N-acétyllactosamine était bien le composé le plus actif (STRECKER, communication personnelle, 1983).

La N-acétyllactosamine n'existant pas à l'état libre dans le lait, il restait à démontrer que la bactérie était capable d'hydrolyser les oligosaccharides azotés neutres du lait maternel. MONTREUIL et al. (1983) montrent que le B. bifidum possède tout l'équipement enzymatique nécessaire pour obtenir le disaccharide qui lui est un nutriment indispensable. Les autres bifides n'ont aucun besoin de ce glucide et ne possèdent aucune des glycosidases de B. bifidum. Les glycosidases de B. bifidum sont des neuraminidases, β -galactosidases, α -fucosidases et N-acétyl-glucosaminidases.

Outre les oligosaccharides, il existe dans le lait maternel des glycopeptides et des glycoprotéines qui possèdent une activité bifidigène ; cette activité est liée à la structure de leur copule glucidique. HIRANO et al. (1969) montrent que 4 fractions glycopeptidiques sur 5 isolées du colostrum humain (masse moléculaire comprise entre 1900 et 18000) présentent une activité bifidigène. En 1973, NICHOLS et BEZKOROVAINY isolent des glycoprotéines du colostrum humain (MM 30000) possédant 22% d'hexosamines. D'autres protéines sont isolées par la suite (NICHOLS et al., 1975 ; BEZKOROVAINY et NICHOLS, 1976). Elles contiennent toutes de la N-acétyl-O-glucosamine et sont toutes actives. La caséine humaine n'est active qu'après digestion enzymatique (BEZKOROVAINY et al., 1979). L'activité est retrouvée dans la fraction glucidique détachée par β -élimination (BEZKOROVAINY et TOPAUZIAN, 1981 a, b), elle est proportionnelle à leur teneur en hexosamine. Pour ces auteurs, la caséine bovine ne présente pas d'activité. Ces résultats sont en accord avec ceux de FOURNET et al. (1979) qui montrent que la copule glucidique de la caséine de vache ne contient pas de N-acétyl-glucosamine.

L'activité bifidigène du lactose est très controversée (MALYOTH, 1949 ; MANCIAUX, 1958 ; PETULEY et LYNAU, 1956 ; MONTREUIL, 1971). Au regard des études récentes, il semble que le lactose ne soit pas un facteur indispensable à la croissance de B. bifidum.

Les glucides du lait de Femme n'interviennent pas directement dans les mécanismes de défense de l'intestin du

nourrisson. Ils agissent en favorisant la croissance d'une flore bifide dont le rôle de protection de l'intestin sera discuté dans le paragraphe suivant.

D- ACTION DE LA FLORE BIFIDE

Stérile à la naissance, le tube digestif du nouveau-né est colonisé en 3 ou 4 jours [TISSIER, 1900 ; MORO, 1900 ; GYLLENBERG et ROINE, 1957 ; SMITH et CRABB, 1961] par une flore microbienne dont la composition varie avec le mode d'alimentation.

1°) Caractéristiques de la flore fécale du nourrisson

La flore fécale du nourrisson alimenté au sein est monomorphe, essentiellement constituée de microorganismes Gram (+) [BULLEN et WILLIS, 1971]. Il s'agit de Bifidobacterium (10^{10} germes/g de selles) et, plus particulièrement de Bifidobacterium bifidum [MITSUOKA et al., 1974 ; BULLEN et al., 1976 ; NEUT et al., 1980].

Dès que l'alimentation du nouveau-né devient mixte ou artificielle, le B.bifidum perd sa prédominance dans les selles au profit des Entérobacteriaceae [ROMOND et al., 1980]. Selon LEVESQUE (1959), le B.bifidum disparaît lorsque le lait maternel ne représente plus que 1/3 à 1/4 de la ration alimentaire de l'enfant. La flore fécale de l'enfant nourri artificiellement est analogue à celle de l'adulte. Les Bifidobacterium sont encore présents mais ils ne représentent plus que 1% de la flore fécale [Tableaux II et III ; pp. 23-24].

2°) Rôle de la flore fécale

D'après les constatations faites par TISSIER en 1900 chez les nourrissons au sein, la flore bifide s'oppose au développement des autres germes. En effet, la colonisation de l'intestin par des bactéries acidophiles, analogues à la flore bifide, inhibent l'action des bactéries putréfiantes responsables d'infections intestinales [TISSIER, 1905].

TABLEAU II

CARACTERISTIQUES DES SELLES ET DE LA FLORE
INTESTINALE DU NOURRISSON ALIMENTE AU SEIN

Aspect des selles	pH des selles	Caractéristiques de la flore bifide	Caractéristiques des autres flores
granuleux, odeur aigrette (5).	de 4,8 à 5,2 (5).	90 p. 100 de la flore fécale est constituée de Bifidobactérium (2,3) 10^{10} Bifidobactérium par g de selle (6).	moins de 1p. 100 de la flore fécale est constituée de Coliformes, les Staphylocoques sont peu nombreux (2) 10^8 Entérobactéries/g de selle (6) le nombre de Bactéroides est inférieur à 10^8 /g de selle le nombre de Clostridium est inférieur à 10^3 /g de selle (1) présence de peu de germes de putréfaction (4,2).

- Références :
- (1) BULLEN et TEARLE, 1976
 - (2) HAENEL, 1970
 - (3) LEVESQUE, 1959
 - (4) MITSUOKA et HAYAKAWA, 1972
 - (5) NEIMANN et al., 1965
 - (6) ROMOND et al., 1980



TABLEAU III

CARACTERISTIQUES DES SELLES ET DE LA FLORE
INTESTINALE DU NOURRISSON ALIMENTE AU LAIT DE VACHE

Aspect des selles	pH des selles	Caractéristiques de la flore bifide	Caractéristiques des autres flores
caractéristiques proches de celles de l'adulte, la consistance est ferme, l'odeur est putride [3].	de 6 à 7 [1,3].	Le nombre de Bifidobacterium devient mineur [4].	10^6 à 10^8 Entérobactéries/g de selle [4] 10^7 à 10^9 Entérocoques/g de selle 10^7 à 10^8 bactéries Gram(-)/g de selle [3] Bactéριοïdes et Clostridium apparaissent, favorisant l'alcalinisation du milieu [5] 10^2 à 10^{10} Bactéριοïdes/g de selle 10^4 à 10^9 Veillonella/g de selle 10^4 à 10^8 Clostridium/g de selle [2].

Références :

- [1] GYORGY, 1957
- [2] MITSUOKA et HAYAKAWA, 1972
- [3] NEUT et al., 1980
- [4] ROMOND et al., 1980
- [5] TASSOVAT et KOTSITCH, 1961



TASSOVATZ et KRAGOUYEVITCH (1964) réalisent le traitement de l'entéro-colite aiguë par ingestion de culture lyophilisée de B.bifidum. La flore bifide aurait un rôle préventif des infections bactériennes (TASSOVATZ et KOTSICH, 1961 ; MATA et al., 1969) et virales (MATA et al., 1969).

Il existe des controverses autour de la question des bifides (PETULEY et LYNAU, 1956 ; LEVESQUE, 1959 ; WAGNER et STARR, 1969). En effet, la flore bifide serait instable lors de diverses affections gastro-intestinales. Le bifide n'aurait pas forcément un rôle protecteur de l'intestin en inhibant la prolifération des germes pathogènes, mais pourrait être simplement le témoin de la bonne santé de l'enfant.

3°) Mécanisme d'action du bifide

Le B.bifidum métabolise une grande variété de sucres en produisant d'importantes quantités d'acides organiques : acide lactique, acétique, formique, succinique et propionique (DITTMAN et al., 1967 ; SMITH et HOLDEMAN, 1968 ; MOORE et al., 1970 ; BULLEN et TEARLE, 1976) qui abaissent le pH des selles (NORTON et SHOHL, 1926) à 4. L'environnement acide inhibe in vitro la croissance des Shigelles (HENTGES, 1967 a), des Salmonelles (MEYNELL, 1963 ; BOHNOFF et al., 1964), des E.coli (KUHN, 1957), des Bacilles typhiques et paratyphiques et des levures (HENTGES, 1967 b).

III- LES PROTEINES

=====

De tous les constituants des laits, les protéines ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux, en raison même de leur importance capitale dans le développement du nourrisson. La littérature abonde en études sur les protéines du lait (MONTREUIL, 1959 ; GARNIER, 1964 ; MCKENZIE, 1970 ; 1971 ; LYSTER, 1972 ; ALAIS et BLANC, 1975 ; WOODWARD, 1976 ; BEZKOROVAINY, 1977 ; RIBADEAU-DUMAS, 1978).

TABLEAU IV

DISTRIBUTION DES PROTEINES DANS
LE LAIT MATERNEL ET DE VACHE

COMPOSANTS	Lait maternel	Lait de vache
Protéines totales (g/100 ml)	0,89	3,14
Caséine	0,25	2,73
Protéines du lactosérum	0,64	0,58
Lactalbumine	0,26	0,11
Lactotransferrine	0,17	traces
Lactoglobuline	-	0,36
Lysozyme	0,05	traces
Sérum-albumine	0,05	0,04
IgA	0,1	0,003
IgG	0,003	0,06
IgM	0,002	0,003

d'après HAMBRAEUS (1977).



La teneur en protéines du lait maternel a été estimée pendant longtemps à 1,1 -1,2 g/100 ml [FOMON, 1974 ; BEZKOROVAINY, 1977]. De récentes investigations ont montré que la teneur réelle en protéines varia de 0,8 à 0,9 g/100 ml [LONNERDAL et al., 1976 a, b ; NAGASAWA et al., 1973].

La teneur en protéines du lait maternel est très basse par rapport à celle du lait de Vache [JENNESS et SLOAN, 1970]. L'examen du Tableau IV ; p. 26 montre que les deux lactosérums possèdent presque la même concentration en protéines lactosériques ; la différence porte donc essentiellement sur la teneur en caséine qui est 10 fois plus élevée dans le lait de Vache.

Les protéines lactosériques sont très nombreuses et nous choisissons de ne décrire que celles qui sont impliquées dans la défense de l'intestin du nourrisson. Parmi ces protéines, nous pouvons citer : la lactotransferrine, le lysozyme, les immunoglobulines (sIgA), la lactoperoxydase et le complément. Les trois premières étant celles qui retiendront plus particulièrement notre attention.

A- LE SYSTEME LACTOPEROXYDASIQUE

Le système lactoperoxydasique dont l'activité bactéricide a été décrite pour la première fois par HESSE en 1894, est constitué de 3 composés : la lactoperoxydase [WRIGHT et TRAMER, 1957], l'eau oxygénée [JAGO et MORRISSON, 1962] et le thiocyanate [REITER et al., 1963 ; 1964].

De nombreuses revues générales traitent de ce sujet [REITER et DRAM, 1967 ; REITER, 1976 ; 1978 ; 1979 ; 1981].

1°) Caractères généraux

La lactoperoxydase dont le taux est élevé dans le lait de Vache, environ 30 mg/ml [POLIS et SHMULKER, 1953] est à un taux vingt fois moindre dans le lait de Femme. La lactoperoxydase est formée d'une seule chaîne polypeptidique de masse moléculaire comprise entre 77000 et 100000.

Le thiocyanate est un métabolite endogène produit lors de la réaction de détoxification entre le thiosulfate et les cyanates. Il peut provenir de l'ingestion de l'anion même ou d'un précurseur.

Le peroxyde d'oxygène est absent du lait. KORHONEN (1981) a montré qu'il provient des leucocytes qui, en phagocytant la caséine en produisent de grandes quantités (RUSSEL et REITER, 1975 ; RUSSEL et al., 1977). In vitro, les bactéries lactiques sont source d' H_2O_2 (REITER et al., 1980).

2°) Localisation

La lactoperoxydase est présente dans le lait (MORRISSON et al., 1957 ; 1961) mais aussi dans la salive, les larmes, le mucus gastro-intestinal, cervical et dans certaines cellules leucocytaires : les éosinophies. Elle est retrouvée dans les selles et semble donc résister au bas pH et à la digestion (GOTHEFORS et MARKLUND, 1975 ; REITER et al., 1980).

L'ion thiocyanate SCN^- est présent de façon permanente dans tous les tissus animaux et les sécrétions (AUNE et THOMAS, 1977 ; BALLANTYNE, 1977 ; RUDEL et al., 1977).

3°) Mode d'action

L'interaction de ces 3 composés a été décrite par THOMAS (1983). La lactoperoxydase, en présence d' H_2O_2 , oxyde le thiocyanate. Le premier produit formé est l'acide hypothiocyaneux ($OSCN^-$) dont l'action est bactériostatique vis-à-vis des bactéries. Les métabolites très fortement oxydés comme l'acide cyanosulfureux (O_2SCN^-) et l'acide cyanosulfurique (O_3SCN^-) sont bactéricides (HOGG et JAGO, 1970 ; HOOGENDORN et al., 1977 ; BJORCK et al., 1979 ; AUNE et THOMAS, 1977 ; PRUITT et TENOVUO, 1982).

B- LE COMPLEMENT

Tous les composants du complément ont été détectés dans le lait (NAKAJIMA et al., 1977).

Les composants C_3 et C_4 du complément existent dans le lait humain [ANDRE et al., 1964] mais en moins grande concentration que dans le sérum. Un C_3 proactivateur a été décrit [GOTZE et MULLER-EBERHARD, 1971], il est stimulé par les IgA et par les IgE [ISHIZAKA et al., 1972]. Le C_3 dans le lait humain pourrait avoir une activité importante, il est connu pour ses propriétés opsonisante, anaphylactique et chimio-tactique mais son activité, dans la défense de l'intestin du nourrisson, n'a jamais été mise en évidence.

C- LES IMMUNOGLOBULINES

Toutes les classes d'immunoglobulines sont représentées dans le lait humain, mais dans des proportions différentes de celles du sérum. Les IgG prédominent dans les sérums humain et bovin ainsi que dans le lait de Vache. Dans le colostrum et le lait humains, les immunoglobulines A occupent une place prépondérante [MONTREUIL et al., 1960 a ; MURALT et al., 1961]. Les IgE, mises en évidence dans le lait de Femme par UNDERDOWN et al. [1976], seraient présentes à un taux plus élevé que dans le sérum [BASUYAU, 1980]. HANSON et JOHANSSON [1970] indiquent la présence d'IgD dans le colostrum humain.

OGRA et al. [1980] estiment que la répartition des Ig par 24 heures, dans le colostrum collecté durant les 3 jours qui suivent la parturition est de l'ordre de 5000 mg pour les IgA, 70 mg pour les IgM et 56 mg pour les IgG. Les immunoglobulines, présentes en grandes quantités dans le colostrum, voient leur taux diminuer rapidement, dès les premiers jours de lactation [PEITERSEN et al., 1975 ; DONTA, 1976 ; McCLELLAND et al., 1978]. Dans le colostrum humain, les concentrations en IgA de sécrétion et en IgM sont respectivement de 17 g/l et 1,6 g/l le premier jour et atteignent respectivement 1 g/l et 0,1 g/l dès le quatrième jour.

La teneur en IgG du lait humain passe de 1 g/l après 48 h., à 0,3 g/l après 10 jours et à 0,1 g/l après 17 jours.

Tout au long de la période de lactation, les IgA sont les plus abondantes et plus précisément les IgA sous leur forme sécrétoire (TOMASI et al., 1968).

1°) Caractères généraux

Des différences structurales ont été mises en évidence entre les IgA sériques et les IgA du lait appelées IgA sécrétoires ou sIgA (SOUTH et al., 1966 ; TOMASI et al., 1968). La masse moléculaire et la constante de sédimentation de ces dernières sont plus élevées. Outre une pièce de sécrétion (Sc) caractérisée pour la première fois par HAVAZ et al. (1966), elles possèdent une pièce de jonction (J) (HALPERN et KOSHLAND, 1970). La formule structurale des IgA du lait qui a été proposée est la suivante : $(IgA)_2$ Sc-J.

Les sIgA humaines sont des glycoprotéines de masse moléculaire comprise entre 375 000 et 394 000 (TOMASI et CALVANICO, 1968 ; NEWCOMB et al., 1968 ; HURLIMAN et al., 1969) et de coefficient de sédimentation égale à 11,4S (TOMASI et BIENENSTOCK, 1968). Les IgA de sécrétion sont plus résistantes aux enzymes protéolytiques et aux agents de réduction que les IgA sériques.

2°) Localisation

Les IgA ont été caractérisées dans divers liquides biologiques : sérum, colostrum, salive, urine, fluide nasal, bronchial et duodéal, provenant de l'Homme ou de différents mammifères.

D- LE LYSOZYME

Découvert pour la première fois par LASHCHENKO en 1909 dans le blanc d'oeuf de Poule, le lysozyme fut redécouvert en 1922 par FLEMING dans le mucus nasal. C'est une mucopéptide N-acétylmuramyl hydrolase (E.C. 3.2.17).

1°) Caractères généraux

Le lysozyme humain est une protéine basique de masse moléculaire 14 400, constituée de 130 résidus d'acides aminés [JOLLES et JOLLES, 1968 ; 1969 ; 1971 ; 1972]. Il est thermostable à 100°C [1 à 2 min.] et à pH acide, et est environ 3 fois plus actif que le lysozyme de blanc d'oeuf de Poule. La thermostabilité du lysozyme est due à la présence de 3 résidus de cystine par molécule [JOLLES et al., 1966].

Cristallisé en 1939 par ABRAHAM et ROBINSON, le lysozyme du blanc d'oeuf de Poule a été entièrement séquencé [JOLLES et al., 1963 ; HERMANN et JOLLES, 1970 ; JOLLES et JOLLES, 1971 ; 1972]. Le lysozyme isolé du lait humain présente une structure primaire identique au lysozyme contenu dans les larmes [JOLLES et JOLLES, 1967]. Les lysozymes humains ont tous le même comportement électrophorétique.

2°) Localisation

Le lysozyme est largement réparti dans l'organisme, principalement dans les liquides et milieux de sécrétions que sont : le lait, la salive, les larmes, l'urine, le plasma séminal, les sécrétions vaginales et utérines, le mucus bronchique.... Il est présent dans les tissus [intestinal, alvéolaire, cartilagineux...] et aussi dans les monocytes, les macrophages et les cellules de Paneth [SYREN et RAESTE, 1971 ; KLOCKARS et OSSERMAN, 1974]. En étudiant l'incorporation de ¹⁴C, in vitro, McCLELLAND et FURTH [1975] mettent en évidence la synthèse de lysozyme par les muqueuses bronchiques et gastro-intestinales ainsi que par les organes lymphoïdes.

Le taux de lysozyme augmente considérablement au niveau des tissus et sécrétions lors de l'inflammation [MEYER et al., 1948] et dans le sérum de malades souffrant de leucémie monocytique ou de leucémie monomyélocytique [OSSERMAN et LAWLOR, 1966].

Dans le lait maternel, la teneur en lysozyme augmente

au cours de la lactation et est maintenue la première année et peut-être même la seconde année de lactation [GOLDMAN et al., 1982]. Au 5ème mois, le taux de lysozyme varie entre 300 et 400 mg/l [CHANDAN et al., 1964 ; Mc CLELLAND et al., 1979]. Par contre, le lait de Vache contient peu de lysozyme, environ 50 mg/100 ml [HAMBRAEUS, 1977].

Le lysozyme est retrouvé dans les selles des nourrissons alimentés au sein [ROSENTHAL et LIEBERMAN, 1931 ; BRAUN, 1958 ; GOLBACH et al., 1964 ; LODINOVA et JOUJA, 1977 ; GRIFFITH et HUMPHREYS, 1979 ; ISAACSON, 1982], il n'est donc pas dégradé au cours du transit intestinal. Le méconium ne contient pas de lysozyme ; après 3 jours de lactation, les selles renferment du lysozyme intact et fonctionnel [HANNEBERG et FINNE, 1974].

E- LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine humaine fut isolée à partir du lait de Femme et décrite, pour la première fois, par MONTREUIL et al., [1960 a, b] puis par JOHANSSON [1960] et par BLANC et ISLIKER [1961].

1°) Caractères généraux

La lactotransferrine est une glycoprotéine monocaténaire de masse moléculaire 80 000 + 5 000, capable de fixer de manière réversible 2 ions ferriques en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm [MONTREUIL et al., 1960 ; AASA et al., 1963 ; SPIK, 1968 ; AISEN et LIEBMAN, 1971]. La fixation de chaque ion Fe^{3+} nécessite la présence d'un ion carbonate ou bicarbonate [BLANC et ISLIKER, 1963, MASSON et HEREMANS, 1968] et la libération de 3 protons [MASSON et HEREMANS, 1968] selon la formule suivante :



La séquence peptidique de la lactotransferrine est en cours d'achèvement [MAZURIER et SPIK, 1974 ; MAZURIER et al., 1974 ; JOLLES et al., 1976 ; METZ-BOUTIGUE et al., 1980 ; 1981 ; MAZURIER et al., 1983]. Elle est composée de 2 domaines : le domaine Nt, fixant l'ion ferrique sur un site acido-labile et le domaine Ct, fixant le deuxième ion ferrique sur un site acido-stable [MAZURIER et SPIK, 1980]. Elle possède 2 glycanes répartis sur chaque domaine et liés à la chaîne protéique par une liaison de type N [β aspartyl]-N-acétyl-glucosamine [SPIK et al., 1982]. La structure des glycanes présente de nombreuses variations dues à l'introduction de 1 à 3 résidus de L-Fucose, branchés en α -1,6 ou en α -1,3, sur une structure de type N-acétyl-lactosaminique. Ces structures ont été établies au laboratoire par MONTREUIL et SPIK, 1975 ; SPIK et MAZURIER, 1977 ; MONTREUIL, 1980 ; SPIK et al., 1982.

2°) Localisation

La lactotransferrine est largement répartie dans l'organisme. On la trouve dans de nombreux liquides et milieux biologiques [MASSON, 1970], principalement dans les liquides et milieux d'excrétion : lait [MONTREUIL et al., 1960], larmes [BROEKHUYSE, 1974 ; GACHON et al., 1979], salive [MASSON, 1970], liquide synovial [BENNETT et al., 1973], plasma séminal [HEKMAN et RUKME, 1969], suc pancréatique [CLEMENTE et al., 1971], liquide céphalorachidien [TERENT et al., 1981], bile [VAN GUT et al., 1975], sang [RUKME et al., 1971 ; BENNETT et MOHLA, 1976], sécrétions bronchiques [BISETE et al., 1963 ; MASSON et al., 1965], mucus cervical et gastro-intestinal [MASSON, 1970].

En dehors des cellules excrétrices des épithéliales respiratoire et digestif, la lactotransferrine connaît une localisation cellulaire, en particulier dans les granules secondaires ou granules spécifiques des leucocytes polymorphonucléaires [MASSON et al., 1969]. Elle est présente, à l'état de traces, dans les monocytes [BENNETT et KOKOCINSKI, 1978] et on la

trouve dans les zones d'inflammations [BULLEN et al., 1972 ; VAN SNICK et al., 1974 ; BENNETT et MOHLA, 1976].

Le taux de lactotransferrine dans le colostrum et le lait humains varie suivant les auteurs. MASSON et HEREMANS (1971) ont trouvé que le taux de lactotransferrine dans le colostrum humain (1 à 9 jours après la parturition) est de 4,2 mg/ml avec une déviation standard de 1,4 mg/ml suivant les individus. Pour NAGASAWA et al. (1972), le taux de lactotransferrine dans le colostrum et le lait humain (11 à 60 jours) est de 4,9 à 2,1 mg/ml. Par contre, McCLELLAND et al. (1978) trouvent, dans le colostrum humain, 1,5 g de lactotransferrine pour 100 ml le 1er jour et 0,5 g/100ml le 5ème jour; le lait mature ne renferme que 200 mg/100 ml.

Le lait de Vache est pauvre en lactotransferrine; le colostrum en renferme 600 mg/100 ml (REITER, 1978) et le lait mature 20 mg/100 ml (MEYER et SENFT, 1979).

SPIK et al. (1982) montrent que la lactotransferrine partiellement dégradée est retrouvée dans les selles des nourrissons alimentés au lait maternel. Cette copro-lactotransferrine a gardé la capacité de fixer le fer (MAZURIER-DEHAINE, 1973).

3°) Comportement électrophorétique

La lactotransferrine fut longtemps considérée comme une β -globuline (MONTREUIL et al., 1960; BLANC et ISLIKER, 1961 ; GOT et al., 1966). Cependant, SCHADE et al. (1969) et MASSON (1970) ont observé des anomalies de migration dans un certain nombre de milieux et l'ont décrite comme ayant une migration de γ -globuline lente.

Il existe une différence de mobilité, sur acétate de cellulose, entre la lactotransferrine dans le lait et la lactotransferrine isolée. En augmentant la force ionique du lait par addition de NaCl 1M, la lactotransferrine dans le

lait migre à la position de la lactotransferrine isolée, MASSON [1970] suggère l'existence d'une association lacto-transferrine-caséine.

A cette différence de mobilité, s'ajoute une différence de coefficient de sédimentation. Le coefficient de sédimentation, sur gradient de sucrose, est de 5,35 pour la lactotransferrine isolée et de 8,25 pour la lactotransferrine dans le lait [SCHADE et al., 1969].

En utilisant la technique d'immunoélectrophorèse, HEKMAN [1971] montre que la lactotransferrine a la capacité de s'associer à un certain nombre de protéines : sérum albumine, caséine, lysozyme, lactalbumine. Ces associations induisent une modification du comportement électrophorétique de la lactotransferrine.

Au laboratoire, DESCAMPS [1974] observa une migration accrue de la lactotransferrine en présence de glycopeptides isolés du lait maternel. La lactotransferrine s'associe à ces glycopeptides.

La lactotransferrine peut également interagir avec des substances qui ne se trouvent pas dans le milieu dans lequel elle baigne habituellement. Ainsi MASSON [1970] pense que "la mauvaise résolution des tracés en gel d'agar tient vraisemblablement à la réaction entre la lactotransferrine et l'agaropectine car l'emploi d'agarose débarrassée en grande partie de l'agaropectine améliore la migration électrophorétique". En complexant la lactotransferrine, les mucopolysaccharides acides de la gélose empêchent la protéine de migrer normalement vers la cathode. La réaction de la lactotransferrine avec l'agar peut expliquer le fait qu'elle ait été décrite comme une β -globuline. De plus, l'étude d'une association lactotransferrine-bleu Trypan qui est un colorant acide diazo-tétrasilfonique, a été réalisée par MALMQUIST et JOHANSSON [1971].

IV- CONCLUSION

=====

Les trois principaux groupes de substances qui constituent le colostrum et le lait maternels renferment des éléments qui prennent part à la défense de la muqueuse intestinale.

- les glucides, en assurant la croissance de B. bifidum, agissent indirectement sur l'équilibre de la flore fécale.

- les lipides possèdent une activité anti-virale et ils peuvent bloquer l'action des exotoxines bactériennes.

- les protéines et principalement la lactotransferrine, le lysozyme et les sIgA ont une activité bactéricide dont les mécanismes d'action, très complexes, feront l'objet du chapitre suivant.

ACTIVITE DES FACTEURS DE DEFENSE
DE L'INTESTIN DU NOURRISSON
CONSERVATION DE CETTE ACTIVITE

Dans ce chapitre, nous résumerons les très nombreux travaux qui ont été réalisés sur l'activité anti-bactérienne des immunoglobulines sIgA, du lysozyme et de la lactotransferrine.

I- ACTIVITE SPECIFIQUE DES FACTEURS SOLUBLES

=====

A- LES IMMUNOGLOBULINES sIgA

Le rôle protecteur des sIgA a fait l'objet de nombreuses revues générales (WELSH et MAY, 1979, MESTECKY et al., 1980 ; HANSON et al., 1980; BIENENSTOCK et BEFUS, 1980 ; Mc NABB et TOMASI, 1981).

Les propriétés et les fonctions biologiques des sIgA se distinguent sur le plan biochimique de celles des autres anticorps. En effet, les sIgA ne sont pas de bons anticorps précipitants.

Les propriétés bien établies des sIgA sont les suivantes :

- limitation de l'adsorption des bactéries aux muqueuses ;
- agglutination des virus ;
- neutralisation des bactéries ;
- inhibition de l'absorption digestive des antigènes ;
- activation du complément par voie alterne.

1°) Limitation de l'adsorption des bactéries aux muqueuses

Les sIgA sont connues pour limiter l'adsorption des bactéries,

des virus et des antigènes solubles aux muqueuses [WILLIAMS et GIBBONS, 1972 ; HEREMANS, 1974 ; FRETER, 1974]. En 1976, LAMM montre que les sIgA empêchent l'adhésion de Vibrio cholerae aux cellules intestinales. Douze heures après avoir reçu du lait de leur mère préalablement immunisé contre E.Coli O 149 K 88, des marçassins sont infestés oralement par la même souche bactérienne [NAGY et al., 1976]. L'étude des sections intestinales de ces animaux montre que les bactéries n'ont pas adhéré aux tissus. L'adhésion de nombreuses autres bactéries est inhibée en présence d'anticorps IgA du lait ou du colostrum [SVANBORG-EDEN et SVENNERHOLM, 1978 ; LILJEMARK et al., 1979 ;

L'action des sIgA est surtout mécanique. La liaison des sIgA à la surface bactérienne entraîne l'hydrophilie, l'anti-adhésivité et sert à exclure l'antigène de la muqueuse [MAGNUSSON et STJERNSTROM, 1982]. Elles se comportent en anticorps agglutinant : la formation de complexes antigène-anticorps non absorbables et éliminés avec le mucus joue probablement un rôle important dans les mécanismes de défense immunitaire [LAMM, 1976].

2°] Neutralisation des virus

Le lait humain et le colostrum contiennent de nombreux anticorps dirigés contre les virus [Tableau V p. 39].

3°] Agglutination des bactéries

Les sIgA sont agglutinantes vis-à-vis de nombreuses bactéries et de leurs toxines. STOLIAR et al. [1976] montrent que le colostrum des Femmes au Guatemala inhibe, chez le lapin, l'action pathogène de Vibrio cholerae et de E.Coli. Cette activité inhibitrice est supportée par les sIgA. ROWLAND et al., [1980] remarquent qu'en Gambie, les enfants nourris au lait maternel hautement bactériostatique étaient mieux protégés.

TABLEAU V

ANTICORPS PRESENTS DANS LE COLOSTRUM OU
DANS LE LAIT HUMAIN DIRIGES CONTRE LES VIRUS

Anticorps	Références
Coxsachie A ₉ , B ₃ , B ₅	DEBRE <i>et al.</i> 1930
	MICHAELS 1965
Flavivirus Poliovirus	FALKLER <i>et al.</i> 1975
	SABIN 1950
	LEPOW <i>et al.</i> 1961
	WARREN <i>et al.</i> 1961
	SABIN <i>et</i> FIELDSTEEL 1962
	GONZAGA <i>et al.</i> 1963
	HODES <i>et al.</i> 1962
	MICHAELS 1965
	KENNY <i>et al.</i> 1967
	MATA <i>et</i> WYATT 1971
Rotavirus	SCHOUB <i>et al.</i> 1977
	YOLKEN <i>et al.</i> 1978
	SIMHON <i>et al.</i> 1979
	OTNAESS <i>et</i> ØRSTAVIK 1980
	MAASS <i>et</i> BARCKHAUS 1980
Alphavirus	WELSH <i>et al.</i> 1978
Cytomegalovirus	PINKU <i>et al.</i> 1982
Hepatite B	NAMBA <i>et al.</i> 1981
Virus syncytial	LAMPRECHT <i>et al.</i> 1976
	DOWNHAM <i>et al.</i> 1976
ECHO virus 6 <i>et</i> 9	MICHAELS 1965

805
L71E

contre les infections diarrhéiques que les enfants recevant du lait faiblement actif. Ceci est en corrélation avec le titre en anticorps sIgA de ces mêmes laits (DOLBY et al., 1980).

L'action des sIgA reste effective après passage dans l'estomac. En effet, les copro-anticorps sont toujours capables de protéger lors d'infections par V. cholerae (FRETER, 1970 ; FUBARA et FRETER, 1972 ; PIERCE et al., 1978). Ils ne réduisent pas le nombre de micro-organismes dans la lumière intestinale mais réduisent le nombre de bactéries adhérees aux microvillosités intestinales (FRETER, 1970 ; FUBARA et FRETER, 1973).

4°) Neutralisation des parasites

Récemment les sIgA ont été impliquées dans la défense anti-parasitaire des muqueuses. Le lait d'une souris immunisée contre Giardia muris protège les souriceaux de l'infection (ANDREWS et HELWETT, 1981). Cependant, les mécanismes d'action contre les parasites ne sont pas très connus (WAKELIN, 1978).

5°) Inhibition de l'absorption digestive des antigènes

Tous les enfants de moins d'un an nourris au lait de vache possèdent des anticorps contre les protéines lactées bovines (LIPPARD et al., 1936). En 1977, AHLSTEDT et al., décrivent l'existence de sIgA humaines dirigées contre la β -lactoglobuline et les caséines α et β de vache. Il existe beaucoup d'autres antigènes solubles contre lesquels les anticorps humains peuvent être dirigés (Mc NABB et TOMASI, 1981). Les anticorps sécrétoires ont un rôle important dans la régulation de l'absorption de ces antigènes (WALKER et ISSELBACKER, 1977). WALKER et al., (1972) ont examiné la capacité des sIgA intestinaux à altérer l'absorption de certaines macromolécules. Une diminution significative de

l'absorption intestinale est notée chez les animaux immunisés, de plus elle est spécifique de l'antigène.

6°) Activation du complément par voie alterne

Les Iga, contrairement aux autres anticorps, ne fixent pas le complément par la voie classique mais par la voie alterne [BURTON, 1973]. Les IgA sont capables de transformer le C₃ pro-activateur en C₃ activateur permettant ainsi le clivage du C₃ en entraînant l'activation de la séquence terminale C₅-C₆ du complément [SPIEGELBERG et GOTZE, 1972]. Si les sIgA peuvent réagir avec le complément, il n'y a pas de preuve actuellement quant à leur rôle biologique vis-à-vis de la lyse ou de l'opsonisation.

B- LE LYSOZYME

De nombreuses études sur l'activité antibactérienne du lysozyme du blanc d'oeuf de poule ont été réalisées. Par contre, l'activité lytique du lysozyme humain a été peu étudiée in vivo.

1°) Action bactéricide

Le lysozyme est une glycosidase capable d'hydrolyser la muréine, principal constituant des parois bactériennes. Il catalyse la réaction de rupture de la liaison [(β 1→4)] entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine de la muréine. Le lysozyme attaque la paroi des bactéries Gram (+) et la muréine plus interne des bactéries Gram(-). Cependant, le lysozyme humain, contrairement au lysozyme du lait de Vache, ne lyse pas les bactéries lactiques [VAKIL et al., 1969].

Les lysozymes humains et bovins sont trois fois plus actifs que le lysozyme du blanc d'oeuf de Poule, cette activité étant mesurée en utilisant comme substrat un organisme très sensible à l'activité lytique des lysozymes:

Micrococcus lysodeikticus. Le spectre de l'activité de lyse d'un lysozyme donné varie beaucoup suivant l'espèce bactérienne qui lui sert de substrat (PETERSON et HARTSELL, 1955 ; SHARPE et al., 1969).

Tous les lysozymes ont besoin d'un minimum d'électrolytes pour se fixer à la paroi bactérienne. Leur taux d'activité à 0°C est appréciable indiquant une relativement basse énergie d'activation (REITER et DRAM, 1962). NAKAMURA (1923) découvre un curieux effet pH : l'exposition de bactéries Gram(-), relativement résistantes à l'action du lysozyme, à pH acide (3,5) puis à pH basique (9,0), favorise la lyse par les larmes et le lysozyme de blanc d'oeuf de Poule à condition que la concentration en enzyme ne soit pas trop forte. Une forte concentration en lysozyme tend à agglutiner les bactéries (PETERSON et HARTSELL, 1955).

ROSENTHAL et LIEBERMAN(1931) sont les premiers à envisager l'influence de lysozyme du lait maternel sur la flore intestinale du nourrisson. Ils montrent que le méconium, ne contient pas de lysozyme ; dans les 3 jours qui suivent la partuition, l'enzyme apparaît dans les selles des enfants nourris au sein. De récents travaux confirment la présence de lysozyme dans les selles des enfants alimentés au lait maternel (HANNEBERG et FINNE, 1974 ; LODINOVA et JOUJA, 1977 ; ISAACSON, 1982).

Le lysozyme humain semble mieux résister à la digestion que celui de blanc d'oeuf de Poule. En effet, le lysozyme humain est toujours retrouvé dans les selles des enfants nourris au sein (58/58 échantillons) tandis que le lysozyme de Poule, ajouté à un lait artificiel, n'est retrouvé que dans 22/34 échantillons de selles.

En cas de diarrhée infectieuse, le taux de lysozyme augmente dans les selles. Cette élévation du taux de lysozyme dans la muqueuse intestinale est due à la migration des leucocytes, des monocytes et des macrophages qui relarguent

l'enzyme dans le fluide intestinale [MEYER et al., 1948]. Des biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse, montrent une augmentation de la concentration en lysozyme [FALCHUK et al., 1975 ; KRAWCZUK et al., 1978]. Cet accroissement du taux de lysozyme ne serait pas entièrement dû à l'infiltration des leucocytes, mais à une synthèse de novo de lysozyme [McCLELLAND et Van FURTH, 1975]. Dans la muqueuse intestinale de Souris, une partie du lysozyme proviendrait des cellules de Paneth [PEETERS et VANTRAPPA, 1975 ; ISAACSON, 1982]. Le lysozyme intervient sur la flore intestinale en lysant les parois bactériennes. Son action se poursuit, indirectement, par la contribution au développement de la flore bifide.

2°) Action sur la flore bifide

Nous avons vu, au chapitre précédent (p. 23), que la flore intestinale du nourrisson alimenté au sein était constituée essentiellement de bactéries lactiques, en particulier de B. bifidum. Le facteur indispensable à la croissance de la flore bifide est un glucide : la N-acétyllactosamine.

L. bifidus var. Penn. ne pousse pas sur un milieu synthétique contenant des acides aminés sans une supplémentation en lait de Femme. Cependant, ces organismes poussent très bien après addition d'un lysat de M. lysodeikticus obtenu par action du lysozyme. Le lysat bactérien fournirait les osamines indispensables à la croissance de L. bifidus var. Penn. [REITER, non publié].

Des expériences in vivo ont été réalisées sur le Rat par SUKEWA et al. [1967]. Des rats sont nourris avec un lait maternisé contenant 1,3 mg/ml de lysozyme de blanc d'oeuf de Poule. Comparées à des témoins, les selles de ces rats sont plus acides et le nombre des B. bifidum est plus élevé.

Ainsi, le lysozyme pourrait jouer un rôle actif dans la défense contre l'infection en intervenant sur l'équilibre des différentes espèces bactériennes : destruction des bactéries pathogènes et croissance de la flore bifide saprophyte.

3°) Rôle immunomodulateur

Outre son rôle anti-bactérien, le lysozyme pourrait avoir un rôle immunomodulateur (JOLLES, 1976). LODINOVA et JOUJA (1977) montrent que le taux des sIgA retrouvées dans les selles d'enfants nourris par un lait complété en lysozyme est augmenté alors que le taux des anticorps sériques reste inchangé. Ces auteurs suggèrent que l'activité du lysozyme sur les parois bactériennes peut stimuler la réponse immune locale. NAMBA et al. (1981) montrent que le lysozyme peut accroître le taux d'anticorps dans le sérum. Des Cobayes dont la nourriture contient du lysozyme voient leur réponse immune primaire à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B augmentée. Le taux des anticorps circulants est plus élevé dans le groupe des animaux ainsi traités. L'hypothèse de JOLLES (1976) est donc confirmée et l'action du lysozyme sécrété naturellement dans l'intestin peut être augmentée par l'ingestion de lysozyme additionnel.

4°) Rôle dans l'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est également augmentée de manière significative en présence de lysozyme.

Du lysozyme humain a été isolé d'urines de patients souffrants de leucémie monocytique ou myélomonocytique. Le lysozyme, à la concentration de 10- 400 mg/ml, stimule de façon significative la phagocytose des cellules de levure par les leucocytes et ce, en l'absence de tous facteurs sériques. Le lysozyme de blanc d'oeuf de Poule n' a pas d' action. Le lysozyme n'agit pas sur les cellules de levure mais sur les leucocytes et il ne peut, toutefois, être considéré comme un facteur opsonisant (KLOCKERS et ROBERTS, 1976).

C- LA LACTOTRANSFERRINE

Longtemps cette glycoprotéine fut considérée comme la principale source de fer pour le nourrisson. Elle intervient non seulement dans l'apport de fer mais également dans la lutte contre l'infection. Son rôle protecteur au niveau des muqueuses a fait l'objet de nombreuses revues générales dont les plus récentes sont celles de REITER [1983] et de SPIK et MONTREUIL [1983].

1°) Apport du fer au nourrisson

L'enfant nourri au sein n'a habituellement, pas besoin d'une supplémentation en fer avant l'âge de 4-6 mois. Un apport en fer aux nourrissons alimentés au lait de vache s'avère utile beaucoup plus tôt. Bien que le taux de fer dans le lait humain ne soit pas nécessairement plus élevé, sa disponibilité est meilleure que dans le lait de vache [LEBENTHAL, 1978].

La lactotransferrine, qui existe à un taux de 1 à 2 g par litre de lait de femme et qui renferme 0,3^o/_o de fer, constitue le principal apport de fer pour le nourrisson.

Une série d'expériences a été réalisée au laboratoire afin de démontrer l'interaction de la lactotransferrine avec les entérocytes humains et de déterminer l'importance du transfert du fer de la lactotransferrine marquée au $^{59}\text{Fe}^{3+}$ à l'intérieur de l'entérocyte [COX et al., 1979].

Des biopsies prélevées au niveau du jéjunum de sujets adultes sains, se sont révélées capables d'incorporer le $^{59}\text{Fe}^{3+}$ complexé à la lactotransferrine avec une vitesse de 0,73 pmol/mg/min pour une concentration de 10 $\mu\text{mol/l}$ en protéine. Dans les mêmes conditions, le fer de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule, glycoprotéines homologues, n'est pas transféré aux entérocytes humains. Par contre, le fer de

la lactotransferrine de vache est incorporé avec une vitesse trois fois inférieure à celle de la lactotransferrine humaine.

Ces expérimentations ont été reprises sur des biopsies prélevées chez des nourrissons et l'expérience a montré que l'absorption du fer était du même ordre de grandeur que chez l'adulte. (MAZURIER, non publié).

Ces expérimentations ont démontré pour la première fois la présence de récepteurs spécifiques des lactotransferrines dans la bordure en brosse des cellules épithéliales. Leur présence expliquerait pourquoi le métal apporté par le lait de femme est absorbé quantitativement par l'intestin du nourrisson alors que l'absorption du fer apporté par l'alimentation artificielle n'atteint que 10%.

2°) Activité bactériostatique

Depuis les premiers travaux de SCHADE et CAROLINE (1944) qui ont mis en évidence l'activité bactériostatique de l'ovotransferrine, l'intervention des différentes transferrines dans la bactériostase semble maintenant bien établie. Ainsi, il a été montré, in vitro, que la lactotransferrine inhibait la croissance de différentes souches d'E.Coli (BULLEN et al., 1972 ; REITER et al., 1975), de staphylocoques (MASSON et al., 1966), de Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS, 1966), de Bacillus stearothermophilus et subtilis (ORAM et REITER, 1968) et de Candida albicans (KIRKPATRICK et al., 1971). Cette activité de la lactotransferrine réside en un mécanisme de ferriprivation (SCHADE et CAROLINE, 1944 ; FEENEY, 1951) qui serait en fait influencé par la présence de chélateurs bactériens (MILES et KHIMJI, 1975 ; NEILANDS, 1980).

Il est généralement admis (BULLEN et al., 1972 ; 1978 ; LAW et REITER, 1977 ; WEINBERG, 1978 ; FRANSSON et LONNERDAL, 1980) que, seules les bactéries qui ont un besoin vital de fer (ex : coliformes) sont inhibées par la lactotransferrine

alors que les organismes ayant un besoin limité en Fer [ex : bifides] (REITER et DRAM, 1968), ne le sont pas.

Les bactéries possèdent plusieurs moyens d'acquérir le fer dans un milieu pauvre en métal ou en présence de lactotransferrine. Elles synthétisent des sidérophores qui diffusent dans le milieu, captent le fer et l'apportent aux bactéries grâce à des transporteurs et des récepteurs spécifiques (BULLEN et al., 1978 ; ROGERS et SYNGE, 1978 ; WEINBERG., 1978). La structure des sidérophores se rattache à deux familles chimiques : celle des acides hydroxamiques (ferri-chromes, ferrioxamine B) et celle des acides phénoliques (entérochiline). Si la compétition pour le fer entre l'entérochiline et la sérotransferrine est actuellement bien étudiée (CARRANO et RAYMOND, 1979), celle qui existe entre l'entérochiline et la lactotransferrine l'est à un degré moindre. Toutefois, la formation d'un complexe entre l'entérochiline et la lactotransferrine saturée en fer a été mise en évidence au laboratoire (SPIK et MONTREUIL, 1983). Cette interaction dépend du taux de saturation en fer (POLLACK et al., 1976), du pH du milieu (BULLEN et al., 1957), du rapport molaire entre transferrine et sidérophores, de la présence d'ions citrate et bicarbonate (REITER et al., 1975).

Bien que la lactotransferrine puisse capter le fer indispensable à la croissance des bactéries pathogènes, la présence de citrate dans le lait - 2 à 3 mM dans le lait humain et 4 à 8 mM dans le lait de vache - induit la formation d'un complexe citrate-fer qui est assimilable par les bactéries (AISEN et LIEBMAN, 1968). Le bicarbonate, qui est essentiel pour la fixation du fer par la lactotransferrine, peut dominer l'effet du citrate (PHELPS et ANTONINI, 1975 ; REITER et al., 1975 ; GRIFFITH et HUMPHREY, 1977 ; SMITH et SCHANGACHER, 1977).

Quels désordres la ferriprivation provoque-t-elle chez les bactéries ?

Peu de travaux ont été effectués sur les troubles que la ferriprivation induit chez les bactéries. La lactotransferrine, protéine basique, s'adsorbe sur la membrane bactérienne chargée négativement. THEODORE et SCHADE (1965) comparent les activités métaboliques de cultures de Staphylococcus aureus sur des milieux riches ou dépourvus de fer. Les Staphylocoques privés de fer présentent une activité respiratoire oxydative diminuée et une utilisation du glucose moindre, ce qui entraîne une diminution de croissance.

Un autre effet de la déficience en fer est l'apparition d'acides ribonucléiques de transfert anormaux (t-RNAs) chez E.Coli (WETTSTEIN et STENT, 1968). Les t-RNAs modifiés sont élués plus rapidement que les t-RNAs normaux. GRIFFITH et HUMPHREYS (1978) ont observé des altérations chromatographiques similaires dans une population de t-RNAs isolés d'E.Coli ayant poussées en présence de lait humain, de colostrum bovin ou de protéines fixant le fer. Environ 90% des t-RNAs sont anormaux ; l'addition de fer restaure le profil d'éluion normal. Malheureusement, certaines souches d'E.Coli poussent normalement en dépit des 80 à 90% de t-RNAs anormaux. GRIFFITH et HUMPHREYS (1977) ont émis l'hypothèse que l'altération du t-RNAs pourrait jouer un rôle dans l'adaptation d'E.Coli, in vivo, ainsi que dans sa pathogénicité.

Ces résultats ne permettent pas de conclure quant au mode d'action que les transferrines mettent en jeu pour inhiber la croissance bactérienne.

3°) Effet bactéricide de l'apolactotransferrine

ARNOLD et al., (1977 ; 1980 ; 1981 ; 1982) démontrent que l'apolactotransferrine, dissoute dans l'eau distillée,

a un effet bactéricide direct sur un grand nombre de micro-organismes incluant des bactéries Gram(+), Gram(-), aérobies, anaérobies et des levures. Parmi ces bactéries nous pouvons citer : Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli (non-entéropathogène), Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans.

Cependant, des organismes morphologiquement et physiologiquement similaires sont résistants : Streptococcus pyogenes, Streptococcus lactis, Lactobacillus casei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis, Escherichia coli (O 126, O111 - entéropathogène), Enterobacter cloacae, Salmonella newport, Shigella sonnei.

L'apo-lactotransferrine doit être en contact direct avec la paroi bactérienne pour provoquer un effet bactéricide. Cet effet est irréversible durant la première heure même par addition de fer ou de magnésium dans le milieu d'incubation. Il est endergonique : pas de bactériostase à 2°C et les germes en phase stationnaire de croissance sont plus résistants que ceux en phase exponentielle.

Des études approfondies réalisées sur S. mutans montrent que l'accumulation de glucose et son métabolisme sont inhibés, comme est l'incorporation des acides aminés et des purines.

Il n'est pas évident que cet effet bactéricide soit accompli par la lactotransferrine native du lait.

4°) Activité antibactérienne "in vivo"

L'activité antibactérienne, in vivo, de la lactotransferrine n'est pas très bien documentée. BULLÉN et al., [1972] et ANTONINI et al., [1977] semblent être les seuls groupes de chercheurs à avoir essayé de montrer l'effet antibactérien de la lactotransferrine in vivo, en utilisant le cobaye.

Le lait de cobaye est relativement riche en lactotransferrine et en transferrine (0,2 - 2mg/100 ml de chaque). BULLEN et al., (1972) infestent oralement, par E.Coli O 111, des Cobayes allaités par leur mère. L'examen du tractus digestif montre que E.Coli colonise à la fois l'intestin grêle et le colon mais, graduellement, les lactobacilles deviennent la flore dominante dans le gros intestin (en 3 jours) puis dans l'intestin grêle (3-5 jours). Chez les cobayes recevant une alimentation artificielle, E.Coli reste la Flore dominante bien que les bactocilles commencent à apparaître spontanément entre le 4e et 6e jour, dans le gros intestin. Pour prouver que les protéines chélatrices de fer sont responsables de la disparition progressive d'E.Coli, une dose d'hématine est quotidiennement administrée à un 3ème groupe de cobayes tétant leur mère. Sacrifiés au bout de 3 jours, les intestins de ces animaux sont colonisés par E.Coli O111, mais le colon contient déjà un nombre appréciable de lactobacilles. Cette expérience n'est pas très convaincante ; en effet, l'hématine peut induire la formation de cytochromes, chez les bactéries lactiques, augmentant ainsi la voie oxydative et la prolifération [BROCK, 1980].

La difficulté que représente la purification de la lactotransferrine bovine, incite certains auteurs à utiliser l'ovotransferrine de blanc d'oeuf de Poule. ANTONINI et al., (1975 ; 1979 ; 1980) confirment que l'activité bactériostatique in vitro et in vivo de l'ovotransferrine est comparable à celle de la lactotransferrine.

A présent, l'ovotransferrine est utilisée à des fins thérapeutiques. Des enfants atteints de diarrhées nécrosantes sont alimentés avec un lait maternisé, supplémenté en ovotransferrine à raison de 600 à 1 200 mg par jour. Les résultats réunis dans le Tableau VI p. 51 sont encourageants. Cependant, l'ovotransferrine est une protéine hétérologue qui

TABLEAU VI

TEMPS DE NORMALISATION DES SELLES.

Patients traités	3 jours	3 à 6 jours	6 à 9 jours
avec ovotransferrine* (m. 3,70 + 0,36)	11(55%)	7(35%)	2(10%)
sans ovotransferrine* (m. 6,15 + 0,41)	1(5%)	11(55%)	8(40%)

*P < 0,01 en faveur du groupe de patients traités avec l'ovotransferrine [test de Student].

d'après CORDA et al.(1983)



peut provoquer des troubles allergiques, si elle traverse la paroi intestinale et pénètre dans le sang.

Nous savons maintenant que la lactotransferrine peut agir en synergie d'action avec les autres facteurs antibactériens présents dans le lait, rendant son activité plus efficace.

II- SYNERGIE D'ACTION DES CONSTITUANTS SOLUBLES DU LAIT MATERNEL

=====

Nous venons de décrire l'activité protectrice des sIgA, du lysozyme et de la lactotransferrine isolés. Or, ces protéines se trouvent réunies dans tous les liquides et milieux biologiques et, elles agissent en synergie d'action.

A- SYNERGIE LYSOZYME -sIgA- COMPLEMENT

Le lysozyme peut agir en synergie avec les sIgA et avec le complément dans la lyse bactérienne des Gram(-) [WARDLAW, 1962]. Les études de HILL et PORTER (1974), effectuées sur le colostrum de Truie, montrent que seules les IgA sécrétoires sont capables d'être lytiques en présence de lysozyme et du complément. Les IgA sériques n'ont aucune action. Ces résultats confirment ceux d'ADINOLFI et al., [1966 a]. Des études effectuées avec des composants purifiés de la voie alterne du complément en présence de lysozyme ont montré qu'il y avait bactériolyse [SCHREIBER et al., 1979]. MAJUMBAR et GHOSE [1981] purifient les anticorps du sérum et du lait de patients convalescents du choléra. Les IgM et les IgG ont des propriétés agglutinantes et vibriocides tandis que les sIgA bien qu'agglutinantes et antiadhérentes ne sont pas vibriocides, même en présence de lysozyme.

Cette synergie d'action soulève de nombreuses controverses [HEDDLE et al., 1975 ; REITER, 1983]. Il semble que les fractions de sIgA très pures ne soient pas lytiques ;

cet effet de lyse serait dû à la présence d'IgM ou IgG contaminantes.

B- SYNERGIE LYSOZYME - LACTOTRANSFERRINE

In vitro, le lysozyme associe son activité lytique vis-à-vis des bactéries Gram(+) à l'action bactériostatique de la lactotransferrine. PERRAUDIN et PRIEELS (1982) ont montré que les protoplastes de Micrococcus luteus, obtenus par action du lysozyme humain, étaient agglutinés par l'addition, au milieu, de lactotransferrine humaine ou bovine. Cette agglutination serait due à des interactions ioniques puisque la succinylation des résidus de lysine de la lactotransferrine abolit son pouvoir agglutinant. Il reste à savoir si cet effet est reproductible in vivo et si cette agglutination signifie quelque chose dans la protection du tractus digestif.

C- SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - sIgA

Les premiers travaux concernant la potentialisation de la lactotransferrine ont été effectués par BULLEN et al., (1972). Ils ont montré que des anticorps IgE spécifiques d'une bactérie E.Coli O111 B 4 étaient capables d'agir en synergie avec la lactotransferrine du lait humain. En effet, en état de ferriprivation, la bactérie synthétise un chélateur : l'entérochiline qui entre en compétition avec la lactotransferrine pour capter le fer du milieu et le transporter jusqu'à des récepteurs spécifiques. Des anticorps dirigés contre le site récepteur de l'entérochiline [BULLEN et al., 1974], en se fixant sur la bactérie, inhiberaient le passage du fer [Fig. 3 p.54].

En 1978, SPIK et al., et ROGERS et SYNGE montrent que la lactotransferrine est potentialisée par un anticorps du lait humain et qu'il s'agit d'immunoglobulines sIgA.

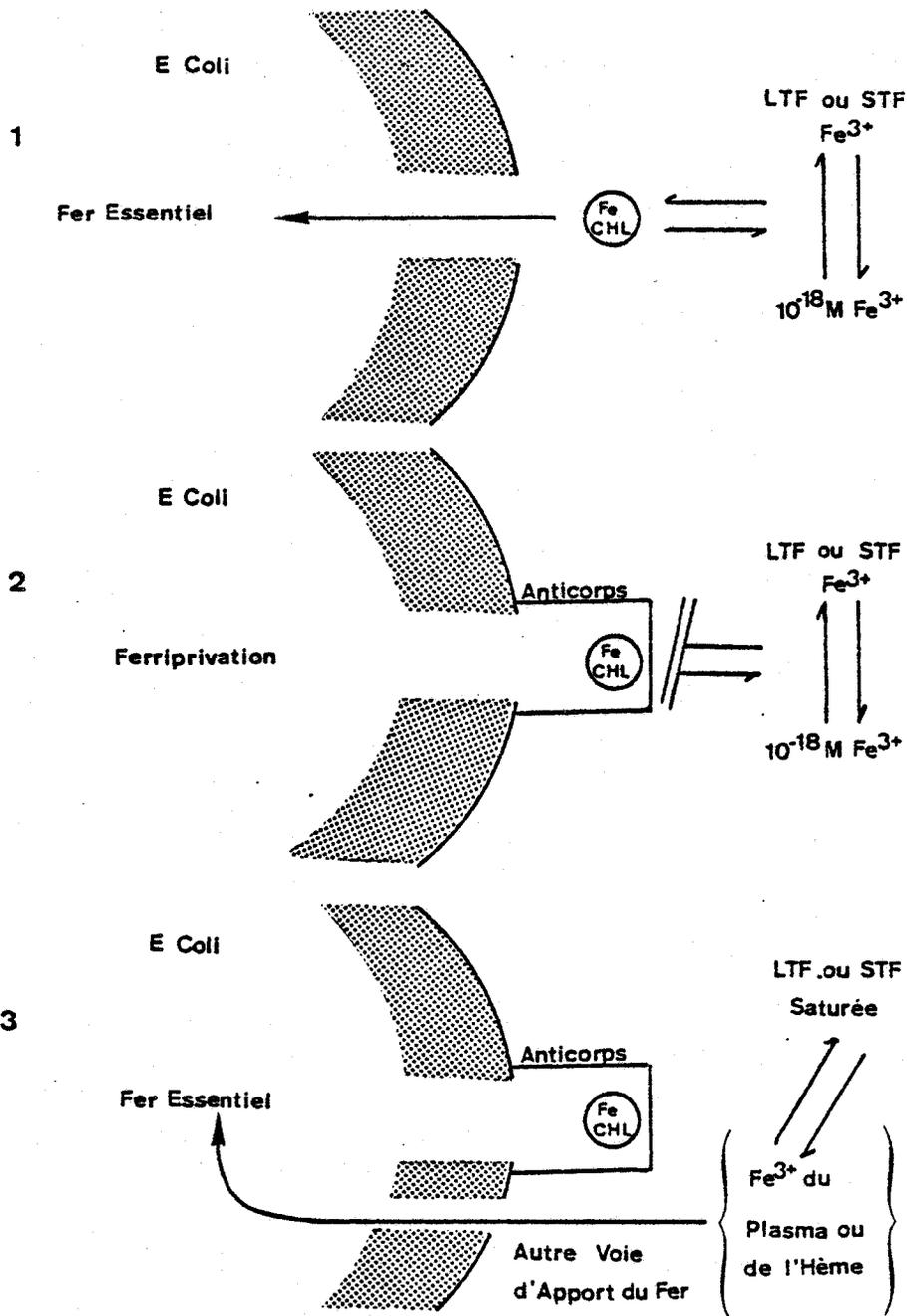


Figure 3 : Hypothèse concernant le mécanisme d'action bactériostatique de la lactotransferrine et des anticorps dirigés contre *E. coli* O₁₁₁B₄/B₂ (BULLEN et al., 1974).

- (1) Compétition pour le fer du milieu entre les transferrines et les chélateurs bactériens (CHL).
- (2) Ferriprivation de la bactérie augmentée par la formation d'un complexe anticorps-chélateur.
- (3) Mise en place d'une voie annexe d'apport du fer.

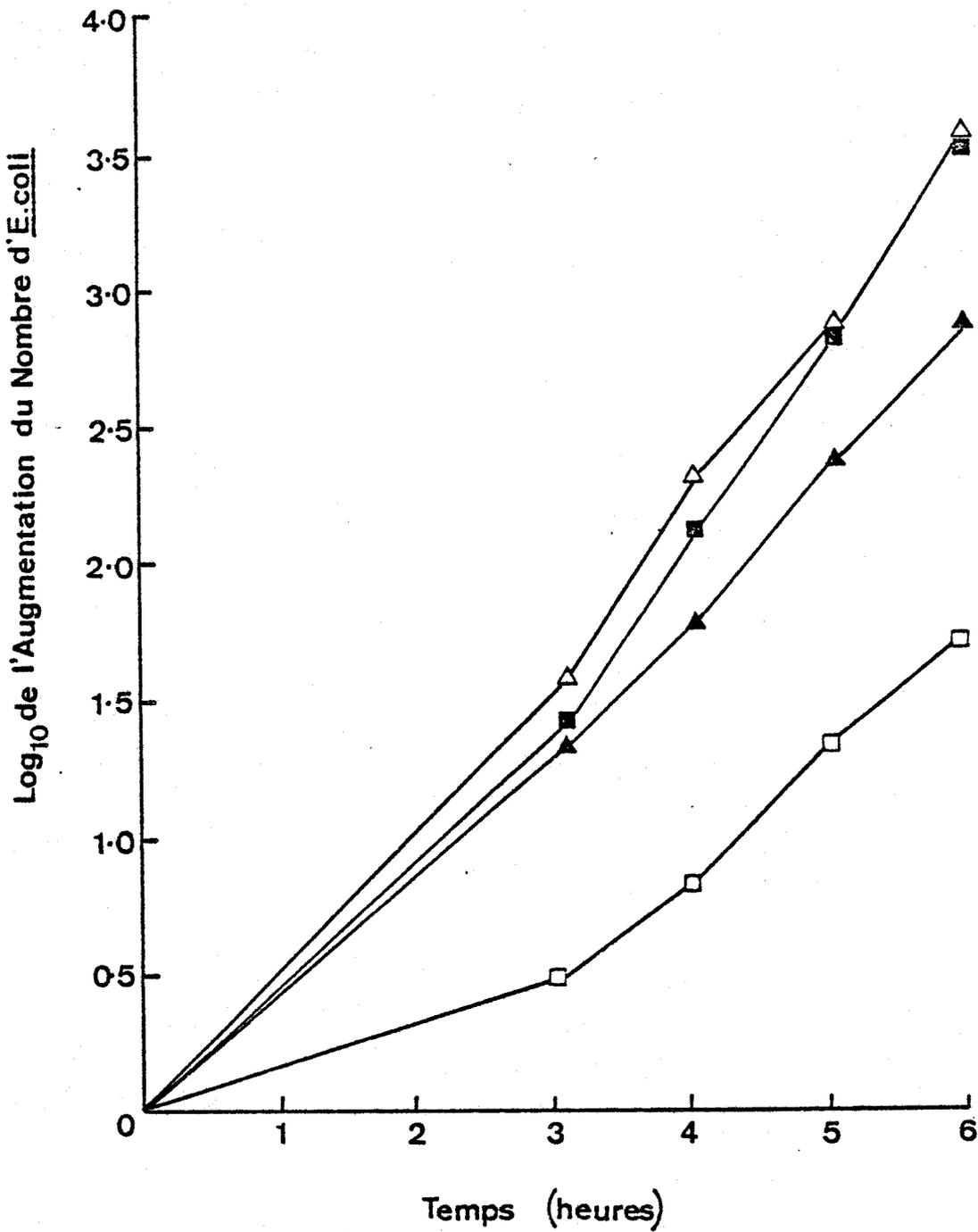


Figure 4 : Potentialisation de l'activité bactériostatique de la lacto-transferrine par les immunoglobulines sIgA (STEPHENS *et al.* 1980)

Δ Contrôle *E. coli* 0111 B4

\blacksquare sIgA (1 mg/ml)

\blacktriangle LTF (1 mg/ml)

\square LTF + sIgA



Les sIgA seules ont une* activité bactériostatique faible. De plus la saturation en fer annule l'activité de la lactotransferrine (BULLEN et al., 1972 ; ROGERS, 1976 ; SPIK et al., 1978). Les travaux de STEPHENS et al., (1980) montrent que la forte activité bactériostatique du lait maternel contre E.Coli ne peut être expliquée par la lactotransferrine ou par les sIgA qui, seules ont une activité inhibitrice faible (Fig. 4 p. 55) mais par leur synergie d'action. Cependant, l'action des anticorps a été remis en question par SAMSON et al., (1979) qui trouvent une activité bactériostatique à un lait sans immunoglobulines. Ce résultat est infirmé par ceux obtenus par DOLBY et HONOUR (1979). Ces auteurs ont montré que l'activité bactériostatique du lait est diminué considérablement par précipitation de la fraction anticorpos par des anti-sIgA. L'action potentialisatrice des sIgA sur la lactotransferrine aurait lieu quand les anticorps sont spécifiques de la bactérie (Mc CLELLAND et al., 1972 ; GINDRAT et al., 1972 ; ROGERS et SYNGE, 1979). En outre, la synergie d'action lactotransferrine - sIgA n'est effective que sur des bactéries pathogènes et ne se manifeste pas avec des bactéries commensales (STEPHENS et al., 1980). Des anticorps spécifiques de ces bactéries ont cependant été détectés dans le lait (DOLBY et STEPHENS, 1983).

B- SYNERGIE LACTOTRANSFERRINE - COMPLEMENT

La lactotransferrine posséderait, suivant sa concentration, une activité tantôt inhibitrice tantôt activatrice du complément (MORGAN et al., 1975 ; VEERHUIS et KYLSTRA, 1982). En utilisant le système hémolytique des hématies de Mouton, MORGAN et al., (1975) ont montré que la lactotransferrine activait le complément. Une synergie d'action semble avoir également lieu entre le complément et d'autres transporteurs de fer : la sérotransferrine humaine, les sidérophores bactériens (RIVIER et al., 1983).

III- CONSERVATION DE L'ACTIVITE DES FACTEURS

=====

Les facteurs solubles de défense présents dans le lait maternel sont de nature protéique et donc sensibles à la chaleur. [Tableau VII p. 58], la pasteurisation cause une perte partielle ou complète de l'activité de ces composants (FORD et al., 1977 ; RAPTOPOULOU-GIGI et al., 1977 ; EVANS et al., 1978). Pour cette raison, il est nécessaire de trouver des conditions de pasteurisation qui conservent les facteurs protéiques du lait tout en détruisant les germes pathogènes qui s'y développent.

Nous avons repris ces études en utilisant différents pasteurisateurs et en faisant varier la température et le temps de chauffage. Nos résultats seront confrontés à ceux de la littérature.

TABLEAU VII

EFFET DE LA PASTEURISATION A DIFFERENTES
TEMPERATURES SUR LA SURVIE DES PROTEINES

Pasteurisation	Lactotransferrine %	Immunoglobulines sIgA %	Lysozyme
Lait non traité	100		
60°C 30mn	84,3	105	115,6
62°C 30mn	43,2	101	76,3
65°C 30mn	14,7	91,9	38,6
67°C 30mn	8	89	15,2
70°C 30mn	5,7	67,7	0

D'après EVANS et al., [1978]



CONCLUSION

Pour pallier à la carence immunitaire et protéger sa muqueuse intestinale contre les agressions bactériennes et virales, l'enfant doit avoir recours à une source exogène d'anticorps avant d'assurer lui-même le relais de sa propre protection par un système immunitaire local efficace. Le colostrum et le lait maternels, comme nous venons de le voir, apportent au nourrisson des facteurs de protection humoraux spécifiques et non spécifiques.

Les facteurs humoraux spécifiques sont surtout représentés par les IgA de sécrétion.

L'IgA sécrétoire a des activités anticorps dirigées contre des bactéries, des virus, des toxines, des antigènes protéiques et non protéiques. Le mécanisme d'action de cet anticorps consiste en : l'agglutination des bactéries, la neutralisation des virus, l'élimination d'antigènes alimentaires, l'inhibition de l'adhésion bactérienne.

Les sIgA assurent la première ligne de défense de l'organisme et ont été comparées, par HEREMANS (1974) à une "peinture antiseptique" car elles tapissent toutes les surfaces des muqueuses.

Les facteurs non spécifiques qui contribuent à la défense intestinale du nourrisson sont :

- la flore bifide qui entrave l'implantation des microorganismes pathogènes en créant des conditions particulières d'environnement et dont la croissance est favorisée par l'apport de composés tels que les oligosaccharides et les glycopeptides du lait maternel.

- les lipides et plus particulièrement les gangliosides qui ont une activité antivirale et qui empêchent la fixation des exotoxines bactériennes à la muqueuse intestinale.

- le lysozyme, la lactotransferrine, la lactoperoxydase qui sont des substances bactériostatiques ou bactéricides présentes en quantité importante dans le lait. Ces protéines, présentes dans toutes les sécrétions en compagnie de sIgA et synthétisées au niveau des tractus épithéliaux, contribuent ainsi à la protection de toutes les muqueuses.

La plupart des protéines lactées : sIgA, lysozyme et lactotransferrine sont retrouvées dans les selles en partie intactes ou partiellement dégradées mais avec une activité biologique conservée. Elles résistent aux enzymes protéolytiques de l'intestin du nourrisson et peuvent donc être efficaces tout au long du tube digestif.

Toutes ces protéines agissent seules mais également en coopération. La coopération la plus importante est la synergie lactotransferrine - sIgA qui a lieu lorsque les anticorps sont spécifiques de la bactérie pathogène.

Compte tenu de l'importance de la lactotransferrine dans la protection de la muqueuse intestinale du nourrisson, notre but a été de l'isoler pour l'administrer à des enfants diarrhéiques. Nous avons essayé de comprendre pourquoi son efficacité est plus grande dans le P₇₋₈ que seule.

TRAVAUX PERSONNELS

MISE AU POINT D'UNE METHODE SEMI-INDUSTRIELLE
DE PREPARATION DE FRACTIONS PROTEIQUES DU
LAIT DE FEMME

I- INTRODUCTION

=====

Le lait est constitué d'un mélange complexe de protéides difficile à fractionner. Cette difficulté est accrue par la forte tendance qu'ont les protéides du lait à s'associer entre espèces de même nature ou de nature différente [JENNESS, 1970].

MONTREUIL et al., (1960 a) ont décrit une méthode de fractionnement des protéines du lait de Femme par précipitation au sulfate d'ammonium. Ce procédé, qui associe un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH, est fondé sur les variations de solubilité des protéides.

Cette technique est simple et facilement utilisable à grande échelle. En outre, elle est douce puisqu'elle ne provoque pas de modifications irréversibles de conformation et, bien que peu sélective, elle fournit des fractions enrichies qui conduisent à des protéides pur en peu d'étapes supplémentaires.

Avant de précipiter sélectivement les protéines, le lait, provenant de Femmes à divers stades de lactation et conservé sous forme congelée, doit subir une série de traitements qui le convertissent en lactosérum. La préparation de lactosérum varie en fonction des quantités de lait à traiter.

La méthode de fractionnement mise au point par MONTREUIL et al., (1960 a) et appliquée sur de faibles quantités de lait donne de bons résultats, mais le passage à des quantités de lait supérieures à 100 l, crée des difficultés.

Le laboratoire n'est pas équipé pour traiter de telles quantités de lait et nous avons eu plusieurs problèmes à résoudre :

- délipidation totale du lait
- concentration des protéines par les moyens mis à notre disposition
- centrifugation de grandes quantités de lait

Dans ce chapitre, nous discuterons des techniques utilisées et des résultats obtenus lors d'un fractionnement de type semi-industriel.

II- RESULTATS =====

A- PREPARATION DES LACTOSERUMS

1°) Délipidation

Des essais de délipidation en faisant varier la température ont été effectués, sur de petites quantités de lait, afin de déterminer l'influence de la température sur la délipidation.

Les masses pondérales des lipides recueillis par centrifugation et des lipides résiduels, extraits par un mélange chloroforme-méthanol, sont inscrites dans le Tableau VIII p. 63 .

Les lipides résiduels, extraits après centrifugation à 0°C et 15°C ne représentent, respectivement, que 0,8 % et 0,6 % des lipides totaux. Après délipidation à 30°C, le lait renferme encore 4,5 % de lipides extractibles par le chloroforme.

La délipidation à basse température ou à température ambiante est plus efficace que la délipidation à + 30°C. Pour les fractionnements classiques dont les quantités de lait à traiter n'excèdent pas 30 l, la délipidation est effectuée au laboratoire, par centrifugation à + 4°C.

TABLEAU VIII

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA DELIPIDATION
DU LAIT DE FEMME

Température	Masse de Lipides récupérés par :		Masse totale de lipides (g/100ml)
	Centrifugation (g/100ml)	Extraction chloroformique (g/100ml)	
0°C	3,4	0,03	3,43
15°C	3,47	0,023	3,493
30°C	3,11	0,142	3,252



Pour le fractionnements de type semi-industriels, réalisés sur des quantités de lait de 50 l à 450 l, la délipidation est effectuée par centrifugation à + 30°C. Le lait ainsi délipidé renferme encore des lipides [de 1 à 1,5 g/l] dont la présence peut avoir des effets néfastes lors des étapes ultérieures, notamment l'étape de concentration.

2°) Concentration

Une étude préliminaire, réalisée sur hémodialyseur HOSPAL RP6 HP, a montré la perte des protéines qui survient au cours de l'étape de concentration.

L'expérience est réalisée sur 1,4 l de lait de Femme, délipidé par centrifugation à 4 000 t/mn 30 mn et à + 4°C. Après concentration au demi, la mesure des volumes recueillis dans les 2 compartiments est égale à :

0,7 l de rétentat R_1 et 0,7 l de filtrat F_1 .

Après concentration au tiers, les volumes obtenus sont de :

0,45 l de rétentat R_2 et 0,95 l de filtrat F_2 .

Les dosages de protéines totales, par la méthode de Lowry (p. 139), ont été effectués sur le lait de départ et sur les filtrats et rétentats obtenus après concentration au demi et au tiers.

Le lait de départ contient 8,4 g de protéines par litre. Après concentration au demi sur hémodialyseur, 6,7 g/l de protéines sont recueillies ($R_1 + F_1$) soit une perte de 20 %. Après concentration au tiers, la perte protéique s'élève à 25,5 % comme le montre le Tableau IX p 65.

Entre les concentrations au demi et au tiers, la perte en protéines est de 5,5 % alors qu'elle est de 20 % entre le lait de départ et la concentration au demi. Il semble donc que cette perte protéique se stabilise au fur et à mesure de la concentration et qu'elle soit due à une adsorption sur la membrane de l'hémodialyseur.

TABLEAU IX

ESSAIS DE CONCENTRATION DES PROTEINES
DU LAIT MATERNEL SUR HEMODIALYSEUR
HOSPAL RP6 HP

Concentration	Taux de Protéines (g/l)		Immuno-globulines IgA (g/l)	Lacto-transferrine (g/l)
	R*	F*		
Lait de départ (1,4 l)	8,4		0,32	0,71
Concentration au demi	5,2	1,5	0,25	0,67
Concentration au tiers	4,6	1,66	0,23	0,58

avec R* : Rétentat

F* : Filtrat



Les quantités de protéines qui passent dans le filtrat sont de 22 % pour la concentration au demi et de 26,5 % pour la concentration au tiers.

Le dosage spécifique des IgA et de la lactotransferrine, réalisé selon la méthode de Mancini et al., (1965), révèle une perte de 0,09 g/l (soit de 18,3 %) et 0,13 g/l (soit de 28 %), respectivement, après concentration au tiers. Cependant, aucune trace d'IgA ni de lactotransferrine n'est retrouvée dans les filtrats F₁ et F₂. L'électrophorèse en acétate de cellulose confirme ce résultat et montre clairement que l' α -lactalbumine et des glycopeptides traversent la membrane de filtration.

Les pertes en protéines qui surviennent au cours de l'étape de concentration sont dues soit à un phénomène d'adsorption sur la membrane comme c'est le cas des IgA et de la lactotransferrine, soit à un mouvement de filtration à travers la membrane (ex : α -lactalbumine, glycopeptides).

3°) Décaséination

Nous utilisons toujours la méthode de décaséination qui consiste à amener le lait délipidé et dialysé à pH 4,6. La quantité moyenne de caséine recueillie est de 3,5 g/l de lait.

Des dosages de lactotransferrine, d'immunoglobulines et de lysozyme nous ont montré que la fraction "caséine" pouvait être contaminée par 2,3 % de lactotransferrine, 0,6 % d'IgG, du lysozyme et des IgA à l'état de traces.

B- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES LACTOSERIQUES

1°) Rendement

Pour apprécier les pertes pondérales qui surviennent au cours du fractionnement au sulfate d'ammonium, nous

TABLEAU X

MASSE DES PRECIPITES OBTENUS PAR RELARGAGE
 AU SULFATE D'AMMONIUM OU LACTOSERUM HUMAIN

Précipités	Saturation (NH ₄) ₂ SO ₄	pH	Masse des précipités en g/l		Fractionnement semi- industriel (450 l)
			Fractionnement classique (5,7 l)	classique (30 l)	
P1	33	7,0	0,8	1,0	0
P2	33	4,6	1,8	2,4	0,36
P3	33	3,8	0,2	0,32	0,20
P4	50	7,0	0,3	0,6	0,14
P5-6	50	3,8	1,0	1,12	0,90
P7-8	75	7,0	1,3	1,73	0,28
P9	75	3,8	0,15	0,21	0,02
P10	100	3,8	0,3	0,35	0,06
Masse de précipités récupérée par litre de lactosérum			5,85	7,73	1,96
Masse de matière sèche adialysable dans 1 litre de lactosérum			6,6	9,6	4,2



avons lyophilisé une partie aliquote de la fraction adialysable du lactosérum utilisé et comparé la masse pondérale de matière sèche obtenue à la somme des masses des différents précipités.

Les masses de chacun des précipités obtenus par la méthode classique de fractionnement sont des valeurs moyennes de 2 fractionnements. Pour le fractionnement de type semi-industriel, les valeurs ont été obtenues par traitement de 450 l de lait maternel [Tableau X p.67].

Il en résulte que le rendement global du fractionnement classique est de 88 % pour 5,7 l de lait et de 80 % pour 30 l, alors que le fractionnement de type semi-industriel donne un rendement de 46,6 %.

Dans tous les cas, les précipités P2 et P7-8 sont, quantitativement les plus importants sauf lors du fractionnement de type semi-industriel où le précipité P5-6 représente 46 % du total des précipités récupérés.

2°) Répartition pondérale des constiants protéiques

a) Fractionnement classique

Les résultats de l'étude de la répartition pondérale des protéines dans les différents précipités obtenus au cours du fractionnement du lait de Femme, par la méthode classique, sont réunis dans le Tableau XI p. 69.

Les différentes classes d'immunoglobulines, IgA, IgM et IgG représentent 11% des protéines recueillies. Les IgA représentent 10,7% des protéines totales à elles seules. En raison de leur haute masse moléculaire, les immunoglobulines précipitent aux faibles concentrations en sulfate d'ammonium (33 % et 50 % de saturation) et sont particulièrement abondantes dans les précipités P2 et P4. Le P2 renferme 44,6 % d'IgA, 41,9 % d'IgM et 20 % d'IgG.

Le rendement pondéral des IgG et des IgM, après fractionnement au sulfate d'ammonium, est très faible (46,7 %

TABLEAU XI

REPARTITION DES PROTEINES DANS LES PRECIPITES OBTENUS
 AU COURS DU FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME PAR LA
 METHODE CLASSIQUE (5,71 de lait de départ)

Précipités	Immunoglobulines (mg/l)			Lactotransferrine (mg/l)	Lysozyme (mg/l)	Pièce de sécrétion (mg/l)
	IgA	IgM	IgF			
Lactosérum dialysé	625	10,6	11,5	1 100	38,2	335,2
P1	41,5	0,06	0,44	9,2	0,17	5,4
P2	<u>265</u>	<u>2,08</u>	1,08	6,2	0,36	13
P3	28,8	0,17	0,11	2	0,05	6,3
P4	<u>147,2</u>	1,15	<u>1,68</u>	7,6	0,15	73,8
P5-6	101	<u>1,5</u>	<u>1,68</u>	<u>170</u>	3,11	<u>157</u>
P7-8	9,5	0	0,37	<u>780</u>	<u>28,20</u>	37
P9	0,8	0	0	4,3	0,90	1,4
Total	594	4,96	5,37	980	32,9	294
Rendement	95%	46,8%	46,7%	89%	86,2%	87,7%

TABLEAU XII

REPARTITION DES PROTEINES DANS LES PRECIPITES OBTENUS
 AU COURS DU FRACTIONNEMENT DU LAIT DE FEMME PAR LA
 METHODE SEMI-INDUSTRIELLE. (4501 de lait de départ)

Précipiés	Immunoglobulines (mg/l)			Lactotransferrine (mg/l)	Lysozyme (mg/l)	Pièce de Sécrétion (mg/l)
	IgA	IgM	IgG			
Lactosérum dialysé	546	11,2	8,4	794	117	150
P1	-	-	-	-	-	-
P2	68,4	1,7	0,86	6,85	3,25	5,9
P3	35	0,9	0,4	3,6	1,8	4,6
P4	60	1,3	1,33	3,4	2	21
P5-6	<u>139,5</u>	<u>4,5</u>	<u>3,8</u>	<u>144</u>	<u>22,5</u>	<u>90</u>
P7-8	2,5	0	0,08	<u>173,6</u>	<u>22</u>	11,5
P9	0,07	0	0	0,4	1,12	0,2
Total	305,5	8,4	6,5	331,85	52,7	133
Rendement	56%	75%	77%	41,8%	45%	88,8%



et 46,3 % respectivement) par rapport au rendement des IgA [95 %]. Les causes de cette faiblesse de rendement n'ont pas été déterminées mais une erreur de dosage n'est pas à écarter. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que les quantités à doser sont très petites. De plus, les IgG, à l'encontre des autres immunoglobulines, sont présentes en quantité relativement importante dans le précipité P5-6 : 31 % des IgG recueillies sont dans le P5-6.

La pièce de sécrétion, qui représente 15,4% des protéines totales recueillies au cours du fractionnement, se trouve dans tous les précipités et plus abondamment dans le P4 et le P5-6. Environ 50 % de la pièce de sécrétion précipite au niveau du P5-6 alors que ce précipité n'est pas très riche en IgA. Dans le P5-6, la pièce de sécrétion se trouve sous forme libre.

La lactotransferrine dont le pourcentage avoisine 19 % des protéines totales du lactosérum, est présente en quantité importante dans le P7-8 qui contient 79,6 % de la lactotransferrine totale. Dans les autres précipités, le taux de lactotransferrine varie de 0,5 % [P2] à 9 % [P1] hormis le P5-6 qui contient 17,3 % de la lactotransferrine totale et représente le précipité le plus riche en cette protéine après le P7-8.

Le lysozyme, présent dans tous les précipités, est plus abondant dans les précipités riches en lactotransferrine c'est-à-dire le P5-6, P7-8 et P9. Environ 85 % du lysozyme précipite au niveau du P7-8.

b) Fractionnement semi-industriel*

Le fractionnement de type semi-industriel, réalisé à partir de 450 l de lait maternel concentré sur hémodyalysateur HOSPAL RP H6 au 1/6^e, procure un faible rendement.

* Le fractionnement de type semi-industriel a été réalisé au laboratoire en collaboration avec Monsieur DECOTTIGNIES que je tiens à remercier pour son aide précieuse.

La lactotransferrine, le lysozyme et les IgA sont les protéines obtenues avec le plus faible rendement. Par contre, les IgM et les IgG sont recueillies avec un meilleur rendement que dans le cas du fractionnement classique [Tableau XI p.69].

La répartition des protéines entre les différents précipités est identique à celle obtenue lors d'un fractionnement classique. La seule différence que l'on observe est la prédominance des immunoglobulines dans le P5-6. Ainsi, le P5-6 renferme 45,6 % des IgA, 53,8 % des IgG et 58,5 % des IgM totales recueillies. Le P5-6 contient aussi 43,4 % de la lactotransferrine totale.

Dans le fractionnement de type semi-industriel, le précipité P5-6 est quantitativement et qualitativement le plus important. Il renferme la moitié des immunoglobulines, de la lactotransferrine, du lysozyme et de la pièce de sécrétion libre ou combinée.

III- DISCUSSION

=====

La répartition des protéines entre les différents précipités obtenus au cours du fractionnement classique au sulfate d'ammonium corroborent les résultats de DESCAMPS (1974). Certains précipités sont relativement simples comme les précipités P2 et P4 constitués essentiellement par des IgA et le précipité P7-8 qui renferme environ 75 % de lactotransferrine ; par contre, les précipités P1, P3 et P9 apparaissent très complexes bien qu'ils constituent des stades d'enrichissement en certains protéides [sérumalbumine, lactalbumine, α -1-antitrypsine] auxquels nous ne nous sommes pas intéressés.

Le fractionnement de type semi-industriel ne donne pas un enrichissement des précipités aussi net. En effet, si le P7-8 est constitué à 33 % de lactotransferrine, le P5-6 renferme, en quantités égales, les immunoglobulines et la lactotransferrine. Mais le problème majeur posé par ce type de fractionnement est le faible rendement.

Quelles peuvent être les causes de cette perte protéique ?

La délipidation du lait n'a pas été totale. En effet, des études de délipidation en fonction de la température ont montré que la délipidation à 30°C était moins complète que la délipidation à température ambiante ou à froid. Or, les 450 l de lait de femme utilisés pour le fractionnement de type semi-industriel ont été délipidés à + 30°C.

Suite à cette étape de délipidation, le lait a été concentré au 1/6^e sur des hémodialyseurs HOSPAL. Des études réalisées sur 1,4 l de lait nous ont montré qu'une partie des protéines filtrait à travers la membrane bien qu'en théorie, leur masse moléculaire leur interdit le passage. De plus, il se forme à la surface des membranes une couche de polarisation induite par la perméation. Cette couche de polarisation, formée de protéines, d'ions minéraux, de peptides..., entraîne une augmentation de la pression osmotique et donc une diminution de la pression effective de filtration. Le flux du soluté à travers la membrane et la couche de polarisation diminuent, provoquant le colmatage de la membrane. La perte protéique importante, produite par l'étape de concentration, expliquerait que le lactosérum dialysé de départ ne contienne que 4,2 g/l de matière sèche. La littérature donne une valeur moyenne de 6,4 g/l pour un lactosérum non concentré [HAMBRAEUS, 1977].

Des essais réalisés en utilisant d'autres marques d'hémodialyseurs [SECON 103, SMAD MP, GAMBRO] n'ont pas donné de meilleurs résultats et le temps de concentration était 4 fois supérieur à celui de l'hémodialyseur HOSPAL.

Pour améliorer l'étape de concentration, il faudrait :

- un écoulement plus rapide le long des membranes de filtration. Une vitesse de filtration de 2 m/sec est recommandée.
- une température de l'ordre de + 40°C. En effet, il existe une température optimale pour obtenir les meilleurs débits. La température est en relation directe avec la viscosité du produit.

L'étape de fractionnement, réalisée avec une centrifugeuse de type industriel, est probablement la cause principale des pertes protéiques. Au cours de cette étape, la perte en matière sèche s'élève à 53 %, le lactosérum concentré puis, dialysé nous servant de référence.

La centrifugeuse utilisée pour recueillir les précipités, fonctionne en continu. Le lait arrive dans la centrifugeuse grâce à une différence de pression, passe dans un cylindre qui tourne à grande vitesse, les particules qui précipitent se collent sur les parois du cylindre et le "surnageant" sort de la centrifugeuse. A sa sortie de la centrifugeuse, le surnageant "mousse" énormément, signe d'une forte dénaturation protéique.

La forte concentration en sulfate d'ammonium et la pression de sortie du liquide sont responsables de la dénaturation protéique.

L'amélioration du rendement obtenu lors du fractionnement de type semi-industriel nécessite l'utilisation d'une ultrafiltreuse employée dans l'industrie laitière et d'une centrifugeuse de conception différente.

En conclusion, nous pouvons dire que le fractionnement de type semi-industriel, tel que nous l'avons pratiqué au laboratoire, n'est pas une méthode rentable. Le matériel dont dispose le laboratoire permet de faire des fractionnements de 30 l de lait maximum.

Pour améliorer le rendement du fractionnement de type semi-industriel, il faut :

- améliorer l'étape de concentration en utilisant une ultrafiltreuse.

Au cours de la décennie écoulée, la technique d'ultrafiltration sur membrane s'est implantée massivement dans l'industrie laitière pour séparer, purifier et fragmenter les protéines lactosériques (MAUBOIS et BRULÉ, 1982). Il existe des ultrafiltreuses, type UFS-P Alfa-Laval, à une

seule cartouche qui est bien adaptée à l'expérimentation en laboratoire.

- améliorer l'étape de centrifugation. La centrifugation devra toujours être réalisée sur une centrifugeuse qui fonctionne en continu mais dont le principe de séparation du précipité et du surnageant soit différent. Elle devra avoir une vitesse de rotation réglable de façon à pouvoir modifier les conditions opératoires en fonction des besoins.

RECHERCHE DE LA FRACTION PROTEIQUE DU LAIT
DE FEMME LA PLUS ACTIVE POUR LE TRAITEMENT
DES DIARRHEES

L'étude de l'activité bifidigène a été réalisée par Madame NEUT, chercheur à la Faculté de Pharmacie de Lille, dans le laboratoire de Microbiologie dirigé par le Professeur BEERENS. Nous leur adressons nos plus vifs remerciements.

Nous tenons à remercier Mademoiselle GAVINI pour les conseils qu'elle nous a apporté dans la mise au point de la méthode de dosage de l'activité bactériostatique.

I- INTRODUCTION

Le rôle du lait de Femme dans la protection du tractus digestif de l'enfant est bien connu. Ce rôle est double : un effet bactériostatique vis-à-vis des souches entéropathogènes et un effet bénéfique sur la croissance de la flore bifide.

L'activité bactériostatique est assurée par un ensemble de composés parmi lesquels le plus important est sans doute la lactotransferrine.

Le facteur de croissance indispensable au Bifidobacterium appartenant à l'espèce Bifidobacterium bifidum est la N-acétyllactosamine, disaccharide azoté que l'on trouve dans les oligosaccharides libres et les copules glucidiques des glycoconjugués. Les espèces Bifidobacterium longum et Bifidobacterium infantis ont besoin des constituants du lait maternel pour croître mais le facteur responsable de leur croissance n'a pas encore été identifié.

Une recherche de l'activité bifigène et de l'activité bactériostatique a été réalisée sur chaque précipité obtenu au cours du fractionnement du lait de Femme afin de donner le précipité le plus actif aux enfants atteints de diarrhée rebelle.

II- RESULTATS

A- INHIBITION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

La souche bactérienne E.Coli 0111 B4 a été cultivée dans le milieu Ringer-Tryptone en présence des différents précipités du lait obtenus par relargage au sulfate d'ammonium.

Chaque précipité est dissous dans le Ringer-Tryptone à la concentration de 5mg/ml. La solution ainsi obtenue estensemencée par une dose de 6.10^2 bactéries et mise en culture à 37°C. Après 18 h de culture, une numération sur boîte est réalisée et les résultats de cette numération sont représentés Fig. 5 p. 78. Ils sont exprimés en logarithme décimal du nombre de germes viables.

L'observation du diagramme montre que tous les précipités ont un léger effet bactériostatique. Le précipité P7-8 est celui qui inhibe le plus fortement la croissance d'E.Coli 0111 B4 ; un écart de 2 logarithmes est un résultat significatif. Nous rappelons que ce précipité est le plus riche en lactotransferrine. Le P5-6, malgré la quantité non négligeable de lactotransferrine qu'il contient, n'est pas actif.

B- ACTIVITE BIFIDIGENE

La recherche de l'activité bifidigène, dont les résultats sont résumés dans le Tableau XIIIp. 80, a été réalisée sur les précipités obtenus par fractionnement d'un mélange de 5,71 de lait de Femme. Les précipités sont utilisés à la concentration existant dans le lait.

Le lactosérum dialysé et la caséine redialysée exercent un pouvoir bifidigène sur les souches suivantes : AA 2/2, B 536 appartenant à l'espèce B-bifidum et C 6 appartenant

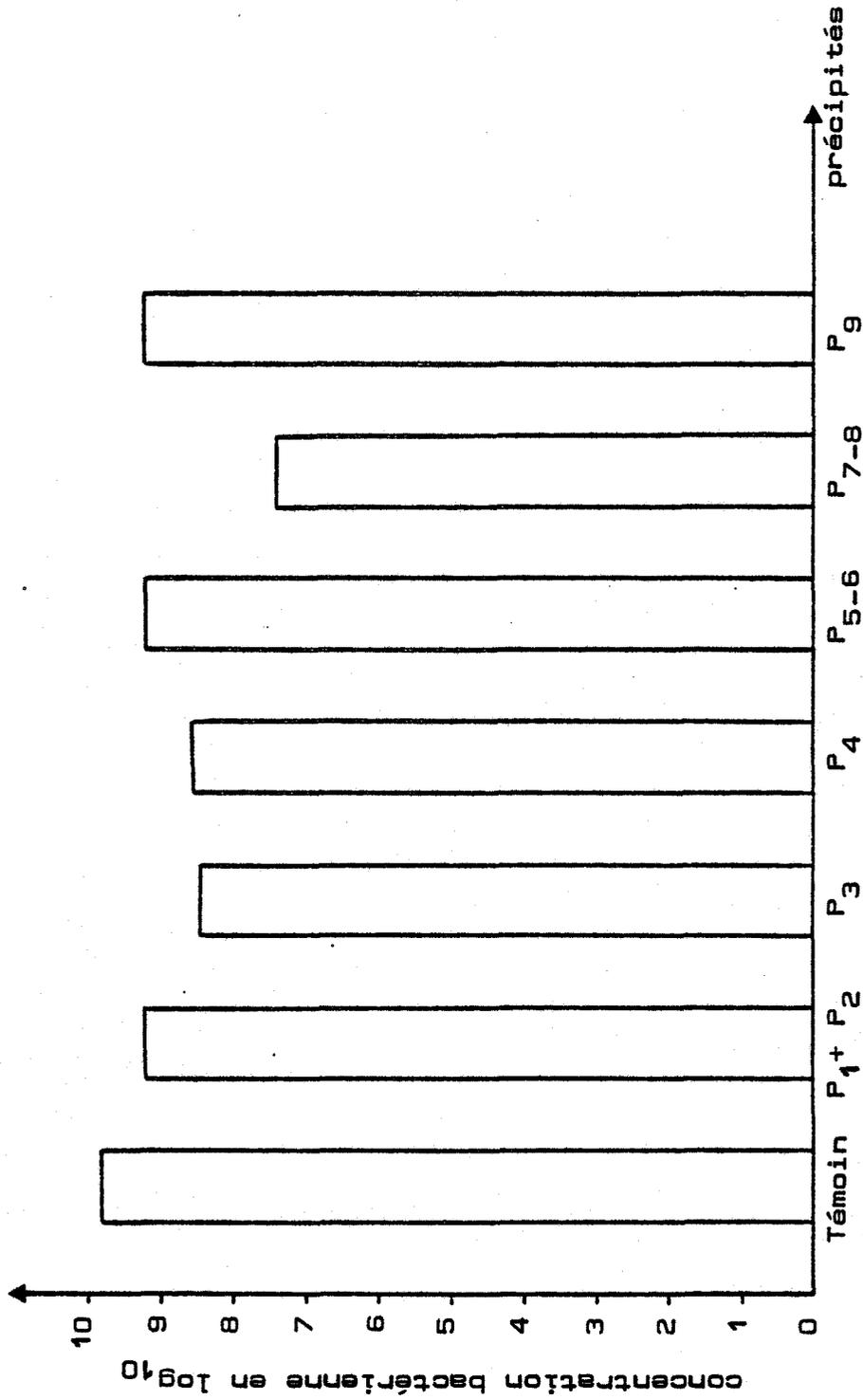


Figure 5 : Activité bactériostatique des précipités du lait de Femme vis-à-vis d'E. coli 0111 B4.



au groupe B.infantis.

Le précipité P7-8 possède une activité bifidigène sur une souche de l'espèce B.bifidum : AA 2/2 et sur les 3 souches des groupes B.longum et B.infantis analysées : LM a 3, B.long.coll et C 6. Le précipité P7-8 est le plus actif.

La croissance de la souche C 6 est influencée, d'autre part, par la présence des précipités P4, P5-6 et plus faiblement par le P2.

III- CONCLUSION

=====

Ces quelques études ont montré que le P7-8 est le seul précipité à posséder les 2 activités bactériostatique et activité bifidigène.

L'activité bactériostatique du P7-8 est, sans aucun doute, liée à sa forte teneur en lactotransferrine. Une étude plus détaillée du P7-8 nous permettra, peut-être, de déterminer la nature du (ou des) constituant(s) qui favorise(nt) la croissance des souches appartenant aux espèces B.longum et B.infantis.

Suite à ces expériences réalisées in vitro, l'utilisation du P7-8 dans le traitement des diarrhées rebelles du nourrisson nous paraît être une solution thérapeutique prometteuse.

TABLEAU XIII

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE BIFIDIGENE DANS LES DIFFERENTS
PRECIPITES DU LAIT DE FEMME*

Espèces	Souches	Lacto-sérum	Caséine redialysée	P1	P2	P3	P4	P5-6	P7-8	P9	P10	S10
D. bifidum	Penn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA 2/2	+	+	-	-	-	-	-	+F	-	-	+
	B 536	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D. longum	LM a3	-	-	-	-	-	-	-	+F	-	-	-
	B. long.	-	-	-	-	-	-	-	+F	-	-	-
D. infantis	C 6	+F	+	-	+F	-	+	+	+	-	-	-

* Les précipités sont utilisés à la concentration existant dans le lait (voir Tableau XI p. 69).



ETUDE BIOCHIMIQUE DU PRECIPITE P7-8
MISE EN EVIDENCE DE COMPLEXES DE LA
LACTOTRANSFERRINE

I- INTRODUCTION
=====

Parmi tous les précipités obtenus par fractionnement du lait maternel au sulfate d'ammonium, c'est le P7-8 qui possède l'activité bactériostatique et bifidigène la plus importante. Nous poursuivrons donc notre étude par la détermination de la nature des constituants présents dans le P7-8 et dans les fractions recueillies après chromatographie du P7-8 sur colonne de SP-Séphadex.

II- RESULTATS
=====

A- COMPOSITION DU PRECIPITE P7-8

1°] Analyse biochimique du P7-8

Les résultats de l'étude physicochimique et immunologique du P7-8, réunis dans le Tableau XV p. 84, sont une moyenne de 3 expériences.

Le P7-8 est très riche en lactotransferrine ($65 \pm 3 \%$) et le taux de cette glycoprotéine est relativement stable d'un P7-8 à l'autre. Nous avons dosé le fer contenu dans ce précipité afin de déterminer le degré de saturation en fer de la lactotransferrine. Le taux de fer dosé dans le P7-8 est de $0,17 \pm 0,05 \text{ ‰}$. Sachant que la lactotransferrine pure est saturée lorsqu'elle fixe $1,16 \text{ ‰}$ de fer, nous en déduisons que la lactotransferrine contenue dans le P7-8 serait saturée si elle en fixait $0,75 \pm 0,04 \text{ ‰}$. La lactotransferrine contenue dans le P7-8 est donc saturée au $1/4$ environ de sa capacité.

A côté de la lactotransferrine, la fraction pondérale-

ment la plus importante est constituée de sucres. Le P7-8 renferme 20 % de sucres répartis comme suit : oses neutres, $10,29 \pm 0,12$ % ; hexosamines, $7,3 \pm 0,4$ % ; acides sialiques, $2,36 \pm 0,34$ %.

Les dosages immunochimiques réalisés sur le P7-8 total révèlent la présence d'IgA et de pièce de sécrétion à des taux non négligeables. Le P7-8 renferme également du lysozyme (6 ± 1 %) hormis l'un des 3 précipités étudiés. Cette fraction protéique constitue une faible part du P7-8 [12 à 14 %].

2°) Fractionnement du P7-8 sur colonne de SP-Séphadex

Sur une colonne de SP-Séphadex C-50 [24 x 1,5 cm], équilibrée dans le tampon acétate de sodium 0,22 M, nous déposons 1 g de P7-8 en solution dans le même tampon. Puis, nous éluons par un tampon acétate de sodium 0,22 M et recueillons une première fraction : Fraction I. Dans un second temps, nous éluons la colonne par un tampon acétate de sodium 0,5 M et recueillons une deuxième fraction : Fraction II.

Ce fractionnement a été réalisé sur 3 précipités P7-8 dont les masses des fractions I et II recueillies et les rendements sont réunis Tableau XIV p. 83.

La fraction II recueillie après fractionnement du P7-8 sur colonne de SP-Séphadex est toujours obtenue en 2 fois plus grande quantité que la fraction I sauf dans le cas du fractionnement 2 où les fractions I et II ont sensiblement le même poids. Le rendement de ces fractionnements est de 90 ± 2 %.

3°) Analyse biochimique des fractions

Sur chacune des fractions recueillies, nous avons dosé les sucres et les constituants protéiques : les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau XV p. 84.

La fraction I renferme les IgA, la pièce de sécrétion,

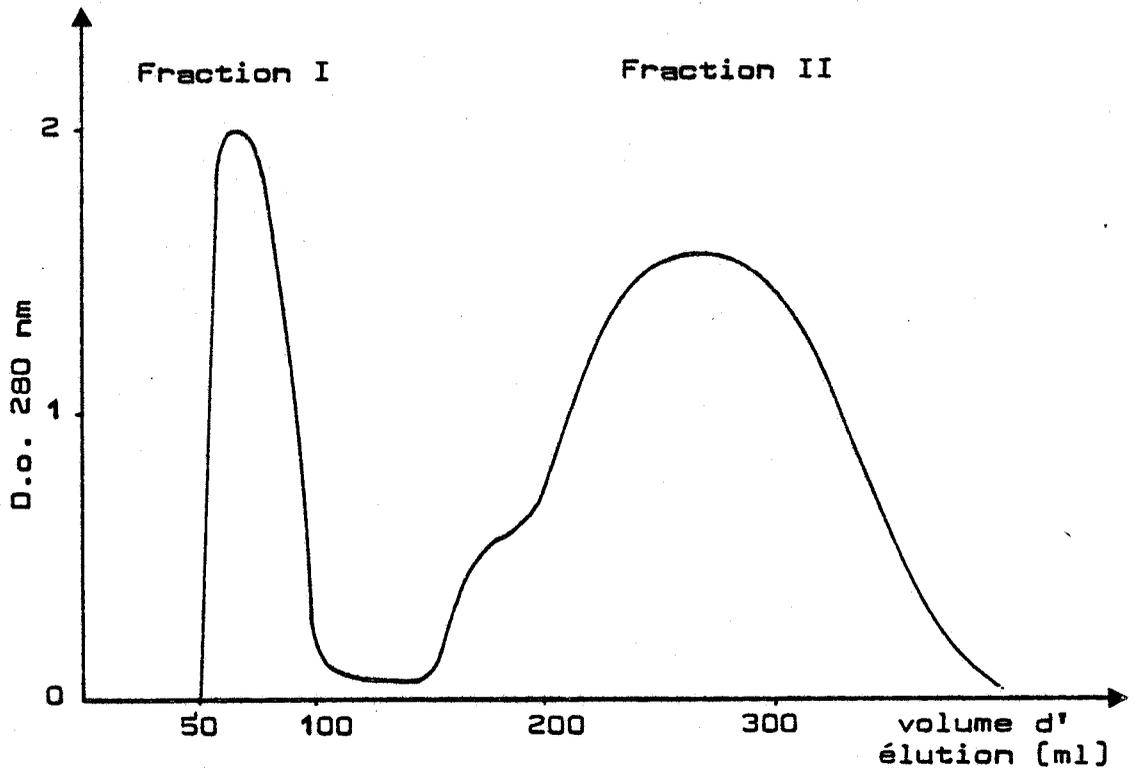


Figure 6 : Profil d'élution du P₇₋₈ chromatographié sur colonne de SP-Séphadex.

TABLEAU XIV

RESULTATS PONDERAUX DES FRACTIONNEMENTS
DE P₇₋₈ SUR SP-SEPHADEX

	Fractionnement 1	Fractionnement 2	Fractionnement 3
Fraction I (mg)	316	422	295
Fraction II (mg)	608	466	620
$\frac{\text{Fraction I}}{\text{Fraction II}} \times 100$	52 %	90,5 %	47,6 %
Rendement	92,4 %	88,8 %	91,5 %



TABLEAU XV

ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DU P7-8 ET DES
FRACTIONS I ET II OBTENUES AU COURS DU FRACTIONNEMENT
SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX

Pourcentages	Fraction I	Fraction II	P7-8
Oses neutres	21,85 ± 6,45	3,4 ± 0,3	10,28 ± 0,12
Hexosamines	17,5 ± 5,5	1,7 ± 0,9	7,3 ± 0,4
Acide sialiques	4,53 ± 1,04	0,88 ± 0,21	2,36 ± 0,34
Lactotransferrine (mg/100 mg)	3,2 ± 1,2	80 ± 15	65 ± 3
IgA (mg/100 mg)	3,62 ± 2,5	0	3,5 ± 2,7
Pièce de sécrétion (mg/100 mg)	5,84 ± 3,7	0,002 ± 0,002	5,8 ± 1,8
Lysozyme* (mg/100 mg)	0,61 ± 0,015	2,8 ± 0,14	6 ± 1

* Les moyennes sont réalisées sur 2 fractionnements car l'un des P7-8 est dépourvu de lysozyme.

et est très riche en sucres. La fraction I contient environ 82 % des sucres présents dans le P7-8.

La fraction I, constituée à 44 % par des sucres, renferme des glycopeptides dont la nature n'est pas encore connue et 2 % de lactotransferrine.

La fraction II, retenue sur SP-Séphadex et éluée lorsque la force ionique du tampon augmente, est constituée à 80 ± 15 % par de la lactotransferrine.

La fraction II renferme peu de sucres ($5,56 \pm 1$ %). Elle ne renferme pas d'IgA et la pièce de sécrétion est présente à l'état de traces. Le principal "contaminant" de la lactotransferrine dans la fraction II est le lysozyme ($2,8 \pm 0,14$ %).

Pour purifier la lactotransferrine et éliminer les traces de protéines contaminantes, la fraction II est rechromatographiée sur colonne de SP-Séphadex. La fraction éluee par l'acétate de sodium 0,5 M et appelée fraction II' n'est pas toujours exempt de lysozyme. Il est possible que le lysozyme soit associé à la lactotransferrine dans la fraction II isolée du P7-8.

Le complexe lactotransferrine-lysozyme ayant un comportement électrophorétique spécifique, nous poursuivrons donc nos investigations en étudiant le comportement électrophorétique de la lactotransferrine dans le P7-8 et les fraction I et II.

4°) Analyse électrophorétique

a) Acétate de cellulose

La lactotransferrine du P7-8 et la lactotransferrine de la fraction I ont le même comportement électrophorétique, sur acétate de cellulose. Elles migrent vers l'anode, dans la région des α . Par contre, la lactotransferrine de la fraction II ne migre pratiquement pas (Fig. 7 p. 86).

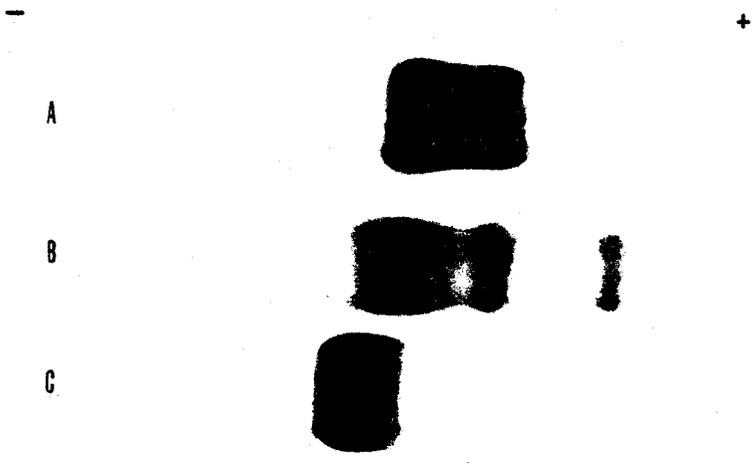


Figure 7 : Electrophorèse sur acétate de cellulose du P₇₋₈ (A), et des fractions I (B) et II (C).

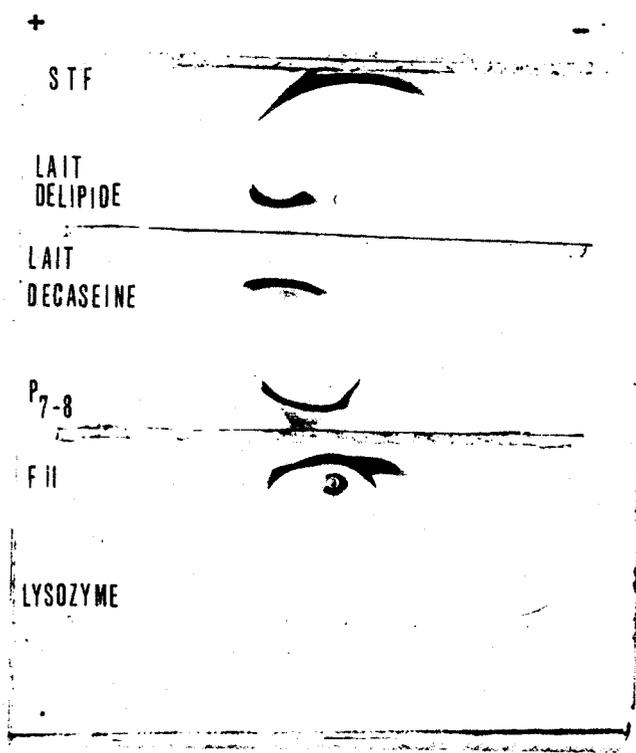


Figure 8 : Immunoélectrophorèse du lait maternel et du P₇₋₈ en présence d'un immunsérum de Lapin anti-lactotransferrine.



b) Immunoélectrophorèse

Nous avons suivi le comportement électrophorétique de la lactotransferrine par immunoélectrophorèse sur gélose, contre un immunosérum anti LTF.

Dans le lait humain délipidé, la lactotransferrine migre dans la région des α_2 -globulines. Après déca-séination, le comportement électrophorétique de la lactotransferrine se rapproche d'une B_1 -globuline. Au fur et à mesure des étapes de purification de la lactotransferrine, nous observons que son comportement se rapproche de celui des B_2 -globulines (Fig. 8 p. 86).

c) Electrophorèses bidimensionnelles

Le précipité P7-8 et les fractions I et II obtenues après fractionnement de ce précipité sur SP-Séphadex, ont été soumis à une électrophorèse bidimensionnelle. Le sérum utilisé est un sérum anti-lactotransferrine qui permet de mettre en évidence la lactotransferrine libre ou associée.

L'analyse des profils immunoélectrophorétiques obtenus (Fig. 9 p. 88) montre que :

- la lactotransferrine du P7-8 migre en partie vers l'anode et en partie vers la cathode. De plus, la présence d'un épaulement nous incite à émettre l'hypothèse que la lactotransferrine du P7-8 est formée de 2 populations.
- la lactotransferrine de la fraction I migre très fortement en direction de l'anode. La présence de 2 arcs superposés n'est pas élucidée.
- la lactotransferrine de la fraction II qui est presque pure ne migre pas du tout comme celle de la fraction III. Or, la lactotransferrine de la fraction III est pure.

L'analyse du comportement électrophorétique de la lactotransferrine montre des variations suivant son degré de purification. Dans le lait, la lactotransferrine se comporte comme une α_2 -globuline, quand elle est pure, elle migre dans la région des β_2 -globulines.

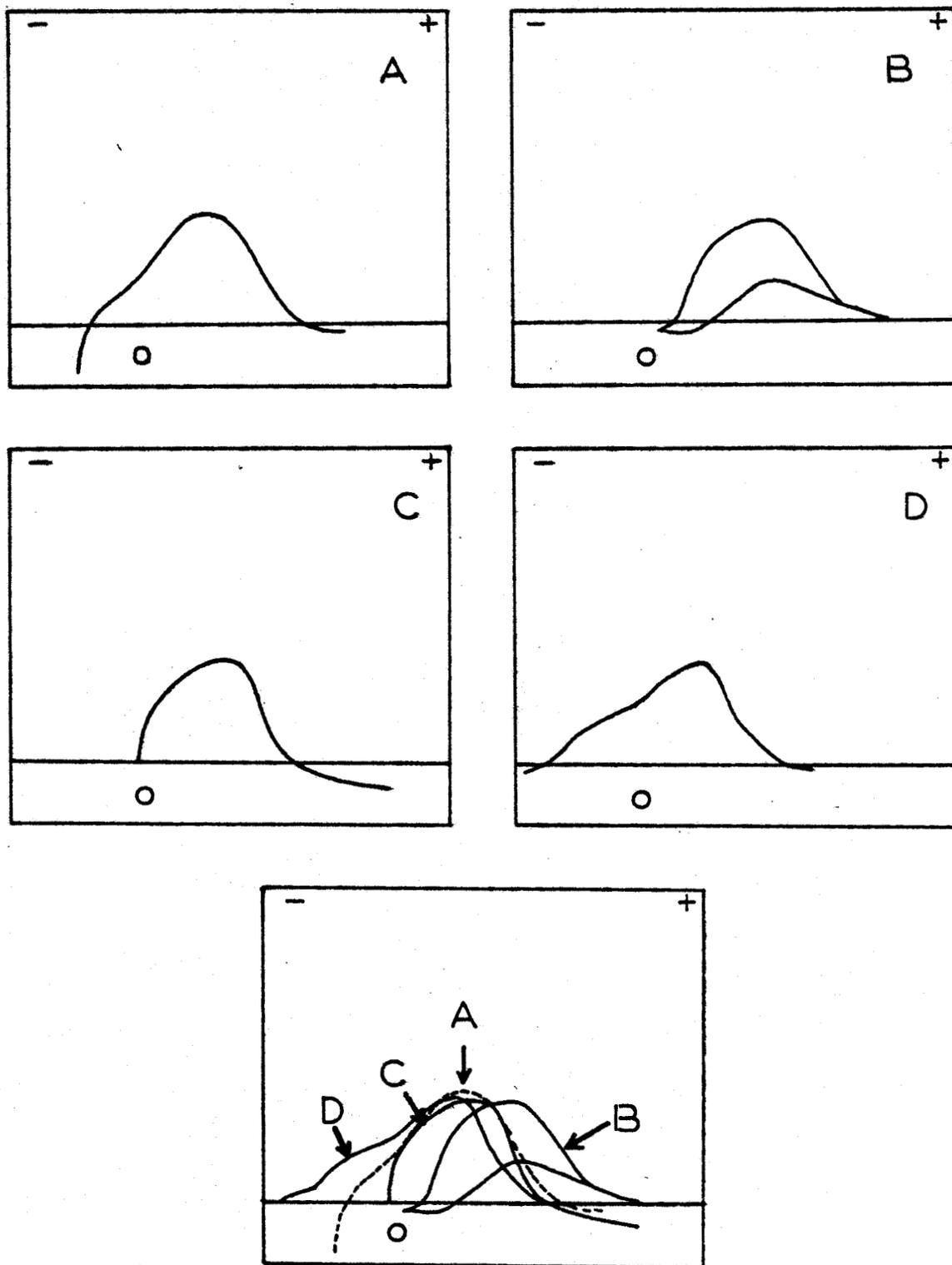


Figure 9 : Mise en évidence de la lactotransferrine dans le P_{7-8} total et les fractions obtenues après passage sur SP-Séphadex, par immunoelectrophorèse double contre un sérum anti-lactotransferrine.

A : P_{7-8} ; B : Fraction I ; C : Fraction II ;
D : Fraction II'.



L'analyse biochimique du P7-8 et des fractions obtenues après chromatographie sur SP-Séphadex met en évidence l'existence de 2 fractions de composition distincte : la fraction I qui renferme les glycopeptides et un peu de lactotransferrine et la fraction II formée de lactotransferrine à laquelle reste fortement associé le lysozyme. L'électrophorèse bidimensionnelle réalisée sur ces 2 fractions fait apparaître une différence de comportement électrophorétique de la lactotransferrine que nous attribuons à la présence d'associations. Ainsi, nous émettons l'hypothèse d'une association lactotransferrine-lysozyme et/ou lactotransferrine-glycopeptides qui fera l'objet de l'étude qui suit.

B- MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE LACTOTRANSFERRINE-LYSOZYME

1°] Isolement du complexe par gel filtration

La fraction II, recueillie après 2 passages sur colonne de SP-Séphadex, est soumise à une étape supplémentaire de chromatographie sur AcA 44 afin d'éliminer le lysozyme libre.

Sur une colonne d'AcA 44 (120 x 2,5 cm), équilibrée dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M, nous injectons 1 g de la fraction II. L'élution par le bicarbonate d'ammonium 0,1 M, présente le profil suivant, Fig.10 p. 90.

Le pic 1 est constitué de lactotransferrine et de lysozyme. Il représente 21 % des fractions recueillies.

Le pic 2, constitué de lactotransferrine immunoélectrophorétiquement pure, représente 70 % des fractions recueillies. Le pic 3 renferme le lysozyme libre.

L'analyse de ces 3 pics par électrophorèse sur acétate de cellulose dans un tampon véronal / HCl pH 7,6 montre que le pic 2 migre très peu. Le pic 1 migre plus nettement vers l'anode. Quant au pic 3 il a un comportement cathodique, propre au lysozyme (Fig 11 p. 90).

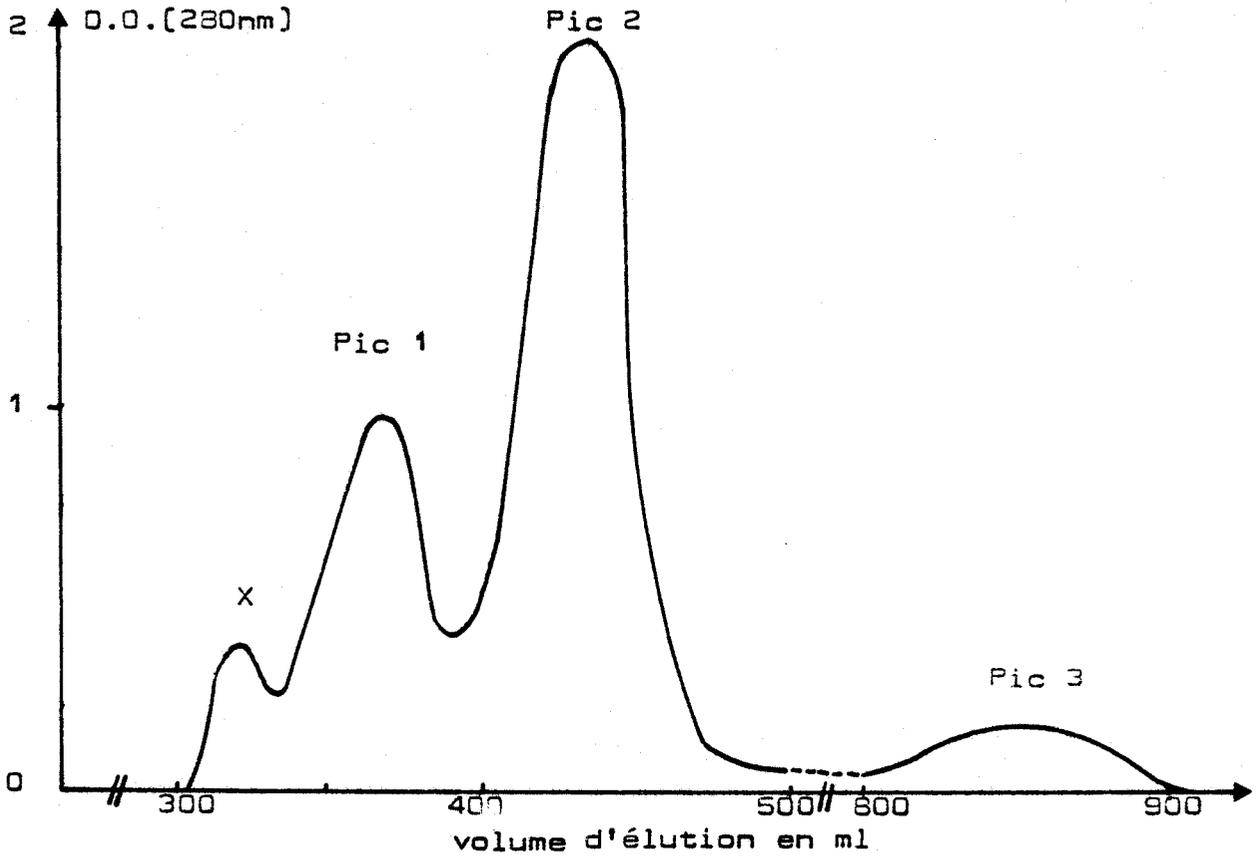


Figure 10 : Profil d'élution de la fraction II' isolée du P₇₋₈ sur une colonne d'AcA 44.

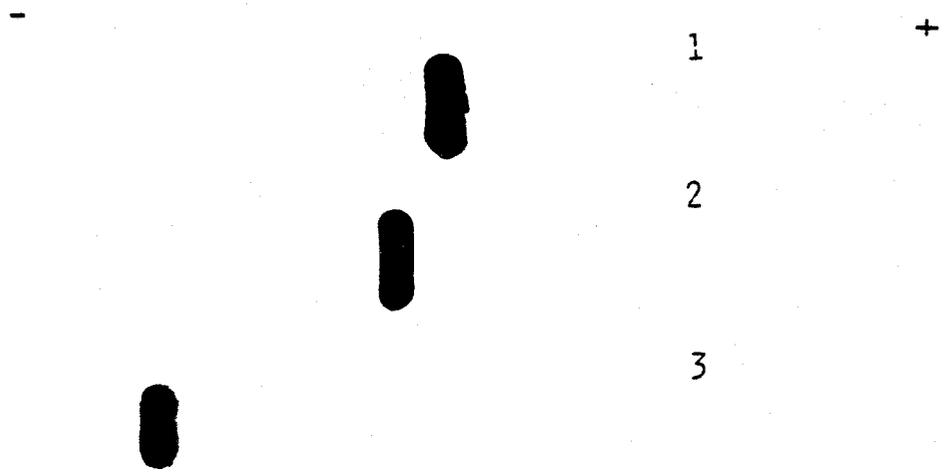


Figure 11 : Electrophorèse sur acétate de cellulose des fractions recueillies après chromatographie sur AcA 44.

- 1- complexe lactotransferrine-lysozyme
- 2- lactotransferrine
- 3- lysozyme



2°) Analyse du complexe lactotransferrine-lysozyme

a) Dosage des protéines

Le dosage du taux de lactotransferrine par l'immunodiffusion radiale et du taux de lysozyme par la méthode du lyso-plate montre que le pic 1 obtenu après chromatographie sur AcA 44 renferme 1 molécule de lactotransferrine pour 2 molécules de lysozyme.

b) Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation permet de calculer la masse moléculaire d'une molécule.

La détermination de la masse moléculaire du pic 1 obtenu par chromatographie sur AcA 44, a été réalisée dans une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN modèle E, équipée du système optique interférentiel de RAYLEIGH.

Le pic 1 est dissous dans un tampon Tris/HCl 0,1 M pH 7,05 à raison de 1 mg par ml de tampon, puis il est dialysé deux jours contre le même tampon. La centrifugation a été faite à 20°C, à la vitesse de 19 500 tpm ; l'équilibre de sédimentation est atteint en 6 heures. Puis nous avons appliqué la formule suivante :

$$M = \frac{2RT}{1 - \vartheta \rho} \frac{1}{C \omega^2} \frac{d \log c}{dr^2}$$

où M est la masse moléculaire de la protéine

$$R = 8,313 \times 10^7$$

$$T = 273 + \theta \quad \text{avec } \theta = \text{température de l'expérience en } ^\circ\text{C,}$$

ϑ = volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le solvant

C = densité du solvant

ρ = concentration de la solution

r = distance de l'axe de rotation

La masse apparente du pic 1 en utilisant le Vsp de la lactotransferrine 0,722 est de 136 000. L'utilisation du Vsp du lysozyme 0,702 donne une masse apparente de 127 400.

Sachant que ce composé contient de la lactotransferrine et du lysozyme, on peut en déduire qu'il renferme :

$$130\ 000 - 85\ 000 = 45\ 000$$

soit 3 molécules de lysozyme par molécule de lactotransferrine. D'après une étude de tamisage moléculaire, le poids moléculaire du composé formant le pic 1 est de 110 000. Cette valeur correspond à un complexe formé de 2 moléculaires de lysozyme par molécule de lactotransferrine.

c) Dichroïsme circulaire

Les études ont été menées dans le domaine spectral 350 - 250 nm. Cette région permet de visualiser des éléments de structure tertiaire et en particulier la présence de résidus aromatiques. Ces études ont été réalisées sur le lysozyme, la lactotransferrine et le complexe lactotransferrine-lysozyme.

Les spectres obtenus sont caractérisés par une large bande négative centrée vers 270 nm, due à la présence de ponts disulfures et par une petite bande positive centrée à 292 nm.

Le spectre du complexe lactotransferrine-lysozyme est très différent des spectres lactotransferrine seule et lysozyme seul. Ceci est une preuve supplémentaire de l'interaction entre les 2 protéines.

d) Immunoélectrophorèses

La mise en évidence du complexe lactotransferrine-lysozyme nous a amené à utiliser une méthode originale de marquage.

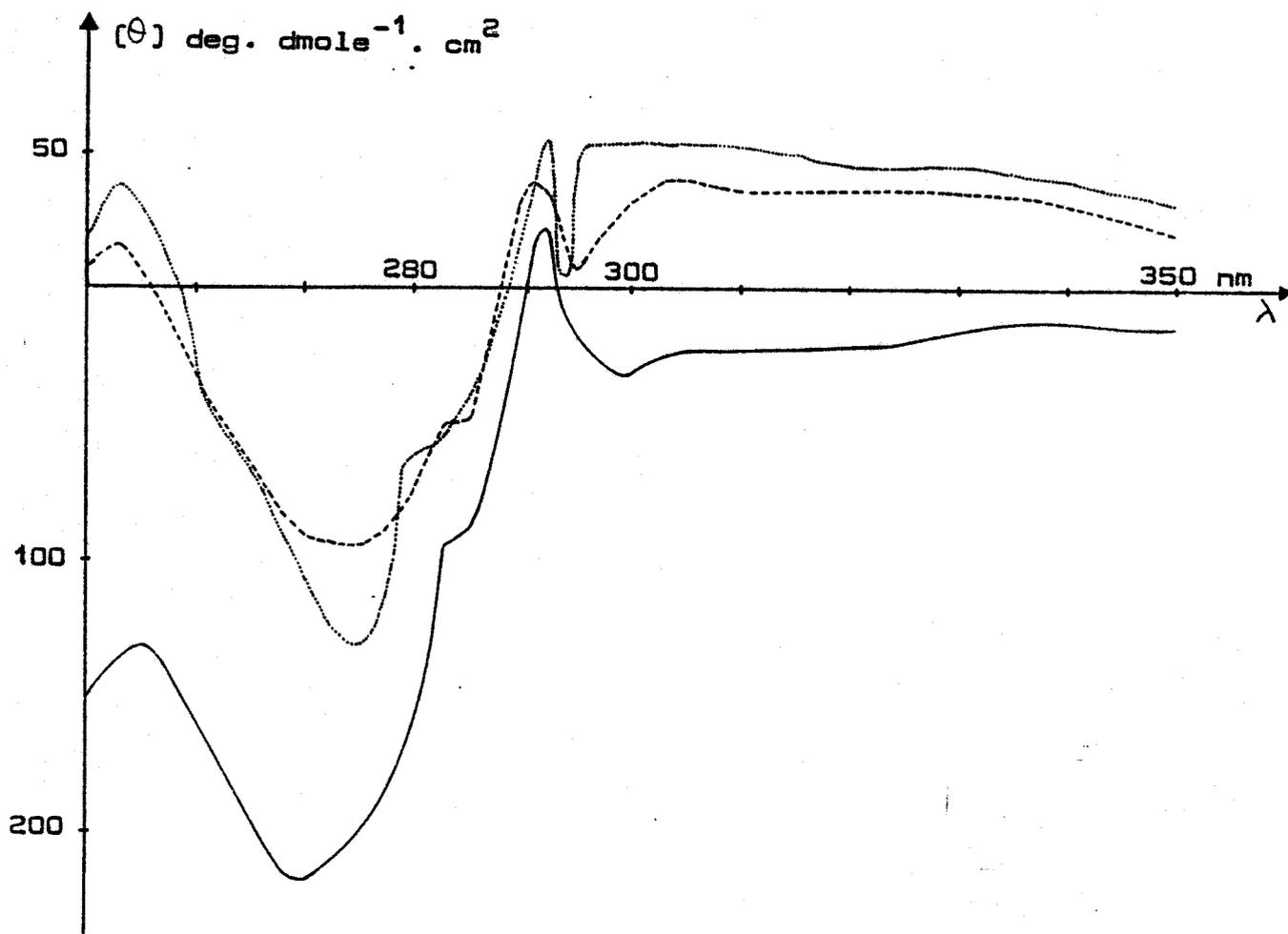


Figure 12 : Spectres dichroïques de la lactotransferrine [.....] du lysozyme [—] et du complexe lactotransferrine-lysozyme [-.....].

Après immunoélectrophorèse simple ou double sur gélose du complexe lactotransferrine-lysozyme contre un immun-sérum de lapin anti-lactotransferrine, la plaque est recouverte par une feuille d'acétate de cellulose imbibée d'une solution d'anticorps anti-lysozyme marqués à la fluorescéine. La technique de marquage des anticorps est décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes p. 135.

Les arcs de précipitation formés par le complexe lactotransferrine-lysozyme et les anticorps anti-lactotransferrine sont rendus fluorescents par les anticorps anti-lysozyme marqués qui réagissent avec le lysozyme présent dans les arcs de précipitation.

L'observation des arcs de précipitation fluorescents est réalisée après excitation à 488 nm par un faisceau Laser * (Laser à Argon).

L'immunoélectrophorèse simple montre que le lysozyme, à l'état pur, présente un comportement cathodique. En présence de lactotransferrine, il se comporte comme une B₂-globuline. Le comportement électrophorétique de la lactotransferrine purifiée et de la lactotransferrine complexée au lysozyme varie très peu.

L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle présente une plus grande variation de migration entre la lactotransferrine purifiée et la lactotransferrine complexée au lysozyme. Le profil obtenu est marqué par les anticorps anti-lysozyme fluorescents. L'observation du profil immunoélectrophorétique après excitation par un faisceau Laser montre que toute la surface délimitée par l'arc de précipitation est fluorescente.

De plus, nous avons remarqué que le profil obtenu par le complexe lactotransferrine-lysozyme est identique à celui de la Fraction II

* l'observation des plaques marquées à la fluorescéine a été réalisée dans le Laboratoire de Spectroscopie infra-rouge et Raman de Monsieur le Professeur DELHAYE que nous remercions vivement.

III- CONCLUSION

=====

Le précipité P7-8 est constitué de 2 fractions séparables par chromatographie sur colonne de SP-Séphadex. La fraction I, non retenue par le support de la colonne, est formée de glycopeptides essentiellement. La fraction II, retenue sur la colonne et éluée par une solution d'acétate de sodium 0,5 M, est constituée de lactotransferrine contaminée par du lysozyme.

L'analyse immunoélectrophorétique de la fraction II a mis en évidence l'existence d'un complexe lactotransferrine-lysozyme. Le complexe existe en petite quantité dans la fraction II (environ 20 %). Le rapport molaire $\frac{LTF}{LZM}$ semble être en faveur de 2 molécules de lysozyme par molécule de transferrine.

Le complexe lactotransferrine-lysozyme existe dans le lait maternel. Une étude de l'activité bactériostatique de ce complexe serait intéressante pour voir si la présence de lysozyme agit en synergie d'action avec le lactotransferrine.

Le complexe lactotransferrine-lysozyme n'est pas la seule association présente dans le lait. Masson (1970) a mis en évidence la présence d'un complexe lactotransferrine-caséine. Au laboratoire, DESCAMPS (1974) a réussi une association entre la lactotransferrine et les glycopeptides du P10. Récemment, nous avons réussi à associer la lactotransferrine avec les glycopeptides du P7-8. Le problème posé par l'existence de telles associations concerne leur rôle biologique.

ACTIVITE BACTERIOLOGIQUE DU P7-8
DANS LE TRAITEMENT DES DIARRHEES

Le traitement des enfants diarrhéiques par l'ingestion du P7-8 a été réalisé à l'Hôpital BRETONNEAU à Paris, dans le service du Professeur NAVARRO. Les contrôles bactériologiques ont été réalisés au laboratoire de Microbiologie du Docteur LAMBERT. Nous remercions tout le personnel qui a pris part à l'élaboration de ce travail.

I- INTRODUCTION
=====

Le traitement des diarrhées de l'enfant par le lait de femme a été envisagé depuis longtemps mais il pose des problèmes en raison de la présence du lactose mal toléré.

Les études précédentes ont montré l'activité bactériostatique et bifidigène du précipité P7-8 isolé du lait de femme et l'administration orale de ce P7-8 nous est apparue comme une solution thérapeutique prometteuse dans le cas de diarrhées graves chez des enfants dont les traitements classiques n'avaient donné aucun résultat.

Les traitements par le P7-8, réalisés dans le service du Professeur NAVARRO à l'hôpital BRETONNEAU (Paris), sont suivis de contrôles cliniques et bactériologiques. Les contrôles bactériologiques sont effectués au Laboratoire de Microbiologie du Docteur LAMBERT avant et après ingestion de P7-8.

II- PROTOCOLE
=====

Le protocole expérimental s'établit comme suit :

Les fractions sont administrées par voie orale en 2 prises par jour, à raison de 2 ou 4 g par jour (fractions P7-8), chez des enfants suspects de pullulation bactérienne intra-luminale : diarrhées prolongées avec note

dyskinétique, notions de décharges bactériémiques avec isolement de bactéries Gram [-], dyspéristaltisme post-chirurgical, après péritonite plastique, après entérocolite nécro-saute...

Une étude systématique de l'écosystème de l'enfant est effectuée avant cette administration. A cet effet, du liquide duodéal est prélevé stérilement et mis en culture le plus rapidement possible. L'analyse est effectuée selon une méthode inspirée par RAIBAUD et al., (1977) et utilisée lors d'études antérieures (LAMBERT-ZECHOVSKY et al., 1981). Les milieux choisis, coulés en boîte de Pétri sont destinés à l'isolement et à la culture d'un maximum d'espèces différentes aérobies et anaérobies.

La technique suivante est utilisée :

Un échantillon de liquide duodéal est dilué dans de l'eau distillée stérile. Des dilutions successives de 10 en 10 en eau distillée stérile de 10^{-2} à 10^{-9} sont réalisées.

- 0,1 ml de chaque dilution et de la suspension initiale estensemencée sur chaque type de milieu, l'étalement de l'inoculum étant effectué au moyen d'une pipette rateau.

- après incubation de 24 h à 48 h selon les milieux, on procède à la numération de toutes les colonies récupérées sur les boîtes, où la densité de culture le permet. En se rapportant à la dilution considérée, on peut établir le nombre de bactéries par gramme de selle [g/g]. Le seuil de détection de la technique est de 10^{-2} g/g.

- l'identification de chaque souche est réalisée au moyen des caractères culturels, biochimiques et immunologiques. Une étude du phénotype de résistance, de chaque souche isolée est faite systématiquement à l'aide d'un antibiogramme classique.

Après cette première étude, la fraction P7-S est administrée quotidiennement avec la posologie de 2 g/jour voire 4 g/jour.

Pendant cette période, les enfants nourris par diète élémentaire, administrée en continu, sont maintenus en apports caloriques quantitatifs et qualitatifs constants.

Après 10 jours d'administration de la fraction P7-8, outre les critères cliniques usuels, les critères de surveillance digestive (volume, aspect des selles, pH, sucres, ballonnement abdominal, vomissements), une 2ème étude de l'écosystème intestinal est faite selon la technique déjà exposée.

III- RESULTATS =====

A- ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE DU P7-8 "in vivo"

Les fractions P7-8 ont été administrées à 4 enfants âgés de 4 mois à 4 ans $\frac{1}{2}$, présentant une mauvaise tolérance aux protéines, une diarrhée néonatale et chronique d'origine essentiellement infectieuse et une stagnation pondérale.

Les effets du traitement ont été suivis par des examens bactériologiques dont les résultats sont résumés dans les Tableaux XVI et XVII p. 101, 102.

Dans les 4 cas considérés, l'ingestion de P7-8 provoque une amélioration de l'état de santé de l'enfant et un changement dans la flore intestinale de l'enfant.

L'analyse bactériologique montre que dans 2 cas sur 4, la flore intestinale de l'enfant est totalement bouleversée. L'ingestion de P7-8 pendant une dizaine de jours a suffi pour qu'apparaisse toute une flore nouvelle.

Le P7-8 provoque la disparition, ou tout au moins, la diminution du nombre de Staphylocoques et Streptocoques.

Le P7-8 n'a pas d'activité bactériostatique vis-à-vis de certaines souches d'E. coli puisqu'au contraire, il favorise leur développement. Ainsi, les souches d'E. coli I et II sont retrouvées dans le liquide duodéal de 2 enfants ayant ingéré du P7-8.



TABLEAU XVI

REPARTITION DES BACTERIES DANS LE LIQUIDE DUODENAL
AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR LE PRECIPITE P 7-8

	Iléostomie du 19 mars 1981	Iléostomie du 30 mars 1981
Isabelle R. née le 5/10/80	$3 \cdot 10^5$ Acinobacter anitratum $6 \cdot 10^5$ Pyocyanique P ₃ $2 \cdot 10^4$ Pyocyanique autoagglutinable $2 \cdot 10^4$ Staphylocoque DN + coagulable + $1 \cdot 10^4$ Streptocoque hémolytique	$7 \cdot 10^2$ Pyocyanique P ₁ $6 \cdot 10^4$ Klebsiella pneumoniae $1 \cdot 10^4$ Citrobacter $2 \cdot 10^4$ E. Coli I $2 \cdot 10^4$ E. Coli II 10^5 Streptocoque D
	Liquide duodénel du 25 mars 1981	Liquide duodénel du 13 avril 1981
Sandrine F. Née le 17/11/80	10^5 E. Coli 119 B ₁₄ 10^3 Pseudomonas Maltophilia $2 \cdot 10^4$ Staphylocoque DN + coagulable $2 \cdot 10^3$ Staphylocoque DN - $3 \cdot 10^3$ Streptocoque D $4 \cdot 10^5$ Streptocoque non groupable en A, B, C, G.	$9 \cdot 10^4$ E. Coli 119 B ₁₄ $4 \cdot 10^1$ Staphylocoque DN + coagulable + $6 \cdot 10^3$ Streptocoque D



TABLEAU XVII

REPARTITION DES BACTERIES DANS LE LIQUIDE DUODENAL
AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR LE PRECIPITE P 7-8

	Liquide duodéal 9 février 1981	Liquide duodéal 19 février 1981
Alan M. Né le 3/7/80	$2 \cdot 10^5$ Klebsiella pneumoniae $3 \cdot 10^4$ Enterobacter cloacae I 10^4 Enterobacter cloacae II $5 \cdot 10^5$ Staphylocoque DN + coagulable +	$2 \cdot 10^5$ Klebsiella pneumoniae $3 \cdot 10^5$ Enterobacter cloacae II $1 \cdot 10^5$ Staphylocoque DN + coagulable + 10^4 Pyocyanique P ₄ $6 \cdot 10^3$ Steptocoque D
	Liquide duodéal 13 mars 1981	Liquide duodéal 23 mars 1981
Judith C. Née le 24/11/78	$6 \cdot 10^2$ Erwinia $8 \cdot 10^4$ Staphylocoque DN + coagulable +	10^5 Staphylocoque DN + coagulable + 10^5 Steptocoque non groupable en A, B, C, G 10^3 Klebsiella pneumoniae $2 \cdot 10^3$ E. Coli I $2 \cdot 10^2$ E. Coli II ₃₆ B ₇ $8 \cdot 10^2$ Pyocyanique P ₆ $3 \cdot 10^3$ Staphylocoque DN



Le P7-8 n'agit pas sur une seule souche bactérienne mais sur toutes les bactéries présentes afin de recréer un équilibre qui s'était rompu. Il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives sur l'activité bactériostatique du P7-8 in vivo en se basant sur 4 cas seulement.

Néanmoins, dans tous les cas, une amélioration de l'état physiologique des malades est observée. Les patients présentaient, avant le traitement, une intolérance aux protéines du lait de vache et parfois même aux protéines du lait de femme. Les résultats obtenus, après traitement par le P7-8, se traduisent par la disparition de l'intolérance aux protéines lactées et une reprise de poids.

B- ACTIVITE BACTERIOLOGIQUE DU P7-8 "in vitro"

1°) Activité bactériostatique

L'activité bactériostatique du P7-8 a été mise en évidence, in vitro, grâce à l'utilisation d'E. coli 0111 B4 [voir p. 76]

Les fractions I et II, recueillies après passage du P7-8 sur colonne de SP-Séphadex, ont fait l'objet d'une étude détaillée au chapitre III p. 81 . Dissoutes dans le Ringer-Trypton, elles sontensemencées par E. coli 0111 B4. Après 15 h de culture, les résultats obtenus sont les suivants :

- Fraction I [0,25 ou 0,5 mg/ml] $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml
- Fraction II [0,5 mg/ml] 10^7 bactéries/ml
- Fraction I + II [0,5 mg/ml + 0,5 mg/ml] 10^8 bactéries/ml

La fraction I, très riche en sucres, n'a aucune activité bactériostatique, mais elle ne favorise pas non plus la croissance d'E. coli 0111 B4. Le nombre de bactéries obtenues est le même que dans le témoin. La fraction II, constituée presque exclusivement de lactotransferrine,

possède toute l'activité bactériostatique du P7-3. Mais le P7-3 présente aussi une activité bifidigène qui pourrait être supportée par la fraction riche en sucres.

2°) Activité bifidigène

L'étude de l'activité bifidigène a été réalisée sur 2 précipités P7-3 différents et sur les fractions I et II qui en découlent.

La fraction I, principalement formée de glycopeptides, contient un facteur de croissance utilisé par les souches appartenant à l'espèce B. Bifidum. La souche C6, appartenant à l'espèce B. Infantis, est également favorisée par la présence de la fraction I dans son milieu de culture.

L'activité bifidigène de la fraction II, comme le montre le Tableau p. 103, est beaucoup plus équivoque. Ainsi la fraction II isolée de certains P7-3 favorise la croissance de toutes les souches de B. bifidum, B. longum et B. infantis analysées. A l'inverse, la fraction II de certains P7-3 ne possède aucune activité bifidigène alors que le P7-3 de départ induit la croissance des souches testées. L'analyse biochimique des fractions II n'a révélée aucune différence notable de composition.

Le remélange des fractions I et II, en quantités égales, régénère l'activité bifidigène du P7-3 de départ. Mais il ne semble pas y avoir synergie d'action entre les fractions I et II. Il se produit seulement une addition de l'activité de chacun des pics.

TABLEAU XVIII

ACTIVITE BIFIDIGENE DU P7-8 AVANT ET APRES
CHROMATOGRAPHIE SUR SP-SEPHADEX

Espèces	Souches	P7-8	Fraction I	Fraction II	FI + FII (1mg + 1mg)
B. bifidum	AA 2/2	+	+	+	-
	B 536	+	+	+	+
	Bif. Nantes	+	+	+	+
B. longum B. infantis	LMa 3	+	-	+	+
	B. long. coll	+	-	+	+
	C6	+	+	+	+
	B. inf. S ₂	+	-	+	+

* les fractions sont utilisées à la concentration de 2 mg/ml

Espèces	Souches	P7-8	Fraction I	Fraction II	FI + FII (1mg + 1mg)
B. bifidum	AA 2/2	=	-	-	-
	B 563	+	+	-	+
	Bif. Nantes	+	+	-	+
B. longum B. infantis	LMa 3	-	-	-	-
	B. long. coll	-	-	-	-
	C6	+	+	+	+
	B. inf. S ₂	+	-	-	-

* les fractions sont utilisées à la concentration de 2 mg/ml



IV- CONCLUSION

=====

Le P7-3 possède une double activité bactériologique : activité bactériostatique et activité bifidigène. Le fractionnement du P7-3 par chromatographie sur colonne de SP-Séphadex permet de montrer que l'activité bactériostatique est liée, exclusivement, à la fraction II c'est-à-dire à la fraction constituée presque exclusivement de lactotransferrine.

L'activité bifidigène est moins localisée ; selon le P7-3 utilisé, la fraction I favorise plus ou moins la croissance des souches bifides. Toutefois, l'activité bifidigène de la fraction I est plus sensible sur les souches appartenant à l'espèce B. bifidum. Ces souches ont besoin de N-acétyllactosamine pour croître et semblent trouver, dans la fraction I et le P7-3, le facteur indispensable à leur croissance.

L'activité bifidigène de la fraction II peut être totale (1er tableau p. 104) ou inexistante. Une étude physico-chimique plus détaillée que celle réalisée au chapitre III p. 81 serait nécessaire pour expliquer cette différence radicale dans l'activité bifidigène des fractions II isolée du P7-3.

In vivo, le P7-3 a un effet positif dans le traitement des diarrhées rebelles de l'enfant. Les résultats sémiologiques sont encourageants : disparition de l'intolérance aux protéines lactées, reprise de poids... Néanmoins, les résultats bactériologiques indiquent la persistance d'une flore pathogène dans le liquide duodéal des patients. Une recherche de la flore bifide après le traitement par le précipité P7-3 aurait été souhaitable afin de vérifier l'activité bifidigène du P7-3, in vivo.

CONSERVATION DES PROTEINES
DU LAIT MATERNEL ET DU P7-8 AU COURS
DES TRAITEMENTS DE STERILISATION

Le traitement des laits maternels par la chaleur et les tests bactériologiques effectués avant et après pasteurisation ont été réalisés au Lactarium de Paris et nous tenons à remercier Madame AUBRY et Madame le Docteur SARROIS-LAROUZE pour tout le travail effectué.

Les analyses physiques de dichroïsme circulaire et d'absorption en U.V. différentielle ont été réalisées par Monsieur AUBRY de l'URCL que nous remercions vivement.

I - INTRODUCTION
=====

L'amélioration des procédés de stérilisation des laits de lactarium a fait l'objet d'un contrat, obtenu par le Laboratoire, avec le Ministère de la Santé.

La conservation des laits de lactarium nécessite l'élimination préalable des germes par des traitements thermiques. A l'heure actuelle, les traitements les plus variés sont utilisés dans les différents lactariums, qui vont de la pasteurisation à 65° - 72° C jusqu'à la stérilisation à 100° - 105° C. Or on sait que les hautes températures appliquées pendant des temps prolongés entraînent la dénaturation partielle, ou totale, de tous les composés thermostables, des protéines en particulier.

Dans la littérature, on trouve quelques études traitant de la conservation des laits de lactarium mais, soit les conditions opératoires utilisées ne correspondent pas à celles des lactariums, soit les études sont nettement incomplètes. Nous nous proposons d'utiliser les machines et les conditions opératoires en vigueur dans les lactariums [voir Matériel et Méthodes p. 147] afin d'étudier les effets de

la chaleur, à la fois sur la dénaturation physicochimique et sur la perte des propriétés biologiques des 3 protéides suivants : IgA, lactotransferrine et lysozyme, impliqués dans les mécanismes de défense de l'intestin du nourrisson contre les germes pathogènes. Nous y ajouterons une étude de la destinée de l'activité bactériostatique du lait entier.

II- RESULTATS =====

A- PASTEURISATION DU LAIT MATERNEL

1°] Tests bactériologiques

Avant pasteurisation, une numération des germes contenus dans le lait est réalisée. La moyenne de ces numérations est égale à $1,9.10^7$ germes/ml de lait, mais avec de larges variations allant de $3,2.10^4$ germes/ml à 2.10^8 germes/ml. Parmi ces germes, nous notons la présence de $1,9.10^7$ bactéries Gram (-) et de 10^4 Staphylocoques par ml de lait.

Les bactéries Gram (-) les plus fréquemment rencontrées sont : Enterobacter floacae, Klebsiella pneumoniae, Serratia liquefaciens, Citrobacter freundii et Pseudomonas. Les souches de Staphylocoque-coagulase et aureus sont présentes dans tous les laits non pasteurisés.

Après pasteurisation à 72°C 15 sec et à 63°C 20 ou 30 mn, les tests bactériologiques sont négatifs c'est-à-dire que la numération sur gélose au sang donne un nombre de germes inférieur à 10 par ml de lait.

Lorsque la pasteurisation est effectuée à 53°C 30 mn, par le pasteurisateur LYON H.M, deux cycles de chauffe sont nécessaires pour obtenir un test bactériologique négatif.

2°] Dénaturation des protéines

Les dosages des taux de lactotransferrine et d'IgA présents dans les laits avant et après pasteurisation sont effectués par la technique d'immunodiffusion radiale [voir p.138].

TABLEAU XIX

TAUX DE SURVIE DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DES sIGA
APRES PASTEURISATION.

Equipement/ N° d'expériences	Température/ durée	sIGA (% survie)	Lactotransferrine (% survie)	Capacité fixation de Fer(% C.F.F initiale)
Pasteurisateur OXFORD H.M /3	63°C/30mn	88,3 ± 3,7	60,3 ± 5,1	51,2 ± 6,5
CM 30/C	63°C/30mn	69,5 ± 17,5	15,9 ± 4,7	7 ± 0,4
Tyndaliseur /3	65°C/20mn	74,7 ± 11,6	28 ± 8	31,8 ± 9,2
Pasteurisateur INSTST THURON /3	70°C/15sec	80,2 ± 7,8	40,3 ± 6,7	37 ± 6,6



TABEAU XX

SURVIE DES PROTEINES ET DE LEUR ACTIVITE
APRES TRAITEMENT PAR LE PASTEURISATEUR

LYON H.M

	Immunoglobulines Iga (% survie)	Lactotransferrine % survie	Capacité fixation du fer(%)	Activité lytique du LZM
50°C 30 mn 1 cycle (15)	94,4 ± 5,2	93,5 ± 5	89 ± 15	106 ± 6
50°C 30 mn 2 cycles	91,2 ± 7,4	90 ± 8,4	81,7 ± 15	103,2 ± 11
65°C 20 mn	57,7 ± 9,5	14,8 ± 5,5	4,8 ± 1,5	90 ± 10



Le taux de capacité de fixation en fer [voir p. 138] a été déterminé sur tous les laits afin de savoir si la lactotransferrine "survivante" conservait son activité biologique.

La méthode du lyso-plate permet d'obtenir directement le taux d'activité lytique du lysozyme.

Les résultats de ces dosages, réunis dans les Tableaux XIX et XX, p. 108 -109, sont exprimés en pourcentage de la valeur initiale dans le lait cru et correspondant à une moyenne de plusieurs expériences, réalisées sur des lots de lait maternel différents.

De bons résultats ont été obtenus avec le pasteurisateur OXFORD H.M à 63°C/30 mn, mais seulement 3 expériences ont été réalisées. Après pasteurisation, le lait renferme encore 36 % d'IgA et 60 % de lactotransferrine active.

Des variations considérables ont été observées en utilisant des conditions opératoires identiques (63°C/30 mn) ou similaires (65°C/20 mn) avec des appareils différents. Ainsi, le tyndaliseur (65°C/20 mn) qui est utilisé dans la plupart des lactariums de France, provoque une dénaturation de 72 % de lactotransferrine et de 25 % d'IgA présents dans le lait. Le pasteurisateur CM 30 (63°C/30 mn) provoque des pertes légèrement supérieures à celles du tyndaliseur.

Le pasteurisateur haute température THONON (72°C/15sec) entraîne une perte de 60 % de la lactotransferrine. Les expériences n'ont été réalisées que trois fois car l'appareil n'est pas au point.

Les résultats obtenus avec le pasteurisateur LYON H.M. (56°C/30 mn 2 fois) sont encourageants. Après 2 cycles de chauffe, seulement 10 % de la lactotransferrine est dégradée. La perte en IgA est très faible et le lysozyme conserve toute son activité. Les pertes en protéines sont énormes lorsque l'on passe à une température de pasteurisation égale à 65°C/20 mn.

Entre 56°C et 65°C, les protéines subissent une forte dénaturation, quelque soit le pasteurisateur utilisé. Pour déterminer la température limite, à partir de laquelle le taux de protéines dans le lait chute fortement, une gamme de températures a été effectuée.

TABLEAU XXI

SURVIE DES PROTEINES DANS LE LAIT MATERNEL
 APRES PASTEURISATION A DIFFERENTES TEMPERATURES
 PAR LYON H.M.

Températures	Immunglobulines A [% survie]	Lactotransferrine [% survie]	Capacité de fixation du fer [%]	Activité lytique du lysozyme
56°C 30 mn	79 ± 0,6	80,4 ± 0,1	76,4 ± 0,2	103 ± 2,5
58°C 30 mn	72,6 ± 1,1	63,5 ± 8	61,1 ± 7,9	101 ± 3
60°C 30 mn	62 ± 2,2	25,2 ± 9	20 ± 8,6	92,8 ± 0,2
62°C 30 mn	49 ± 4,4	5,8 ± 0,9	7,3 ± 1,3	89 ± 2
64°C 30 mn	35°C ± 2	3 ± 0,6	4,7 ± 2	99 ± 2



L'étude a été réalisée avec le pasteurisateur LYON H.M. Le lait est pasteurisé à 56°C, 60°C, 62°C et 64°C pendant 30 mn. Les résultats des dosages réalisés sur 2 lots de lait maternel et réunis dans le Tableau XXI p. 111, montre que :

- la dénaturation des IgA est progressive et linéaire entre 56°C et 64°C. Une élévation de température de 2°C entraîne une perte de 7 % d'IgA.
- la lactotransferrine subit une forte dénaturation entre 58°C et 60°C. Le taux de lactotransferrine, dosé dans le lait chute de 38,3 %. La diminution du taux de capacité de fixation du fer est égale à 41,1 %.
- le lysozyme ne subit pas de perte notable de son activité, même à 64°C.

La lactotransferrine est plus sensible à la chaleur que les IgA et le lysozyme. Il existe une température seuil, au-delà de laquelle la dénaturation de la lactotransferrine est presque totale. Cette température seuil est comprise entre 58°C et 60°C.

3°) Activité bactériostatique du lait après pasteurisation

Le lait, chauffé à différentes températures dans le pasteurisateur LYON H.M., est délipidé et ajusté à pH 7,2 avec NH_4OH 0,1 N. Il estensemencé par E. coli 0111 84.

Les résultats des numérations, effectuées après 5 h et 24 h de culture, sont représentés Fig. 12 p. 113. Le lait témoin, bouilli à 100°C pendant 15 mn sert de référence.

Les laits crus et traité à 56°C ont une activité bactériostatique puissante. Après 5 h de culture, le nombre de bactéries est à peu près égal à l'inoculum de départ : dans le lait cru, l'inoculum de départ est multiplié par 10 après 24 h de culture et seulement par 2 dans le lait traité à 56°C.

Le lait pasteurisé à 53°C 30 mn conserve une légère activité bactériostatique : mais les laits chauffés à 60°C, 62°C et 64°C n'ont plus aucun effet.

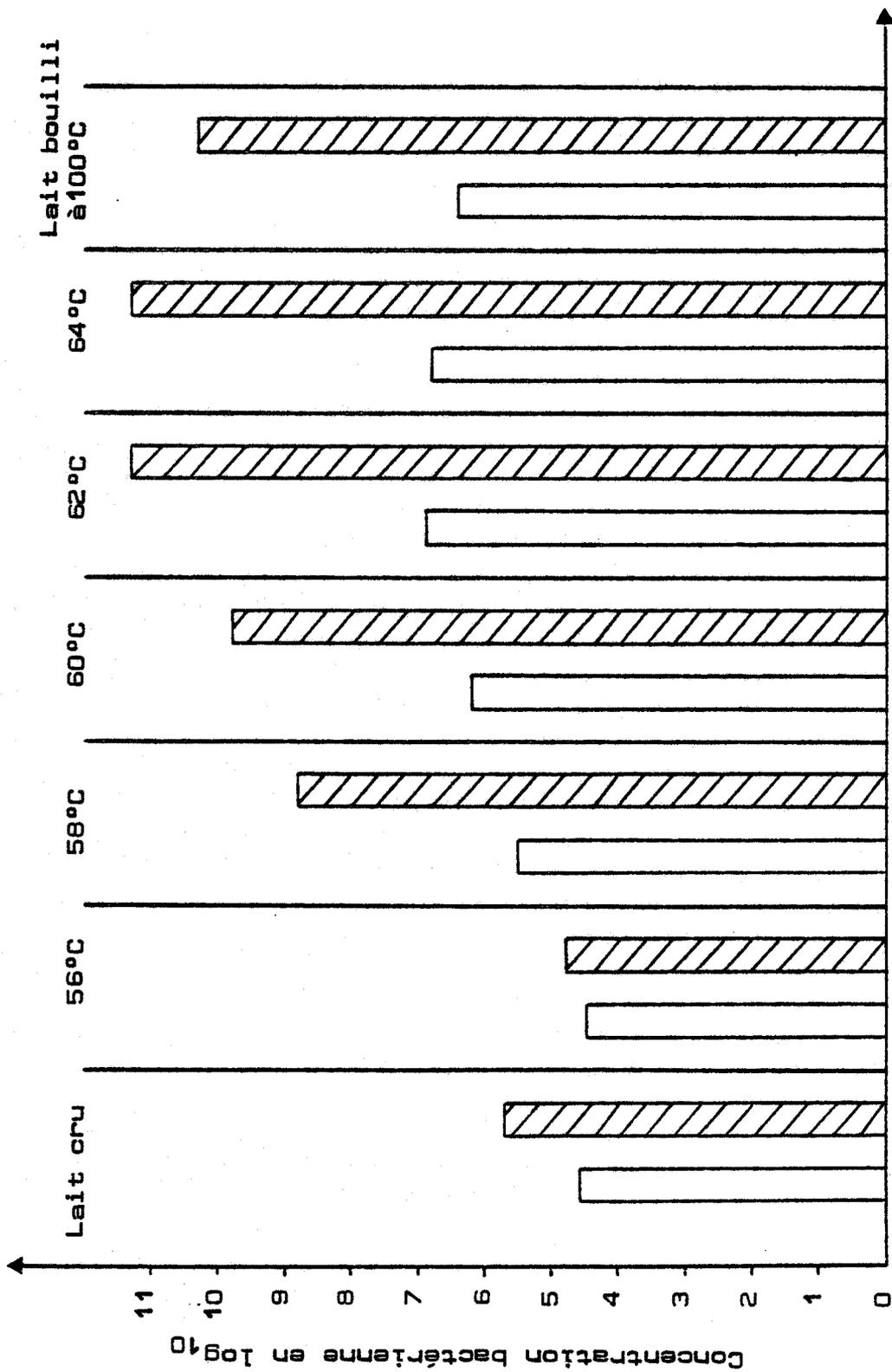


Figure 14 : Activité bactériostatique du lait maternel après pasteurisation à différentes températures.



Le lait maternel perd son activité bactériostatique après traitement par la chaleur à 58°C 30 mn.

B- DENATURATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DU P7-8 PAR LA CHALEUR

Ces essais ont été réalisés au laboratoire sur de petites quantités de P7-8 et de lait maternel qui nous sert de référence.

Dans un pilulier en pyrex, nous introduisons 10 ml d'une solution de P7-8 dilué à 4 % dans du sérum physiologique. Le pilulier est placé dans un bain-marie dont la température est fiable à $\pm 2^\circ\text{C}$. Le couvercle du pilulier est percé et un thermomètre est introduit pour surveiller la température de la solution. La température de pré-chauffage, pour amener la solution à la température voulue, est d'environ 10 mn. Après 30 mn de chauffage, la solution de P7-8 est refroidie brusquement dans un mélange eau-glace.

Cette expérience a été réalisée sur 3 P7-8 différents et sur 3 laits totaux provenant de mères différentes. Les températures utilisées sont $56^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $64^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Après refroidissement, les laits sont délipidés par centrifugation, puis la quantité de lactotransferrine restante est dosée par immunodiffusion radiale sur les P7-8 et les laits délipidés. Les résultats obtenus, exprimés en pourcentage de protéines dosées, sont exprimés dans le tableau suivant :

Température	P7 - 8	Lait total
56°C 30mn	74,5 \pm 5	93 \pm 4,7
60°C 30mn	71,5 \pm 3,2	91,5 \pm 3,6
64°C 30mn	40 \pm 7,3.	8,2 \pm 2

Jusqu'à une température de 60°C, la lactotransferrine dans le lait résiste mieux à la chaleur. A 56°C \pm 2°C, le P7-8 perd 25 % de lactotransferrine tandis que le lait n'en perd que 6 % soit 4 fois moins. Une élévation de température de +4°C n'entraîne pas de changement ; la perte est à peine plus élevée.

Après 30 mn de chauffage à 64 \pm 2°C, le précipité P7-8 renferme encore 40 % de lactotransferrine. Le lait entier, traité dans les mêmes conditions, ne renferme que 8,2 % de lactotransferrine intacte.

La lactotransferrine est plus ou moins dégradée suivant qu'elle soit presque pure ou en mélange dans le lait. Dans le lait, la lactotransferrine est bien protégée de la dénaturation par la chaleur jusqu'à une température de 60°C 30 mn. Puis, à 64°C, elle est nettement moins bien protégée dans le lait que dans le P7-8. Cette observation, étrange, n'est pas expliquée. Nous poursuivons notre étude par des expériences de dichroïsme circulaire et d'absorption en U.V. différentielle.

C- ANALYSES PHYSIQUES

1°) Dichroïsme circulaire

Les études ont été menées dans le domaine spectral 350-250 nm. Cette région permet en effet de visualiser des éléments de structure tertiaire et en particulier la présence de résidus aromatiques.

Ces études ont été réalisées sur le lactosérum déca-séiné par la Renine, sur le P7-8 et sur la lactotransferrine native et la lactotransferrine désaturée.

Tous les spectres dichroïques obtenus sont caractérisés par une large bande négative centrée vers 275 nm. Cette bande est due à la présence de ponts disulfures. Vers 205 nm, une autre bande dichroïque est visible ; elle est due aux résidus de tyrosine et de tryptophane.

On peut résumer les résultats de la façon suivante :

- lactosérum décaséiné : 2 zones de stabilité thermique
le lactosérum est parfaitement stable jusqu'à 50°C puis il subit une légère dénaturation si on poursuit le chauffage jusqu'à 63°C pendant 1 heure. Au delà de cette limite, il y a dénaturation totale.
- P7-8 : dénaturation à 63°C après 1 heure de chauffage.
- lactotransferrine native : dénaturation à 63°C
- lactotransferrine désaturée : dénaturation à 56°C.

Une étude de restructuration a été entreprise sur le lactosérum décaséiné. Pour cela l'échantillon est chauffé à 56°C ou à 63°C durant différents temps (30 mn et 1 h) puis il est refroidi à 25°C très rapidement ou très lentement. En aucun cas nous n'avons pu observer de rénaturation. Cependant, le refroidissement très rapide empêche la dénaturation de se poursuivre alors que le refroidissement très lent (2 à 3 h) permet au phénomène de se poursuivre un peu.

L'étude par le dichroïsme circulaire de la structure secondaire des différents échantillons nous a donné pratiquement les mêmes résultats. Il faut cependant noter la différence de concentration utilisable dans ce domaine spectral 250-190 nm. On passe de 1 mg/ml à 0,1 mg/ml.

- lactosérum décaséiné : pas de dénaturation observable
- P7-8 : changement de conformation après chauffage à 63°C
30 mn mais pas de destruction totale.
- lactotransferrine native : stable après chauffage à 63°C
1 h destruction à 70°C
- apolactotransferrine : début de dénaturation dès 63°C
15 mn

Les différences observées entre les 2 domaines dichroïques sont dues à la différence de concentration protéique.

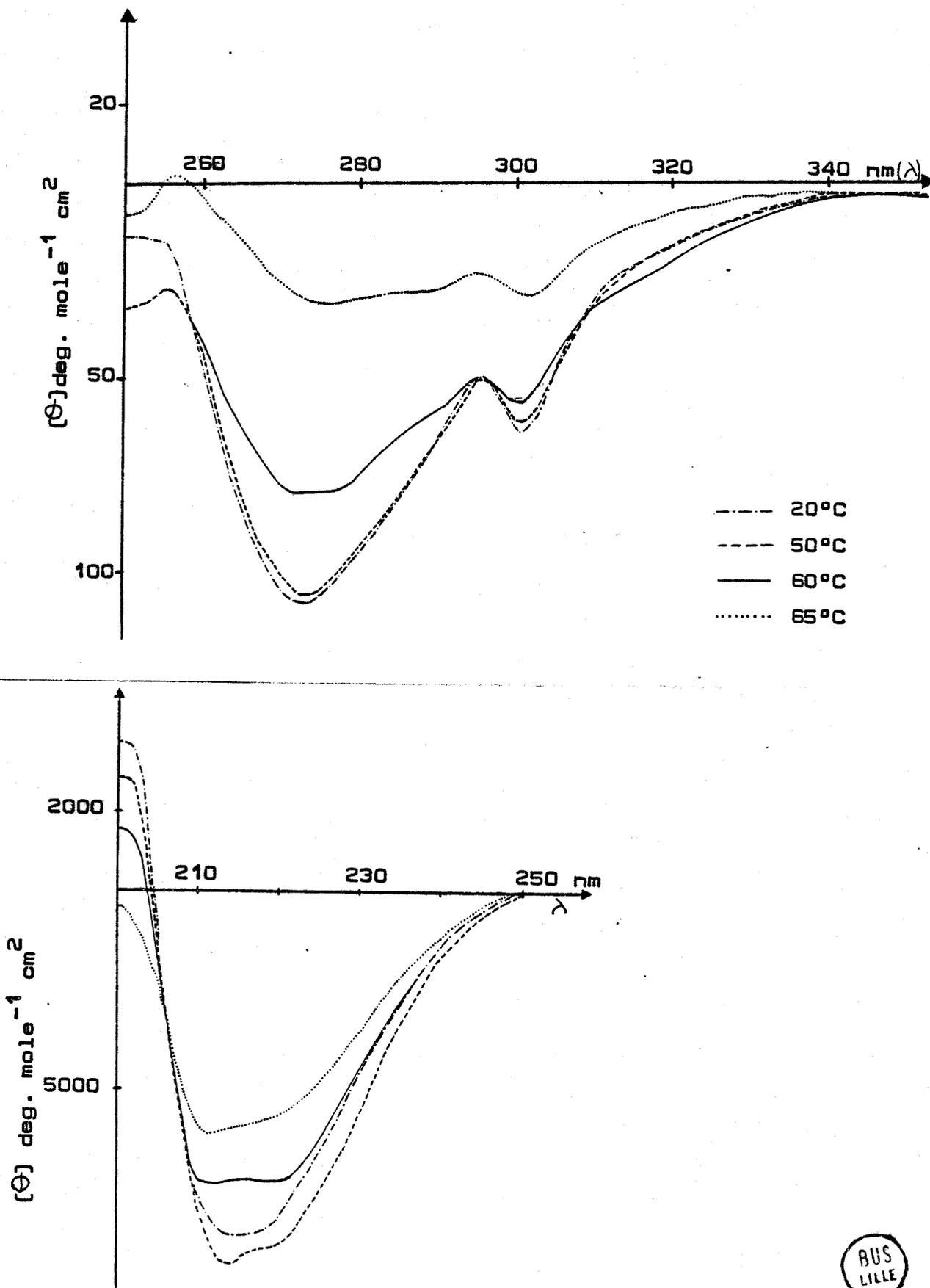


Figure 15 : Etude dichroïque de la lactotransferrine humaine chauffée à différentes températures.



2°] Absorption ultra-violette différentielle

Cette technique a été utilisée, non pas pour déterminer le nombre de résidus aromatiques exposés, mais pour suivre tous changements conformationnels autour et/ou au niveau de ces résidus. De plus, tout début de précipitation dans le milieu sera immédiatement détecté par l'apparition de turbidité mesurable aux plus hautes longueurs d'onde.

Les spectres différentiels ainsi obtenus montrent de nombreux pics à 300, 294, 288, 270, 266, 260 et 253nm. Les pics situés aux plus hautes longueurs d'onde correspondent aux résidus de tyrosine et de tryphophane et les pics situés aux plus basses longueurs d'onde correspondent aux résidus de phénylalanine et d'histidine.

Lorsque le chauffage est doux et progressif, on observe une augmentation de tous ces pics qui traduit une plus grande mobilité des chromophores, liée à l'écart de température. Ce phénomène est linéaire tant qu'aucun changement de structure secondaire ou tertiaire n'apparaît. Dès qu'un changement intervient, on observe une rupture de pente et il est ainsi possible de déterminer la température limite de stabilité structurale [Fig. 15 p. 119].

Nous avons donc tracé pour les 4 échantillons les courbes $D.O = f(T^{\circ}C)$ et les résultats que nous pouvons dégager sont les suivants :

- lactosérum décaséiné : changement de conformation entre 50°C et 66°C puis début de précipitation.
- P7-3 : début de dénaturation vers 50°C puis début de précipitation.
- lactotransferrine native : changement de pente entre 60 et 63°C avec début de précipitation.
- apolactotransferrine : début de dénaturation vers 62-63°C puis début de précipitation.

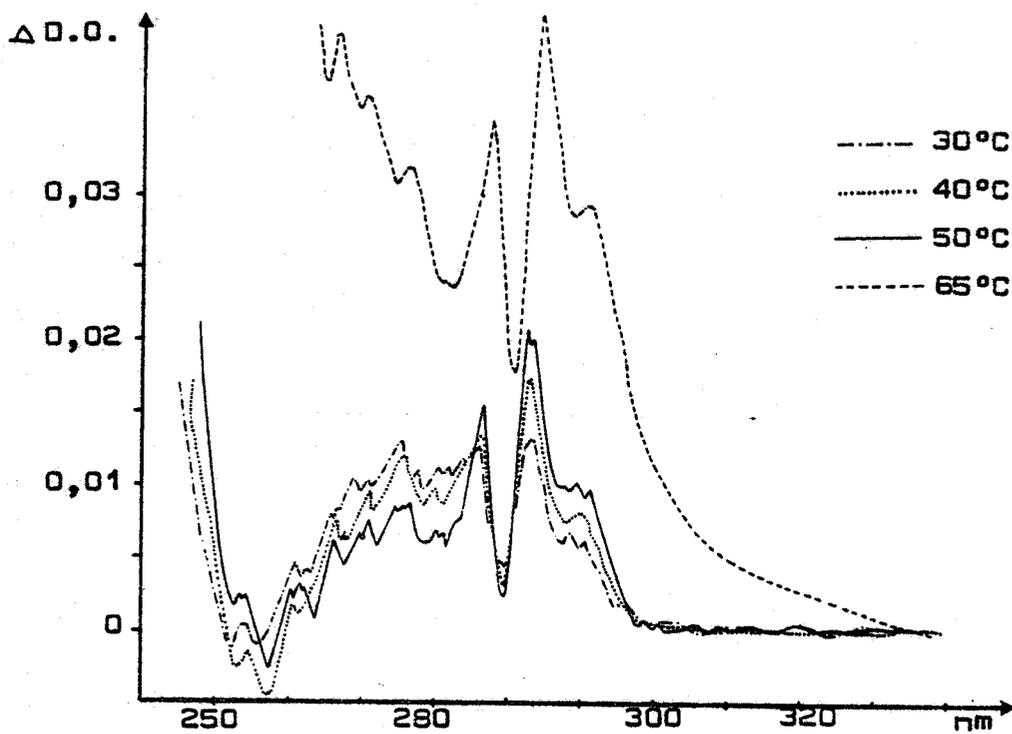


Figure 16 : Spectres typiques d'absorption ultraviolette différentielle.

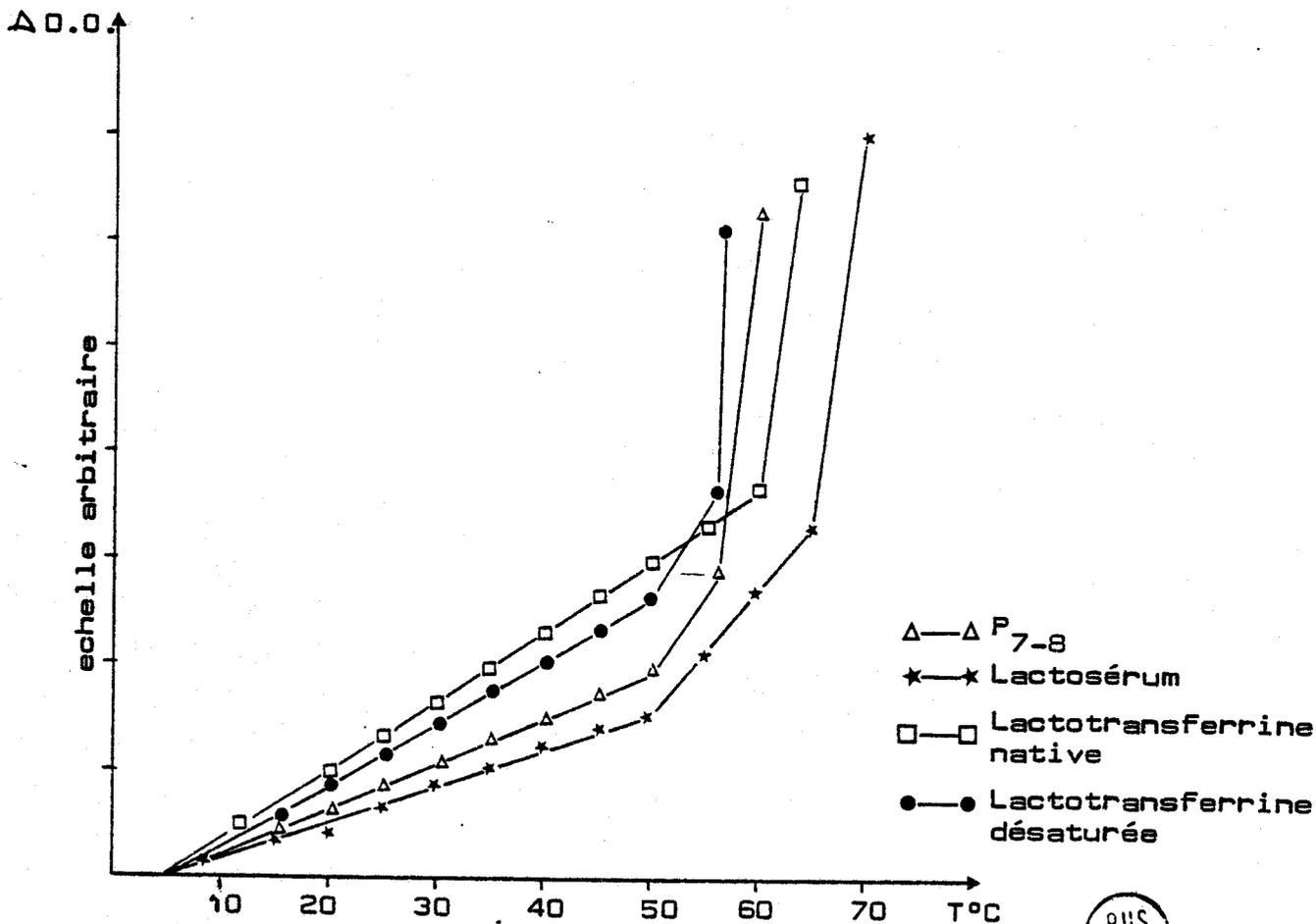


Figure 17 : $D.O._{294nm} = f(T^{\circ}C)$



III- DISCUSSION

=====

Les Immunoglobulines IgA

SZOLLOSY et al., [1974] trouvent que le traitement du lait humain à 65°C 30 mn cause la destruction de 20 % des IgA. Après chauffage à 56°C 30 mn et 62°C 30 mn, la perte en IgA est, respectivement, de 4 % et 22 % (FORD et al., 1977). Selon EVANS et al., (1978), le taux d'IgA est encore égale à 101 % après traitement à 62°C 30 mn. Un chauffage à 67°C 30 mn ne provoque la perte que de 11 % des IgA présentes dans le lait maternel.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par FORD et al., [1977] et par LIEBHABER et al., [1977]. La pasteurisation [63°C 30 mn] entraîne une chute du taux d'IgA de 12 à 30 %, suivant le pasteurisateur utilisé. La perte en IgA est très faible lorsque la température ne dépasse pas 56°C. Après chauffage à 56°C 2 x 30 mn, la perte en IgA est de 8,3 %.

Le traitement du lait maternel par un pasteurisateur haute température [72°C 15 sec] cause la destruction de 20 % des IgA.

Le lysozyme

Le lysozyme purifié est très stable à pH acide (pH 4,5), un traitement à 100°C pendant 3 mn ne provoque pas de perte de son activité (JOLLES et JOLLES, 1961).

Le pH du lait humain varie entre 6,8 et 7,2 (BLANC, 1931). Le lysozyme, présent dans le lait maternel, est donc moins stable à la chaleur. Une étude réalisée par FORD et al., [1977] montre, qu'au delà de 70°C 15 mn, il y a une destruction progressive de l'enzyme et qu'à 100°C 15 mn, il n'en reste plus que 3 %. Pour EVANS et al., [1973], la destruction du lysozyme commence dès que la température atteint 62°C pendant 30 mn et, après traitement à 67°C 30 mn, il ne reste plus que 15,2 % de lysozyme.

FORD et al., [1977] et EVANS et al., [1978] montrent que l'activité lytique du lysozyme est stimulée après un léger chauffage.

Nos études montrent qu'après chauffage à 56°C et 58°C 30 mn, l'activité lytique du lysozyme est respectivement de 103 et 101 %. La pasteurisation à 64°C 30 mn, provoque une perte de l'activité du lysozyme égale à 12 %. Nos résultats concordent avec ceux de FORD et al., [1977].

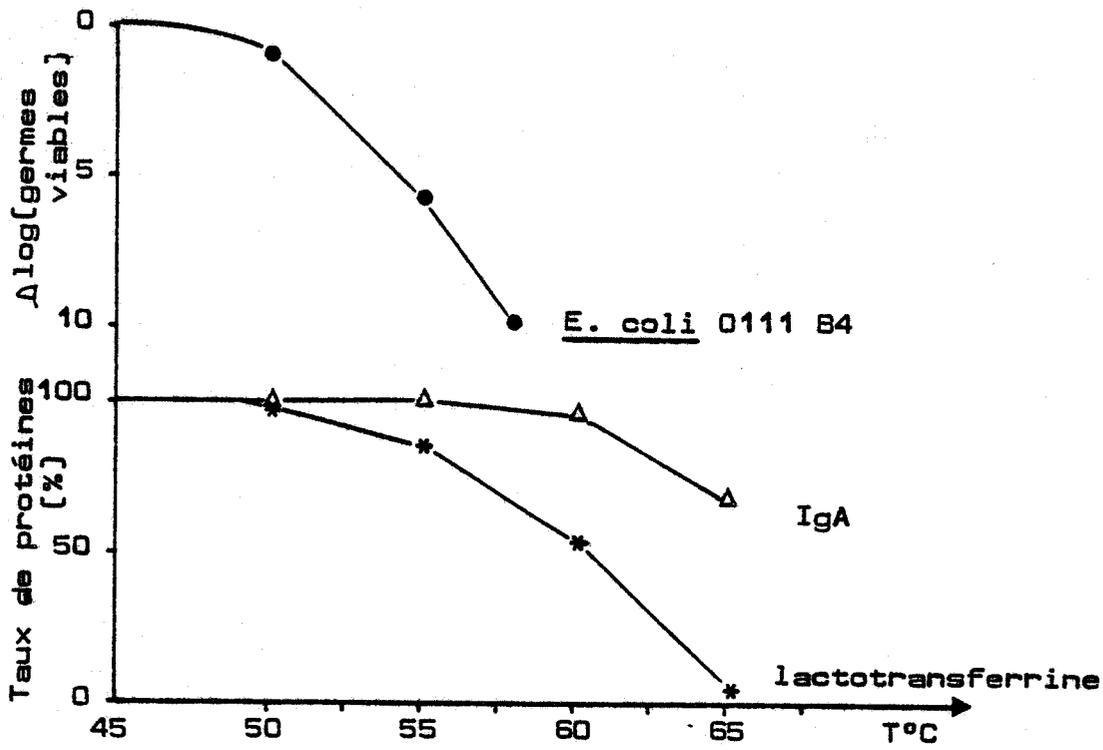
La lactotransferrine

Plusieurs études ont été réalisées sur la thermostabilité de la lactotransferrine et, il a été établi que la lactotransferrine était en partie dégradée durant la pasteurisation à 62°C 30 mn [FORD et al., 1977 ; EVANS et al., 1978 ; LYSTER et al., 1983].

Les résultats obtenus par EVANS et al., [1978] et exprimés dans le Tableau VI p. 58, sont en accord avec ceux de FORD et al., [1977]. RAPTOPOULOU-CIGI et al., [1977] montrent qu'après pasteurisation [62°C 30 mn] le taux de lactotransferrine présent dans le lait ne varie pas ; il reste égal à 100 %.

LYSTER et al., [1983] a étudié la dénaturation par chauffage à 62°C, de la lactotransferrine isolée, en réalisant une cinétique de temps. Les dosages effectués par la technique des "Rockets" montrent qu'il y a une diminution constante du taux d'apolactotransferrine durant l'heure de chauffage, mais pas de perte significative de lactotransferrine saturée en fer par addition de complexe NTA-fer [nitriolo-tri acétate].

Nos résultats montrent que la lactotransferrine présente dans le lait, subit une forte dénaturation entre 58°C et 60°C 30 mn. L'élevation de température égale à + 2°C, provoque une perte de 33,5 % du taux de lactotransferrine. Le dosage de la



d'après Lyster [1983].

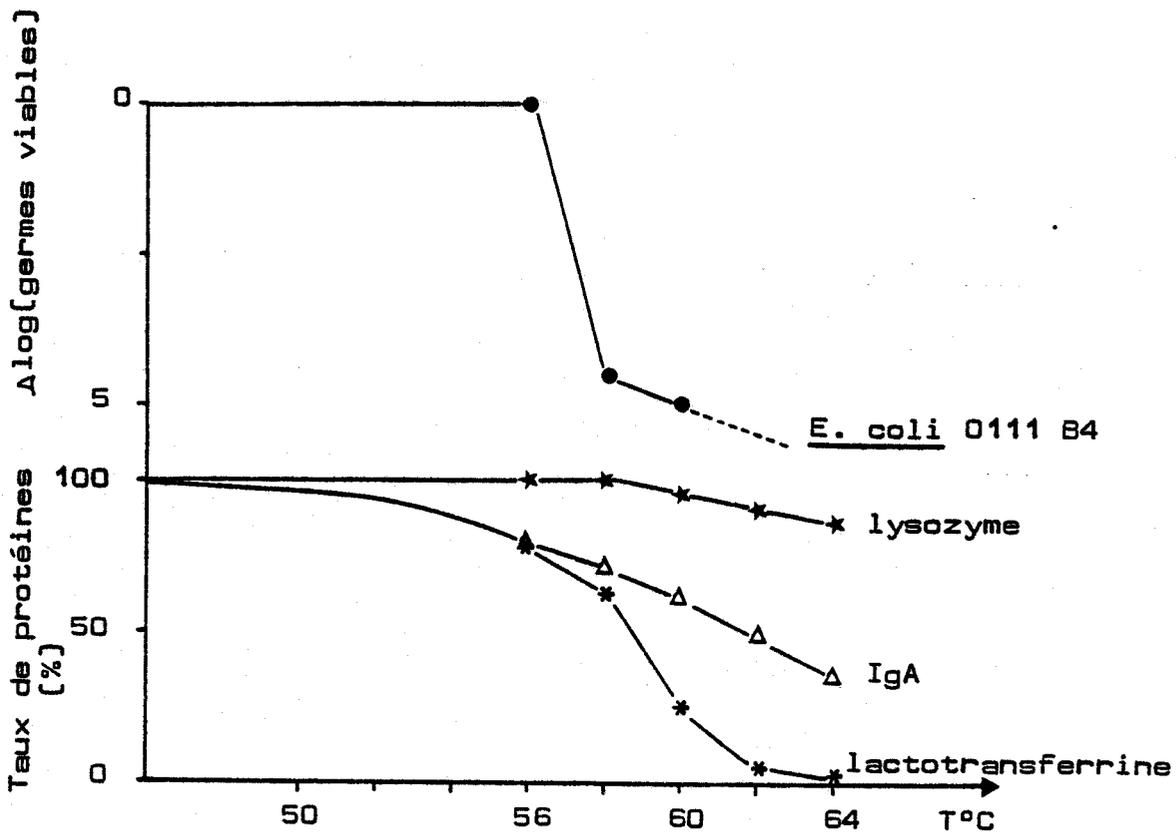


Figure 18 : Effet du chauffage à différentes températures pendant 30 mn.



capacité de fixation en fer dans le lait corrobore les dosages du taux de lactotransferrine.

La poursuite de ces investigations par une étude physique de dichroïsme circulaire et d'adsorption en U.V différentielle montre que la lactotransferrine désaturée est moins stable thermodynamiquement que la lactotransferrine native. La lactotransferrine dans le lait est mieux protégée et est moins vite dégradée que la lactotransferrine isolée ou dans le P7-3.

IV- CONCLUSION

=====

Suite à ces travaux, l'arrêté relatif aux conditions d'installation et de fonctionnement des lactariums a été modifié. Les procédés de stérilisation suivants ont été retenus :

- la tyndallisation : le lait est chauffé en biberon, à 65°C pendant 20 mn, trois jours de suite, suivies d'un refroidissement brutal ;
- La pasteurisation à haute température : le lait est chauffé par passage en continu dans une tubulure portée à 72°C pendant 15 sec. Le lait est ensuite refroidi brutalement ;
- Pasteurisation à basse température : le lait est chauffé dans des biberons en verre ou en plastique d'un volume de 100 à 250 ml par immersion pendant 30 mn dans un bain-marie à 63°C. Le lait est ensuite refroidi brutalement.

Nous regrettons que le traitement à 56°C 2 x 30 mn n'ait pas été retenu car c'est lui qui préservait le mieux l'activité bactériostatique du lait maternel tout en assurant une stérilisation correcte. Nos résultats sont en accord avec ceux, obtenus par LYSTER (1963, sous presse) en utilisant des conditions opératoires différentes.

La lactotransferrine, dans le lait, est mieux protégée que la lactotransferrine purifiée ou du P7-3. Des études

physiques montrent que le lactosérum, décaséiné par la renine, est dénaturé lorsque la température dépasse 63°C 1 h. La lactotransferrine isolée est détruite dès que la température atteint 63°C. De plus, le degré de saturation en fer est très important : une lactotransferrine saturée résiste mieux à la chaleur qu'une lactotransferrine native.

Ces résultats sont à considérer avec quelque réserve car les conditions opératoires sont très différentes de celles utilisées pour les études précédentes.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre travail, qui a consisté à rechercher une fraction très active du lait maternel en vue du traitement d'enfants atteints de diarrhées rebelles sont les suivantes :

1°) Le fractionnement du lait de Femme par relargage au sulfate d'ammonium fournit des fractions enrichies en certains protides. Ainsi, le précipité P₇₋₈ est constitué à 64% de lactotransferrine et les précipités P₂ et P₄ renferment la majeure partie des immunoglobulines du lait (sIgA, IgM et IgG).

Afin d'obtenir, en grandes quantités les fractions du lait de Femme, nous avons mis au point une méthode semi-industrielle de fractionnement mais les résultats ne sont pas satisfaisants. Le rendement obtenu par cette méthode n'est que de 50% alors que le fractionnement classique donne un rendement de 80%. Pour améliorer le rendement, l'étape de concentration devra être réalisée en utilisant une ultra-filtreuse industrielle. La centrifugation nécessite l'utilisation d'une machine de type industriel, fonctionnant en continu, mais de conception différente de la SHARPLESS.

2°) Une recherche de l'activité bactériostatique et bifidigène a été réalisée sur les différents précipités du lait maternel.

- L'activité bactériostatique des fractions protéiques du lait de Femme a été déterminée sur la souche E. coli 0111 B4. Le précipité P₇₋₈ s'est avéré être le plus actif.

- l'activité bifidigène a été déterminée sur différentes souches bactériennes classées en trois espèces : B. bifidum, B. longum, B. infantis. Le lactosérum dialysé et la caséine redialysée exercent un pouvoir bifidigène sur les souches appartenant à l'espèce B. bifidum. Le P₇₋₈ agit sur toutes les souches analysées. Toutefois, l'activité bifidigène de ce précipité varie selon le lot.

3°) L'analyse biochimique du P₇₋₈ montre qu'à côté de la lactotransferrine, il y a des immunoglobulines IgA (2,8%), de la pièce de sécrétion (5,8%), du lysozyme (6%) et environ 11% de glycopeptides. Chromatographié sur colonne de SP-Séphadex, le P₇₋₈ fournit 2 fractions. La fraction I, non retenue, renferme les glycopeptides, les IgA, la pièce de sécrétion et très peu de lactotransferrine. Elle ne possède aucune activité bactériostatique mais favorise la croissance des souches bifides appartenant aux espèces B. infantis et B. longum.

La fraction II, retenue sur colonne de SP-Séphadex, est constituée de lactotransferrine et de lysozyme. La mise en évidence d'un complexe lactotransferrine-lysozyme par l'analyse immunoélectrophorétique de la fraction II a été confirmée par l'ultracentrifugation analytique et le dichroïsme circulaire. L'étude électrophorétique du complexe lactotransferrine-lysozyme nous a amené à utiliser une nouvelle technique. Les arcs de précipitation marqués à la fluorescéine, sont observés après excitation à 488nm par un faisceau Laser.

L'activité bactériostatique de cette fraction II est importante ; de plus, certaines fractions II favorisent la croissance des souches bifides appartenant aux espèces B. bifidum, B. infantis et B. longum tandis que d'autres fractions n'ont aucune action.

4°) Le P₇₋₈ a été administré à 4 enfants souffrants de diarrhée rebelle.

Les études bactériologiques ont consisté à dénombrer et identifier les germes aérobies dans le liquide duodénal avant et après traitement. Les résultats se sont traduits par une amélioration notable de l'état du malade avec, en particulier, la disparition de l'intolérance aux protéines, par une reprise de poids et par une modification de la flore bactérienne duodénale. Cette modification montre, dans tous les cas, une disparition totale ou partielle des Staphylocoques.

5°] La conservation des protéines du lait maternel et du P₇₋₈ au cours des traitements de stérilisation est excellente lorsque la température ne dépasse pas 56°C et que la durée de chauffage est de deux fois 30 mn. Le lait garde toute son activité bactériostatique. Lors d'un chauffage de 30 mn à des températures comprises entre 58° et 60°C, la lactotransferrine subit une forte dénaturation et perd son activité biologique c'est-à-dire sa capacité de fixer le fer qui se traduit par une perte de l'activité bactériostatique.

Au vu des résultats obtenus, il serait intéressant de poursuivre ces travaux par :

- l'amélioration de la préparation industrielle de fractions actives du lait de Femme ;
- l'étude des complexes de la lactotranferrine : lactotransferrine-lysozyme, lactotransferrine-glycopeptides, de manière à préciser leur activité biologique;
- l'étude du traitement des enfants diarrhéiques sur un plus grand nombre de cas ;
- la modification de l'arrêté ministériel pour étendre, à tous les lactariums de France, les meilleures conditions de conservation du lait de Femme.

MATERIEL ET METHODES

I- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU LAIT DE FEMME

=====

A- INTRODUCTION

MONTREUIL et al., [1960 a] ont décrit une méthode de fractionnement des protéines du lait de Femme par précipitation au sulfate d'ammonium. Ce procédé, qui associe un gradient de concentration en sulfate d'ammonium à un gradient de pH, a été modifié au laboratoire par DESCAMPS [1974].

Avant de précipiter les protéines, le lait, provenant de Femmes à divers temps de lactation et conservé sous forme congelée, doit subir une série de traitements qui le convertissent en lactosérum. La préparation du lactosérum varie en fonction des quantités de lait à traiter.

B- PREPARATION DES LACTOSERUMS

1°) Pour un fractionnement classique

a- Délipidation

Le lait est centrifugé à 0°C pendant 40 minutes et à la vitesse de 3 000g. Les lipides viennent se condenser à la surface du lait et forment une couche grasseuse, facile à éliminer. Le lait est ensuite filtré sur gaze afin d'ôter tous les petits fragments de la souche lipidique qui pourraient rester.

Des essais de délipidation en faisant varier la température ont été effectués. Un mélange de lait bien homogénéisé est divisé en 3 fractions de 100 ml. Chaque fraction est centrifugée à 4 000 t/mn pendant 30 mn, mais à des températures différentes : 0°C, + 10°C, + 30°C. La couche lipidique surnageante est recueillie, lyophilisée et pesée.

Le lait ainsi traité n'est pas totalement délipidé et

les lipides restants sont extraits par un mélange chloroforme : méthanol [2 : 1 v/v]. Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après mélange et décantation, on obtient un déphasage avec passage, dans la phase hydroalcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux purs.

Le lait délipidé par centrifugation est vigoureusement agité en présence de 50 ml du mélange chloroforme : méthanol. Après une nuit de repos à + 4°C, la phase chloroformique est prélevée puis évaporée. Les masses des lipides résiduels ainsi recueillis sont pesées.

b- Dialyse

Le lait délipidé est soumis à une dialyse de 3 jours contre de l'eau distillée pour éliminer le lactose dont la présence entraîne une précipitation irrégulière de la caséine.

Les tubes de dialyse utilisés sont des tubes de cellophane Nojax 230.

o- Décaséination

L'adialysable est réchauffé à 20°C puis amené à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Après une nuit de repos, il est centrifugé à 3 000g x 30 mn.

2°) Pour un fractionnement semi-industriel

L'aménagement du laboratoire ne permet pas de faire des fractionnements de lait à l'échelon industriel. Pour des quantités supérieures à 50 l, le lait délipidé est concentré avant d'être dialysé et décaséiné.

a- Délipidation

Le lait est délipidé par centrifugation à 30°C. La machine

utilisée est une Wesphalia à coupelles*.

b- Concentration et dialyse

Le lait délipidé est concentré par passage sur un hémodialyseur [HOSPAL RP 6 HP]. Cet appareil est utilisé comme rein artificiel, dans les hopitaux.

Le lait, amené à l'hémodialyseur par une pompe, circule le long d'un système de membranes perméables RP AN 69 à base de copolymère d'acrylonitrile [épaisseur 30 microns]. Au cours de ce passage, le lait est concentré et, ce faisant, il perd une partie de ses molécules de faible masse moléculaire et de ses ions (sucres, ions minéraux, peptides et parfois le lysozyme).

Le lait est préalablement délipidé pour éviter que les lipides ne viennent colmater les pores des membranes perméables. En effet, cette étape de concentration a été réalisée à + 4°C.

Le rétentat renferme encore du lactose et il est donc dialysé pendant 3 jours contre de l'eau distillée dans des tubes de cellophane Nojax 40.

c- Décaséination

Le mode de décaséination est le même que celui décrit ci-dessus [p.129]. L'acide chlorhydrique [HCl] 0,1N utilisé pour ajuster le pH à 4,6 est remplacé par HCl 3N.

C- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU LACTOSERUM

Avant de commencer le fractionnement, une partie aliquote de lait délipidé, dialysé et décaséiné, est prélevée et lyophilisée. Cette aliquote, appelée lactosérum dialysé, nous sert

* Cette étape de délipidation a été réalisée dans le hall de l'IUT de Biologie Appliquée, et nous tenons à remercier le Directeur, Monsieur le Professeur FOURNET.

de référence.

1°) Fractionnement classique

Pour les fractionnements de colostrum et de lait humains n'excédant pas 3 litres, nous utilisons la méthode classique mise au point par MONTREUIL et al., [1960 a] et modifiée par DESCAMPS [1974] [voir fig. 17 p.132].

Les paliers de saturation 33 p. 100 et 50 p. 100 en sulfate d'ammonium sont obtenus par addition lente, sous agitation magnétique, d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 7. Puis nous passons à 74 p. 100 et à 100 p. 100 de saturation, par agitation de la solution en présence de sulfate d'ammonium cristallisé.

Nous utilisons la formule suivante pour calculer la masse de sel, en grammes, à ajouter à 100 ml de solution de saturation S1, pour obtenir une saturation S2.

$$X = \frac{0,1 G (S 2 - S 1)}{1 - \frac{VG}{1000} S 2}$$

avec G en grammes de $SO_4 (NH_4)_2$ dans 1 000 ml de solution saturée

$$G = 536,34 \text{ g à } 20^\circ\text{C}$$

V, volume apparent spécifique de $SO_4 (NH_4)_2$ en solution saturée

$$V = 0,5414 \text{ à } 20^\circ\text{C}$$

Les pH sont ajustés lentement, avec des solutions d'acide chlorhydrique et d'ammoniaque 3N.

Un repos d'une nuit est observé avant de recueillir chacun des précipités par centrifugation à 4 000 t/mn pendant 45 mn et à + 4°C.

Les précipités sont dissous dans un volume d'eau distillée minimum et le pH est éventuellement ramené à la neutralité. Les solutions obtenues sont dialysées à 4°C pendant 3 à 4 jours contre de l'eau désionisée. Les tubes de

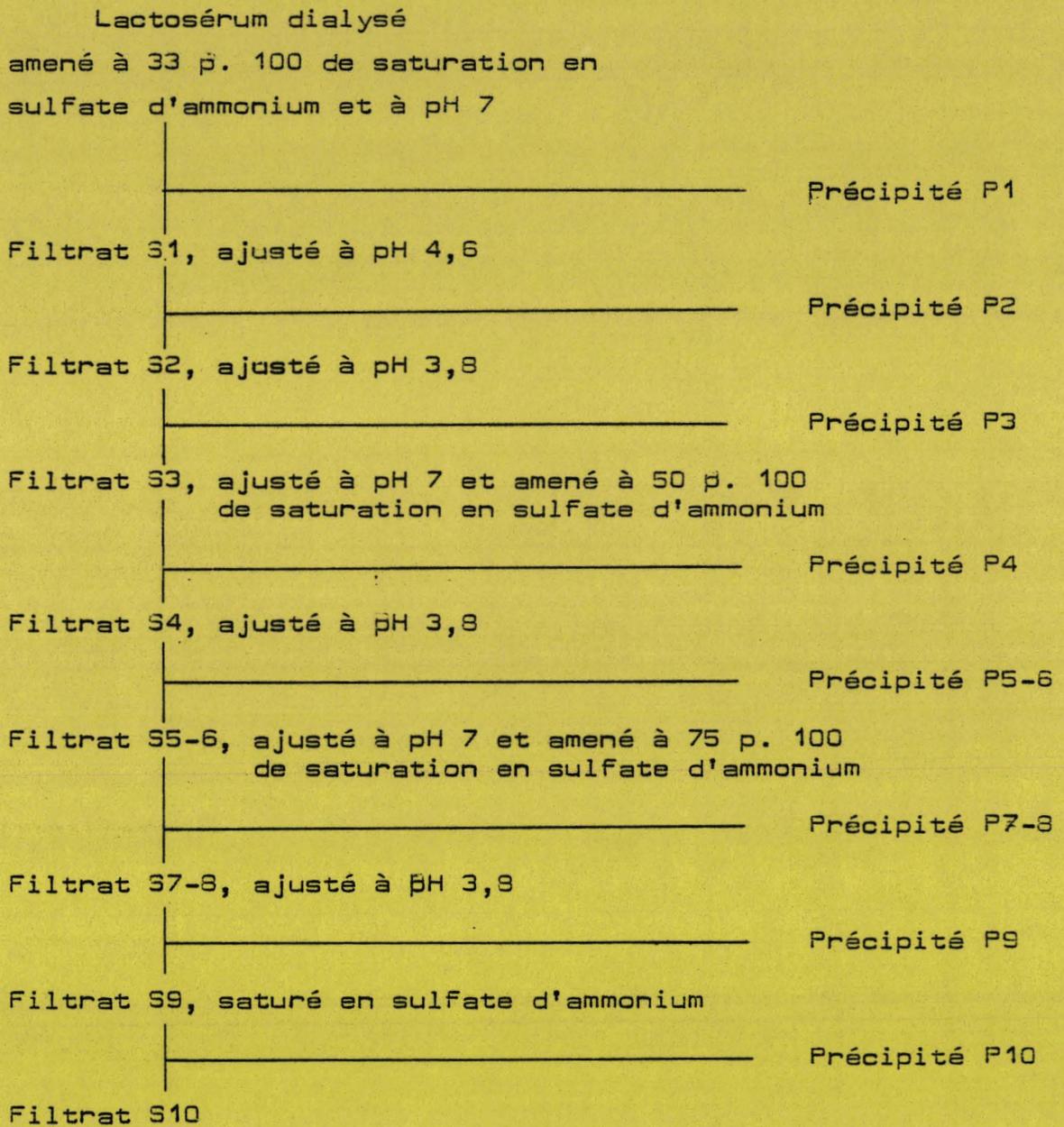


Figure 17 : Schéma de fractionnement du lactosérum selon le procédé de Montreuil et al. [1960] modifié par Descamps [1974].



dialyse utilisés sont des tubes de cellophane Nojax 230.

2°) Variante du fractionnement classique

Lorsque la quantité de lait à fractionner est supérieure à 3 litres, la solution saturée de sulfate d'ammonium est remplacée par du sulfate d'ammonium cristallisé. Pour les paliers de saturation 33 p. 100 et 50 p. 100, nous ajoutons respectivement 190 g/l et 101 g/l de sulfate d'ammonium en cristaux.

Dans le cas des fractionnements de type semi-industriel, les précipités sont recueillis par centrifugation ; la centrifugeuse utilisée (SHARPLESS) est une machine de type semi-industriel qui fonctionne en continu. La force centrifuge appliquée est de 20 000 g et le débit est d'environ 15 l/h.

La centrifugeuse ne possédant pas de système de réfrigération, est placée dans la chambre froide à + 4°C.

II- PURIFICATION DES PROTEINES

=====

A- LA LACTOTRANSFERRINE

1°) Purification de la lactotransferrine native

La lactotransferrine humaine a été isolée à partir du précipité P7-8 selon le protocole décrit par CHERON, MAZURIER et FOURNET (1977).

Le précipité P7-8 (Fig.17 p. 132), très riche en lactotransferrine, est chromatographié sur une colonne de SP-Séphadex équilibrée dans un tampon acétate de sodium 0,22 M. La lactotransferrine se fixe sur le support de la colonne.

La colonne est lavée avec de l'acétate de sodium 0,22 M puis 0,4 M. L'évolution de la lactotransferrine s'effectue

ensuite avec une solution d'acétate de sodium 0,5 M. L'éluat est dialysé et lyophilisé. Le lyophilisat, redissous dans un tampon acétate de sodium 0,22 M est rechromatographié dans les mêmes conditions que précédemment.

2°) Préparation de l'apolactotransferrine

La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M phosphate de sodium 0,2 M E.D.T.A 40 mM pH4 pour obtenir une concentration maximale de 0,5 p. 100. Après une incubation de 24 h, la solution est dialysée 3 jours contre de l'eau distillée.

B- LE LYSOZYME

DETERMINATION DU DEGRE DE

=====

PURETE DES PROTEINES

=====

A- PREPARATION DES IMMUNSERUMS

1°) Sérums de Lapin anti IgA et anti-lactotransferrine

L'immunsérum est obtenu par immunisation d'un lapin auquel nous injectons 1 ml d'une solution d'antigène dans du sérum physiologique, additionnée d'adjuvant de Freund (1 ml).

Le sérum anti-lactotransferrine est obtenu par injection d'une solution de lactotransferrine à 1 p. 1 000. Pour le sérum anti-IgA, la solution d'IgA purifiées est utilisée à la concentration de 5 p. 1 000.

La solution antigénique est injectée par piquêre intramusculaire dans les pattes arrières d'un lapin. Un cycle d'injection consiste en une injection par semaine pendant 1 mois. Le lapin est saigné, une semaine après la dernière injection, par incision de la veine marginale de l'oreille.

Pour avoir un immunsérum de bonne qualité, il est souvent nécessaire de faire 2 ou 3 cycles d'injection.

2°) Sérum de lapin anti-colostrum humain

La solution antigénique utilisée pour immuniser un lapin, est un "cocktail" des différents précipités obtenus par fractionnement de colostrum. Les quantités de protéines sont croissantes : 5, 10, 15, 20 mg/2ml avec 1 ml de sérum physiologique et 1 ml d'adjuvant de Freund.

3°) Sérums anti-IgG, anti IgM, anti-lysozyme, anti-pièce de sécrétion

Ces anti-sérums sont achetés dans le commerce [Behringwerke AG, Marburg].

B- MARQUAGE D'UN ANTISERUM A LA FLUORESCENCE

1°) Précipitation des anticorps

Nous avons utilisé la méthode décrite par CAMPBELL et al., [1964]. A 2 ml d'un sérum de lapin anti-lysozyme [Behringwerke], nous ajoutons goutte à goutte, 1 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Puis nous ajustons le pH à 7,8 avec de la soude 1 N ou 2 N. Le mélange est agité très doucement pendant 2 h puis est centrifugé à 1 400g x 30mn et à température ambiante. Le précipité obtenu est redissous dans une solution saline pour restaurer le volume initial de sérum.

Ce cycle est refait 2 fois. Le troisième précipité recueilli est dissous dans un tampon 0,025 M Na_2CO_3 et 0,025 M NaHCO_3 pH 10,2 dans un volume égal à la moitié du volume de départ (soit 1 ml). La solution obtenue est dialysée 24 h à + 4°C contre le même tampon afin d'éliminer les traces de sulfate d'ammonium.

2°) Préparation d'anticorps fluorescents

La solution d'anticorps anti-lysozyme est dissoute dans le tampon 0,025 M Na_2CO_3 - 0,025 M NaHCO_3 de sorte que la concentration en protéines soit de 1%. Introduite dans un petit tube de dialyse, elle est dialysée contre 10 volumes d'une solution de FITC (5-fluorescéine isothiocyanate, Eastman Kodak), 0,1 mg/ml, dans le même tampon.

La dialyse est effectuée à + 4°C et sous agitation constante pendant 24 h. Le tube de dialyse doit être complètement immergé, nous utilisons donc une éprouvette.

Après 24 h d'incubation, la solution d'anticorps est dialysée, contre un tampon phosphate pH 7,3, jusqu'à ce que la fluorescéine ne soit plus détectable dans le dialysable. Les anticorps fluorescents sont prêts à être utilisés.

C- METHODES ELECTROPHORETIQUES ET IMMUNOELECTROPHORETIQUES

1°) Acétate de cellulose

Les électrophorèses sont réalisées sur des bandes d'acétate de cellulose de 2,5 x 16 cm fournies par POLIPHOR, dans le tampon LAURELL et al., [1957] pH 8,6 et sous une tension de 120 V pendant 2 h. La révélation des protéines est effectuée par coloration au réactif à l'Amidoschwartz.

2°) Immunoélectrophorèses

a- Immunoélectrophorèse simple

Nous utilisons la technique d'immunoélectrophorèse de GRABAR et WILLIAMS [1953] sur gélose en suivant la micro-méthode de SCHEIDEGGER [1955].

L'électrophorèse sur gélose [Agar Noble] est effectuée dans un tampon véronal pH 8,2 dont la composition est la suivante :

- Véronal sodé 20,6 g

- NaCl 23,4 g
- Eau distillée 4,8 l
- ajusté à pH 8,2 avec HCl 0,2 N

et sous une tension de 1,5 V/cm pendant 90 minutes. Puis nous découpons à l'emporte pièce une fente que nous remplissons d'immunsérum.

La plaque d'électrophorèse est placée pour 48 h dans un humidificateur à température ambiante afin que l'immunsérum diffuse. Puis la plaque est lavée dans du sérum physiologique, séchée et colorée.

b- Immunoélectrophorèse double

L'immunoélectrophorèse double, encore appelée électrophorèse bidimensionnelle, est effectuée selon la méthode décrite par LAURELL [1965]. La composition du tampon d'électrophorèse utilisé est la suivante :

Véronal acide	28 g
Tris	55,4 g
Lactate de Ca	0,666 g
Na ₂ N ₃	0,812 g
Eau distillée q.s.p.	5 l
pH	0,6

La première électrophorèse est réalisée sur une plaque de verre [10 x 10 cm] recouverte d'un gel d'Agarose A 37 1 % dans le tampon pH 8,6. Nous découpons, à l'emporte pièce, 4 puits de 3 mm de diamètre dans lesquels nous déposons 9 ul des échantillons à analyser.

Les 4 échantillons migrent dans la première dimension sous l'effet d'un courant de 10 V/cm, appliqué pendant 1 h 30.

Après l'électrophorèse, le gel est coupé en 4 bandes, chaque bande étant reportée perpendiculairement sur une autre plaque de verre [10 x 10 cm]. Puis nous coulons 12,5 ml d'Agarose A 37 1 % contenant un anti-sérum.

Pour la seconde dimension, la migration est effectuée sous une tension de 2 V/cm durant toute la nuit.

Les plaques sont ensuite lavées dans du sérum physiologique, séchées et colorées par un réactif à l'Amidoschwartz.

D- DOSAGES IMMUNOLOGIQUE ET ENZYMATIQUE DES PROTEINES

1°) Immunodiffusion radiale

La quantification des protéines se fait par la technique d'immunodiffusion radiale de MANCINI et al., [1965]. L'antigène diffuse dans la gélose contenant l'immunsérum et, lorsque la zone d'équivalence est atteinte, il se forme un anneau de précipitation dont la surface est proportionnelle à la quantité d'antigène déposée.

Sur une plaque de verre [10 x 10 cm], nous coulons 15 ml de gélose, Agarose A 37 1 % dans un tampon barbiturate pH 8,6, contenant l'immunsérum. Après refroidissement du gel, des puits de dépôts de 1,5 mm de diamètre sont pratiqués. Une prise d'essai de 2 μ l est déposée dans chaque puit. La diffusion se fait en chambre humide pendant 48 heures. Après lavage du gel et coloration à l'Amidoschwartz, les diamètres des cercles de précipitation sont mesurés.

Une gamme étalon réalisée par dilution d'un antigène pur et déposée dans les mêmes conditions que la solution à analyser, est toujours incluse dans la plaque.

2°) Dosage du lysozyme

Le lysozyme est dosé par la méthode du lyso-plate décrite par OSSERMAN et LAWLOR [1966] et modifiée par SELSTED et MARTINEZ [1980].

A un gel d'Agarose A 37, à la concentration de 1 % dans le tampon phosphate 0,05 M pH 7,4, est ajoutée une suspension de Micrococcus lysodeikticus. La concentration finale en bactéries doit être de 50 mg/100 ml de gélose.

Dans une boîte de Pétri de diamètre 9 cm, nous coulons

20 ml de gélose : l'épaisseur du gel est de 4 mm. Après solidification, les puits de dépôts (3 mm de diamètre) faits à l'emporte-pièce, sont remplis par 15 ul de la solution à analyser ou de la solution de lysozyme standard.

Après une incubation de 18 h à 37°C, le diamètre des plages de lyse est mesuré et la courbe d'étalonnage est tracée. Elle porte en abscisse le logarithme décimal de la concentration en lysozyme et en ordonnée, le diamètre de la plage de lyse exprimé en millimètres.

Remarque : le lysozyme standard utilisé est du lysozyme de blanc d'oeuf de Poule (commercialisé par SIGMA). Or, l'activité de ce lysozyme est inférieure à l'activité de lysozyme humain d'un facteur 3. Nous devons tenir compte de ce facteur dans nos résultats.

IV- ANALYSES CHIMIQUES

=====

A- DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

Le taux de protéines totales contenues dans un échantillon à analyser est déterminé en utilisant la méthode de LOWRY et al., [1951].

- Solution A : NaCO_3 2 % dans NaOH 0,1 N
- Solution B : sulfate de cuivre 5 H_2O 0,5 % dans le tartrate de Na,K 1 %
- Solution C : 50 ml de la solution A + 1 ml de la solution B

A 0,1 ml d'une solution de protéines sont ajoutés 0,5 ml de la solution C. Le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 mn. Nous ajoutons ensuite 50 ul du réactif Folin-ciocalteu, préalablement dilué au 1/2. La solution ainsi formée est laissée 30 mn à l'obscurité après agitation. Une coloration bleue se développe : la lecture est effectuée à 750 nm.

Le témoin utilisé est une solution de sérum albumine à 0,1 mg/ml.

B- DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN GLUCIDES

La composition centésimale en glucides des fractions P7-3, a été déterminée par l'application des procédés de dosages colorimétriques suivants [voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK, 1963].

1°) Dosage des oses neutres

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol-sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI [1929] modifiée par RIMINGTON [1931].

2°) Dosage des osamines

Les osamines, libérées par hydrolyse chlorhydrique [HCl 4 N, redistillé et exempt de fer, à 105°C pendant 4 h] sont dosées par la méthode modifiée d'ELSON et MORGAN [1933] selon laquelle la glucosamine libérée en milieu alcalin, donne, avec l'acétylacétone, un chromogène qui réagit avec le réactif d'EHRlich pour donner une coloration rose-violacée.

3°) Dosage des acides sialiques

Les acides sialiques totaux sont dosés par le réactif de DISCHE [1930] à la diphénylamine selon le procédé de WERNER et ODIN [1952].

C- DETERMINATION DE LA CAPACITE DE FIXATION EN FER

1°) Saturation en fer

a) Principe

Un excès de fer est ajouté au lait délipidé pour saturer les sites de liaison libres sur la lactotransferrine.

Le fer non fixé est adsorbé sur une résine échangeuse d'ions. Le fer résiduel, représentant la capacité totale de fixation, est alors dosé.

b) Solution

- Solution 0,1 M en citrate de sodium et 0,1 M en bicarbonate de sodium pH 8,6.

- Solution de sel ferrique d'AZARI et BAUGH [1967]
chlorure ferrique à 6 H₂O 232 mg
solution citratée précédente q.s.p 100 ml

Cette solution mère de sel ferrique dont nous avons défini le taux de fer par la méthode décrite ci-après, est diluée au 1 : 15 afin d'obtenir une solution saturante à 15 ug de fer par ml.

c) Mode opératoire

A 2 ml de lait délipidé par centrifugation, nous ajoutons 1 ml de la solution saturante d'AZARI : après avoir bien mélangé à l'aide d'un agitateur en verre, attendre 10 mn.

Pour éliminer le fer non fixé, le contenu du tube est passé sur une microcolonne de DOWEX 1 x 4 AG [200 - 400 mesh] sous forme chlorure. 1 ml de DOWEX 1 x 4 équilibrée dans l'eau est introduit dans un cône de pipette automatique, lavé par 1 ml d'eau distillée puis par 0,6 ml du mélange. Le reste du mélange est passé sur la colonne et recueilli.

2°) Dosage du fer

a) Principe

Après rupture de la liaison fer-lactotransferrine par l'acide chlorhydrique et déprotéinisation par acide trichloracétique, l'ion ferrique est réduit en ion ferreux par l'acide thioglycolique. L'ion ferreux forme avec la batho-

phénanthroline disulfonée un complexe rose dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en fer.

b) Solutions

- Solution étalon de fer	3 mg/l [53,7 umol/l]
- Solution déprotéinisante	
acide trichloracétique	612 mmol/l
acide chlorhydrique	2,1 mol/l
acide thioglycolique	433 mmol/l
- Solution chromogène	
bathophénanthroline disulfonée	466 umol/l
acétate de sodium	2 mol/l

c) Mode opératoire

Dans un tube à hémolyse en pyrex, préalablement lavé à l'acide nitrique, introduire 1 ml de la solution à analyser. Ajouter goutte à goutte, en mélangeant doucement à l'aide d'un agitateur en verre, 1 ml de la solution déprotéinisante. Après un repos de 5 mn, le tube est porté au bain-marie 75°C pendant 10 mn. Une floculation blanche apparaît dans le tube ; elle est éliminée par une centrifugation de 15 mn à 3 000 t/mn.

1 ml de surnageant est prélevé, auquel 1 ml de la solution chromogène est ajouté. Les 2 solutions sont bien mélangées et, après un repos de 5 mn, l'intensité de coloration est lue à 535 nm. La D.O. du dosage et de l'étalon est lue contre le témoin eau distillée. La coloration est stable au moins 1 h.

V- ACTIVITES BACTERIOLOGIQUES

=====

A- DOSAGE DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

La souche d'E. coli de sérotype O 111 B4 provient de la

collection de la Faculté de Médecine du C.H.A de Lille. Elle a été isolée à partir des selles d'un nourrisson souffrant de gastroentérite (G.E.I) et elle est conservée sur milieu de LEMINOR [1972]. Après mise en culture, la pureté de la souche est vérifiée par isolement sur une boîte de gélose lactosée au Bromo Crésol Pourpre ou sur une boîte de gélose au sang. La souche doit être repiquée tous les 15 jours sur gélose nutritive.

1°) Préparation de l'inoculum

Une öse de bactéries, prélevée sur gélose nutritive, est reportée dans 10 ml de Ringer-Tryptone et incubée à 37°C au bain-marie agité.

Après 3 h de culture, la population bactérienne peut-être estimée à 10^8 bactéries par millilitre. Une dilution au $1/100^e$ dans du sérum physiologique stérile est effectuée et servira à l'ensemencement.

2°) Mise en culture

Les précipités à analyser sont dissous dans le milieu Ringer-Tryptone à raison de 5 mg/ml.

Dans un tube à hémolyse stérile, sont introduits :

- 1 ml de la solution à analyser
- 15 ul d'une solution de NaHCO_3 1 M
- 20 ul de l'inoculum dilué au $1/100^e$

Il est nécessaire d'inclure, dans chaque expérimentation, un tube témoin contenant 1 ml de milieu Ringer-Tryptone sans inhibiteur. Après 18 h d'incubation à 37°C, une numération sur boîte de Pétri est réalisée.

3°) Numération sur boîtes de Pétri

Pour la numération sur boîte, des dilutions sont effectuées afin d'avoir un taux maximale de 10^3 germes par ml. Dans un tube à hémolyse stérile, 0,9 ml de sérum

physiologique stérile et 0,1 ml de la culture bactérienne sont introduits. Des dilutions en cascade sont ainsi réalisées jusqu'à 10^{-5} et $5 \cdot 10^{-6}$ pour l'inoculum de départ. La numération après 18 h de culture, est faite à partir de dilutions de 10^{-7} à 10^{-9} .

4°) Milieux de culture

Ringer Tryptone (REITER, 1975)

- Tryptone (hydrolysats tryptique de caséine)		10 g
- NaCl		6 g
- KCl		0,1 g
- CaCl_2		0,1 g
- NaHCO_3		0,42 g
- Eau permutée	q.s.p.	1 litre

pH 7,5

Milieu de Mac CONKEY

- Peptone bactériologique		20 g
- Sels biliaires		1,5 g
- NaCl		5 g
- Lactose		10 g
- Rouge neutre		0,03 g
- Cristal violet		0,001 g
- Agar		15 g
- Eau permutée	q.s.p.	1 litre

pH 7,1

B- MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE BIFIDIGENE

1°) Souches utilisées

Les souches appartenant au genre Bifidobactérium proviennent soit d'isollements récents de selles de nourrissons alimentés au sein ou au lait "maternisé", soit de

la collection du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille. Toutes sont conservées à l'état congelé en milieu de Rosenow [BUTTIAUX et al., 1974].

Le choix des souches a été fait en fonction de leur taxonomie et de leurs besoins nutritionnels. Les souches utilisées appartiennent à 3 espèces qui peuvent être réparties en deux groupes : un premier qui comprend les espèces longum et infantis dont la croissance est favorisée par l'alimentation artificielle. Un deuxième groupe formé par l'espèce bifidum voit sa croissance favorisée par le lait maternel.

Pour le dosage, la souche estensemencée dans un milieu cerveau-coeur cystéiné en tube. Afin de maintenir l'anaérobiose pendant tout le développement, on coule 1 cm de paraffine [PF 60°C] à la surface du milieu. Après 24 h de séjour à 37°C, le volume entier de cette préculture est ajouté à 100 ml du même milieu. Après 48 h d'incubation à 37°C, on observe une multiplication abondante.

2°) Préparation du milieuensemencé

50 ml sont prélevés et centrifugés pendant 15 mn à 4 000 tr/min. Le culot est repris par une solution de Ringer cystéiné pour éliminer au maximum le milieu de culture. Après une nouvelle centrifugation, le culot est dilué dans 10 ml de milieu de GARCHES liquide. Il représente une préparation minimum qui permet la survie des germes sans développement notable.

Une partie aliquote de la suspension bactérienne est prélevée afin d'en déterminer la densité optique (D.O) à 620 nm, le milieu de GARCHES servant de témoin. Si nécessaire, la suspension bactérienne est diluée pour amener la D.O. à une valeur comprise entre 1,0 et 1,5. 5 ml de cette suspension sont ensuite homogénéisés dans 100 ml de milieu de GARCHES gélosé. Le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification, un disque de papier

filtre stérile, imbibé de 10 ul de la solution à tester, est déposé au centre de la boîte.

3°] Préparation du substrat à analyser

Les différents précipités du lait de Femme sont utilisés à des concentrations de 20 mg/ml et de 2 mg/ml.

Les précipités sont repris dans de l'eau distillée et utilisés sans aucun autre traitement. Généralement, l'acidification du milieu due à la croissance de Bifidobactérium empêche la prolifération des contaminants.

4°] Réalisation du test

Après avoir déposé les disques imprégnés à la surface du milieu, les boîtes de Pétri sont mises en incubation à 37°C en anaérobiose pendant 5 jours dans une jarre B.B.L. avec sachet GASPAK. Une substance dont l'activité est positive stimule la croissance bactérienne autour du disque.

5°] Milieux de culture

Milieu cerveau-cœur cystéiné

- bouillon cerveau-cœur	37 g
- extrait de levure	5 g
- chlorhydrate de cystéine	0,5 g
- eau distillée	q.s.p. 1 l

Le milieu est ensuite ajusté à pH 7 et stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Solution de Ringer cystéiné

- NaCl	9 g
- KCl	0,42 g
- CaCl ₂	0,48 g
- NaCo ₃	0,20 g

- | | | |
|----------------------------|--------|--------|
| - Chlorhydrate de cystéine | | 0,30 g |
| - Eau distillée | q.s.p. | 1 l |

La solution obtenue est diluée au 1/4, répartie en flacons et autoclavée 20 mn à 120°C.

Milieu de Garches

- | | | |
|--|--|--------|
| - Asparagine | | 5 g |
| - Lactose | | 10 g |
| - $\text{CH}_3\text{COO Na}, 3\text{H}_2\text{O}$ | | 3,66 g |
| - $\text{SO}_4 \text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$ | | 0,50 g |
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ | | 2,33 g |
| - KH_2PO_4 | | 0,90 g |
| - Cystine | | 0,20 g |
| - Casamino acids vitamin free | | 10 g |
| - Solution P.A.B. (100 mg acide p-amino-benzoïque dans 100 ml d'eau distillée) | | 1 ml |
| - Solution vitaminée (1 mg biotine + 100 mg pantothénate de calcium dans 100 ml d'eau distillée) | | 1 ml |
| - Eau distillée | | 1 000 |

Les ingrédients sont dissous par chauffage. Le pH est ajusté à 6,4 et le milieu est autoclavé à 108°C pendant 30 mn. Il est solidifié par addition de 10 g d'agar/l.

VI- PASTEURISATION DES LAITS DE LACTARIUM

=====

A- COLLECTE DU LAIT MATERNEL

Des échantillons de lait provenant de 20 à 40 donneuses sont mélangés. Dans la plupart des cas, le lait est collecté dans un flacon stérile en utilisant une pompe électrique (EGNELL[®]) ou une pompe manuelle.

Le lait est congelé ou gardé à + 4°C dans un réfrigérateur pendant 48 h avant d'être collecté par le personnel du lactarium.

Les échantillons de lait maternel sont réunis pour donner un lot de 4 litres.

B- PASTEURISATEURS

1°) Pasteurisation à "basse" température

a) Pasteurisateur de lait maternel Oxford

Après un temps de pré-chauffage d'environ 35 mn, le porte-biberons est immergé dans le bain-marie et l'opération de pasteurisation débute par une phase de stabilisation de 10 à 15 mn, pendant laquelle la température du lait est portée à 63°C. La température de l'eau est ensuite maintenue à 63°C précis pendant 31 mn. Par la suite, l'eau est évacuée rapidement et remplacée par de l'eau froide, courante à grande vitesse pendant 19 mn, afin de réduire la température du lait à environ 20°C.

La capacité de traitement est de 4 litres par cycle et chaque cycle dure 100 mn. Le lait est conditionné dans des biberons de 100 ml FREFLO jetables.

b) CM 80

Les biberons sont placés dans un bain-marie pré-chauffé à 63°C. L'opération de pasteurisation qui dure 30 mn est précédée d'une phase de stabilisation de 10 mn.

A la fin de l'étape de pasteurisation, le lait est rapidement refroidi par immersion automatique dans une eau froide.

Le cycle entier dure 90 mn car un temps de pré-chauffage de 45 mn est nécessaire : 7,2 l de lait répartis en biberons de 140 ou 240 ml peuvent être traités à chaque cycle.

Tout au long de ce cycle, les biberons sont agités doucement (60 coups/mn) prévenant ainsi la coagulation ou la séparation du lait en 2 phases.

c) Lyon H.M. (Subtil Crépieux)

Grâce à une assistance technique disponible, il a été possible de faire varier la température de pasteurisation. Nous avons donc utilisé 3 modes de pasteurisation : 63°C 30 mn, 56°C 30 mn une fois et deux fois.

Le volume total de lait traité est de 9,6 l et le cycle dure 120 mn. Les biberons utilisés sont les mêmes que ceux du pasteurisateur CM 80.

Dans toutes les expériences réalisées avec des pasteurisateurs à basse température, un biberon rempli de lait est placé au centre du bain-marie et les autres sont remplis avec de l'eau.

2°) Pasteurisation à haute température

L'appareil utilisé est le STOUTZ-ACTINATOR.

Le lait, placé dans une cuve de 20 l réfrigérée à + 4°C, est injecté grâce à une pompe dans une tubulure de 0,30 m où il est chauffé à 70°C pendant 15-17 secondes. Puis il est refroidi brusquement à + 4°C, le temps de refroidissement variant de 30 à 45 secondes. Le débit est de 28 à 33 litres de lait/heure.

L'inconvénient majeur de ce système réside dans le fait que le lait doit être manipuler après pasteurisation pour être mis en biberons d'où un risque de contamination bactérienne.

C- ANALYSES BACTERIOLOGIQUES

1°) Numération des germes

Avant et après chaque expérience de pasteurisation, une

étude bactériologique est réalisée pour compter le nombre de germes présents dans le lait.

a) Avant pasteurisation

- numération de la flore mesophile totale (gélose au sang)

0,1 ml de lait dilué au 1/1 000 et 1/10 000

- numération de Staphylococcus (milieu de Chapman)

0,1 ml de lait dilué au 1/10

- numération des Entérobactéries (milieu Origalsky)

0,1 ml de lait dilué au 1/100

b) Après pasteurisation

- numération de la flore mesophile totale (gélose au sang)

0,1 ml de lait non dilué

2°) Activité bactériostatique

Nous avons utilisé la méthode décrite à la page 142 et légèrement modifiée.

A 1 ml de lait délipidé et filtré sur Millipore 0,45 μ m, sont ajoutés 15 μ l de NaHCO_3 et 20 μ l de la préculture bactérienne E. coli O111 B4 diluée au 1/100^e. La numération est effectuée après 5 h et 24 h de culture.

D- ANALYSES PHYSIQUES DE LA DENATURATION DE LA LACTOTRANS-

FERRINE

1°) Dichroïsme circulaire

Les expériences ont été réalisées sur un dichographe Jobin Yvon R.J. MARK III qui permet des mesures de 130 à 800 nm. La sensibilité de l'appareil peut varier de $2 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-6} .

Cet appareil est complètement informatisé et permet d'effectuer tous calculs sur les spectres expérimentaux de façon très précise.

L'épaisseur des cellules de mesure peut varier de 0,01 à 1 cm. L'ellipticité molaire $[\theta]$ est calculée à partir du spectre expérimental par la formule :

$$[\theta] = 3300 \cdot \frac{M}{cd} \cdot A \cdot \Delta \text{ en deg. mole}^{-1} \text{ cm}^2$$

M : masse moyenne des résidus d'acides aminés

\bar{c} : concentration en g/l

d : longueur de la cuve en cm

A : intensité du signal obtenu, mesurée en mm

Δ : sensibilité de l'appareil ($2 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-6})

Tous les spectres dichroïques ont été réalisés entre 20 et 70°C. La température est mesurée par une sonde au platine plongée directement dans la solution.

2°] Absorption ultraviolette différentielle

Les expériences ont été réalisées sur un spectrophotomètre Cary 118 C dans des cellules de 1 cm d'épaisseur.

Au départ, les 2 cuves sont placées à 5°C puis l'une des deux est chauffée jusqu'à 70°C par paliers de 5°C. La température est mesurée de la même façon que pour les expériences de **dichroïsme** circulaire. Les mesures sont effectuées entre 350 et 240 nm.

B I B L I O G R A P H I E

Les nombres entre parenthèses renvoient à la page du mémoire

- AASA R., MALMSTROM B., SALTMAN P., VANNGARD T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, 203 [32]
- ADINOLFI M., GLYNN A.A., LINDSAY M., MILNE C.M., *Immunology*, 1966, 10, 517 [52]
- AHLSTEDT S., CARLSSON B., FALLSTROM S.P., HANSON L.A., HOLMGREN C., LIDEN-JANSON G., LINDBLAD B.S., JODAL U., KAIJSER B., SOHLAKERLUND A., WADSWORTH C., in "Immunology of the gut". Ciba Foundation Symposium 46, p. 115, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, 1977 [40]
- AISEN P., LIEBMAN A., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 30, 407 [47]
- AISEN P., LIEBMAN A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 257, 314 [32]
- ALAIS C., BLANC B., *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 1975, 20, 66 [25]
- ANDRE A., PEETOM F., RONDMAN K.W., *Vox Sang.*, 1964, 8, 99 [29]
- ANDREWS J.S., HEWLETT E.L., *J. Infect. Dis.*, 1981, 143, 242 [40]
- ANTONINI E., OFSI N., VALENTI P., *G. Malleattie Infective and Parassitarie*, 1977, 2, 481 [49]
- ARNOLD R.R., COLE M.F., MCGHEE J.R., *Science*, 1977, 197, 263 [48]
- ARNOLD R.R., BREWER M., GAUTHIER J.J., *Infect. Immunity*, 1980, 28, 893 [48]
- ARNOLD R.R., RUSSEL J.E., CHAMPION W.J., GAUTHIER J.J., *Infect. Immunity*, 1981, 32, 655 [48]
- ARNOLD R.R., RUSSEL J.E., CHAMION W.J., BREWER M., GAUTHIER J.J., *Infect. Immunity*, 1982, 35, 792 [48]

- BACK E., MOLLBY R., KAIJSER B., STINTZING G., WADSTROM T., HABTE D., *J. Infect. Dis.*, 1980, 142, 318 [8, 9]
- BALLANTYNE B., *Clin. Toxicol.*, 1977, 11, 195 [28]
- BASUYAU J.P., MALLET E., LENORMAND J.J., BRUNELLE P., de MENIBUS C.H., *La nouvelle presse médicale*, 1980, 9, 591 [29]
- BEERENS H., ROMOND C., NEUT C., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, 33, 2434 [20]
- BENNETT R.M., EDDIE-QU RTEY A.C., HOLT P.J.L., *Arthr. Rheum.*, 1973, 16, 186 [33]
- BENNETT R.M., MOHLA C., *J. Lab. Clin. Med.*, 1976, 88, 156 [33, 34]
- BENNETT R.M., KOKOCINSKI T., *Brit. J. Haematol.*, 1978, 39, 509 [33]
- BEZKOROVAINY A., NICHOLS J.H., *Pediat. Res.*, 1976, 10, 1 [21]
- BEZKOROVAINY A., *J. Dairy Sci.*, 1977, 60, 1023 [25, 27]
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., NICHOLS J.H., *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1979, 32, 1428 [21]
- BEZKOROVAINY A., TOPAUZIAN H., *Clin. Biochem.*, 1981 a, 14, 135 [21]
- BEZKOROVAINY A., TOPAUZIAN H., *Int. J. Biochem.*, 1981 b, 13, 585 [21]
- BIENENSTOCK J., BEFUS A.D., *Immunology*, 1980, 41, 249 [37]
- BISERTE G., HAVEZ R., CUVELIER R., *Exp. Annu. Bioch. Med.*, 1963, 25, 85 [33]
- BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J., *Lancet*, 1973, 2, 1281 [6]
- BJORCK L., CLAESSION O., SCHULTHESS W., *Milchwissenschaft*, 1979, 34, 726 [28]
- BLANC B., ISLIKER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 929 [32, 34]
- BOHNOFF M., MILLER C.P., MARTIN W.R., *J. Exp. Med.*, 1964, 120, 805 [25]
- BRAUN O.H., *Z. Kinderheilkd*, 1958, 81, 742 [32]
- BRAY J., *J. Path. Bact.*, 1945, 57, 239 [7]
- BROCK J.H., *Arch. Dis. Child.*, 1980, 55, 417 [50]
- BROEKHUYSE R.N., *Invest. Ophthalmol.*, 1974, 13, 550 [33]
- BULLEN C.L., WILLIS A.T., *Br. Med. J.*, 1971, 3, 338 [22]
- BULLEN C.L., TEARLE P.V., *J. Med. Microbiol.*, 1976, 9, 335 [23, 25]
- BULLEN C.L., TEARLE P.V., WILLIS A.T., *J. Med. Microbiol.*, 1976, 9, 325 [22]

- BULLEN J.J., CUSHNIE G.H., ROGERS H.J., *Immunology*, 1957, 12, 303 [47]
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L., *Br. Med. J.*, 1972, 1, 69 [34, 46, 49, 50, 53, 56]
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., GRIFFITHS E., in "Microbial Iron Metabolism" [J.B. Nielands eds.], Academic Press, New York, 1974, p. 517 [53, 54]
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., GRIFFITHS E., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1978, 80, 1 [46, 47]
- BURTON D.W., *J. Med. Microbiol.*, 1973, 6, 131 [41]
- BUTTIAUX R., BEEFENS H., TACQUET A., "Manuel de techniques bactériologiques", 4ème ed., Editions Médicales Flammarion, 1974, Paris [145]
- CAMPBELL D.H., GARVEY J.S., CREMER N.E., SUSSDORF D.H., "Methods in Immunology" [Benjamin Inc. ed.], 1964, New York, Amsterdam, [135]
- CANTEY J.R., BLAKE R.K., *J. Infect. Dis.*, 1977, 135, 454 [13]
- CARRANO C.J., RAYMOND K.N., *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 5401 [47]
- CHANDAN R.C., SHAHANI K.M., HOLLY R.C., *Nature*, 1964, 204, 706 [32]
- CHANDRA R.K., *Bull. W.H.O.*, 1979, 57, 167 [3, 4]
- CHERON A., MAZURIER J., FOURNET B., *C.R. Acad. Sci.*, 1977, 284, 585 [133]
- CLEMENTE F., RIBEIRO T., COLOMB E., FIGARELLA C., SALES H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 251, 456 [33]
- CORDA R., BIDDAU P., CORRIAS A., PUXEDDU E., *Int. J. Tiss. Reac.*, 1983, 5, 117 [51]
- COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., PETERS T.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 588, 120 [45]
- CRAMBLETT H.G., AZIMI P., HAYNES R.E., *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1971, 176, 80 [5]
- CUATRECASAS P., *Biochemistry*, 1973, 12, 3547 [16]
- DAVIDSON G.P., GALL D.G., PETRIC M., BUTTER D.G., HAMILTON J.R., *J. Clin. Invest.*, 1977, 60, 1402 [7]
- DE S.N., BATTACHARYA K., SARKAR J.K., *J. Pathol. Bacteriol.*, 1956, 71, 201 [8]
- DEBRE R., RAMON G., LEVY-SOLAL E., THIROLOIX P.L., *Nourrisson*, 1930, 18, 235 [39]
- DESCAMPS J., *Thèse Doc. ès Sci.*, Lille, 1974 [5, 35, 96, 131, 132]

- DESJEUX J.F., Nestlé-Guigoz, Rapport du 3^e Congrès de Monaco, 1976, E 11- E 25 [7]
- DESJEUX J.F., in "Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology" [Bonfils S., Fromageot P., Rosselin G. eds.], 1977, p. 435, Amsterdam, North-Holland Publishing Co. [6]
- DESJEUX J.F., GRASSET E., LESTRADET H., Arch. Fr. Pédiatr., 1979, 36, 69 [7]
- DITTMANN J., HOLM-ANDERSEM I., LIEM G., MAYER J.B., Zschr. Kinderheilkd, 1967, 101, 305 [25]
- DOLBY J.M., HONOUR P., J. Hyg. [Camb.], 1979, 83, 255 [56]
- DOLBY J.M., HONOUR P., ROWLAND M.G.M., J. Hyg. [Camb.], 1980, 85, 347 [40]
- DOLBY J.M., STEPHENS S., Immunology, 1983, in press [56]
- DONAT H., Zentbl. Gynäk., 1976, 98, 1631 [29]
- DONTA S.T., SMITH D.M., Infect. Immunity, 1974, 9, 500 [11]
- DOWNHAM M.A.P.S., SCOTT R., SIMS D.G., WEBB J.K.G., GARDNER P.S., Brit. Med. J., 1976, 2, 274 [39]
- DUGUID J.P., GILLIES R.R., J. Pathol. Bacteriol., 1957, 74, 397 [9]
- DUPONT H., FORMAL S.B., HORNICK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P., SHEAHAN D.G., LABREC E.H., KALAS J.P., New Engl. J. Med., 1971, 285, 1 [8, 13]
- EDITORIAL , Bull. W.H.D., Geneva, p. 31, 1976 [3]
- EDITORIAL , Lancet, 1978, August 5, 300 [3]
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824 [140]
- ESHDAT Y., OFEK I., YASHOUV-GAN Y., SHARON N., MIRELMAN D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, 85, 1551 [9]
- ETKIN S., GORBACH S.L., J. Lab. Clin. Med., 1971, 78, 81 [11]
- EVANS D.J., CHEN L.C., CURLIN G.T., EVANS D.G., Nature New Biol., 1972, 236, 137 [11]
- EVANS D.G., EVANS D.J., PIERCE N.F., Infect. Immunity, 1973, 7, 873 [11]
- EVANS T.J., RYLEY H.C., NEALE L.M., DODGE J.A., LEWARNE V.M., Arch. Dis. Child., 1978, 53, 239 [57, 58, 120, 121]
- FALCHUK K.R., PERROTTO J.L., ISSELBACHER K.J., New Engl. J. Med., 1975, 292, 395 [43]

- FALKLER W.A., DIWAN A.R., HALSTEAD S.B., Arch. Virol., 1975, 47, 3 [15]
- FEENEY R.E., Biochim. Biophys. Acta, 1951, 34, 196 [46]
- FERGUSON W.W., JUNE R.C., Am. J. Hyg., 1952, 55, 155 [8]
- FIELD M., FROMM D., WALLACE C.K., GREENOUGH W.B., J. Clin. Invest., 1969, 48, 24 a [6]
- FIELD M., in "Mechanisms of Intestinal Secretion" (Binder H.J. eds.), 1979, p. 83, Alan R. Liss. Inc., New York [11]
- FIELDSTEEL A.H., Cancer Res., 1974, 34, 712 [15]
- FINKELSTEIN R.A., CRC. Crit. Rev. Microbiol., 1973, 2, 553 [6]
- FLEMING A., Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.), 1922, 93, 306 [30]
- FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H., Lancet, 1973, 2, 1497 [6]
- FOMON S.J., in "Infant Nutrition" 2^e ed. (W.B. Sanders), Philadelphia, 1974 [27]
- FORD J.E., LAW B.A., MARSHALL V.M.E., REITER B., J. Pediat., 1977, 90, 29 [57, 120, 121]
- FORMAL S.B., LABREC E.H., KENT T.H., FALKOW S., J. Bacteriol., 1965, 89, 1374 [13]
- FOURNET B., FIAT A.M., ALAIS C., JOLLES P., Biochim. Biophys. Acta, 1979, 576, 336 [21]
- FRANSSON G.B., LONNERDAL B., J. Paediatr., 1980, 96, 380 [46]
- FRETER R., Infect. Immunity, 1970, 2, 556 [40]
- FRETER R., in "Barua and Burrows Cholera" (Saundey ed.), 1974, p. 315, Philadelphia [38]
- FRISK C.S., WAGNER J.E., Am. J. Vet. Res., 1977, 38, 1861 [13]
- FRISK C.S., WAGNER J.E., OWENS D.R., Infect. Immunity, 1978, 20, 319 [13]
- FRISK C.S., WAGNER J.E., OWENS D.R., Infect. Immunity, 1981, 31, 1232 [13]
- FUBARA E.S., FRETER R., Am. J. Clin. Nutr., 1972, 25, 1357 [40]
- FUBARA E.S., FRETER R., J. Immunol., 1973, 111, 395 [40]

- GACHON A.M., VERRELLE P., BETAÏL G., DASTUGUE B., *Exp. Eye Res.*, 1979, 29, 539 [33]
- GARNIER J., *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1964, 4, 163 [25]
- GAUHE A., GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R., ROSE C.R., HANS W.R., ZILLIKEN F., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 48, 214 [20]
- GILES C., SANGSTER G., *J. Hyg.*, 1948, 46, 1 [7]
- GINDRAT J.J., GOTHERFORS L., HANSON L.A., WINBERG J., *Acta Paediatr. Scand.*, 1972, 61, 587 [56]
- GOLBBACH W., HAENEL H., GRÜTTE F.K., *Ernähr. Forsch.*, 1984, 9, 295 [32]
- GOLDMAN A.S., CUTBERTO G., NICHOLS B.L., GOOBLUM R.M., *J. Pediatr.*, 1982, 100, 563 [32]
- GONZAGA A.J., WARREN R.J., ROBBINS F.C., *Pediatrics*, 1963, 32, 1039 [39]
- GORBACH S.L., BANWELL J.G., CHATTERJEE B.D., JACOBS B., SACK R.B., *J. Clin. Invest.*, 1971, 50, 881 [8]
- GOT R., GOUSSAULT Y., FONT J., *Carbohydr. Res.*, 1966, 3, 157 [34]
- GOTHERFORS L., MARKLUND S., *Infect. Immunity*, 1975, 11, 1201 [28]
- GOTZE O., MULLER-EBERHARD H.J., *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 90 [29]
- GRABAR P., WILLIAMS C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 17, 65 [136]
- GREENOUGH W.B., PIERCE N.F., VAUGHN M., *J. Infect. Dis.*, 1970, 121, S111 [6]
- GRIFFITH E., HUMPHREYS J., *Infect. Immun.*, 1977, 15, 396 [47, 48]
- GRIFFITH E., HUMPHREYS J., *Eur. J. Biochem.*, 1978, 82, 503 [32, 48]
- GRIMMONPREZ L., *C.R. Acad. Sci.*, 1966, 263 D, 1269 [19]
- GRIMMONPREZ L., MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968 a, 50, 843 [17, 18, 19]
- GRIMMONPREZ L., MONTREUIL J., "International Symposium IV, Chromatographie-Electrophorèse", *Press. Acad. Europ. ed.*, Bruxelles, 1968 b, 372 [19]
- GRIMMONPREZ L., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, 39 [17]
- GRIMMONPREZ L., *Thèse Doc. ès Sci.*, Lille, 1972 [17]
- GRIMMONPREZ L., MONTREUIL J., *Biochimie*, 1975, 57, 695 [19]
- GRUTTNER R., SCHAFFER K.H., SCHROTER W., *Klin. Wschr.*, 1960, 38, 1162 [34]

- GUERRANT R.L., BRUNTON L.L., SCHNAITMAN T.C., REBHUN L.I., GILMAN A.G., *Infect. Immun.*, 1974, 10, 320 [11]
- GYLES C.L., BARNUM D.A., *J. Infect. Dis.*, 1969, 120, 419 [9]
- GYLES C.L., *Ann. NY.Acad. Sci.*, 1971, 176, 314 [8]
- GYLES C.L., *J. Infect. Dis.*, 1974, 129, 277 [11]
- GYLLENBERG H., ROINE P., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1957, 41, 144 [22]
- GYORGY P., ROBERT F., NORRIS R.F., ROSE C.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954 a, 48, 193 [20]
- GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R., ROSE C.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954 b, 48, 209 [20]
- GYORGY P., ROSE C.S., *J. Bacteriol.*, 1955, 69, 483 [20]
- GYORGY P., *Mod. Probl. Pediat.*, 1957, 2, 1 [24]
- GYORGY P., C.R. 3ème Congrès Intern. Nutr., 1964, Amsterdam, p. 203 [3]
- GYORGY P., DHANAMITTA S., STEERS E., *Science*, 1962, 137, 338 [15]
- GYORGY P., JEANLOZ R.W., Von NICOLAI H., ZILLIKEN F., *Eur. J. Biochem.*, 1974, 43, 29 [20]
-
- HAENEL H., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1970, 23, 1433 [23]
- HALPERN M.S., KOSHLAND M.E., *Nature*, 1970, 228, 1276 [30]
- HAMBRAEUS L., *Pediatr. Clin. N. Am.*, 1977, 24, 17 [16, 26, 32, 73]
- HAMILTON R., *Pediatr. Clin. N. Am.*, 1975, 22, 747 [7]
- HANNEBERG B., FINNE P., *Acta Paediatr. Scand.*, 1974, 63, 588 [32, 42]
- HANSON L.A., JOHANSSON B.G., in "Milk Proteins" [McKenzie eds.], 1970, vol.1, p. 45 Academic Press, New York [29]
- HANSON L.A., AHLSTEDT S., ANDERSON B., CARLSSON B., DAHLGREN U., LIÖDIN-JANSON G., MATTSBY-BALTZER I., SVANBORG EDEN C., *J. Reticuloendothelial Soc.*, 1980, S 28, 1 [37]
- HAVEZ R., GUERRIN F., MUH J.P., BISERTE G., *C.R. Soc. Biol.*, 1966, 160, 571 [30]
- HEKMAN A.M., RUKME P., *Fert. Steril.*, 1969, 20, 312 [33]
- HEKMAN A.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 251, 380 [35]
- HENTGES D.J., *J. Bacteriol.*, 1967 a, 93, 1369 [25]
- HENTGES D.J., *J. Bactériol.*, 1967 b, 93, 2029 [25]
- HEREMANS J.F., in "The Antigens" [M. Sela ed.], 1974, vol. II, p. 365, Academic Press, New York, San Francisco, London, [38, 59]

- HERMANN J., JOLLES J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 200, 178 [31]
- HESSE W., *Zschr. Hyg. Inpektr.*, 1894, XVII, 238 [27]
- HEWLETT E.L., GUERRANT R.L., EVANS D.J., GREENOUGH W.B., *Nature*, 1974, 249, 371 [11]
- HILL I.R., PORTER P., *Immunology*, 1974, 26, 1239 [52]
- HIRANO S., HAYASHI H., TERABAYASHI T., ONODERA K., ISEKI S., KOCHIBE N., NAGAI Y., YAGI N., NAKAGAKI T., IMAGAWA T., *J. Biochem.*, 1968, 64, 563 [21]
- HIRSCHHORN N., MOLLA A., *Johns Hopkins Med. J.*, 1969, 125, 291 [6]
- HODES H.L., BERGER R., HEVIZY M., *Am. J. Dis. Child.*, 1962, 104, 457 [39]
- HOGG D.M., JAGO G.R., *Biochem. J.*, 1970, 117, 778 [28]
- HOLMGREN J., *Infect. Immunity*, 1973, 8, 851 [11]
- HOLMGREN J., SODERLIND O., WADSTROM T., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1973 a, 81, 757 [11]
- HOLMGREN J., LONNROTH I., SVENNERHOLM L., *Infect. Immunity*, 1973 b, 8, 208 [16]
- HOOGENDOORN H., PIESSENS J.P., SCHOLTES W., STODDARD L.A., *Caries Res.*, 1977, 11, 77 [28]
- HOOVER J.R.E., BRAUN G.A., GYORGY P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 47, 216 [19]
- HURLIMAN J., WALDESBUHL M., ZUBER C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 181, 393 [30]
- ISAACSON P., *Gut*, 1982, 23, 578 [32, 42, 43]
- ISHIZAKA T., SIAN C.M., ISHIZAKA K., *J. Immunol.*, 1972, 108, 848 [29]
- JAGO G.R., MORRISSON M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1962, 111, 585 [27]
- JENNESS R., in "Milk Proteins, Chemistry and Molecular Biology." [H.A. McKenzie eds.], 1970, vol. I, p. 17 Academic Press, New York, London [61]
- JENNESS R., SLOAN R.E., *Dairy Sci. Abstr.*, 1970, 32, 599 [27]
- JENNESS R., in "Lactation" [Larson and Smith eds.], 1974, vol. III, p. 3, Academic Press, New York [16]
- JOHANSSON B., *Acta Chem. Scand.*, 1960, 14, 510 [16, 32]
- JOLLES P., JOLLES J., *Nature [Lond.]*, 1961, 192, 1187 [120]
- JOLLES J., JAUREGUI-ADELL J., BERNIER I., JOLLES P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 668 [31]

- JOLLES J., DIANOUX A.C., HERMANN J., NIEMANN B., JOLLES P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 128, 568 [31]
- JOLLES J., JOLLES P., *Biochemistry*, 1967, 6, 411 [31]
- JOLLES J., JOLLES P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 2543 [31]
- JOLLES J., JOLLES P., *Helv. Chim. Acta*, 1969, 52, 2671 [31]
- JOLLES J., JOLLES P., *Helv. Chim. Acta*, 1971, 54, 2668 [31]
- JOLLES J., JOLLES P., *FEBS Lett.*, 1972, 22, 31 [31]
- JOLLES P., *Biomedicine*, 1976, 25, 275 [44, 45]
- JUNE R.C., FERGUSON W.W., WOLFEL M.T., *Am. J. Hyg.*, 1953, 57, 222 [8]
- KANTOR H.S., TAO P., GORBACH S.L., *J. Infect. Dis.*, 1974 a, 129, 1 [11]
- KANTOR H.S., TAO P., WISDOM C., *Infect. Immunity*, 1974 b, 9, 1003
- KAPIKIAN A.Z., KIM H.W., WYATT R.B., *New. Engl. J. Med.*, 1976, 294, 965 [6]
- KELLY M., BUTLER D.G., HAMILTON J.R., *J. Pediatr.*, 1972, 80, 925 [7]
- KENNY J.F., BOESMAN M.I., MICHAELS R.H., *Pediatrics*, 1967, 39, 202 [39]
- KIRBY A.C., HALL E.G., COACKLEY W., *Lancet*, 1950, 2, 201 [7, 8]
- KIRKPATRICK C.H., GREEN J., RICH R.R., SCHADE A.L., *J. Infect. Dis.*, 1971, 124, 539 [46]
- KLOCKARS M., OSSERMAN E.F., *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, 22, 139 [31]
- KLOCKERS M., ROBERTS P., *Acta Haemat.*, 1976, 55, 289 [44]
- KOBATA A., in "The Glycoconjugates" (M.I. Horowitz and W. Bigman eds.), 1977, vol. I, p. 423, Academic Press, New York, London [17]
- KOBATA A., YAMASHITA K., TACHIBANA Y., *Method. Enzymol.*, 1978, 50, 216 [17]
- KOHLER E.M., *Am. J. Vet. Res.*, 1988, 29, 2263 [8]
- KORHONEN H., in "Resistance factors and genetic aspects of mastitis control" (L. Basselik-Chabielska ed.), 1981, p. 421, Ossolineum, Warszawa, Poland [28]
- KRAWCZUK J., SAWICKI Z., KRAWCZYNSKI J., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1978, 16, 343 [43]
- KRONBORG I.J., HOWARD A., *Current Therapeutics*, Oct. 1980, 21 [12]

- KUHN R., BROSSMER R., Chem. Ber., 1956, 89, 2471 [19]
- KUHN R., BAER H.H., Chem. Ber., 1956, 89, 504 [18]
- KUHN R., KIRSCHENLOHR W., Ann. der Chem., 1956, 600, 135 [20]
- KUHN R., Angew. Chem., 1957, 69, 23 [25]
- KUHN R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297 [19]
- KUHN R., in "Carbohydrate Chemistry of substances of Biological Interest." Proc. IV Intern. Cong. Biochem. Vienne, 1958 [M.L. Wolform eds.], 1959, vol. I, p. 67, Pergamon Press [19]
- KUHN R., GAUHE H., Chem. Ber., 1962, 95, 518 [18]
- KUHN R., GAUHE H., Chem. Ber., 1965, 98, 395 [19]
- KWAN C.N., WISHNOW R.M., Infect. Immunity, 1974, 10, 146 [11]
-
- LAMBERT-ZECHOVSKY N., BINGEN E., BEAUFILS F., BOURRILLON A., MATHIEU H., Path. Biol., 1981, 29, 293 [98]
- LAMM M.E., Adv. Immunol., 1976, 22, 223 [38]
- LAMPRECHT C.L., KRAUSE H.E., MUFSON M.A., J. Infect. Dis., 1976, 134, 211 [39]
- LASHCHENKO P., Z. Hyg. Infektionskr., 1909, 64, 419 [30]
- LAUBER E., REINHARDT M., Am. J. Clin. Nutr., 1979, 32, 1159 [16]
- LAURELL A.B., Vox Sang., 1957, 2, 312 [136]
- LAURELL A.B., Ann. Biochem., 1965, 10, 358 [137]
- LAW B.A., REITER B., J. Dairy Res., 1977, 44, 595 [46]
- LEBENTHAL E., in "Digestive Disease in Children." [E. Lebenthal eds.], 1978, Grune et Stratton, New York [14, 45]
- LEMIGNON L., in "Le Diagnostic de Laboratoire des Bacilles Gram(-)." Collection Technique de Base, T.I., 4ème ed., 1972 [143]
- LEPOW M.L., WARREN R.J., GRAY N., INGRAM V.G., ROBBINS F.G., New Engl. J. Med., 1961, 264, 1071 [39]
- LEVESQUE J., Ann. Ped., 1959, 35, 36 [22, 23, 25]
- LIEBHABER M., LEWISTON N.J., ASQUITH M.T., OLDS-ARROYO L., SUNSHINE P., J. Pediatr., 1977, 91, 897 [120]
- LILJEMARK W.F., BLOOMQUIST C.G., OFSTEHAGE J.C., Infect. Immunity, 1979, 26, 1104 [38]
- LINZELL J.L., PEAKER M., Physiol. Rev., 1971, 51, 564 [16]
- LIPPARD V.W., SCHLOSS O.M., JOHNSON P.A., Am. Med. Assoc. J. Dis. Child., 1936, 51, 562 [40]
- LODINOVA R., JOUJA V., Acta Paediatr. Scand., 1977, 66, 709 [32, 42, 44]

- LONNERDAL B., FORSUM E., GEBRE-MEDHIN M., HAMBRAEUS L., Am. J. Clin. Nutr., 1976 a, 29, 1134 [16, 27, 34]
- LONNERDAL B., FORSUM E., HAMBRAEUS L., Am. J. Clin. Nutr., 1976 b, 29, 1127 [16, 27]
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265 [139]
- LYSTER R.L.J., J. Dairy Res., 1972, 39, 279 [25]
- LYSTER R.J.L., HUNJAN M., HALL E.D., Ann. Nestlé, 1983 (sous presse) [121, 122, 123]
- MAASS G., BARCKAUS C., Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., 1980, A 246, 294 [39]
- Mc CLELLAND D.B.L., SAMSON R.R., PARKIN D.M., SHEARMAN D.J.C., Gut, 1972, 13, 450 [56]
- McCLELLAND D.B.L., Van FURTH R., Immunology, 1975, 28, 1099 [31, 43]
- McCLELLAND D.B.L., McGRATH J., SAMSON R.R., Acta Paediatr. Scand., 1978, S 271, 3 [14, 29, 32, 34]
- McGONAGLE T.J., SEREBRO H.H., IBER F.L., BAYLESS T.M., HENDRIX T.R., Gastroenterology, 1969, 57, 5 [6]
- McKENZIE H.G., in "Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology." vol. I,II, Academic Press, New York 1970, 1971 [25]
- McNABB P.G., TOMASI T.B., Ann. Rev. Microbiol., 1981, 35, 477 [37, 40]
- MAGNUSSON K.E., STJERNSTROM I., Immunology, 1982, 45, 239 [38]
- MAHALANABIS D., WALLACE C.K., KALLEN R.J., MONDAL A., PIERCE N.F., Pediatrics, 1970, 45, 374 [6]
- MAJUMBAR A.S., GHOSE A.C., Infect. Immunity, 1981, 32, 9 [52]
- MALMQUIST J., JOHANSSON B.G., Biochim. Biophys Acta, 1971, 236, 38 [35]
- MALYOTH G., Ann. Pediatr., 1949, 173, 34 [21]
- MANCIAUX L., Thèse de Médecine, 1958, Nancy [21]
- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., Immunochemistry, 1965, 2, 235 [65, 138]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., PROGNOT J., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 111, 466 [33]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., in "Protids of Biological Fluids." [H. Peeters eds.], 1966, 14, p. 115, Elsevier, Amsterdam [46]

- MAJUMBAR A.S., GHOSE A.C., *Infect. Immunity*, 1981, 32, 9
[52]
- MALMQUIST J., JOHANSSON B.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971,
236, 38 [35]
- MALYOTH G., *Ann. Ped. Basel*, 1949, 173, 34 [21]
- MANCIAUX L., Thèse de Médecine n° 70, Nancy, p. 55 [21]
- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., *Immunochemistry*,
1965, 2, 235 [65, 138]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., PRIGNOT J., *Biochim. Biophys.
Acta*, 1965, 111, 466 [33]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., in "Protids of Biological Fluids"
[H. Peeters eds.], 1966, 14 p. 115 Elsevier, Amsterdam
[46]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., PRIGNOT J., WAUTERS G., *Thorax*,
1966, 21, 538 [46]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1968, 6, 579
[32]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E., *J. Exp. Med.*, 1969,
130, 643 [33]
- MASSON P.L., "La Lactotransferrine" Collection "Medico
Monographies d'Agrégés". [S.A. Arscia eds.], 1970 [33, 34,
35, 96]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1971,
39 B, 119 [19, 34]
- MATA J.L., URUTIA J.J., GARCIA B., FERNANDEZ R., *Ann. J.
Dis. Child.*, 1969, 117, 142 [25]
- MAUBOIS J.L., BRULE G., *Le lait*, 1982, 62, 484 [74]
- MAZURIER-DEHAINE C., Thèse 3ème cycle, Lille, 1973 29[34]
- MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., *FEBS Lett.*, 1974, 48,
262 [33]
- MAZURIER J., SPIK G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 629,
399 [33]
- MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL
J., JOLLES P., *Experientia*, 1983, 39, 135 [33]
- MERSON M.H., MORRIS G.K., SACK D.A., WELLS J.G., FEELEY J.C.,
SACK R.B., CREECH W.B., KAPIKIAN A.Z., GANGAROSA E.J., *N.
Engl. J. Med.*, 1976, 294, 1299 [9]
- MERSON M.H., ØRSKOV F., ØRSKOV I., SACK R.B., HUQ I.,
KOSTER F.T., *Infect. Immun.*, 1979, 23, 325 [9]
- MESTECKY J., MCGHEE J.R., CRAGO S.S., JACKSON S., KILIAN M.,
KIYONO H., BABB J.L., MICHALEK S.M., *J. Reticulendothelial
Soc.*, 1980, S 28, 45 [37]

- MASSON P.L., HEREMANS J.F., PROGNOT J., WAUTERS G., Thorax, 1966, 21, 538 [46]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., Eur. J. Biochem., 1968, 6, 579 [32]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E., J. Exp; Med., 1969, 130, 643
- MASSON P.L., "La Lactotransferrine", Collection Medico Monographies d'Agrégés, (S.A. Arscia eds), Bruxelles, 1970, p. 93 [33, 34, 35, 96]
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., Comp. Biochem. Physiol., 1971, 39 B, 119 [19, 34]
- MATA J.L., URUTIA J.J., GARCIA B., FERNANDEZ R., Ann. J. Dis. Child., 1969, 117, 142 [25]
- MATA L.J., WYATT R.G., Am. J. Clin. Nutr., 1971, 24, 976 [39]
- MAUBOIS J.L., BRULE G., Le Lait, 1982, 62, 484 [74]
- MAZURIER-DEHAINE C., Thèse de 3ème cycle, 1973, Lille [34]
- MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., FEBS Lett., 1974, 48, 262, [33]
- MAZURIER J., SPIK G., Biochim. Biophys. acta, 1980, 629, 399 [33]
- MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., Experientia, 1983, 39, 135 [33]
- MERSON M.H., MORRIS G.K., SACK D.A., WELLS J.G., FEELEY J.C., SACK R.B., CREECH W.B., KAPIKIAN A.Z., GANGAROSA E.J., New Engl. J. Med., 1976, 294, 1299 [9]
- MERSON M.H., ØRSKOV F., ØRSKOV I., SACK R.B., HUQ I., KOSTER F.T., Infect. Immunity, 1979, 23, 325 [9]
- MESTECKY J., MCGHEE J.R., CRAGO S.S., JACKSON S., KILIAN M. KIYONO H., BABB J.L., MACHALEK S.M., J. Reticuloendothel. Soc., 1980, 28 S, 45 [37]
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., Biochim. Biophys. Acta, 1980, 622, 308 [33]
- METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., Biochim. Biophys. Acta, 1981, 670, 243 [33]
- MEYER K., GELLHORN A., PRUDDEN J.F., LEHMAN W.L., STEINBERG A., Am. J. Med., 1948, 5, 496 [31, 43]
- MEYER F., SENFT B., Milchwissenschaft, 1979, 34, 74 [34]
- MEYNELL G.G., Brit. J. Exp. Pathol., 1963, 44, 209 [25]
- MICHAELS R.H., J. Immunol., 1965, 94, 262 [39]
- MILES A.A., KHIMJI P.L., J. Med. Microbiol., 1975, 8, 477 [46]
- MITSUOKA T., HAYAKAWA K., Zbl. Bakt. Hyg. Iabt. Orig., 1972, A 223, 333 [23, 24]
- MITSUOKA T., HAYAKAWA K., KIMURA N., Zbl. Bakt. Hyg. Iabt. Orig., 1974, A 226, 469 [22]
- MOLLA A.M., RAHMAN M., SARKER S.A., SACK D.A., MOLLA A., J. Pediatr., 1981, 98, 835 [7]

- MONTREUIL J., C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., 1956, 242, 192
[18]
- MONTREUIL J., in "TRAITE de Biochimie Générale", Masson ed.,
Paris, 1959, 1, 1003 [25]
- MONTREUIL J., MULLET S., C.R. Soc. Biol., 1959, 153, 1364
[17]
- MONTREUIL J., KOBUS W., C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 2075
[17]
- MONTREUIL J., MULLET S., Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42,
365 [17]
- MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S., C.R. Soc. Biol.,
1960 a, 154, 732 [29, 32, 61, 128, 131, 132]
- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., Biochim. Biophys. Acta,
1960 b, 45, 413 [32]
- MONTREUIL J., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 1 [21]
- MONTREUIL J., SPIK G., in "Protins of Iron Storage and Trans-
port in Biochemistry and Medecine", [R.R. Crichton eds.],
1975, p. 27, North Holland, Amsterdam [33]
- MONTREUIL J., Adv. Carb. Chem. Biochem., 1980, 37, 157 [33]
- MONTREUIL J., BOUQUELET S., SPIK G., STRECKER G., ROMOND C.,
Communication personnelle, 1983 [21]
- MOON H.W., Am. J. Vet. Res., 1978, 172, 443 [7]
- 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, 12 [25]
- MORGAN O.S., BANKAY J., QUASH G.A., W.I. Med. J., 1975,
XXIV, 46 [56]
- MORO E., Wien. Klin. Wochenschr., 1900, 13, 144 [22]
- MORRISSON M.H., HAMILTON B., STOTZ E., J. Biol. Chem., 1957,
228, 767 [28]
- MORRISSON M.H., ALLEN P.Z., BRIGHT J., JAYOSINGHE W., Arch.
Biochem. Biophys., 1961, 111, 126 [28]
- MOSS J., VAUGHAN M., in "Secretory diarrhea", [M. Field,
J.S. Fordtran and S.G. Schultz eds.], 1980, The Williams
and Wilkins Co, Baltimore [11]
- NAGASAWA T., KIYOSAWA I., KUWAHARA K., J. Dairy Sci., 1972,
55, 1651 [19, 21, 27, 34]
- NAGY L.K., BHOGAL B.S., MCKENZIE T., Res. Vet. Sci., 1976,
21, 303 [38]
- NAKAMURA O., Zschr. Immunitatsforsch. Experimentelle and
Klinische Immunologie, 1923, 38, 425 [42]

- NALIN D.R., LEVINE M.M., MATA L., Bull. W.H.O., 1979, 57, 453 [7]
- NAMBA Y., HIDAKA Y., TAKI K., MORITOMO T., Infect. Immunity, 1981, 31, 580 [44]
- NEILANDS J.B., in "Iron in Biochemistry and Medicine" [A. Jacobs and M. Worwood eds.], 1980, vol.II, p. 529, Academic Press, London, New York [46]
- NEIMANN N., LAVERGUE E., MANCIAUX M., STERLIN S., PERCEBOIS L., *Pediarie*, 1965, 139 [23]
- NETER E., SHUMWAY C.N., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 504 [8]
- NEUT C., ROMOND C., BEERENS H., *Reprod. Nutr. Develop.*, 1980, 20, 1679 [22, 24]
- NEUT C., ROMOND C., BEERENS H., *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 1981, 14, 19 [20]
- NEWCOMB R.W., NORMANSELL D., STANWORTH D., *J. Immunol.*, 1968, 101, 905 [30]
- NICHOLS J.H., BEZKOROVAINY A., *Biochem. J.*, 1973, 135, 875 [21]
- NICHOLS J.H., BEZKOROVAINY A., PAQUE R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 412, 99 [21]
- NORTON R.G., SHOHL A.T., *Am.J. Dis. Child.*, 1926, 32, 183 [25]
- OAKLEY J.R., McWEENY P.M., HAYES-ALLEN M., EMERY J.L., *Lancet*, 1976, 1, 770 [3]
- OFEK I., MIRELMAN D., SHARON N., *Nature*, 1977, 265, 623 [9]
- OFEK I., SHARON N., *La Recherche*, 1983, 142, 376 [10]
- OGRA P.L., FISHAUT M., THEODORE C., in "Human Milk" [S. Freier et A. Eidelman eds.], 1980, p. 115, *Excerptamedica*, Amsterdam, Oxford, Princeton [29]
- ORAM J.D., REITER B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 170, 351 [46]
- OSSERMAN E.F., LAWLOR D.P., *J. Exp. Med.*, 1966, 124, 921 [31, 138]
- OTNAESS A.B., HALVORSEN S., *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. C*, 1980, 88, 247 [15]
- OTNAESS A.B., ØRSTAVIK I., *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sec.C*, 1980, 88, 15 [39]
- OTNAESS A.B., ØRSTAVIK I., *Infect. Immunity*, 1981, 33, 459 [16]
- OTNAESS A.B., SVENNERHOLM A.M., *Infect. Immunity*, 1982, 35, 738 [16]

- PEETERS T., VANTRAPPA G., *Gut*, 1975, 16, 553 [43]
- PEITERSEN B., BOHN L., ANDERSEN H., *Acta Paediatr. Scand.*, 1975, 64, 709 [29]
- PERRAUDIN J.P., PRIEELS J.P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 718, 42 [53]
- PETERSON R.G., HARTSELL E., *J. Infect. Dis.*, 1955, 96, 75 [42]
- PETULEY F., LYNNAU V., *Biochem. Zts.*, 1956, 62, 326 [21, 25]
- PHELPS C.F., ANTONINI E., *Biochem. J.*, 1975, 147, 385 [47]
- PIERCE N.F., CRAY W.C., SIRCAR B.K., *Infect. Immunity*, 1978, 21, 185 [40]
- PINKU A., HAIKIN H., FRIEDMAN M.G., SAROV I., *J. Med. Vir.*, 1982, 9, 111 [39]
- PITT J., *Pediatrics*, 1979, 64, 745 [14]
- POLIS B.D., SHMUKLER H.W., *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 475 [27]
- POLLACK S., AISEN P., LASKY F.D., VANDERHOFF G., *Br. J. Haematol.*, 1976, 34, 231 [47]
- POLONOVSKY M., LESPAIGNOL A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 320 [16]
- PRUITT K.M., TENOVUO J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 704, 204 [28]
-
- RAIBAUD P., DUCLUZEAU R., TANCREDE C., *Med. Mal. Infect.*, 1977, 7, 130 [98]
- RAPTOPOULOU-GIGI M., MARWICK K., McCLELLAND D.B.L., *Br. Med. J.*, 1977, 1, 12 [57, 121]
- REITER B., ORAM J.D., *Nature*, 1962, 193, 651 [42]
- REITER B., PICKERING A., ORAM J.D., POPE G.S., *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 33, XII [27]
- REITER B., PICKERING A., ORAM J.D., in "International Symposium Food Microbiology" 4th, [N. Molin eds.], 1964, p. 297, Almquist et Wicksell, Uppsala, Sweden [27]
- REITER B., ORAM J.D., *Nature*, 1967, 216, 328 [27]
- REITER B., ORAM J.D., *J. Dairy Res.*, 1968, 35, 67 [47]
- REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D., *Immunology*, 1975, 28, 83 [46, 47, 144]
- REITER B., in "Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes", 1976, p. 31 [F.A. Skinner and W.H. Hugo eds.] Academic Press, London [27]
- REITER B., *J. Dairy Res.*, 1978, 45, 131 [27, 34]

- REITER B., in "Oxygen Free Radicals and Tissue Damage", Ciba Foundation Symposium 1979, n°65, p. 285, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, New York [27]
- REITER B., MARSHALL V.M.E., PHILIPS S.M., Res. Vet. Sci., 1980, 28, 116 [28]
- REITER B., in "Immunological Aspects of Infection in the Foetus and Newborn" (H.P. Lambert and C.B.S. Wood eds.), 1981, p. 155, Academic Press, London [27]
- RIBADEAU-DUMAS B., "Progrès récents dans la biochimie des protéines du lait" 20ème Congrès int. de Laiterie, Paris 1978 [25]
- RIMINGTON C., Biochem. J., 1931, 25, 1062 [140]
- RIVIER D., PAGE N., ISLIKER H., Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1983, 134 C, 25 [56]
- ROGERS H.J., Immunology, 1976, 30, 425 [56]
- ROGERS H.J., SYNGE C., Immunology, 1978, 34, 19 [47, 53, 56]
- ROHDE J.E., NORTHROP R.S., in "Acute Diarrhea in Childhood" Ciba Foundation Symposium, 1976, 42, 339 [3]
- ROMOND C., BEERENS H., NEUT C., MONTREUIL J., Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1980, 131 A, 309 [20, 22, 23, 24]
- ROSENTHAL L., LIEBERMAN H., J. Infect. Dis., 1931, XVIII, 226 [32, 42]
- ROWLAND M.G.M., COLE T.J., TULLY M., DOLBY J.M., HONOUR P., J. Hyg. (Camb.), 1980, 85, 405 [38]
- RUDEL W.S.J., BLENDIS L.M., WLATERS C.L., Gut, 1977, 18, 73 [28]
- RUKME P., VISSER D., KWA H.G., HART A.A.M., Folia Med. Neerl 1971, 14, 156 [33]
- RUSSEL M.W., REITER B., J. Reticuloendothelial Soc., 1975, 18, 1 [28]
- RUSSEL M.W., BROOKER B.E., REITER B., J. Comp. Path., 1977, 87, 43 [28]
- SABIN A.B., Am.J. Dis. Child., 1950, 80, 866 [39]
- SABIN A.B., FIELDSTEEL A.H., Pediatrics, 1962, 29, 105 [15]
- SACK R.B., GORBACH S.L., BANWELL J.G., JACOBS B., CHATTERJEE B.D., MITRA R.C., J. Infect. Dis., 1971, 123, 378 [8, 9, 11]
- SACK R.B., Ann. Rev. Microbiol., 1975, 29, 333 [8]
- SACK R.B., HIRSCHHORN N., BROWNLEE I., CASH R.A., WOODWARD W.E., SACK D.A., New Engl. J. Med., 1975, 292, 1041 [9]
- SACK D.A., KAMINSKY D.C., SACK R.B., WAMOLA I.A., ØRSKOV F., ØRSKOV I., SLACK R.C.B., ARTHUR R.R., KAPIKIAN A.Z., Johns Hopkins Med. J., 1977, 141, 63 [9]

- SACK D.A., CHOWDHURY A.M.A.K., EUSOF A., Lancet, 1978, 2, 280 [7]
- SACK D.A., ISLAM S., BROWN K.H., J. Pediatr., 1980, 96, 20 [6]
- SAKAZAKI R., TAMURA K., SAITO M., Jap. J. Med. Sci. Biol., 1967, 20, 387 [8, 11, 13]
- SAMSON R.R., MIRTLE C., McCLELLAND D.B.L., Immunology, 1979, 38, 367 [56]
- SARKAR N.H., CHARNEY J., DION A.S., MOORE D.H., Cancer Res., 1973, 33, 626 [15]
- SCHADE A., CAROLINE L., Science, 1944, 100, 14 [46]
- SCHADE A., PALLAVICINI C., WEISMANN U., in "Protides in Biological Fluids" (H. Peeters), 1969, vol. 16, p. 619, Pergamon Press, Oxford [34, 35]
- SCHEIDEGGER J.J., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103 [136]
- SCHOENFELD H., J. Kinderh., 1926, 113, 19 [20]
- SCHOUB B.D., PROZESKY D.W., LECATSAS G., OOSTHUIZEN R., J. Med Microbiol., 1977, 11, 25 [39]
- SCHREIBER D.S., TRIER J.S., BLACKLOW N.R., Gastroenterology, 1977, 73, 174 [3, 7]
- SCHREIBER D.S., MORRISSON D.C., PODACK E.R., MULLER-EBERHARD H., J. Exp. Med., 1979, 149, 870 [52]
- SELSTED M.E., MARTINEZ R.J., Ann. Biochem., 1980, 109, 67 [138]
- SHARON N., ESHDAT Y., SILVERBLATT F.J., OFEK I., in "Bacterial Adherence to Cell Surface Sugars" (K. Elliott, M. D' Connor and J. Whelan eds.) 80th Ciba Foundation Symposium, 1981, p. 119, Pitman Medical, London [9]
- SHARPE M.E., LATHAM M.J., REITER B., J. Gen. Microbiol., 1969, 56, 353 [42]
- SHEPHERD R.W., TRUSLOW S., WALKER-SMITH J.A., Lancet, 1975, 2, 1082 [6]
- SHEPHERD R.W., BUTLER D.G., CUTZ E., GALL D.G., HAMILTON J.R., Gastroenterology, 1979, 76, 770 [7]
- SMITH H.W., CRABB W.E., J. Pathol. Bacteriol., 1961, 82, 53 [22]
- SMITH H.W., HALLS S., J. Pathol. Bacteriol., 1967, 93, 531 [8]
- SMITH L.D.S., HOLDEMAN L.V., Pathol. Anaerobic Bacteria, 1968, 17, 432 [25]
- SMITH H.W., GYLES C.L., J. Med. Microbiol., 1970, 3, 387 [8]

- SMITH N.W., SACK R.B., J. Infect. Dis., 1973, 127, 164
[11]
- SMITH K.L., SCHANBACHER F.L., Am. Vet. Med. Assoc., 1977,
170, 1224 [47]
- SNODGRASS D.R., FERGUSON A., ALLAN F., ANGUS K.W., MITCHELL B.,
Gastroenterology, 1979, 76, 477 [7]
- SOUTH M.A., COOPER M.D., WOLLHEIM FA., HONG R., GOOD R.A.,
J. Exp. Med., 1966, 123, 615 [30]
- SOUTH M.A., J. Pediatr., 1971, 79, 1 [5]
- SPIEGELBERG H.L., GOTZE O., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp.
Biol., 1972, 31, 655 [41]
- SPIK G., Thèse Doct. ès Sci., 1968, Lille [19, 32]
- SPIK G., MAZURIER J., in "Proteins of Iron Metabolism"
[E.B. Brown, P. Aisen, J. Fielding and R.R. Crichton eds.],
1977, p. 143, Grune & Stratton Inc., New York [33]
- SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J., DOLBY J.M., Immunology,
1978, 35, 663 [53, 56]
- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J.,
DORLAND L., Van HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., Eur. J.
Biochem., 1982, 121, 413 [33]
- SPIK G., BRUNET B., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G.,
MONTREUIL J., Acta Paediatr., 1982, 71, 979 [34]
- SPIK G., MONTREUIL J., Bull. Eur. Physiopathol. Resp.,
1983, in press [45, 47]
- STEPHENS S., DOLBY J.M., MONTREUIL J., SPIK G., Immunology,
1980, 41, 597 [55, 56]
- STOLIAR O.A., PELLETT R.P., KANIECKI-GREEN E., KLAUS M.H.,
CARPENTER C.C.J., Lancet, 1976, 1, 1258 [38]
- SUKEWA K., KIKUCHI T., HONDA H., J. Jap. Soc. Food Nutr.,
1967, 20, 45 [43]
- SVANBORG-EDEN C., SVENNERHOLM A.M., Infect. Immunity, 1978,
22, 790 [38]
- SYREN E., RAESTE A.M., Acta Haematol., 1971, 45, 29 [31]
- SZOLLOSY E., MARJAI E., LANTOS J., Acta Microbiol. Acad. Sci.
Lung, 1974, 21, 319 [120]
- TALLET S., MCKENZIE C., MIDDLETON P., KERANER B.,
HAMILTON R., Pediatrics, 1977, 60, 217 [6, 7]
- TASSOVATS B., KOTSICH A., Ann. Pediatr., 1961, 37, 285
[24, 25]
- TASSOVATS B., KRAGOUYEVITCH D., Ann. Pediatr., 1964, 40, 291
[25]
- TAYLOR J., POWELL B.W., WRIGHT J., Br. Med. J., 1949, 2, 117
[7]

- TAYLOR J., Zentrbl. Bakteriolog. Orig. A, 1959, 174, 357
[7]
- TERENT A., HALL GREN R., VENGE P., BERGSTROM K., Stroke,
1981, 12, 40 [33]
- THEODORE T.S., SCHADE A.L., J. Gen. Microbiol., 1965, 40,
385 [48]
- THOMAS E.L., in "Lactoperoxydase system : chemistry and
biological significance" (K.M. Pruitt and J. Tenovua eds.),
1983, Marcel Dekker Inc., in press [28]
- TILLMANS J., Biochem. Z., 1929, 215, 36 [140]
- TISSIER H., "Recherches sur la flore intestinale normale
et pathologique du nourrisson", 1900, Paris [22]
- TISSIER H., Ann. Inst. Pasteur, 1905, 19, 109 [22]
- TOMASI T.B., BIENENSTOCK J., Adv. Immunol., 1968, 9, 1
[30]
- TOMASI T.B., CALVANICO N., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp.
Biol., 1968, 27, 617 [30]
- UNDERDOWN B.J., KNIGHT A., PAPSIN F.R., J. Immun., 1976, 116,
1435 [29]
- VAKIL J.R., CHANDAN R.C., PARRY J.M., SHAHANI K.M., J.
Dairy Sci., 1969, 52, 1192 [41]
- Van GUT H., Van GOOL J., LADIGES N.C.J.J., BOERS W., Quat.
J. Exp. Physiol., 1975, 60, 79 [33]
- Van HEYNINGEN S., Science, 1973, 183, 656 [6]
- Van SNICK J.L., MASSON P.L., HEREMANS J.F., J. Exp. Med., 1974,
140, 1068
- VEERHUIS R., KIJLSTRA A., Exp. Eye Res., 1982, 34, 257 [56]
- Von MURALT G., GUGLER E., ROULET D.L., in "Protides of the
Biological Fluids", Proceedings of the 8th Colloquim, Brugge
1960, p. 166, Elsevier, Amsterdam [29]
- VORHERR H., in "Lactation. A comprehensive treatise." (Larson)
vol. IV, p. 181, Academic Press, New York, 1978 [16]
- WAGNER M., STARR T.J., Germfree Biology, Plenum Press New York,
1969, 5, 389 [25]
- WAKELIN D., Nature, 1978, 273, 617 [40]
- WALKER W.A., ISSELBACHER K.J., BLOCH K.J., Science, 1972,
177, 608 [40]
- WALKER W.A., ISSELBACHER K.J., New Engl. J. Med., 1977, 297,
767 [40]

- WARDLAW A.C., J. Exp. Med., 1962, 115, 123 [52]
- WARREN R.J., LEPOW M.L., BARTSCH G.E., ROBBINS F.C., Am. J. Dis. Child., 1961, 102, 685 [39]
- WEINBERG E.D., Microbiol. Rev., 1978, 42, 45 [46, 47]
- WELSH J.K., SKURRIE I.J., MAY J.T., Infect. Immunity, 1978, 19, 395 [15]
- WELSH J.K., MAY J.T., J. Pediatr., 1979, 94, 1 [37]
- WERNER I., ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1952, 57, 230 [140]
- WETTSTEIN F.O., STENT G.S., J. Mol. Biol., 1968, 38, 25 [48]
- WILLIAMS R.C., GIBBONS R.J., Science, 1972, 177, 697 [38]
- WOODWARD D.R., Dairy Sci. Abstr., 1976, 38, 137 [25]
- WRIGHT R.C., TRAMER J., J. Dairy Res., 1958, 25, 104 [27]
-
- YOLKEN R.H., WYATT R.G., MATA L., URRUTIA J.J., GARCIA B., CHANOCK R.M., KAPIKIAN A.Z., J. Pediatr., 1978, 93, 916 [39]
- YOW M.D., MELNICK J.L., BLATTNER R.J., Am. J. Epidemiol., 1970, 92, 33 [5]
-
- ZENSER T.V., METZGER J.F., Infect. Immunity, 1974, 10, 503 [11, 16]
- ZILLIKEN F., BRAUN G.A., GYORGY P., J. Biol. Chem., 1956, 63, 394 [19]

