



HAL
open science

Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxydase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention

Jp Perraudin

► **To cite this version:**

Jp Perraudin. Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxydase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention. *Le Lait*, 1991, 71 (2), pp.191-211. hal-00929239

HAL Id: hal-00929239

<https://hal.science/hal-00929239>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxydase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention

JP Perraudin

Biopole, 75, Bd Edmond Machtens b16, B-1080 Bruxelles, Belgique

Résumé — Depuis fort longtemps, les hommes ont su mettre à profit les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines laitières. La connaissance de ces propriétés permet aujourd'hui d'utiliser ces protéines en tant que matières premières de base indispensable dans la technologie de nouveaux produits.

À l'heure actuelle, avec des techniques de séparation de plus en plus sophistiquées, de nouvelles voies d'utilisation ont pu être explorées puis exploitées. Elles représentent les premières utilisations non alimentaires sur lesquelles est venue se greffer une approche de recherche totalement différente de celle pratiquée jusqu'à nos jours dans le secteur laitier.

En effet, l'amélioration des techniques de purification a permis à un certain nombre d'entreprises de disposer actuellement de quelques protéines laitières en quantités suffisantes afin d'envisager l'investigation de nouveaux horizons à plus hautes valeurs ajoutées.

C'est actuellement le cas de la lactoferrine et de la lactoperoxydase.

Ces 2 molécules, présentes dans tous les liquides de sécrétion chez l'homme, ont, si l'on en juge le nombre de publications, suscité un grand intérêt auprès des scientifiques de recherche fondamentale. Depuis de nombreuses années, les chercheurs se penchent sur l'étude des propriétés spécifiques de la lactoferrine et de la lactoperoxydase et essaient de comprendre leur rôle physiologique.

Il est vrai qu'en tant que piègeur du fer, la lactoferrine avait surtout suscité des recherches sur son rôle antibactérien; mais à l'heure actuelle, d'autres activités de la protéine sont mises en évidence démontrant son effet sur la croissance cellulaire, son rôle comme transporteur du fer et son action immunostimulatrice.

En ce qui concerne la lactoperoxydase, les recherches sont principalement axées sur son activité antibactérienne, mais depuis quelque temps, on a pu démontrer une action spectaculaire de l'enzyme contre certains virus.

lactoferrine / lactoperoxydase / technique de purification / activité biologique

Summary — **Biologically-active proteins. Recently-acquired knowledge and separation technology.** *Mankind has been exploiting the functional and nutritional properties of milk proteins for centuries. Knowledge of these properties now enables us to use them as indispensable raw materials for new-product technology. At the present time, thanks to increasingly more sophisticated separation techniques, new avenues for their use have been explored and adopted. These are the first non-food uses of these proteins. They have been developed using a totally different research approach from that used until now in the dairy industry.*

Improved purification techniques have enabled a certain number of enterprises to obtain sufficiently large quantities of milk proteins to make the investigation of new, higher-added-value horizons worthwhile. This is the case for lactoferrin and lactoperoxidase. Judging by the number of articles in the literature, these two molecules, which are found in all of the secretions of the human body, have attracted great interest in fundamental research. Researchers have been studying the specific prop-

erties of lactoferrin and lactoperoxidase and to have tried to understand their physiological roles for many years. Given lactoferrin's ability to trap iron, research focused primarily on lactoferrin's antibacterial effect. Today, however, the protein's other properties – its effect on cell growth and its role in iron transport, have been discovered. Lactoperoxidase research has likewise focused mainly on the enzyme's antibacterial activity. However, lactoperoxidase has recently been shown to display spectacular action against some viruses.

lactoferrin / lactoperoxidase / purification process / biological activity

MÉTHODES D'OBTENTION DE LA LACTOFERRINE ET DE LA LACTOPEROXYDASE

À en juger par l'abondance de la littérature scientifique et des brevets, concernant la mise au point de l'extraction de la lactoferrine et de la lactoperoxydase, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le sujet. Ces protéines sont de plus en plus recherchées, non seulement pour leur intérêt nutritionnel, mais surtout pour d'autres propriétés qui leur permettent de trouver un débouché de valorisation dans d'autres secteurs tels que la pharmacie et la cosmétique.

La figure 1 montre un schéma classique d'extraction industrielle à partir d'une colonne renfermant une résine échangeuse d'ions. Le système est simple. On fait passer sur cette résine, la matière première (lactosérum, lait) contenant la lactoferrine et la lactoperoxydase. Après absorption, on lave la résine plusieurs fois, puis on fait passer une solution de décrochage qui sera, soit concentrée par ultrafiltration, soit précipitée, pour éliminer les contaminants. Le concentrat ou le surnageant peut, suivant les cas, être rechromatographié, pour séparer la lactoferrine de la lactoperoxydase et obtenir des produits dont le taux de pureté sera supérieur à 90%. Avant de procéder à l'extraction suivante, on devra régénérer la résine.

Ce qui différencie principalement les procédés, c'est le type de résine utilisé

pour l'extraction (tableau I). Roussel Uclaf (1985) fait appel, pour n'extraire que la lactoferrine, à des groupements carboxyméthyles greffés sur un support composé de copolymère acrylique. Entremont (1988) utilise une résine dont le support est de la silice, sur lequel se trouvent fixés des groupements sulfopropyls. Par contre, Snow Brand (1988) utilise des polysaccharides tels que la cellulose ou la chitine es-

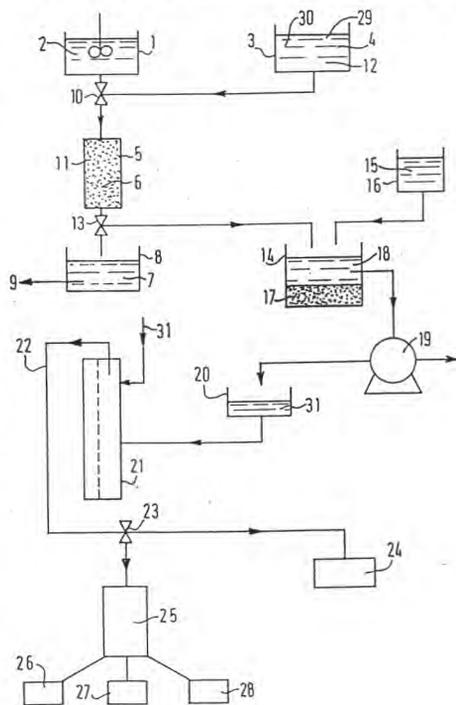


Fig 1. Schéma d'extraction (Entremont, 1988). *Extraction method (Entremont, 1988; Patent No (8703517).*

tériorifiées avec de l'acide sulfurique anhydre; Oléofina (1986), de l'alginate ou du carraghénane polymérisé, soit sous forme de billes, soit sous forme de fils. SMR (1988) dont le procédé a la particularité d'obtenir en une étape la lactoferrine et la lactoperoxydase, utilise de la Sépharose comme support couplé avec des groupements sulfopropyls. De son côté, Morinaga (1988) a préféré un échangeur d'ions faibles qui possèdent des groupements carboxyméthyls, afin de n'obtenir que la lactoferrine.

Plusieurs points sont primordiaux, en général, lorsque l'on veut extraire de façon

industrielle la lactoferrine et la lactoperoxydase.

Tout d'abord, il faut établir le «design» du module qui recevra la résine, afin de ne pas perturber la ligne de traitement habituelle de la matière première.

Ensuite, il faudra étudier les paramètres physiques des résines :

- en tenant compte de la taille des billes pour éviter tout colmatage dans le module;
- en tenant compte de la surface interne et externe d'absorption des billes, de façon à contrôler le rapport existant entre la vitesse d'écoulement de la matière première

Tableau I. Méthodes d'extraction utilisées par différentes sociétés.

Extraction methods performed by different companies.

<i>Société</i>	<i>Produit</i>	<i>Échangeur d'ions</i>	<i>pH</i>	<i>Lavage solution</i>	<i>Décrochage solution</i>
Roussel Uclaf	LF	CM Trisacryl (IBF) CM Sepharose CL 6 B (pharmacie)	7-8	0,15 mol.l ⁻¹ NaCl	0,4 mol.l ⁻¹ NaCl
Oléofina	LF-LP	Polysaccharide Acide : Alginate Carraghénane	6,5	0,03 mol.l ⁻¹ CaCl ₂	0,5 mol.l ⁻¹ CaCl ₂
Elf Aquitaine	LF-IGG	Silice	8,2	0,005 mol.l ⁻¹ PO ₄ ²⁻	0,5 mol.l ⁻¹ HAC 0,1 mol.l ⁻¹ NaCl
Entremont	LF-LP IGG	Silice Spherosil	6,4	0,15 mol.l ⁻¹ NaCl	Acide pH 1-4
Snow Brand	LF	Cellulofine Cellulose-H ₂ SO ₄ Chitine-H ₂ SO ₄	5	0,3 mol.l ⁻¹ NaCl 0,3 mol.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄	1 mol.l ⁻¹ NaCl 1 mol.l ⁻¹ NaCl
SMR	LF-LP	S-Sepharose	6,5	0,01 mol.l ⁻¹ PO ₄ ²⁻	0,075 mol.l ⁻¹ NaCl 0,3 mol.l ⁻¹ NaCl 0,9 mol.l ⁻¹ NaCl
Morinaga	LF	Carboxyméthyl	6,7	0,01 mol.l ⁻¹ NaCl 0,0 mol.l ⁻¹ KCl 0,01 mol.l ⁻¹ MgCl ₂	1,5 mol.l ⁻¹ NaCl

et la constante d'affinité des molécules sur la résine;

– en tenant compte de la spécificité du groupement ionique, afin que seules les molécules visées s'absorbent, ne perturbant, en aucun cas, les caractéristiques physiques de la matière première.

Enfin, du point de vue économique, il faut tenir compte des possibilités de régénération des résines.

Lactoferrine

Le rôle de la lactoferrine est étroitement lié à l'importance du fer. Si le fer est un métal précieux pour la vie, il peut aussi devenir un poison. Sous forme libre, le fer en trop grande quantité présente une menace pour l'organisme. En effet, c'est un élément indispensable pour les bactéries infectieuses et les cellules tumorales. Il influence également le développement de certains cancers et joue un rôle sans équivoque dans le développement de l'arthrite. J Brock (1989) a mis en évidence qu'il existait une relation étroite entre ce métal à l'état libre et l'immunité. En fait, les cellules du système immunitaire protègent les tissus de la toxicité du fer, jouant ainsi un rôle primordial dans le contrôle de la concentration du métal. De telles cellules synthétisent et relarguent des protéines telles que la lactoferrine, la transferrine et la ferritine, capables de neutraliser le fer, c'est-à-dire d'éliminer sa toxicité en le fixant.

La lactoferrine est une glycoprotéine que l'on retrouve dans la plupart des sécrétions externes, lait, salive, larmes etc. et dans les leucocytes polymorphonucléaires. Son poids moléculaire est de 77 000 et elle contient 2 sites qui lui permettent de fixer chacun un ion ferrique (Fe^{3+}). Le bicarbonate est essentiel pour

la fixation du fer. Le complexe lactoferrine-fer est très résistant à la protéolyse et très stable jusqu'à un pH aussi bas que 2. La lactoferrine native possède un taux de saturation en fer de 10–30%. La présence de citrate peut déplacer le bicarbonate de la lactoferrine et, dès lors, relarguer le fer. Toutefois, la fixation du fer dépend du rapport bicarbonate/citrate, influençant ainsi l'activité bactériostatique de la lactoferrine.

L'attention des chercheurs fut d'abord attirée par l'activité antibactérienne de la lactoferrine. Cet intérêt très vif fut lié au fait qu'il était évident que les enfants nourris au sein, étaient moins susceptibles aux infections microbiennes que les enfants nourris au biberon. Malheureusement, l'activité antibactérienne bien authentique *in vitro*, n'a pas encore été prouvée de manière concluante *in vivo*. Actuellement, il est généralement accepté que la lactoferrine paralyse les bactéries, de haute exigence en fer (*ie E coli*), lorsqu'elles sont incorporées dans le lait humain. De même, la raison d'être de l'utilisation de la lactoferrine dans les formules de nourriture destinées aux enfants provient des effets du lait humain sur la flore intestinale des bébés.

Que des enfants soient nourris au sein ou au biberon, leur intestin est d'abord colonisé par des entérobactéries gram⁻. Leur matière fécale peut contenir de manière prédominante des *E coli*. Cette colonisation de départ, fut observée chez beaucoup d'espèces animales, en analysant non pas la flore fécale mais le contenu bactérien dans les différentes sections de l'intestin. Ce n'est qu'après une semaine que les bébés nourris au sein, possèdent dans leur flore fécale des bifido-bactéries dépassant les entérobactéries dans la proportion de 1 000 pour 1. Comme on peut l'observer figure 2, la flore des nourrissons ayant reçu un lait classique et celle de ceux qui ont reçu ce même lait mais contenant une certaine quantité de lactoferrine

(65 mg/l) contiennent des proportions différentes des 2 lignées de germes. Morinaga a également démontré que la présence de lactoferrine dans un lait destiné à l'alimentation infantile augmente le taux d'inhibition des bactéries nuisibles et permet à la flore d'être proche de celle des enfants nourris au sein (fig 3).

Un autre fait, illustrant le phénomène décrit ci-dessus a été observé par l'étude du développement de la flore intestinale chez les nourrissons ayant reçu des formulations contenant un taux important de fer métallique (sulfate de fer) pour empêcher les anémies. Il fut démontré de manière concluante que même 5 mg/l de fer (la plupart des formules en contiennent au moins 12 mg/l), ont un effet sur le développement de la flore intestinale durant les 12 pre-

mières semaines après la naissance. Contrairement aux enfants nourris au sein, pour lesquels les bifidobactéries dominent les *E coli*, les enfants recevant une formule de lait fortifié en fer, possèdent un taux important de *E coli* et d'autres entérobactéries. On a même pu observer une déstabilisation des *Bifidus*.

Mais la simple explication de l'effet de la lactoferrine fixant le fer du milieu, permettant ainsi l'inhibition de croissance n'est pas défendable. En effet, si la lactoferrine est capable d'inhiber la croissance des cellules de *Bacillus stéarothermophilus* ou de *Bacillus subtilis* sous leur forme végétative, d'autres composés capables de fixer le fer, tels les desferrioxamines, n'ont montré aucune activité inhibitrice. De plus, Stuart *et al* (1984) ont prouvé que la lactoferrine agit

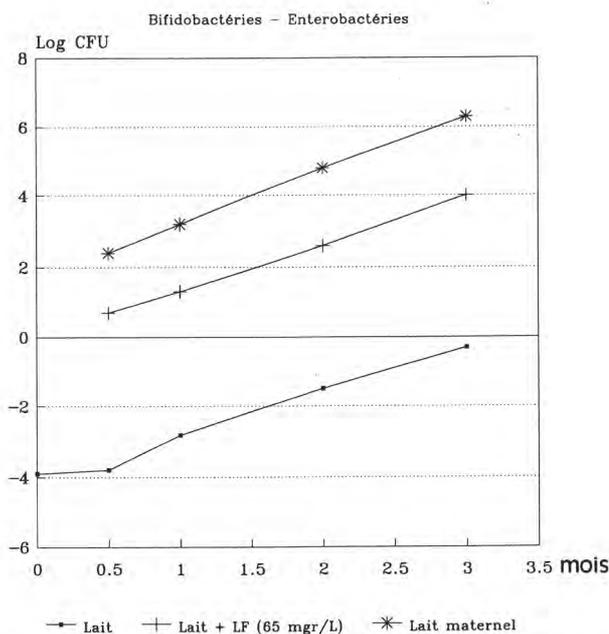


Fig 2. Bactéries contenues dans la matière fécale d'enfants nourris au lait maternel (*), avec un lait contenant de la lactoferrine (+) et un lait classique (■).
Bacteria contained in the feces of babies fed with breastmilk (), with milk containing lactoferrin (+) and normal milk (■).*

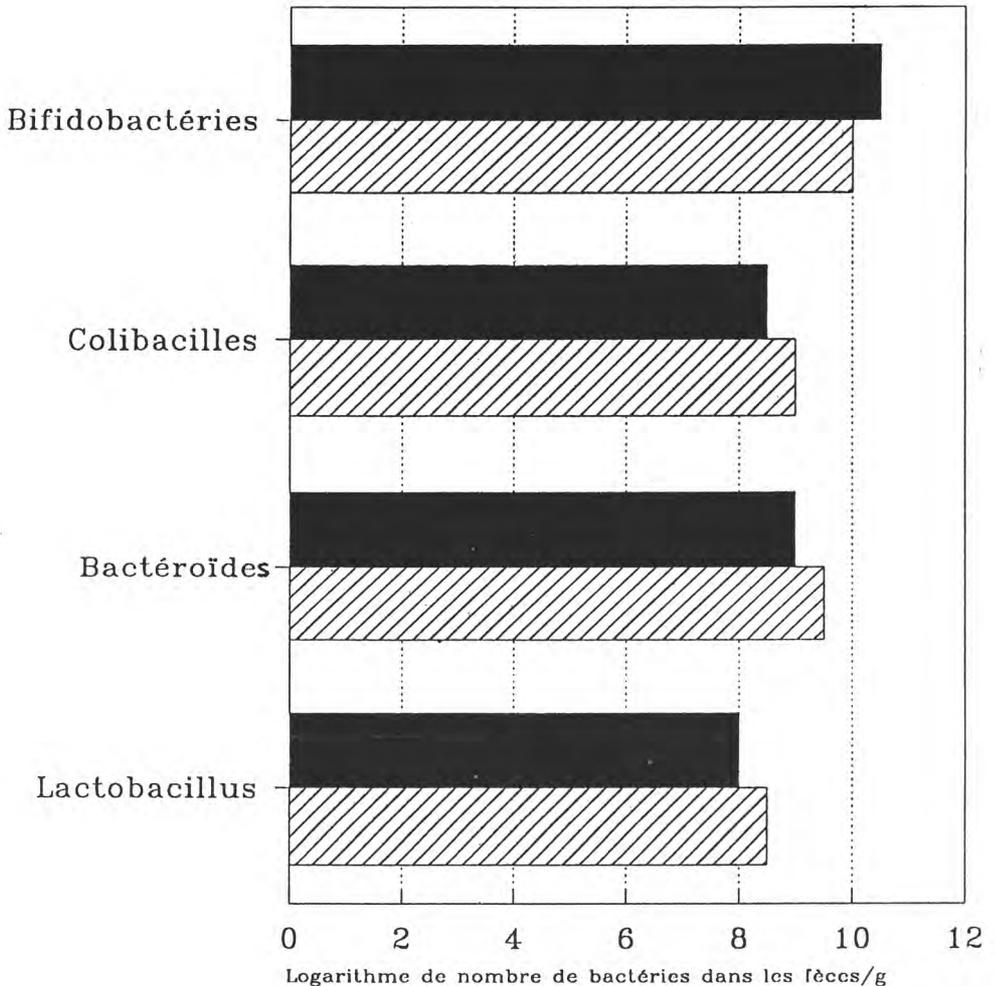


Fig 3. Bactéries contenues dans la matière fécale d'enfants nourris au lait maternel (barre noire) et d'enfants nourris avec un lait (BF-L) actuellement en vente au Japon par la société Morinaga (barre hachurée).

Bacteria contained in the feces of babies fed with breastmilk (black bar) and with milk (hatched bar) named BF-L and sold by Morinaga Company in Japan. ■ breast milk. ▨ milk BF-L.

directement sur les coliformes. Ils ont montré que l'ajout de lactoferrine en large excédent par rapport à la quantité de fer présent dans le milieu, augmentait l'effet inhibiteur de la croissance des *E coli*. De

leur côté, Kalfas *et al* (1990) et Naidu *et al* (1990a, b, c, d) ont démontré que l'action de la lactoferrine vis-à-vis d'un nombre important d'espèces comme le *Yersinia*, le *Campylobacter*, les Salmonelles, les shi-

gelles, le *Staphylococcus aureus*, le *Porphyromonas gingivalis*, se faisait par une liaison spécifique entre la lactoferrine et chacun de ces microorganismes. Ils ont également réussi à isoler le récepteur de la lactoferrine se trouvant sur la membrane du *Staphylococcus aureus*.

Depuis lors, les chercheurs se sont penchés sur le rôle possible des sidérophores dans le mécanisme d'inhibition des microorganismes par la lactoferrine. En fait, sous des conditions de stress (c'est-à-dire avec des niveaux de fer limités), beaucoup de microorganismes synthétisent des sidérophores (protéines bactériennes fixatrices du fer) telles que l'aérobactine et l'entérocholine. Le mécanisme d'action de ces protéines secrétées par les microorganismes, consiste à fixer le fer du milieu; et à transporter le métal sur certaines protéines membranaires au niveau desquelles le fer sera internalisé. Or *in vitro*, il a été démontré que les sidérophores sont capables de fixer le fer avec une constante d'affinité nettement supérieure à celle de la lactoferrine et sont même capables de déplacer le fer de la lactoferrine. La question qui se pose est de savoir quelles sont les relations existantes entre la synthèse des sidérophores et la présence de la lactoferrine dans le milieu.

Les interactions entre la lactoferrine et les microorganismes ont également pu être mises en évidence lorsque l'on associe la molécule avec du lysozyme (Perraudin et Prieels, 1982). Ces expériences ont montré que lors de la libération des protoplastes du *Micrococcus luteus* par l'activité du lysozyme, la présence de lactoferrine permettait leur agglutination (fig 4). Ce même phénomène fut observé par Suzuki *et al* (1989) dans le cas de *E coli*, et par Soukka *et al* (1990) dans le cas des *Streptococcus mutans*.

D'un autre côté, Shimamura (1989) s'est penché sur l'effet promoteur de la lactoferrine sur les bifidobactéries (fig 5).

Le résultat final de ces 2 actions de la lactoferrine sur les microorganismes renforce les observations faites sur la flore des enfants nourris soit au sein, soit avec un lait contenant du fer, soit avec un lait contenant de la lactoferrine.

Toutefois, le rôle de la lactoferrine ne se limite pas à son action sur les microorganismes. Bien que son importance ait été controversée pendant des années, elle apparaît de plus en plus comme un constituant essentiel du lait maternel, sur le plan de la nutrition en fer. Elle joue un rôle central dans l'apport du fer aux nourrissons. Cette idée a été concrétisée par la caractérisation dans les selles des nourrissons alimentés au sein, de lactoferrine partiellement dégradée, mais encore capable de fixer le fer du milieu. Les premières expériences, suggérant une spécificité de reconnaissance de la lactoferrine et l'absence de reconnaissance des transferrines, ont été réalisées par Cox *et al* (1979), sur des biopsies provenant du duodénum humain. La présence d'un récepteur membranaire spécifique des lactoferrines à la surface de la bordure en brosse des entérocytes présents dans la partie duodénale a été mise en évidence par Mazurier *et al* (1985) sur des entérocytes de lapin, par Hu *et al* (1989) sur des entérocytes de souris et par Davidson et Lönnerdal (1985) sur des entérocytes de singe. Le récepteur ainsi isolé, possède une masse moléculaire de 100 000. Il fixe d'une manière spécifique et saturable les différentes lactoferrines. La fixation ne dépend pas du degré de saturation en fer de la protéine, mais du pH, avec un maximum à pH 5,5. Elle est, en outre dépendante de la concentration en calcium. La partie glycanique de la protéine ne joue pas de rôle dans le mécanisme de reconnaissance, c'est la partie protéique des lactoferrines qui est reconnue. Le récepteur ne présente aucune affinité pour les transferrines sur la bordure en brosse et sa pré-

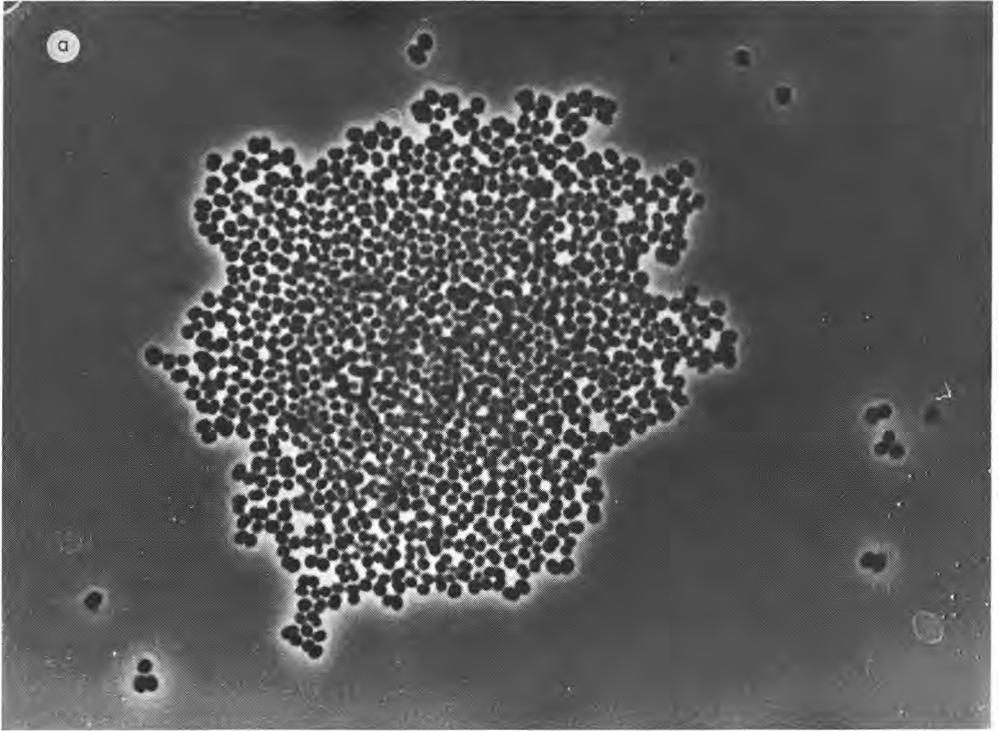


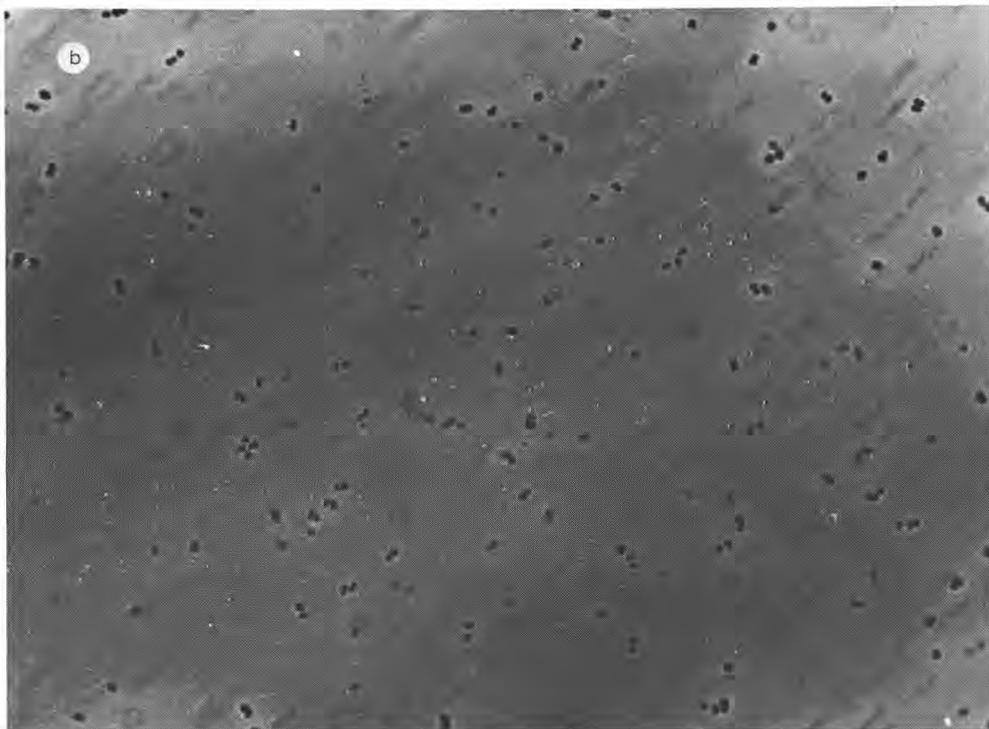
Fig 4. Photographies au microscope d'une suspension de cellules **a** en présence de lactoferrine humaine et **b** en absence.

Light microscopy pictures of the cell suspension in presence of human lactoferrin (a) and in its absence (b).

sence, par contre, sur les membranes basolatérales a été démontrée par microscopie électronique.

Nous savons depuis déjà un certain temps que le colostrum et les laits favorisent le développement des intestins. Widowson (1985) et ses collaborateurs ainsi que bien d'autres chercheurs tels Berseth *et al* (1983), Heird *et al* (1984) ont établi que le colostrum et le lait donnés aux porcelets, rats, lapins et chiens accélèrent la maturation du tractus intestinal, impliquant que la structure des protéines du lait ingéré pourrait avoir une signification biologique autre que la simple fourniture d'acides

aminés (tableau II). Plusieurs groupes de chercheurs ont tenté de déterminer la nature des facteurs mitogènes présents dans le lait. Récemment, Nichols *et al* (1987) identifièrent la lactoferrine en tant que promoteur de l'accroissement. Pour ce faire, ils analysèrent l'incorporation de thymidine marquée dans l'ADN de cellules de cryptes récoltées chez des rats adultes. Les formules basées sur le lait bovin, le soja et les hydrolysats de caséine neutralisent l'incorporation de la thymidine dans l'ADN, respectivement de 14, 33 et 44%. L'addition de lactoferrine au lait bovin et au lait de soja restaure partiellement l'incorpora-



tion de la thymidine dans l'ADN, ce qui ne fut pas le cas avec les hydrolysats de caséine (tableau III). Cet effet indirect sur le développement digestif donnerait 2 nouvelles facettes à l'activité biologique de la lactoferrine.

Si la lactoferrine est nécessaire, (comme semblent le prouver les expériences de Nichols), à l'augmentation de la longueur et du poids de l'appareil intestinal, elle peut également réparer les tissus endommagés par une infection générée *in vivo* par la présence de fer libre.

De par l'ensemble de ces données, la lactoferrine apparaît donc comme un constituant essentiel du lait maternel, au plan de la nutrition du fer. Toutefois, son rôle ne se limite pas à ce seul aspect. En effet, la digestion et l'absorption intestinale sont liées à la bonne santé de l'intestin. À cet égard, la lactoferrine joue un rôle central

dans les mécanismes de la défense infectieuse de l'intestin.

Ces différents mécanismes soulignent la diversité d'action et l'importance de la lactoferrine dans l'alimentation du nouveau-né.

Le système peroxydase

Introduction

Les peroxydases sont des enzymes (protéines) qui font partie des systèmes de défense naturels non immunitaires décrits dans le lait et les sécrétions des glandes exocrines telles la salive, les larmes, ou les sécrétions intestinales.

Moins spécifiques que les éléments du système immunitaire, ces systèmes de protection jouent un rôle de défense contre

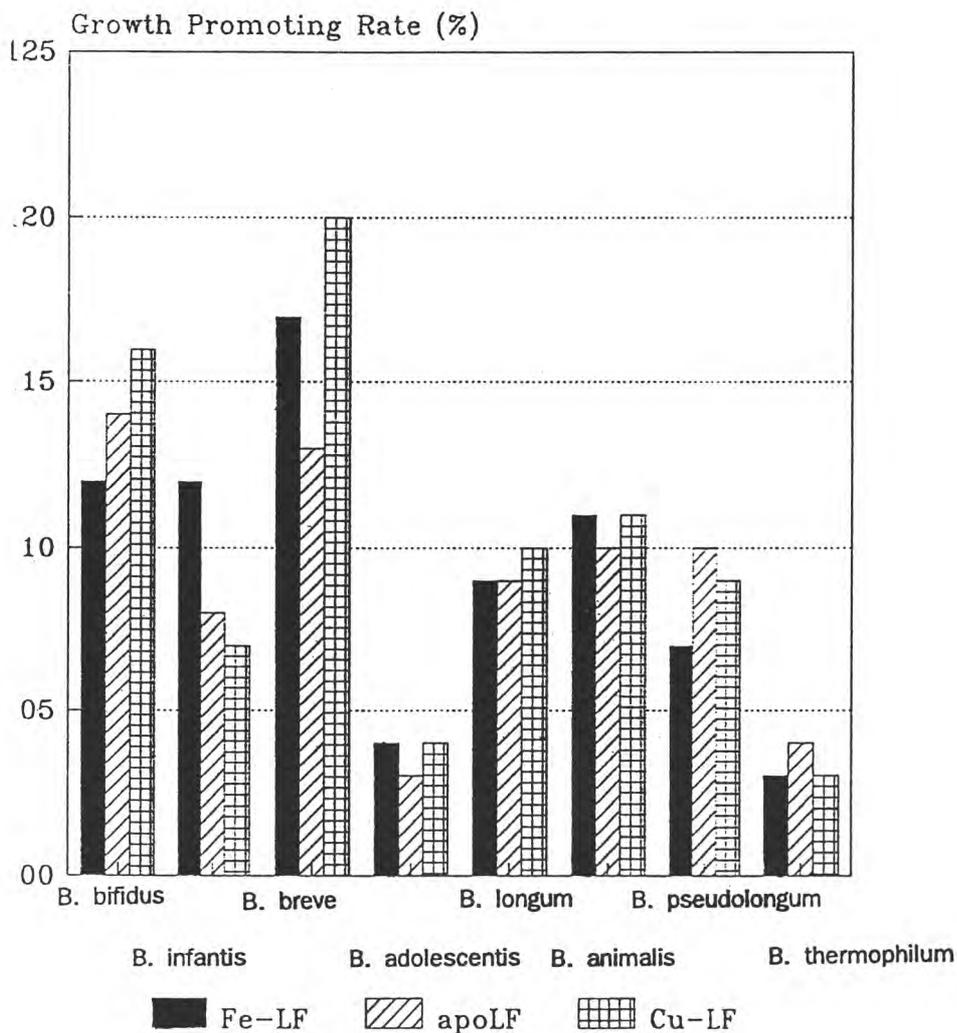


Fig 5. Effet de la lactoferrine sur la croissance de Bifidobacteries.
Effect of lactoferrin on the growth of Bifidobacterium species.

l'envahissement des muqueuses par les bactéries.

Les peroxydases n'ont pas d'activité antibactérienne par elles-mêmes, mais, mises en présence de cofacteurs déterminés, elles constituent un puissant système de défense. Ces cofacteurs sont, d'une part le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , et

d'autre part un ion, qui selon la spécificité de l'enzyme peut être l'ion thiocyanate SCN^- , l'ion chlorure Cl^- , l'ion bromure Br^- ou l'ion iodure I^- .

Par exemple, la myéloperoxydase, présente dans les leucocytes, catalyse l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène des ions Cl^- , Br^- , SCN^- , I^- ; la lactoperoxydase

Tableau II. Poids d'organes de chiens nouveaux-nés pendant les 24 premières h.
Organ weights (g) of newborn puppies during the first 24 hours.

	À la naissance	Après avoir tété 24 h	Nourri artificiellement
Estomac	1,17 ± 0,18	1,57 ± 0,15	1,39 ± 0,19
Duodenum	0,89 ± 0,17	1,27 ± 0,09	1,11 ± 0,02
Jejunum et Ileum	6,86 ± 1,39	10,20 ± 1,20	7,67 ± 0,16
Muqueuse	3,35 ± 0,73	5,86 ± 0,86	3,40 ± 0,24
ADN de la muqueuse (mg)	7,67 ± 1,36	11,99 ± 1,71	7,60 ± 0,46

d'après Heird *et al* (1984)

du lait de vache catalyse l'oxydation des ions Br^- , SCN^- , I^- et la peroxydase du rai-fort catalyse uniquement l'oxydation de I^- .

La réaction d'oxydation catalysée par ces enzymes peut se résumer comme suit :



où $\text{X}^- = \text{SCN}^-$, Cl^- , Br^- ou I^-

Le produit de la réaction, OX^- , est un agent oxydant à courte durée de vie, qui va réagir, par exemple, avec les groupements NH_2 ou thiols ($-\text{SH}$) d'enzymes essentielles au métabolisme bactérien.

Description du système lactoperoxydase du lait de vache

C'est en 1924 que Hanssen a établi une corrélation entre l'activité bactéricide du lait cru contre *Bacillus typhosa* et *Bacillus paratyphosa* et l'activité des oxydases et peroxydases présentes dans ce lait.

Wright et Tramer (1958), en étudiant un groupe de streptocoques, arrivèrent à la même constatation; l'inhibition a lieu dans des conditions aérobies et peut être supprimée par l'addition d'agents réducteurs

(Jones et Little, 1927; Jones et Simms, 1930). Wright et Tramer ont également suggéré que l'inhibition des germes était due à un agent oxydant formé par action de la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène produit par le métabolisme des streptocoques dans des conditions d'aérobie (Wright et Tramer, 1958).

Lorsque Morrison et ses collaborateurs publièrent une méthode d'isolement et de purification de la peroxydase par chromatographie échangeuse d'ions (Morrison *et al*, 1957), Portmann et Auclair (1959) purent démontrer le rôle joué par l'enzyme, en rétablissant, par addition d'enzyme purifiée à du lait chauffé, une activité inhibitrice.

Jago et Morrison (1962) ont décrit le rôle joué par le peroxyde d'hydrogène; et l'observation qu'un troisième composant était nécessaire pour que fonctionne le système d'inhibition, a conduit à l'identification du thiocyanate SCN^- (Reiter *et al*, 1964; 1966b).

Le système lactoperoxydase est donc un système enzymatique composé de l'enzyme (lactoperoxydase) et de ses 2 substrats (le peroxyde d'hydrogène et l'anion thiocyanate) dont le produit de réaction l'anion hypothiocyanite est bactéricide à

des concentrations de l'ordre de quelques $\mu\text{mol/l}$.

Sources de thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène

Thiocyanate

L'acide thiocyanique existe sous 2 formes mésomères H-S-C-N et H-S=C=N , en équilibre l'une avec l'autre. Ces 2 formes déprotonées sont appelées thiocyanate et isothiocyanate (Hughes, 1979).

L'anion thiocyanate est ubiquiste des tissus et sécrétions chez les mammifères. La concentration en SCN^- dans l'organisme est fonction des habitudes alimentaires. Beaucoup de plantes sont en effet riches en glucosinolates qui, après hydrolyse, libèrent l'anion SCN^- . Les légumes appartenant au genre *Brassica*, famille des Crucifères (chou, chou frisé, chou de Bruxelles, chou-fleur, navet, rutabaga) sont particulièrement riches en glucosino-

lates. Les glucosides constituent le deuxième groupe majeur des précurseurs du thiocyanate.

Présence du thiocyanate chez l'homme et chez l'animal

Concentrations dans l'organisme humain. L'ion SCN^- est largement répandu dans les tissus et les sécrétions. Il est présent dans la glande mammaire, la glande salivaire, la thyroïde, dans l'estomac, le rein et les fluides biologiques (liquide synovial, céphalorachidien, lymphes, plasma).

Rappelons que les concentrations en SCN^- dans l'organisme sont liées à l'alimentation et sont le plus souvent plus élevées chez les fumeurs que chez les non fumeurs, ceci est dû à un cycle de détoxification du CN^- contenu dans la fumée, qui aboutit au SCN^- .

Concentrations chez l'animal. Les taux de SCN^- mesurés dans le sérum de différents animaux sont repris dans le tableau IV.

Tableau III. Effet de facteurs de croissance sur les cellules de cryptes. *Crypt cell bioassays of trophic factors (DNA synthesis).*

Protéines ajoutées (5% v/v)	n	% stimulation de l'incorporation de ^3H -thymidine	
Milieu de Trowell *	46	100 ± 7	
Colostrum	41	136 ± 15	
Lactoferrine (4 mg/ml)	13	130 ± 13	n
Saline **	30	100 ± 11	LF supplémenté
Saline **	30	100 ± 11	stimulation (%)
Lait maternisé	4	182 ± 14	4
Lait de vache	26	86 ± 12	24
Soja	14	67 ± 6	
Caséine hydrolysée	10	56 ± 7	10
Facteur de croissance épidermique (5 g/ml)	6	87 ± 13	

* d'après Nichols *et al* (1987)

** d'après Children's Nutrition Research center (1988)

Les valeurs mesurées sont en général un peu supérieures à celles mesurées chez l'homme et les variations rencontrées sont attribuables aux différents types d'alimentation.

D'une espèce à l'autre, il n'existe pas de différences importantes dans la répartition du SCN^- entre les organes, ainsi que dans le taux de SCN^- mesuré dans les fluides biologiques. En contraste avec les valeurs élevées qui ont été mesurées dans la salive humaine, SCN^- n'a pu être détecté dans la salive du cheval, du mouton, du bœuf, du porc, du cobaye et du lapin (Weuffen *et al.*, 1982).

Concentration dans le lait de vache. Le lait de vache comprend de 0,1 à 10 ppm de SCN^- , mais des concentrations supérieures ont été décrites (15 ppm). La concentration en thiocyanate dans le lait varie selon les saisons, avec une valeur minimale en hiver (janvier-février) et maximale en été; elle dépend du régime ali-

mentaire de l'animal, de la consommation de trèfle, par exemple, ou de crucifères; le taux de SCN^- dans le lait peut atteindre 13 ppm.

Par ailleurs, il semble que le taux de SCN^- dans le lait soit influencé par l'état de santé du pis. Lorsque celui-ci présente des signes apparents d'infection, le lait contient davantage de SCN^- . Il contient alors plus de $5 \cdot 10^5$ leucocytes par ml. Il semblerait donc que l'accroissement en SCN^- provienne du plasma.

Dans une étude portant sur l'observation pendant 5 années consécutives de la fluctuation saisonnière du thiocyanate dans le lait industriel, Boulangé *et al.* (1963) démontrent la fluctuation saisonnière du taux de thiocyanate avec un minimum hivernal et un maximum estival. L'origine alimentaire de cette fluctuation avait été démontrée précédemment (Boulangé, 1959).

Le taux de SCN^- dans le lait est inférieur à celui du sérum, qui lui-même est inférieur à celui de l'urine; le passage des ions SCN^- du fourrage dans le lait dépendra donc du taux de SCN^- dans le sérum (Virtanen et Gmelin, 1960) et des vitesses respectives d'élimination du SCN^- vers la glande mammaire ou par filtration rénale.

Dans le colostrum des truies, des valeurs de 4-8 mg de SCN^-/l ont été décrites (Weuffen *et al.*, 1982). Mais c'est le lait de chèvre qui semble être le plus riche en SCN^- (Bernard, 1957). Il en contiendrait 4 fois plus que le lait de vache.

Peroxyde d'hydrogène

La production de l'ion hypothiocyanite par le système lactoperoxydase dépendra des quantités de thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène disponibles.

Le peroxyde d'hydrogène dans le lait peut être naturellement produit sous l'action d'oxydases, par les leucocytes poly-

Tableau IV. Taux en SCN^- sérique chez différents animaux.
Serous SCN^- levels in different animals.

<i>Animal</i>	<i>mg(SCN⁻)/l (sérum)</i>
Vache	1,3 – 15
Veau d'engraissement	3,4 – 8,7
Chèvre	0,9 – 6,3
Mouton	3 – 4,9
Porc	0,9 – 4,4
Porcelet	6 – 8,5
Chien	4 – 10
Lapin	0,9 – 10
Cobaye	1 – 22
Rat	0,3 – 6,7
Souris	2 – 8,5
Poule	1,4 – 5,3

d'après Weuffen *et al.* (1982).

Tableau V. Concentration en SCN⁻ (mg/kg) dans les tissus et les organes.
SCN⁻ concentration in tissues and organs.

Origine	Cheval	Mouton	Porc	Bœuf
Cerveau	0,1	1,2	0,6	0,6
Capsules surrénales	0,2	1,7	1,2	0,8
Pancréas	0,5	1,5	1,7	0,6
Reins	0,7	2,2	1,2	3,4
Rate	0,7	2,9	0,4	1,5
Thyroïde	0,8	1,1	1,2	4,3
Estomac	0,8	19,0	0,7	3,8
Poumon	1,1	1,4	0,3	1,5
Foie	1,3	2,7	0,5	1,3
Muscle cardiaque	1,3	1,8	0,4	0,7

D'après Weuffen *et al* (1982).

morphonucléaires et par le métabolisme de certains microorganismes catalase (-) (bactéries lactiques) dans des conditions d'aérobie. Cependant, le peroxyde d'hydrogène ainsi formé semble être rapidement réduit par la catalase ou la peroxydase. Si l'on inhibe ces 2 enzymes par addition de NaN₃ (azoture de sodium), il est alors possible de détecter des concentrations nanomolaires de peroxyde d'hydrogène.

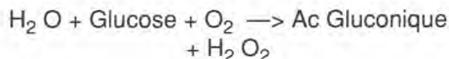
S'il est facile d'ajouter le peroxyde d'hydrogène dilué dans un milieu tel que le lait, comme recommandé par la FIL (1986) pour la préservation du lait dans certaines conditions climato-logiques ou technologiques, il est moins évident d'assurer la libération de peroxyde d'hydrogène lors de la dissolution d'une formulation solide. Ceci est d'autant plus difficile que le peroxyde d'hydrogène, s'il est substrat de la lactoperoxydase, est également un agent chimique capable d'inactiver les enzymes par oxydation d'acides aminés tels que : les résidus tryptophane, tyrosine, méthionine, histidine, cystéine (Neumann, 1967).

Il est donc primordial de parvenir à libérer le peroxyde d'hydrogène tout en le maintenant à un seuil de concentration tel que l'enzyme puisse produire l'hypothiocyanite en quantités suffisantes sans risque de dénaturations.

Le peroxyde d'hydrogène peut se conserver sous forme solide de différentes façons: soit sous forme de peroxyde d'urée, soit sous forme de peroxydes métalliques tels que les peroxydes de sodium, magnésium et calcium.

L'activation de la lactoperoxydase au moyen de ces substances est d'ailleurs préconisée par Ewos (Björck *et al*, 1979). Malheureusement, ces peroxydes métalliques, même conservés solides sous atmosphère inerte, libèrent le peroxyde d'hydrogène et inactivent l'enzyme.

Une alternative à l'utilisation de peroxydes métalliques, comme producteur de peroxyde d'hydrogène consiste en l'utilisation d'un système enzymatique du type glucose oxydase/glucose. La glucose oxydase catalyse la réaction suivante :



La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par le système enzymatique dépendra de la concentration des 2 substrats et de l'activité spécifique de la glucose oxydase.

Oxydation du thiocyanate par la lactoperoxydase

Reiter et ses collaborateurs (1964) ont montré que dans le lait de vache, l'oxydation du thiocyanate était impliquée dans le mécanisme d'action antibactérien catalysé par la lactoperoxydase. Björck *et al* (1975) ont montré que l'agent actif était dialysable, c'est-à-dire une molécule de petit poids moléculaire, et que l'enzyme elle-même ne devait pas être en contact direct avec la bactérie exposée. Aune et Thomas

(1977) d'une part, et Hoogendoorn *et al* (1977) d'autre part, sont arrivés à la même conclusion, que OSCN^- était l'agent antibactérien du système.

Activité antimicrobienne de la lactoperoxydase

L'hypothiocyanite, OSCN^- , produit d'oxydation du SCN^- , réagit principalement avec les groupements thiols ($-\text{SH}$) et avec les formes réduites des nucléotides de la nicotinamide (NADH et NADPH). Ces derniers sont oxydés en NAD^+ et NADP^+ . Les groupes $-\text{SH}$ appartiennent aux résidus cystéine des protéines, à la cystéine libre ou au glutathion réduit. Ils vont être oxydés en liens disulfures ($-\text{S}-\text{S}-$), en sulfényl thiocyanates ($-\text{S}-\text{SCN}$) et en acides sulféniques ($-\text{S}-\text{OH}$) (Aune et Thomas, 1978). Le système lactoperoxydase tue ou inhibe la croissance de nombreuses espèces de microorganismes. La lactoperoxydase est catalytiquement active à des concentrations aussi faibles que $0,5 \mu\text{g/l}$ (Pruitt *et al*, 1979). L'activité du système peroxydase a été abondamment rapportée, contre des virus (Belding *et al*, 1970), des mycoplasmes (Reiter *et al*, 1981), des bactéries (gram $^-$ et gram $^+$), des champignons (Hamon et Klebanoff, 1973), des parasites (Nogueira *et al*, 1982).

L'hypothiocyanite endommage la membrane cytoplasmique, ainsi que l'ont montré Marshall et Reiter en 1980 chez *E coli*. En effet, 10 min après que les cellules d'*E coli* aient été mises au contact d'une solution contenant OSCN^- , un relargage d'acides aminés et de potassium se produit.

L'altération de la membrane de *E coli* est également suggérée par un accroissement de perméabilité pour l'ion H^+ des cellules traitées par le système lactoperoxydase.

Il semble que la paroi cellulaire des gram $^+$ soit un obstacle plus grand à l'action

de l'hypothiocyanite que ne l'est la paroi cellulaire des bactéries gram $^-$. Il y a néanmoins des observations qui montrent l'inhibition du transport des acides aminés chez *Lactobacillus acidophilus* (Clem et Klebanoff, 1966; Slowey *et al*, 1968) et *Staphylococcus aureus* (Hamon et Klebanoff, 1973), le transport du glucose chez *Streptococcus agalactiae* (Mickelson, 1977), la prise d'oxygène et de glucose chez de nombreuses espèces. L'action *in vitro* du système lactoperoxydase sur une série de souches bactériennes pathogènes a également été étudiée par Van Landuydt et Lambert (1985).

D'un autre côté, le système lactoperoxydase fut testé sur des veaux (Priels *et al*, 1989) à titre préventif et curatif. Le modèle *in vivo* consistait à traiter les veaux avec la souche *E coli* 510. Les résultats décrits dans la figure 6, montrent que pour une concentration précise de lactoperoxydase, il était possible de prévenir le déclenchement de la diarrhée et de maintenir le veau sous alimentation lactée malgré une infection sévère par les colibacilles entéro-gènes. De même, après apparition de la diarrhée provoquée par les *E coli*, la lactoperoxydase est capable de faire régresser ce symptôme dans les 24 h et de freiner la pullulation des *E coli* dans l'intestin, sans pour cela changer le régime alimentaire.

Cette expérience a également permis aux auteurs de constater que la présence des souches dans les matières fécales, ne montre pas de différence nette entre les veaux traités et non traités. On peut penser qu'en inhibant les synthèses protéiques, le système lactoperoxydase affecte l'attachement des colibacilles aux villosités des entérocytes de l'intestin (fig 7).

Dans le cadre d'un congrès sur la prévention alimentaire, Oléofina (Perraudin, 1990) a présenté une série de résultats concernant l'action du système lactoperoxydase dans des aliments contaminés

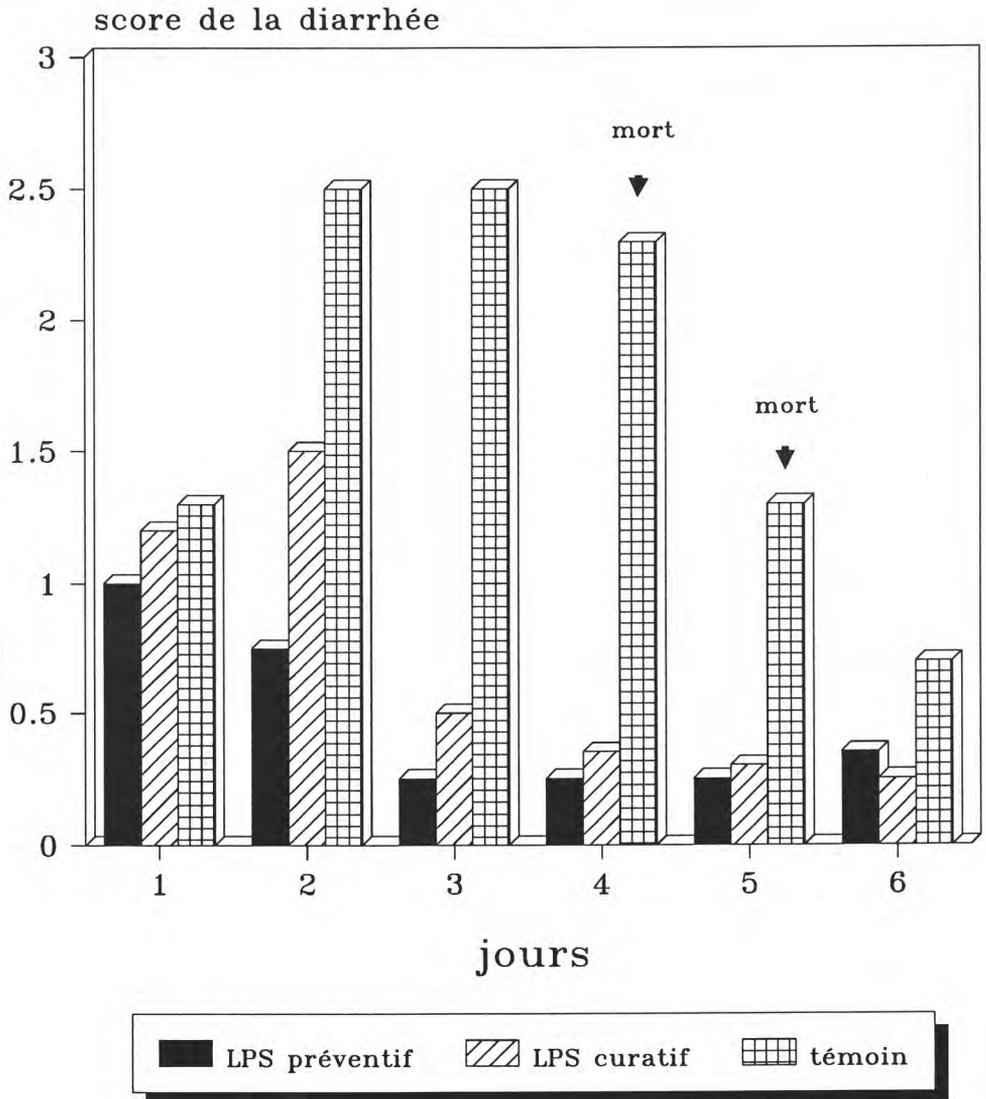


Fig 6. Comparaison de la sévérité d'une diarrhée en fonction du type de traitement.
Comparison of the severity of the diarrhoea according to type of treatment.

par différents microorganismes. Parmi ces expériences, citons celles effectuées sur le *cottage cheese* où le système lactoperoxydase a montré son efficacité dans la régression de la contamination dûe aux

Pseudomonas, aux *Coli* et aux *Salmonella typhimurium*. Il en fut de même pour un lait maternisé contaminé par des *Salmonella typhimurium*. L'action du système s'est révélée également très efficace dans les

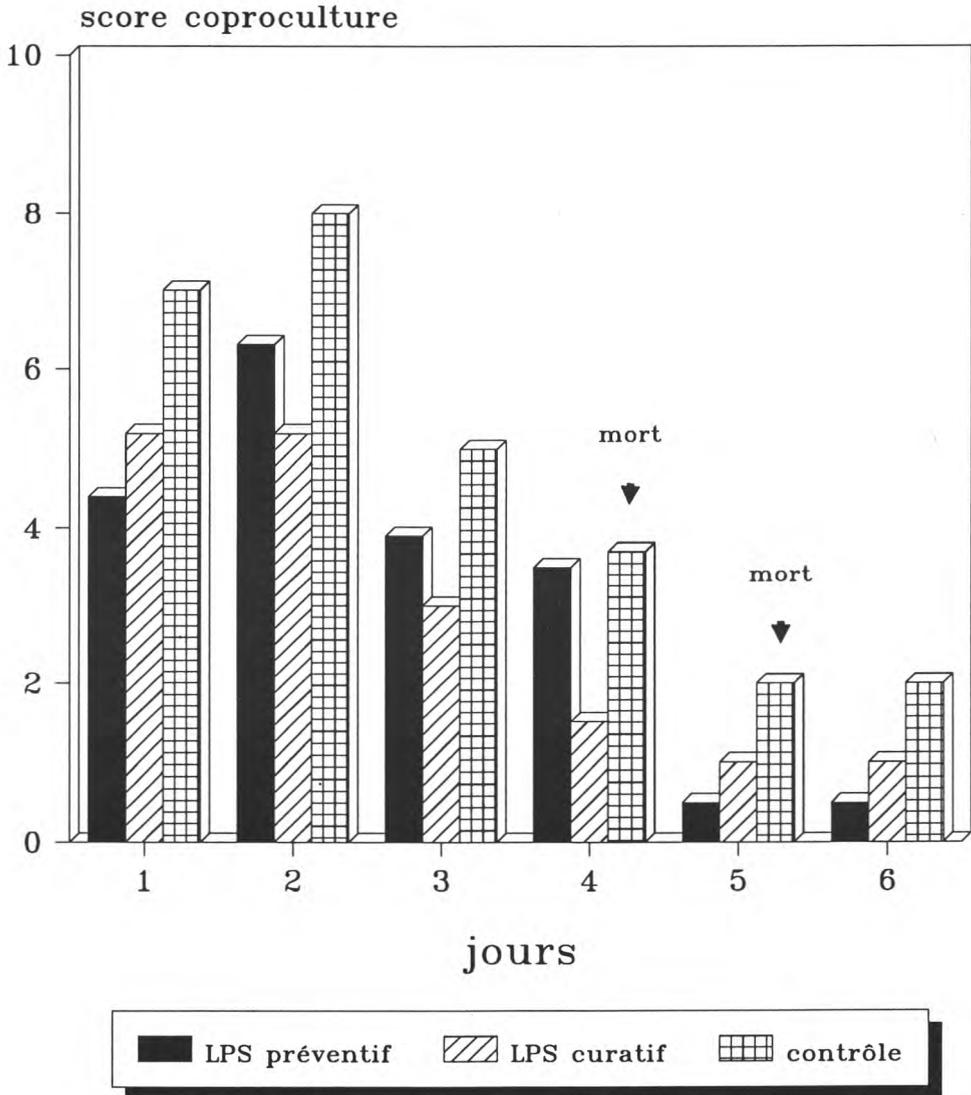


Fig 7. Concentration des ETEC, dans les selles, en fonction du traitement.
Comparison of the excretion of ETEC organisms in the stools according to treatment.

crèmes glacées et la crème pâtissière permettant ainsi d'augmenter le temps de conservation de ces 2 aliments.

Par ailleurs, une série d'expériences conduites par Courtois *et al* (1990) a pu

démontrer l'action du système lactoperoxydase contre des microorganismes anaérobies responsables chez les patients de parodontite chronique évolutive. Dans ce domaine, la même équipe a mené une

étude prouvant que l'ion hypothiocyanite était capable d'abolir l'effet cytopathique du virus de l'herpès (fig 8). Ne s'arrêtant pas là, ils ont conduit plusieurs expériences arrivant à la conclusion que l'ion hypothiocyanite était capable d'inhiber complètement le virus responsable de l'immuno-déficience chez l'homme.

Ces expériences tendent à confirmer que le système peroxydase est un puissant système naturel de défense. Cette activité a été exploitée avec succès dans plusieurs applications.

C'est ainsi que l'activation de la lactoperoxydase du lait cru a permis de préserver la qualité bactériologique du lait non réfrigéré dans les pays tropicaux. De même, l'activation de la peroxydase de la salive a permis d'observer chez des sujets traités une réduction de l'apparition de caries, de parodontites et de la formation de la plaque dentaire.

Enfin, il semble que le système peroxydase puisse jouer chez le jeune ruminant un rôle actif dans la régulation de la flore intestinale. Par ses propriétés bactériosta-

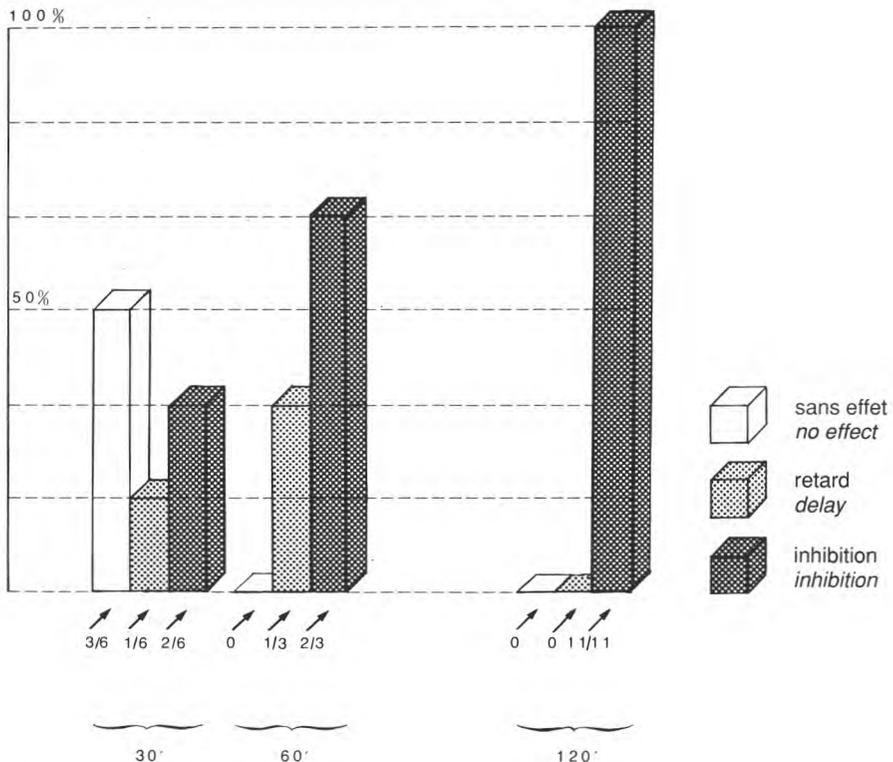


Fig 8. Diagrammes représentant les résultats obtenus après 30, 60, 120 min de prétraitement du HVS1 (Herpes Simplex Virus) par le système lactoperoxydase.

Diagrammatic representation of the results obtained after 30, 60 and 120 min pre-treatment of HSV1 (Herpes simplex virus) with the lactoperoxidase system.

tiques et bactéricides, le système lactoperoxydase pourrait en effet favoriser la colonisation du jéjunum-duodénum par la flore lactique au détriment des pathogènes tels que *E coli*, Salmonelles ou *Campylobacter*.

RÉFÉRENCES

- Aune TM, Thomas EL (1977) Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur J Biochem* 80, 209-214
- Aune TM, Thomas EL (1978) Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Biochemistry* 17, 1005-1010
- Belding ME, Klebanoff SJ, Ray GC (1970) Peroxidase-mediated virucidal systems. *Science* 167, 195-196
- Bernard C (1957) *Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses*, 395 p
- Berseth CL, Lichtenberger LM, Mourriss FH (1983) Comparison of the gastrointestinal growth-promoting effect of rat colostrum and mature milk in newborn rats. *Am J Clin Nutr* 37, 52-60
- Björck L, Rosen G, Marshall V, Reiter B (1975) Antibacterial other Gram-negative bacteria. *Appl Microbiol* 30, 199-204
- Björck L, Claesson O, Schultness W (1979) The lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. *Milchwissenschaft* 34, 726-729
- Boulangé M (1959) Fluctuation saisonnière du taux des thiocyanates dans le lait frais de vache. *CR Soc Biol* 153, 2019-2021
- Boulangé M, Hank K, Vert P (1963) Fluctuation saisonnière du taux des thiocyanates dans le lait frais de vache. *CR Soc Biol* 157, 1074-1076
- Brock JH (1989) Iron and cells of the immune system. In: *Iron and Immunity. Cancer and Inflammation* (De Souza M, Brock JH, eds) John Wiley and Sons Ltd, 81-98
- Children's Nutrition Research Center (1988) Houston, Annu Rep
- Clem WH, Klebanoff J (1966) Inhibitory effect of saliva on glutamic acid accumulation by *Lactobacillus acidophilus* and the role of the lactoperoxidase-thiocyanate system. *J Bacteriol* 91, 1848-1852
- Courtois P, Van Beers D, de Foor M, Mandelbaum M, Pourtois M (1990) Abolition of *Herpes simplex* cytopathic effect after treatment with peroxidase generated hypothiocyanite. *J Biol Buccale* 18, 71-74
- Cox T, Mazurier J, Spik G, Montreuil J, Peters R (1979) Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. *Biochim Biophys Acta* 558, 120-128
- Davidson LA, Lönnnerdal B (1985) Isolation and characterization of monkey milk lactoferrin and identification of the specific brush border receptor. In: *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik G, Montreuil J, Crichton R, Mazurier J, eds) Elsevier, Amsterdam, 275-278
- Entremont (1988) Procédé pour extraire des protéines du lactosérum par adsorption et élution. *Brevet Fr* 8 703 517
- FIL (1986) Commission du Codex Alimentarius, programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires XXI^e session du comité d'experts gouvernementaux sur le code de principes concernant le lait et les produits laitiers. Rome, 2-6 juin
- Hamon CB, Klebanoff SJ (1973) A peroxidase mediated, *Streptococcus mitis*-dependent antimicrobial system in saliva. *J Exp Med* 137, 438-450
- Hanssen FS (1924) The bactericidal property of milk. *Br J Exp Pathol* 5, 271-280
- Heird WC, Schwarz SM, Hansen IH (1984) Colostrum-induced enteric mucosal growth in beagle puppies. *Pediatr Res* 18, 512-515
- Hoogendoorn H, Prissens JP, Scholtes W, Stoddard LA (1977) Hypothiocyanite ion: the inhibition formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Res* 11, 77-84
- Hu WL, Mazurier J, Sawatzki G, Montreuil J, Spik G (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small intestinal brushborder. Binding characteristics of membrane bound and Triton X-100 solubilized forms. *Biochem J* 249, 435-441

- Hughes MN (1979) *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic Acid and its Derivatives. General Chemistry*. Acad Press, New York, 1-67
- Jago GR, Morrison M (1962) Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 111, 585-588
- Jones FS, Little RB (1927) The bactericidal properties of cow's milk. *J Exp Med* 45, 319-335
- Jones FS, Simms HF (1930) The bacterial growth inhibitor (lactonin) of milk. The preparation in concentrated form. *J Exp Med* 51, 327-339
- Kalfas S, Andersson M, Edwardsson S, Forsgren A, Naidu AS (1990) Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *J Biol Chem* (sous presse)
- Marshall VME, Reiter B (1980) Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J Gen Microbiol* 120, 513-516
- Mazurier J, Montreuil J, Spik G (1985) Visualization of lactoferrin brushborder receptors by ligand-blotting. *Biochem Biophys Acta* 821, 453-460
- Mickelson MN (1977) Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 132, 541-548
- Morinaga (1988) A process for producing bovine lactoferrin in high purity. Brevet Jpn 168 478/86
- Morrison MH, Hamilton B, Stotz E (1957) The isolation and purification of lactoperoxidase by ion exchange chromatography. *J Biol Chem* 228, 767-776
- Naidu AS, Fournier JM, Kalfas S, Watts JL, Forsgren A (1990a) Comparison between bovine lactoferrin and other protein binding to *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis. *J Med Microbiol* (sous presse)
- Naidu AS, Fournier JM, Watts JL, Forsgren A (1990b) Bovine lactoferrin binding to *Staphylococcus aureus* and its comparison with other possible factors associated in the pathogenesis of bovine mastitis. *J Med Microbiol* (sous presse)
- Naidu AS, Miedzobrodski J, Musser JM, Rosdahl VT, Hedström SA, Forsgren A (1990c) Human lactoferrin binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* (sous presse)
- Naidu AS, Zoltan Tigyí MD, Naidu SS, Forsgren A (1990d) Lactoferrin binding in enteropathogenic gram-negative bacteria. *J Med Microbiol* (sous presse)
- Neumann NP (1967) Oxidation with hydrogen peroxide. In: *Methods in Enzymology. Vol XI Enzyme Structure* (Hirs CHW, ed) Acad Press, New-York, 485-487
- Nichols BL, McKee KS, Putman M (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat cruyt cells. *Pediatr Res* 21, 563-567
- Nogueria NM, Klebanoff SJ, Cohn ZA, Cruz T (1982) Sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 128, 1705-1708
- Oléofina (1986) Procédé de purification de protéines du lait et ses dérivés. Brevet CH 666 692
- Oram JD, Reiter B (1966a) The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. I. The effect of the inhibitor system on susceptible and resistant strains of group-N streptococci. *Biochem J* 100, 373-381
- Oram JD, Reiter B (1966b) II. The oxidation of thiocyanate and the nature of the inhibitory compound. *Biochem J* 100, 382-383
- Perraudin JP, Prieels JP (1982) Lactoferrin binding to lysozyme-treated *Micrococcus luteus*. *Biochem Biophys Acta* 718, 42-48
- Perraudin JP (1990) Biokonservierung. Behr's Seminare, Frankfurt
- Portmann A, Auclair JE (1959) Relation entre la lacténine L₂ et la lactoperoxydase. *Lait* 39, 147-158
- Prieels JP, Delahaut P, Jacquemin E, Kaeckenbeeck A (1989) Application du système lactoperoxydase au traitement de la diarrhée colibacillaire chez les veaux. *Ann Med Vet* 133, 143-150
- Pruitt KM, Adamson M, Arnold R (1979) Lactoperoxidase binding to streptococci. *Infect Immun* 25, 304-309
- Reiter B, Pickering A, Oram JD (1964) An inhibitory system-lactoperoxidase-thiocyanate peroxide in raw milk. 4th Int Symp on Food microbiology, Uppsala (Sweden), 297-305

- Reiter B, Fulford RJ, Marshall VE, Yarrow N, Ducker MJ, Knutsson M (1981) An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves. *Anim Prod* 32, 297-306
- Roussel Uclaf (1985) Procédé d'extraction de protéines du lait, produits, application du procédé et compositions pharmaceutiques. *Brevet Fr* 8 510 649
- Shimamura S (1989) Activité promotrice de la lactoferrine sur la prolifération du *Bifidobacterium*. Congr Bifidobacterium et Santé, 8-9 juin, Paris
- Slowey RR, Eidelman S, Klebanoff SJ (1968) Antibacterial activity of the purified peroxidase from human parotid saliva. *J Bacteriol* 96, 575-579
- SMR (1988) Process for extracting pure fractions of lactoperoxidase and lactoferrin from milk serum. *Brevet WO* 89/04 608
- Snow Brand (1988) Method for separating and purifying lactoferrin from milk by use of sulfuric ester. *Brevet Jpn* 88 450 87
- Société Nationale Elf Aquitaine (1982) Process of extraction of lactoferrin and immunoglobulins of milk. *Brevet Fr* 8109740
- Soukka T, Lumikari M, Tenuovo J (1990) Synergistic bactericidal action of human lactoferrin and lysozyme against *Streptococcus mutans*. *J Oral Pathol* (sous presse)
- Stuart J, Norell S, Harrington JP (1984) Kinetic effect of human lactoferrin on the growth of *Escherichia coli* 0111. *Int J Biochem* 16, 1043-1047
- Suzuki T, Yamauchi K, Kawase K, Tomita M, Kiyosawa I, Okonogi S (1989) Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* 0111. *Agric Biol Chem* 53, 1705-1706
- Van Landuydt HW, Lambert AM (1985) *In vitro* activity of lactoperoxidase, lactoferrin and lysozyme against recent clinical isolates. *Second Eur Congr Clinical Microbiology*, Brighton, 3-10
- Virtanen A, Gmelin R (1960) The transfer of thiocyanate from fodder to milk. *Acta Chem Scand* 14, 941-943
- Weuffen W, Kramer A, Jülich WD, Schroeder H (1982) Vorkomen bei Mensch und Tier 123-158. In: *Medizinische und biologische Bedeutung der thiocyanate* (Rhodanide) (Weuffen W, ed) VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin
- Widdowson EM (1985) Development of the digestive system: comparative animal studies. *Am J Clin Nutr* 41, 384-390
- Wright RC, Tramer J (1958) Factors influencing the activity of cheese starters. The role of milk peroxidase. *J Dairy Res* 25, 104-118