



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**THESE**

présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I**

en

**BIOLOGIE APPLIQUEE A LA NUTRITION ET AUX BIOINDUSTRIES**

par

**Pascale BARATTE-EULOGUE**

**Action comparée sur la flore intestinale de  
trois laits fermentés au *Bifidobacterium*.  
Evaluation de propriétés probiotiques et du comportement de  
la souche BB 536 de *Bifidobacterium longum* chez l'homme.**

Soutenue le 14 mai 1992 devant la commission d'examen

**Membres du jury**

M. R. GAY	Président du jury
M. J.A. KURMANN	Rapporteur
M. J.M. SIMONET	Rapporteur
M. D. VIDON	Rapporteur
M. P. GAUCHER	Examineur
M. J. PERRIN	Examineur
M. H. PETITDEMANGE	Examineur
M. J. BALLONGUE	Examineur

*À mes parents et mes frères,*

*à Jean-Marc,*

*pour Alizée.*

Je remercie Messieurs les Professeurs R. GAY et H. PETITDEMANGE pour m'avoir accueillie au laboratoire de Chimie Biologique 1, avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail et avoir accepté de le juger.

Je suis reconnaissante envers Monsieur J. BALLONGUE, Maître de conférences, pour avoir dirigé mes recherches et pour la confiance qu'il m'a témoignée. Il m'a communiqué sa passion pour les *Bifidobacterium*, prodigué de judicieux conseils et a accepté de juger ce travail.

Je témoigne ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse en tant que rapporteur :

J'exprime ma plus profonde gratitude à monsieur le Professeur J.A. KURMANN, référence incontestée dans le domaine des bifidobactéries, dont les nombreux ouvrages et recherches bibliographiques m'ont été d'un grand secours pour la réalisation de ce travail, ainsi qu'à Messieurs les Professeurs J.M. SIMONET et D. VIDON.

Je remercie les autres membres du jury :

- Monsieur le Professeur P. GAUCHER;
- Monsieur J. PERRIN, Ingénieur DPE de Saint-Hubert Industrie Laitière.

Je remercie Monsieur le Professeur J.P. BELAICH et tous les membres du Laboratoire de Chimie Microbienne du CNRS de Marseille pour leur aide efficace concernant les techniques de biologie moléculaire.

Je remercie également l'ANRT et Saint-Hubert Industrie Laitière pour leur soutien financier.

J'associe à mes remerciements mes collègues du laboratoire pour leur aide et leur amitié.

## ABREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ALT	:	acide lipoteichoïque
ATCC	:	American Type Culture Collection
6 AU	:	6-azauracile
<i>B.</i>	:	<i>Bifidobacterium</i>
BL	:	Blood Liver
bp.	:	paires de bases
CCCP	:	carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone
u.f.c.	:	unité formant une colonie
<i>Cl.</i>	:	<i>Clostridium</i>
Co A	:	coenzyme A
CPG	:	chromatographie en phase gazeuse
dATP	:	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	:	désoxycytidine triphosphate
2 DGal	:	désoxy-2-galactose
2 DGLu	:	désoxy-2-glucose
dGTP	:	désoxyguanosine triphosphate
DLC	:	date limite de consommation
DNase	:	désoxyribonucléase
DO	:	densité optique
dTDP	:	désoxythymidine diphosphate
dTMP	:	désoxythymidine monophosphate
dTTP	:	désoxythymidine triphosphate
dUDP	:	désoxyuridine diphosphate
dUMP	:	désoxyuridine monophosphate
dUTP	:	désoxyuridine triphosphate
<i>E.</i>	:	<i>Escherichia</i>
EDTA	:	éthylène diamine tétraacétate
E.M.S.	:	éthyl méthane sulfonate
et coll.	:	et collaborateurs
F6PPK	:	fructose-6-phosphate phosphocétolase
5 FU	:	5-fluorouracile
G + C	:	guanine et cytosine
kb	:	kilobase
μCi	:	microcurie
M	:	molaire
mol	:	mole
MOPS	:	acide 3-(N-Morpholino)propanesulfonique
NAD	:	nicotinamide-adénine dinucléotide
NTG	:	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
P	:	phosphate
<sup>32</sup> P	:	phosphore 32
<i>S.</i>	:	<i>Streptococcus</i>
SDS	:	Sodium Dodécyl Sulfate
SSC	:	Sel Sodium Citrate
STE	:	Sel Tris-EDTA
T	:	temps de génération
TBE	:	Tris Borate EDTA
TE	:	Tris-EDTA
TPY	:	Tryptone Phytone Yeast extract
Tris	:	Tris (hydroxyméthyl)-aminoéthane
TS	:	Tryptone-Sel
TTC	:	triphénytétrazolium chloride
UI	:	unité internationale
U.V.	:	ultra-violet

# *SOMMAIRE*

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	1
<b>I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
<b>I.1. LE GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i></b> .....	3
I.1.1. LES BIFIDOBACTERIES - DECOUVERTE ET HISTORIQUE.....	3
I.1.2. MORPHOLOGIE .....	4
I.1.3. PHYSIOLOGIE .....	5
I.1.3.1. Type respiratoire.....	5
I.1.3.2. Température et pH.....	6
I.1.4. METABOLISME .....	7
I.1.4.1. Métabolisme des glucides.....	7
I.1.4.2. Les métabolites.....	7
I.1.4.3. Les enzymes.....	8
I.1.4.4. Les vitamines produites .....	9
I.1.4.5. Besoins nutritionnels .....	10
I.1.4.5.1. Matière azotée.....	10
I.1.4.5.2. Oligoéléments.....	10
I.1.4.5.3. Vitamines.....	11
I.1.4.5.4. Facteurs de croissance.....	11
I.1.5. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	16
I.1.6. MILIEUX DE CULTURE ET CARACTERES CULTURAUX.....	18
I.1.6.1. Les milieux complexes .....	18
I.1.6.2. Milieux de culture semi-synthétiques.....	18
I.1.6.3. Milieux de culture entièrement synthétiques .....	19
I.1.6.4. Milieux de culture sélectifs.....	19
I.1.6.5. Caractères cultureux .....	21
I.1.7. COMPOSITION DE LA PAROI ET DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE.....	21
I.1.7.1. La paroi .....	21
I.1.7.2. La membrane cytoplasmique .....	22
I.1.8. CARACTERES DU GENOME.....	23
I.1.8.1. Composition en bases de l'ADN.....	23
I.1.8.2. Plasmides .....	23
I.1.9. ECOLOGIE DES <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	24
I.1.9.1. Implantation chez le nouveau né .....	24
I.1.9.1.1. Origine de la colonisation.....	24
I.1.9.1.2. Facteurs influençant la colonisation .....	26
I.1.9.2. Evolution du sevrage à l'âge adulte.....	30
I.1.9.2.1. Influence de l'âge.....	30
I.1.9.2.2. Influence de l'alimentation .....	31
I.1.9.2.3. Pathogénicité.....	31

I.2. METHODES D'IDENTIFICATION.....	32
I.2.1. PHENOTYPIE .....	32
I.2.1.1. Identification du genre <i>Bifidobacterium</i> .....	32
I.2.1.1.1. Morphologie.....	32
I.2.1.1.2. Conditions de culture .....	32
I.2.1.1.3. Métabolites .....	32
I.2.1.1.4. Recherche d'enzymes.....	32
I.2.1.1.5. Etude des profils électrophorétiques.....	33
I.2.1.1.6. Lipides et composants de la membrane cellulaire et de la paroi .....	33
I.2.1.1.7. Autres critères d'identification .....	33
I.2.1.2. Identification des espèces .....	34
I.2.1.2.1. Fermentation des sucres .....	34
I.2.1.2.2. Etude des isoenzymes de la F6PPK.....	37
I.2.1.2.3. Etude des profils protéiques.....	37
I.2.1.2.4. Sérologie des transaldolases.....	40
I.2.1.2.5. Enzymes.....	40
I.2.1.2.6. Besoins nutritionnels.....	41
I.2.1.2.7. Composition de la paroi .....	41
I.2.1.2.8. Traitement des résultats.....	41
I.2.2. GENOTYPIE .....	42
I.2.2.1. Identification du genre <i>Bifidobacterium</i> .....	42
I.2.2.2. Identification des espèces .....	42
I.2.2.2.1. Composition en bases de l'ADN .....	42
I.2.2.2.2. Hybridation ADN-ADN .....	42
I.2.2.2.3. Recherche de plasmides .....	44
I.2.2.2.4. Nouvelles méthodes.....	44
I.2.3. CONCLUSION .....	45
I.2.4. RELATIONS ENTRE LE PHENOTYPE ET LE GENOTYPE.....	46
I.2.5. PROBLEMES ENGENDRES PAR LES DIFFICULTES D'IDENTIFICATION .....	46
I.3. ROLE DES <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	47
I.3.1. PHYSIOLOGIE INTESTINALE ET DIGESTION .....	47
I.3.1.1. La paroi intestinale.....	47
I.3.1.2. Histologie de l'épithélium de recouvrement de la muqueuse intestinale.....	47
I.3.1.3. Le mucus .....	49
I.3.1.4. La digestion.....	51

I.3.2. RELATIONS ENTRE FLORE INTESTINALE ET CELLULES INTESTINALES .....	51
I.3.2.1. Conditions de la colonisation.....	51
I.3.2.2. Mécanisme de l'adhésion .....	52
I.3.2.3. Analyse de la flore adhérente .....	54
I.3.2.4. Adhésion des bifidobactéries .....	55
I.3.2.5. Modifications de l'adhésion .....	55
I.3.2.6. Exemples de conséquences de l'adhésion.....	55
I.3.2.7. Moyens de contrer l'adhésion.....	56
I.3.3. LA FLORE INTESTINALE.....	56
I.3.3.1. Techniques d'évaluation .....	56
I.3.3.2. Composition.....	57
I.3.3.3. Facteurs agissant sur la flore .....	58
I.3.3.4. Rôle et effets de la flore intestinale.....	60
I.3.3.4.1. Action sur la physiologie de la paroi intestinale et dans la défense immunitaire .....	60
I.3.3.4.2. Les bactéries en tant que nutriment.....	61
I.3.3.4.3. Effets métaboliques .....	61
I.3.3.4.4. Action tumorale.....	62
I.3.3.4.5. Effet de barrière anti-infectieuse vis-à-vis d'agents pathogènes.....	64
I.3.4. LE YAOURT ET SON INFLUENCE SUR LA FLORE INTESTINALE .....	65
I.3.4.1. Effet sur la composition de la flore intestinale.....	66
I.3.4.2. Stimulation du système immunitaire.....	66
I.3.4.3. Effets métaboliques.....	66
I.3.4.4. Activité anticarcinogène .....	68
I.3.5. RELATIONS BIFIDES-FLORE INTESTINALE.	
ROLE PROBIOTIQUE DES <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	68
I.3.5.1. Pouvoir d'adhésion épithéliale dans différentes parties du tractus alimentaire.....	69
I.3.5.2. Action sur la morphologie et la physiologie de la paroi du tube digestif .....	69
I.3.5.3. Effets nutritionnels.....	69
I.3.5.4. Effets métaboliques.....	70
I.3.5.5. Effet de barrière anti-infectieuse vis-à-vis des bactéries pathogènes .....	71
I.3.5.6. Effets thérapeutiques .....	74
I.4. MUTANTS DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....	77
I.4.1. Mutants obtenus chez <i>Bifidobacterium</i> .....	77
I.4.2. Utilisation du CCCP.....	77
I.4.3. Utilisation de substrats suicides .....	77
I.4.3.1. Analogue de sucre .....	77
I.4.3.2. Analogue de l'acétate de sodium.....	78
I.4.3.3. Analogues de bases.....	78

<b>OBJECTIFS</b> .....	80
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b> .....	82
II.1. LAITS FERMENTES ET SOUCHES ETUDIES .....	82
II.2. CHOIX D'UN MILIEU D'ISOLEMENT ET DE DENOMBREMENT POUR <i>BIFIDOBACTERIUM</i> . 83	
II.3. ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES BACTERIES DE LAITS FERMENTES..... 84	
II.3.1. Isolement et dénombrement des <i>Streptococcus</i> et <i>Lactobacillus</i> .....	84
II.3.2. Isolement et dénombrement des <i>Bifidobacterium</i> .....	84
II.3.3. Isolement et dénombrement des <i>Bifidobacterium</i> de LF 1 et LF 4 .....	85
II.4. IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> ISOLEES .....	85
II.4.1. Identification du genre <i>Bifidobacterium</i> .....	85
II.4.2. Identification des espèces .....	86
II.5. IDENTIFICATION GENOTYPIQUE DES ESPECES..... 87	
II.5.1. Extraction de l'ADN..... 87	
II.5.2. Hybridation ADN/ADN..... 88	
II.5.3. Exploitation des résultats..... 93	
II.6. PHYSIOLOGIE DE <i>B.LONGUM</i> ATCC 15707, BB 536, <i>B.ANIMALIS</i> ATCC 25527 ET <i>B.BIFIDUM</i> ATCC 15696..... 93	
II.6.1. Technique de culture en anaérobiose .....	93
II.6.2. Evaluation de la biomasse..... 94	
II.6.3. Détermination des paramètres de croissance..... 94	
II.6.4. Dosage enzymatique du lactose résiduel et du galactose formé..... 94	
II.6.5. Dosage enzymatique de l'acide lactique produit..... 94	
II.6.6. Dosage de l'acide acétique produit .....	95
II.6.7. Vitesses spécifiques de formation et de consommation de métabolites..... 95	
II.6.8. Croissance de <i>B. longum</i> ATCC 15707 sur milieu tamponné..... 96	
II.7. RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE DE COMPOSITION DEFINIE..... 96	
II.7.1. Techniques de culture..... 96	
II.7.2. Milieux de culture synthétiques .....	97
II.7.3. Milieux de culture semi-synthétiques .....	97
II.8. ISOLEMENT DE MUTANTS .....	97
II.8.1. Recherche de cribles de sélection .....	97
II.8.1.1. Méthodologie d'utilisation du CCCP..... 97	
II.8.1.2. Etude de la toxicité du 2-DGlu et du 2-DGal sur <i>B.longum</i> ATCC 15707 et BB 536.. 98	
II.8.1.3. Etude de la toxicité du fluoroacétate de sodium et des analogues de bases..... 98	
II.8.1.4. Toxicité du 5 FU sur la flore intestinale..... 99	

II.8.2. Techniques d'obtention de mutants.....	99
II.8.2.1. Mutation spontanée.....	99
II.8.2.2. Mutation aux U.V.....	100
II.8.2.3. Mutation avec l'E.M.S.....	100
II.8.2.4. Calcul du taux de réversion.....	100
II.9. ETUDE DES SOUCHES MARQUEES ATCC 15707 M.42 ET BB 536 M.15.....	101
II.9.1. Recouvrement des mutants.....	101
II.9.1.1. En mélange avec leurs souches-mères.....	101
II.9.1.2. Recouvrement des mutants en mélange dans des selles.....	101
II.9.2. Physiologie comparée des mutants et de leurs souches-mères.....	101
II.9.3. Résistance de <i>B. longum</i> ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 aux antibiotiques.....	102
II.10. FABRICATION DE LAITS FERMENTES.....	102
II.10.1. Suivi de l'acidification de <i>B. longum</i> ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 sur lait.....	102
II.10.2. Suivi de la flore de laits fermentés avec <i>B. longum</i> ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 ou BB 536 m.15.....	102
II.11. ETUDES CLINIQUES.....	103
II.11.1. Analyse bactériologique des fécès.....	103
II.11.2. Action de 3 laits fermentés commerciaux sur la flore intestinale humaine.....	104
II.11.3. Action de laits fermentés à différentes souches de <i>B. longum</i> sur la flore intestinale humaine.....	104
II.11.4. Action de laits fermentés à ATCC 15707 m.42 ou BB 536 m.15 sur la flore intestinale humaine.....	105
II.12. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE.....	105
II.12.1. Souches testées et milieux de culture.....	105
II.12.2. Mise en évidence de l'action inhibitrice des souches testées.....	106
II.12.3. Effets de la chaleur.....	106
II.12.4. Effets des enzymes protéolytiques.....	106
II.12.5. Effets de la catalase.....	106
II.12.6. Effets du pH.....	106

<b>III. RESULTATS</b>	107
<b>III.1. ETUDE DE BACTERIES ISOLEES DE LAITS FERMENTES COMMERCIAUX AUX BIFIDOBACTERIUM</b>	107
III.1.1. ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES BACTERIES	107
III.1.1.1. Choix des milieux d'isolement	107
III.1.1.2. Résultats des isolements et dénombrements	109
III.1.2. IDENTIFICATION DES SOUCHES DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> ISOLEES	110
III.1.2.1. Vérification phénotypique du genre <i>Bifidobacterium</i>	110
III.1.2.2. Identification phénotypique des espèces	110
III.1.2.3. Identification génotypique des espèces	112
III.1.2.3.1. Mise au point de la méthode d'extraction d'ADN	113
III.1.2.3.2. Résultats des extractions d'ADN	115
III.1.2.3.3. Résultats des hybridations ADN/ADN	115
<b>III.2. ACTION DE 3 LAITS FERMENTES</b>	117
III.2.1. CHOIX DU PROTOCOLE	117
III.2.2. RESULTATS	117
III.2.3. DISCUSSION	119
III.2.4. QUESTIONS	119
III.2.5. CHOIX DU MARQUAGE	120
<b>III.3. ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE</b>	122
III.3.1. CROISSANCE DE <i>B.LONGUM</i> ATCC 15707, BB 536, <i>B.ANIMALIS</i> ATCC 25527 ET <i>B.BIFIDUM</i> ATCC 29521 SUR TPY ET BL AGAR	122
III.3.1.1. Evaluation de la biomasse	122
III.3.1.2. Détermination des paramètres de croissance	123
III.3.1.3. Evolution des métabolites	123
III.3.2. CROISSANCE DE <i>B.LONGUM</i> ATCC 15707 SUR MILIEU TPY TAMPONNE	125
III.3.3. MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE DE COMPOSITION DEFINIE	126
III.3.3.1. Milieux de culture témoins complexes	126
III.3.3.2. Milieux de culture entièrement synthétiques	126
III.3.3.3. Milieux de culture semi-synthétiques	127
III.3.3.4. Survie de <i>B. longum</i> ATCC 15707 et BB 536 sur milieu Tomarelli	128
III.3.3.5. Croissance de <i>B. longum</i> ATCC 15707 et BB 536 sur milieu Tomarelli	128
<b>III.4. ISOLEMENT DE MUTANTS DE <i>B. LONGUM</i></b>	129
III.4.1. RECHERCHE DE TECHNIQUES DE MARQUAGE	129
III.4.1.1. Résistance de <i>B. longum</i> ATCC 15707 et BB 536 au CCCP	129
III.4.1.2. Analogues de sucre	129
III.4.1.3. Analogue d'acétate de sodium	131
III.4.1.4. Analogues de bases	131
III.4.1.5. Toxicité du 5 fluorouracile sur la flore intestinale	132

III.4.2. OBTENTION DE MUTANTS .....	132
III.4.2.1. Mutation spontanée .....	133
III.4.2.1.1. Obtention de mutants sur 2 dGal .....	133
III.4.2.1.2. Obtention de mutants sur 6AU et 5FU.....	133
III.4.2.2. Mutation aux U.V.....	134
III.4.2.2.1. Survie de BB 536 aux U.V. ....	134
III.4.2.2.2. Obtention de mutants sur 2 dGal .....	134
III.4.2.2.3. Obtention de mutants sur 6AU et 5FU.....	134
III.4.2.3. Mutation à l'E.M.S.....	135
III.4.2.3.1. Survie de BB 536 à l'E.M.S.....	135
III.4.2.3.2. Obtention de mutants sur 2 dGal .....	135
III.4.2.3.3. Obtention de mutants sur 6AU et 5FU.....	135
III.4.3. ETUDE DES MUTANTS ATCC 15707 m.42 ET BB 536 m.15.....	136
III.4.3.1. Survie des mutants.....	136
III.4.3.2. Recouvrement des mutants en mélange avec les cellules-mères.....	136
III.4.3.3. Recouvrement des mutants parmi la flore intestinale .....	137
III.4.3.4. Profils physiologiques des mutants.....	138
III.4.3.5. Comparaison de la résistance de <i>B. longum</i> ATCC 15707, BB 536 et de leurs mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 aux antibiotiques.....	138
III.4.4. COMPORTEMENT DE <i>B. LONGUM</i> ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 M.42 ET BB 536 M.15 LORS DE FABRICATION DE LAIT FERMENTE .....	141
III.4.4.1. Etude de l'acidification du lait .....	141
III.4.4.2. Suivi de la population bactérienne dans des laits fermentés avec les mutants.....	141
III.4.4.3. Test de dégustation .....	142
III.5. EFFETS PROBIOTIQUES .....	143
III.5.1. EFFETS DE L'INGESTION DE DIFFERENTES SOUCHES DE <i>B. LONGUM</i> .....	143
III.5.2. ORIGINE DES <i>BIFIDOBACTERIUM</i> RETROUVES DANS LES SELLES APRES INGESTION DE LAIT FERMENTE.....	144
III.5.3. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE.....	146
 <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	 148
 <b>ANNEXES .....</b>	 152
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 167

*AVANT - PROPOS*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE avec SAINT-HUBERT Industrie Laitière à Ludres (54) et a obéi à un cahier des charges imposé par l'industriel.

La souche BB 536 à laquelle nous faisons référence dans nos travaux est celle qui entrait dans la composition du lait fermenté B'A jusqu'en septembre 1991. Depuis cette date, le produit commercialisé sous le nom B'A est élaboré à partir d'une souche de *Bifidobacterium* différente dont nous n'avons pas étudié les propriétés.

Les témoignages rupestres les plus anciens illustrant des fermentations lactiques dateraient d'environ 5000 ans. Les techniques de coagulation du lait étaient utilisées pour créer de nouveaux produits mais constituaient surtout un bon mode de conservation. La flore impliquée dans ces fabrications provenait le plus souvent de l'environnement et n'était en aucun cas contrôlée. La découverte des microorganismes par Pasteur a bouleversé la conception des laits fermentés puisqu'aujourd'hui, la majorité d'entre eux sont élaborés à l'aide de ferments de composition connue et contrôlée.

Le monde médical s'est depuis longtemps intéressé aux propriétés du yaourt et à son intérêt nutritionnel. La théorie de METCHNIKOFF (1908) qui prône l'influence favorable des laits fermentés au *Lactobacillus* sur la flore intestinale endogène est controversée dès 1915 par RAHE (1915) qui montre que ces microorganismes ne survivent pas au passage dans l'estomac et l'intestin grêle. Dès lors, de nombreux travaux relatifs aux *Lactobacillus* ont été menés. Les résultats souvent contradictoires obtenus sont dus au manque de fiabilité des techniques d'isolement et d'identification des bactéries à partir de selles. Les dernières techniques de culture en anaérobiose ont permis de conclure à un effet probiotique faible et non durable des espèces *L. acidophilus* et *L. bulgaricus*, in vivo chez l'homme.

Les nutritionnistes se sont alors tournés vers d'autres microorganismes. Selon GURR (1984), "les microorganismes qui ont le plus de chance de passer l'estomac et le grêle et de coloniser le milieu, sont ceux indigènes à l'espèce qui consomme le produit fermenté". Les recherches se sont orientées vers le genre *Bifidobacterium* qui, contrairement aux *Streptococcus* et *Lactobacillus* du yaourt qui ne proviennent pas d'écosystèmes humains, est isolé d'animaux ou d'hommes.

Les effets probiotiques des *Bifidobacterium*, déjà mentionnés lors de leur découverte en 1899 (TISSIER, 1900), furent démontrés par MANCIAUX dès 1958. Ce sont les propriétés thérapeutiques de ce genre bactérien qui ont incité les japonais à l'introduire dans leur alimentation (MITSUOKA, 1982; YAMAZAKI, 1985; EBISSAWA, 1987). Depuis 1986, la microflore classique du yaourt : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* s'est enrichie d'une troisième bactérie appartenant au genre *Bifidobacterium*, parfois associée au *Lactobacillus acidophilus*. B'A, mis au point par Saint-Hubert Industrie Laitière, fut le premier produit de ce type lancé sur le marché. L'engouement des consommateurs pour ce lait fermenté aux qualités organoleptiques agréables s'est rapidement propagé aux autres industriels laitiers et aux équipes médicales. De nombreux laits fermentés au *Bifidobacterium* sont apparus sur le marché français, des propriétés bactériostatiques de ces produits envers la flore intestinale indésirable ont été mentionnées chez l'animal (FAURE, 1982; YAMAZAKI, 1982) et quelques travaux relatifs aux effets probiotiques chez l'homme ont été publiés (ROMOND, 1988; ASSELIN, 1988; HAMZE, 1989).

## *I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

## I.1. LE GENRE *BIFIDOBACTERIUM*

### I.1.1. LES BIFIDOBACTERIES - DECOUVERTE ET HISTORIQUE :

En 1899, à l'Institut Pasteur, TISSIER observe et isole, à partir de selles de nourrissons, une bactérie de forme très particulière et jusqu'alors inconnue, présentant des ramifications en Y.

Le problème de la place de cette bactérie au sein de la classification est alors posé.

Au début du siècle, la taxonomie reposant uniquement sur des critères morphologiques, TISSIER (1900) nomme cette bactérie : *Bacillus bifidus communis*. A peu près à la même époque mais en Italie, MORO (1900a) découvre, dans des conditions similaires, une bactérie qu'il reconnaît être différente de celle de TISSIER. Il l'identifie comme appartenant au genre *Lactobacillus*. Malgré les différences existant entre ces deux bactéries, HOLLAND (1920) propose une dénomination commune : *Lactobacillus bifidus*.

Au cours des années, la dénomination de ce nouveau microorganisme va évoluer et s'affiner parallèlement aux progrès de la biologie.

ORLA-JENSEN (1924), s'appuyant sur des techniques nouvelles, est à l'origine d'un tournant décisif dans l'histoire de la taxonomie. Basées jusqu'à cette époque uniquement sur l'aspect morphologique, la classification et l'identification des microorganismes prendront désormais en compte de nouveaux critères : la physiologie, les exigences nutritionnelles du métabolisme énergétique et surtout les caractères métaboliques et enzymatiques particuliers.

Ainsi, en 1967, DE VRIES et STOUTHAMER (1967) mettent en évidence chez ces bactéries ramifiées, d'une part la présence de fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK), enzyme absente chez les lactobacilles et d'autre part l'absence d'aldolase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase, deux enzymes retrouvées chez les lactobacilles.

Ils concluent alors que la classification des bifidobactéries dans le genre *Lactobacillus* n'est pas justifiée.

Deux courants vont dès lors se distinguer : l'école française qui prône la séparation des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* en regroupant toutes les bactéries bifides sous le générique unique de *B. bifidum* (HOLLAND, 1920; ORLA JENSEN, 1919, 1924; PREVOT 1940, 1955) et l'école anglo-saxonne qui préfère intégrer les bifidobactéries dans le genre *Lactobacillus*.

NOM	AUTEUR	ANNEE
<i>Bacillus bifidus</i>	TISSIER	1900
<i>Bacteroides bifidus</i>	CASTELLANI-CHALMERS	1919
	BERGEY'S MANUAL 1ère à 4ème édition	1923-1934
<i>Lactobacillus bifidus</i>	HOLLAND	1920
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ORLA - JENSEN	1924
<i>Bacterium bifidum</i>	LEHMANN - NEUMANN	1927
<i>Tisseria bifida</i>	PRIBRAM	1929
<i>Nocardia bifida</i>	VUILLEMIN	1931
<i>Actynomices bifidus</i>	NANNIZZI	1934
<i>Actinobacterium bifidum</i>	PUNTONI	1937
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>var bifidus</i>	WEISS et RETTGER	1938
<i>Lactobacillus parabifidus</i>	WEISS et RETTGER	1938
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	PREVOT	1938
<i>Lactobacillus bifidus</i>	BERGEY'S MANUAL 5ème à 7ème édition	1939-1957
<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	NEGROVI - FISCHER	1944
<i>Corynebacterium bifidum</i>	OLSEN	1949
<i>Lactobacillus bifidus</i>	NORRIS et coll.	1950
<i>Lactobacillus bifidus</i> <i>var pennsylvanicus</i>	GYÖRGY	1953
5 groupes de bactéries <i>bifidus</i>	DEHNERT	1957
Description des espèces humaines	REUTER	1963
Nouvelles espèces animales	MITSUOKA	1969
Nouvelles espèces animales	SCARDOVI	1969
Nouvelles espèces	HOLDEMAN et MOORE	1972
Création du genre <i>Bifidobacterium</i> constitué de 11 espèces	BERGEY'S MANUAL 8ème édition	1974

**Tableau 1** : Chronologie de la taxonomie des bifidobactéries  
(d'après RASIC et KURMANN, 1983).

L'avènement de la chemiotaxonomie dans les années 1960 a marqué le début d'une autre période dans la taxonomie bactérienne. En effet, les recherches en biochimie des procaryotes ont montré que l'analyse des composants cellulaires pouvait devenir un instrument essentiel en classification et identification des bactéries. "Le développement des instruments d'analyse permet d'obtenir rapidement des données précises et reproductibles, il minimise les erreurs dans les recherches individuelles et il élimine les jugements subjectifs" (DELLAGLIO, 1989).

Il faut attendre 1965 et les progrès de la génétique moléculaire pour que les équipes de SEBALD (1965) et WERNER (1966) démontrent que le pourcentage en G + C de l'ADN des bifidobactéries diffère de celui des *Lactobacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*.

En 1974, la VIII<sup>ème</sup> édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology reconnaît "*Bifidobacterium*" comme un genre à part entière comprenant 11 espèces (BUCHANAN et GIBBONS, 1974).

Aujourd'hui, ce genre qui appartient à la famille des Actinomycetaceae (SCARDOVI, 1986) compte 24 espèces regroupées selon leur origine écologique : 15 sont isolées uniquement chez l'animal et 9 colonisent les cavités naturelles de l'homme (SCARDOVI, 1981).

Le tableau 1 rassemble les différents noms proposés pour cette bactérie depuis sa découverte (RASIC et KURMANN, 1983) et le tableau 10 (p. 36) recense les espèces décrites à ce jour.

### **I.1.2. MORPHOLOGIE :**

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* présentent une forme globalement bacillaire, possèdent une coloration de Gram positive, sont immobiles et non sporulées.

Ces bâtonnets au contour extérieur irrégulier sont le plus souvent incurvés et leurs extrémités généralement renflées "en massue" peuvent présenter une ou plusieurs ramifications. Il n'est cependant pas rare de rencontrer également des formes plus arrondies, des bacilles très courts ou longs, de largeur variable.

Cependant, ce polymorphisme ne peut en aucun cas être assimilé à une dégénérescence puisque ces formes sont capables de générer à nouveau les formes de départ (MAYER et MOSER, 1950). Il semble plutôt que la composition du milieu de culture soit à l'origine de ces formes en V, Y ou X rencontrées chez le genre *Bifidobacterium*.

Plusieurs composants de milieux peuvent influencer sur la forme de ces bactéries :

- la concentration en N-acétylglucosamine (intervenant dans la synthèse du peptidoglycane comme le montre la figure 4 page 22) joue sur la forme de *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* (GLICK et coll., 1960);

- différents acides aminés (alanine, acide aspartique, acide glutamique et sérine) (HUSAIN et coll., 1972);

- les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (KOJIMA, 1968, 1970a et 1970b).

Plus les quantités de N-acétylglucosamine et d'acides aminés sont faibles, plus les formes sont ramifiées. En revanche, en milieu favorable, les bacilles sont plus longs (MAYER et MOSER, 1950).

La coloration de Gram met en évidence une répartition souvent irrégulière de la chromatine généralement accumulée au niveau des bifurcations ou des massues (MAYER, 1950; RAYNAUD et GUINTINI, 1959b).

### **I.1.3. PHYSIOLOGIE :**

#### **I.1.3.1. Type respiratoire :**

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies stricts. Cependant, le degré de tolérance à l'oxygène varie selon les espèces et les milieux de culture et de nombreux auteurs ont étudié ce caractère :

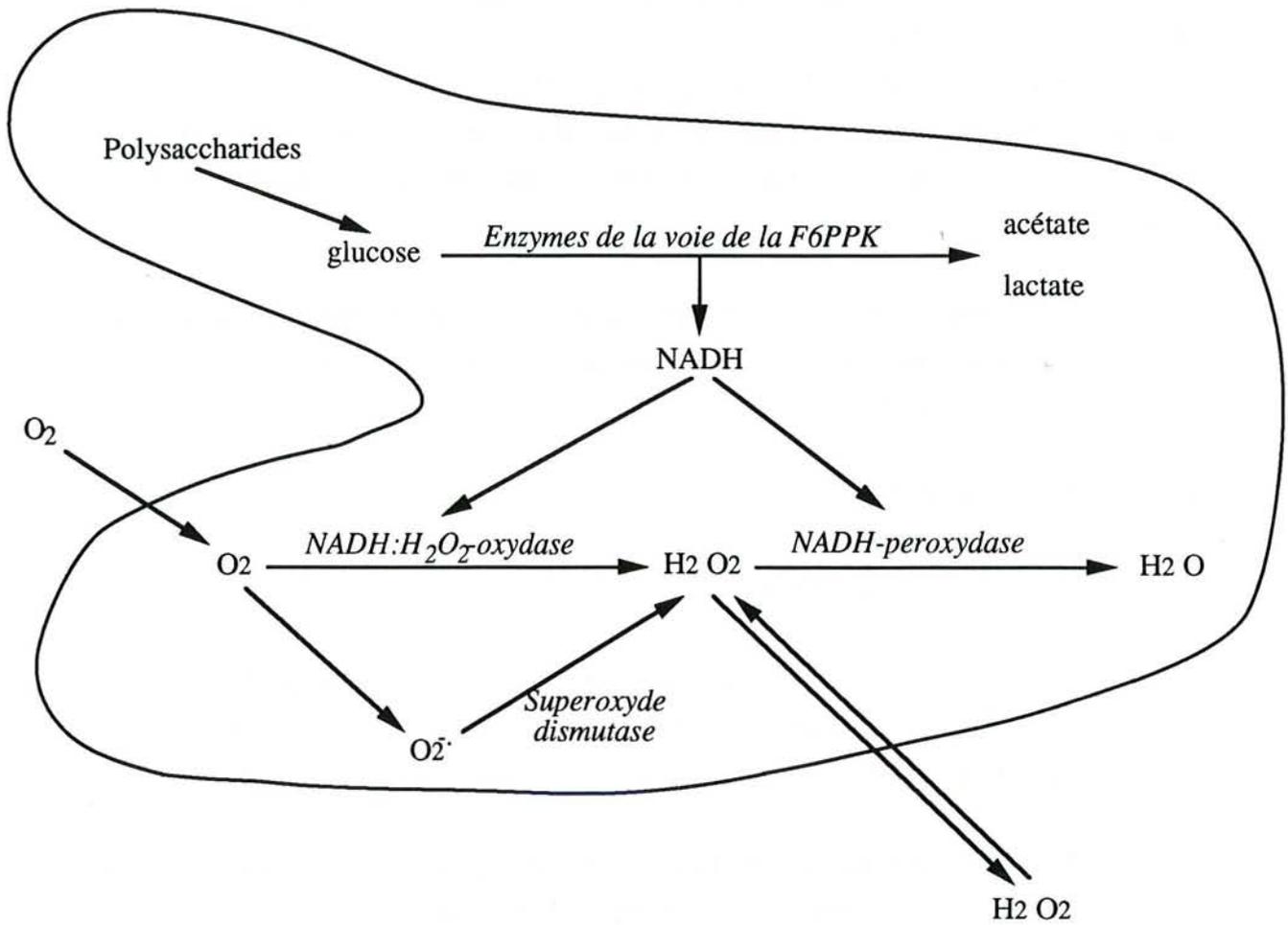
DE VRIES et STOUTHAMER (1969) ont effectué des travaux assez poussés mais déjà anciens sur les facteurs déterminant le degré d'anaérobiose de douze souches de *Bifidobacterium*. Ils ont constaté que :

- aucune des douze souches testées ne se développe sur gélose en aérobiose.

- les souchesensemencées en gélose profonde en aérobiose présentent des zones d'inhibition très variables. L'addition de catalase au milieu ne diminue que légèrement ces zones tandis que celle de cystéine les diminue fortement et augmente le taux de croissance et la densité cellulaire.

- trois sortes de réponses sont observées lors du passage de l'anaérobiose aux conditions aérobies :

- croissance aérobie sans accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  : Une souche de *B. bifidum* relativement aérotoleérante forme de petites quantités d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par NADH-oxydation. L'absence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observée en culture liquide aérobie dépourvue d'activité catalasique ou NADH peroxydasique peut être expliquée par un système peroxydase inconnu qui détruirait cet  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figure 1** : Devenir de l'oxygène absorbé par les *Bifidobacterium*  
 (d'après ISHIBASHI, 1989).

- croissance limitée avec accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : La limitation pour la souche de *B. liberorum* étudiée serait due à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène jugé comme toxique pour l'enzyme clé du métabolisme des glucides de *Bifidobacterium* : la Fructose-6-Phosphate Phosphocétolase (F6PPK) (RASIC et KURMANN, 1983).

- pas de croissance sans accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Les souches de *B. bifidum* testées nécessitent un faible potentiel rédox pour la croissance et la fermentation.

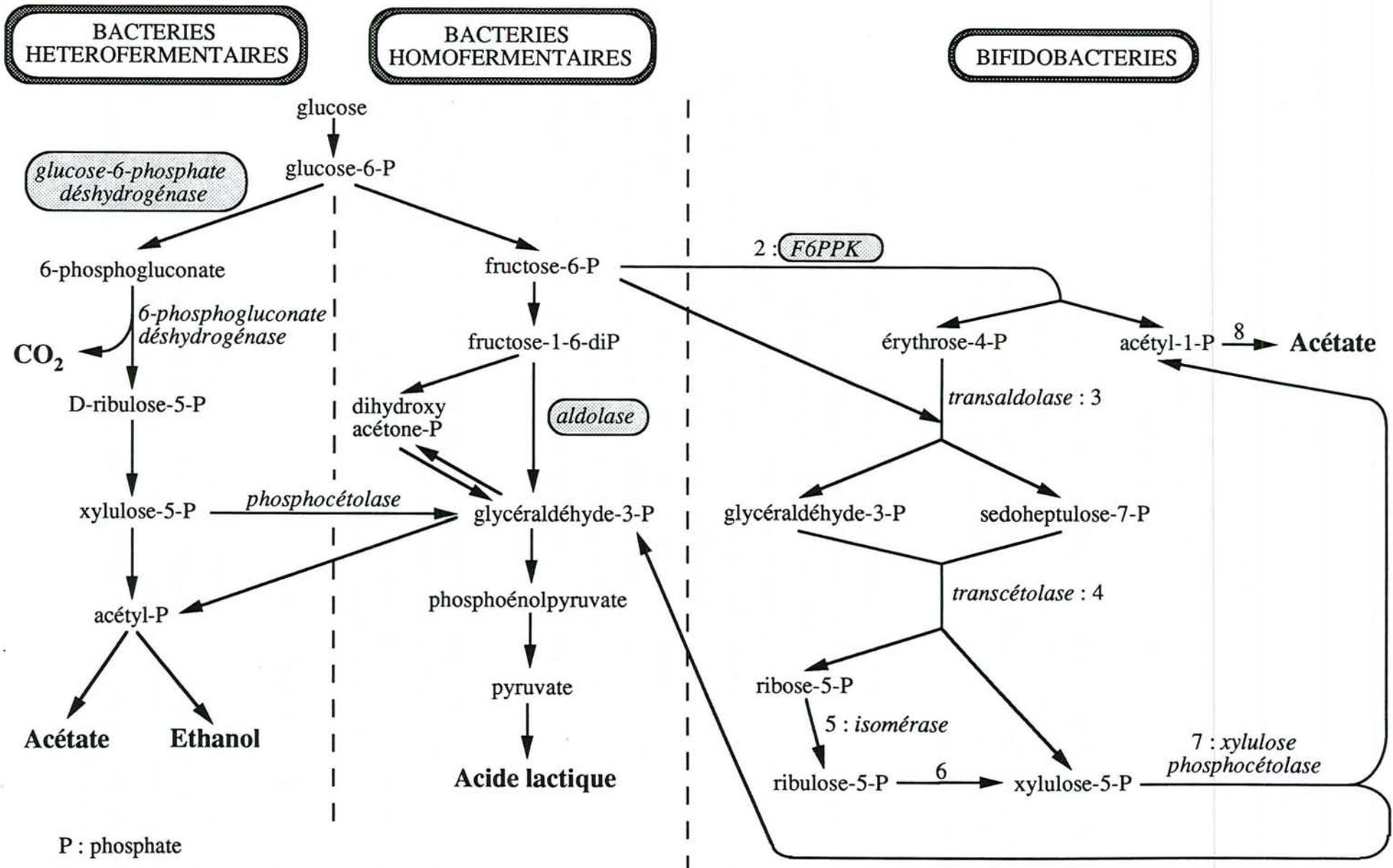
Le Bergey's Manual signale qu'en présence de CO<sub>2</sub>, la sensibilité à l'oxygène varie considérablement selon les souches. Parmi les souches capables de se développer en présence d'oxygène, certaines restent catalase négative, d'autres deviennent catalase positive et pour d'autres encore, la présence de catalase est liée à la présence d'hémine dans le milieu (SCARDOVI, 1986).

Une étude de l'absorption d'oxygène par cinq souches de *Bifidobacterium* d'origine humaine a permis de montrer une diminution de la pression partielle en oxygène du milieu au cours de la multiplication de ces souches. L'absorption endogène d'oxygène est liée à la présence de NADH-oxydase. Elle a lieu même en absence de glucose et dépendrait directement de la quantité de polysaccharides accumulés dans les cellules. De plus, toutes les souches ont accumulé du peroxyde d'hydrogène qui est ensuite réduit par la NADH-peroxydase mais l'activité de cette enzyme varie selon la souche étudiée. Les souches les plus sensibles à l'oxygène auraient une activité NADH-peroxydasique faible, entraînant une accumulation de peroxyde d'hydrogène toxique. Une autre possibilité serait l'empêchement de la multiplication par la présence d'oxygène actif tel que le superoxyde. Ces conclusions sont résumées par la figure 1 (ISHIBASHI, 1989).

Des mutants de certaines souches identifiées à l'époque comme *B. bifidum*, caractérisés par la perte du caractère anaérobie strict, auraient été isolés (MAYER et coll., 1950; NORRIS et coll., 1950) mais ces travaux déjà anciens mériteraient d'être repris compte tenu des difficultés d'identification des espèces de *Bifidobacterium* au moment de ces études.

### **I.1.3.2. Température et pH :**

La température optimale de développement des souches humaines est comprise entre 36 et 38°C. En revanche, celle idéale pour les souches animales est légèrement plus élevée, aux environs de 41 à 43°C et peut atteindre 46,5°C (RASIC et KURMANN, 1983). Ainsi, le choix d'une espèce de *Bifidobacterium* entrant dans la composition d'un lait fermenté impose la technologie de fabrication.



**Figure 2 :** Résumé des voies métaboliques et produits des bactéries hétéro- et homofermentaires ainsi que des bifidobactéries.

La croissance est nulle en dessous de 20°C et au dessus de 46°C et la thermorésistance des bactéries de ce genre est inexistante : *B. bifidum* meurt à 60°C (RASIC et KURMANN, 1983).

Le pH initial optimum de croissance se situe entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance ne peut se dérouler en deçà de pH 5,0 et au delà de pH 8,0 (SCARDOVI, 1986).

#### **I.1.4. METABOLISME :**

##### **I.1.4.1. Métabolisme des glucides :**

DE VRIES et STOUTHAMER (1967) ont montré que chez dix-sept souches de *Bifidobacterium*, l'aldolase (enzyme de la glycolyse retrouvée chez les lactobacilles homofermentaires) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (retrouvée chez les lactobacilles hétérofermentaires) étaient absentes alors que la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) était présente (figure 2).

Chez le genre *Bifidobacterium*, les hexoses sont dégradés exclusivement, et ceci de façon spécifique, par la voie du fructose-6-phosphate décrite par SCARDOVI et TROVATELLI (1965) (figure 3).

##### **I.1.4.2. Les métabolites :**

La fermentation de 2 moles de glucose conduit globalement à 3 moles d'acétate et 2 moles de lactate. En réalité, l'acide pyruvique peut être dégradé selon 2 voies :

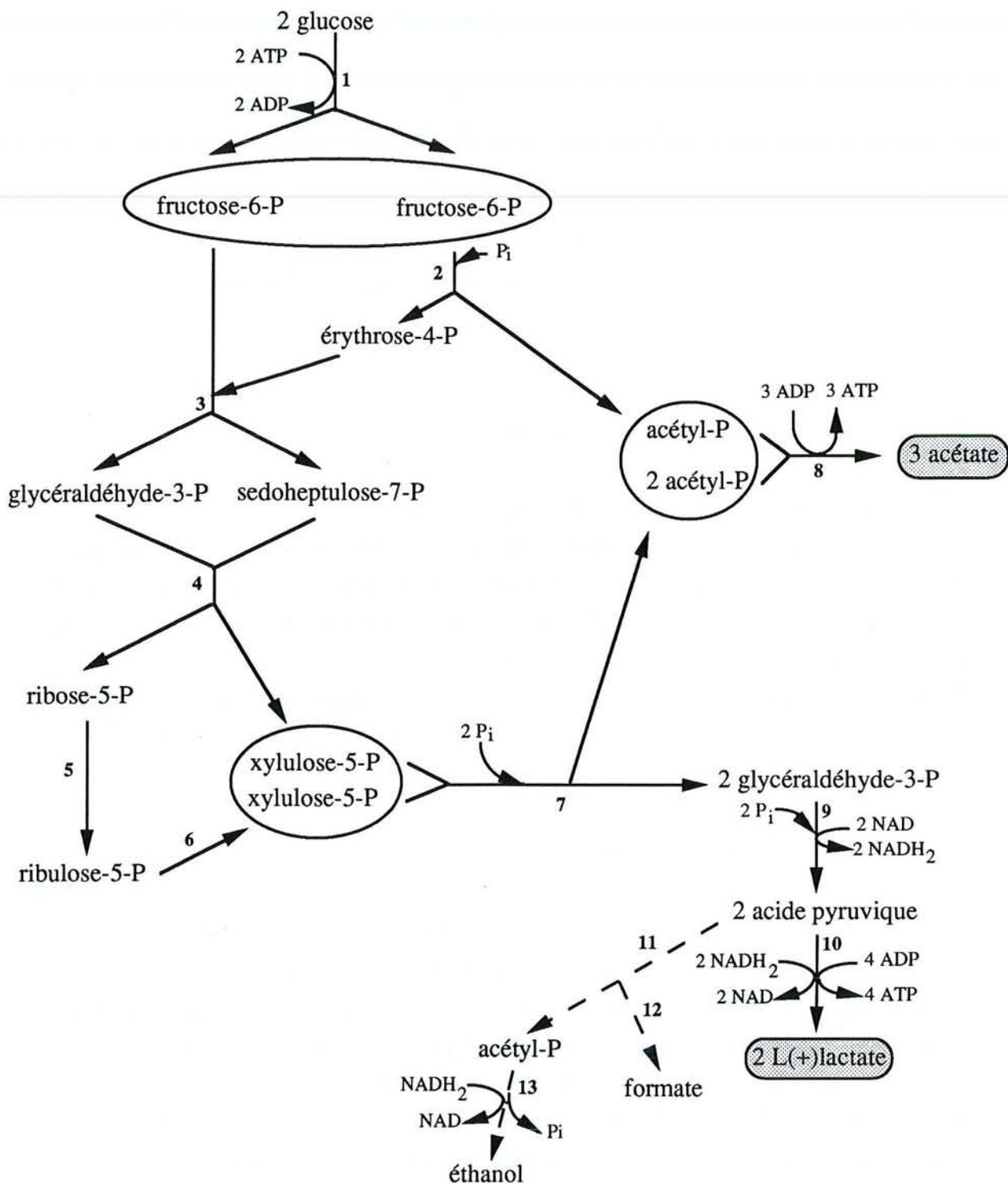
La première est la réduction du pyruvate en L(+) lactate par la L(+) lactate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.27), enzyme dont l'activité est régulée par le fructose 1,6-diphosphate.

La seconde voie est le clivage du pyruvate, par la réaction phosphoroclastique, en acide formique et acétyl-phosphate dont une partie serait ultérieurement réduite en alcool éthylique pour régénérer du NAD. Cependant, les essais effectués pour révéler la présence de l'enzyme phosphoroclastique ont échoué (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968).

Les proportions des produits terminaux de fermentation varient de façon importante entre les souches et même au sein d'une même espèce (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968; LAUER et KANDLER, 1976).

De petites quantités d'acide succinique sont produites.

Il est important de souligner également que les bifidobactéries produisent uniquement l'isomère L(+) de l'acide lactique. Les laits fermentés au *Bifidobacterium* sont donc recommandés aux nouveaux-nés qui ne dégradent que très lentement l'isomère D(-) et qui



**Figure 3** : Formation d'acétate et de lactate à partir de glucose par la voie des bifidobactéries (d'après SCARDOVI et TROVATELLI, 1965).

- 1 : hexokinase et glucose-6-phosphate isomérase
- 2 : fructose-6-phosphate phosphocétolase
- 3 : transaldolase
- 4 : transcétolase
- 5 : ribose-5-phosphate isomérase
- 6 : ribulose-5-phosphate 3-épimérase
- 7 : xylulose-5-phosphate phosphocétolase
- 8 : acétate kinase
- 9 : enzymes de la voie homofermentaire
- 10 : L(+)-lactate déshydrogénase
- 11 : enzyme phosphoroclastique
- 12 : formate déshydrogénase (EC 1.2.1.2)
- 13 : alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1)

peuvent être, par conséquent, sujets à des troubles tels qu'acidose, formation de méthémoglobine et perturbations neurologiques en cas d'ingestion de cet isomère (RASIC et KURMANN, 1983).

Une faible quantité de CO<sub>2</sub> peut être produite lors de la dégradation du gluconate (SCARDOVI, 1986).

#### I.1.4.3. Les enzymes :

Les produits terminaux de la fermentation sont formés par l'action séquentielle de transaldolase, transcétolase, xylulose-5-phosphate phosphocétolase et des enzymes de la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas agissant sur le glycéraldéhyde-3-phosphate.

L'enzyme caractéristique du métabolisme des sucres par le genre *Bifidobacterium* est la **fructose-6-phosphate phosphocétolase** (F6PPK - EC 4.1.2.22). Cette enzyme spécifique du genre est absente chez les bactéries anaérobies susceptibles d'être confondues morphologiquement avec les bifidobactéries, à savoir *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et Actinomycetaceae (SCARDOVI et TROVATELLI, 1965).

BIAVATI et coll. (1986) ont mis en évidence, par électrophorèse en gel d'amidon (zymogramme) puis comparaison des mobilités électrophorétiques, trois types différents pour cette enzyme selon l'origine écologique de la souche dont elle est isolée, mammifère, abeille ou homme (SCARDOVI et coll., 1971a). Les F6PPK de *B. globosum* (type animal) et de *B. dentium* (type humain) ont été purifiées (SGORBATI et coll., 1976).

Par la même méthode, quatorze isoenzymes de **transaldolase** (EC 2.2.1.2) et dix-neuf de **6-phosphogluconate déshydrogénase** (6 PGD) (EC 1.1.1.44) ont pu être révélées (SCARDOVI et coll., 1979b). Chaque souche donnait une seule bande par enzyme. Si la transaldolase est une enzyme essentielle et caractéristique du shunt du fructose-6-phosphate, la 6PGD (fonctionnelle chez les bactéries hétérofermentaires) est apparemment une enzyme non fonctionnelle chez les bifidobactéries, au moins dans les cellules cultivées sur glucose puisque celles-ci, en règle générale, sont déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase détectable (SCARDOVI et TROVATELLI, 1965).

Quelques recherches ont été effectuées sur d'autres enzymes moins caractéristiques :

- MIURA et coll. (1979) déterminent les activités suivantes par HPLC :

**arylsulfatase** (R-sulfate + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  R-OH + sulfate),

**$\beta$ -glucuronidase** (R-glucuronide + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  R-OH + acide glucuronique) et

**$\beta$ -glucosidase** (hydrolyse des aryl- ou alkyl- $\beta$ -glucosides).

	<i>B.breve</i>	<i>B.infantis</i>	<i>B.longum</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>B.adolescentis</i>
thiamine (B1)	+	+++	+	+++	(+)
riboflavine (B2)	oui	oui	+++	oui	oui
pyridoxine (B6)	oui	oui	+++	oui	oui
acide folique (B9)	+	+++	+	+++	(+)
cobalamine (B12)	oui	oui	oui	oui	oui
acide ascorbique (C)	oui	oui	oui	oui	oui
acide nicotinique (PP)	+++	+++	+	+++	(+)
biotine (H)	oui	+++	oui	oui	oui

**Tableau 2** : Production de vitamines par quelques espèces de *Bifidobacterium* d'origine humaine (d'après TERAGUCHI et coll., 1984 et DEGUCHI et coll., 1985).

- LEE et coll. (1980) ont purifié et caractérisé la **galactokinase** (EC 2.7.1.6) (galactose + ATP  $\longrightarrow$  galactose-1-phosphate + ADP) de *B. bifidum* après croissance sur galactose.

- TOCHIKURA et coll. (1986) ont purifié la  **$\beta$ -D-galactosidase** de *B. longum* (lactose + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  galactose + glucose).

- DESJARDINS et ROY (1990) ont utilisé les systèmes API ZYM pour déterminer que les vingt-deux souches d'origine humaine qu'ils ont testé possèdent des activités  $\alpha$ - et  $\beta$ -galactosidases et  $\alpha$ -glucosidase. La  **$\beta$ -glucosidase**, en revanche, n'est détectée ni chez *B. bifidum*, ni chez *B. longum*. Cette technique ne peut cependant être utilisée que lors d'une étude d'approche. Ces travaux ont été confirmés la même année par l'équipe de CHEVALIER (1990). Les activités  $\beta$ -glucosidase,  **$\beta$ -glucuronidase** et **N-acétyl-glucosaminidase** ont également été mises en évidence.

#### I.1.4.4. Les vitamines produites :

DEGUCHI et coll (1985) se sont intéressés à la synthèse de six vitamines par les *Bifidobacterium* d'origine humaine : thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxine (B6), acide folique (B9), cyanocobalamine (B12) et acide nicotinique (PP). Parmi ces vitamines, cinq (sauf la riboflavine) sont synthétisées par la majorité des souches examinées et une grande proportion de chacune d'elle est excrétée. Ces auteurs notent également, qu'en ce qui concerne la thiamine, l'acide folique et l'acide nicotinique, *B. bifidum* et *B. infantis* sont bons producteurs, *B. breve* et *B. longum* en libèrent de faibles quantités et *B. adolescentis* ne synthétise aucune de ces vitamines.

TERAGUCHI et coll (1984) précisent que, outre ces trois vitamines, la riboflavine, la pyridoxine, la cyanocobalamine, l'acide ascorbique (vitamine C) et la biotine (vitamine H) sont produites par ces cinq souches et accumulées par les cellules.

DEGUCHI et coll. ne mettent pas en évidence la synthèse de riboflavine chez toutes les souches des espèces humaines étudiées. Seules les vitamines B6, B9 et B12 sont excrétées dans le milieu. La production des vitamines B2 et B6 par *B. longum* est exceptionnelle. *B. breve* et *B. infantis* se caractérisent par une production importante de vitamines PP et H respectivement. *B. adolescentis* ne serait effectivement qu'un faible producteur.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

Nous pouvons toutefois nous interroger sur la véritable identité des espèces étudiées, les techniques réellement fiables d'identification des espèces de *Bifidobacterium* n'étant pas encore couramment utilisées à l'époque de ces travaux.

#### **I.1.4.5. Besoins nutritionnels :**

##### **I.1.4.5.1. Matière azotée :**

La plupart des souches de *Bifidobacterium* sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme unique source d'azote (HASSINEN et coll., 1951). Cependant, *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum* et *B. cuniculi* ne se développent qu'en présence d'azote organique. In vitro, et en absence de source azotée organique, les bifidobactéries peuvent synthétiser d'importantes quantités d'acides aminés. *B. bifidum*, par exemple, produit de l'alanine, de la valine, de l'acide aspartique et jusqu'à 150 mg/l de thréonine (MATTEUZI et coll., 1978).

Selon HATANAKA et coll. (1987a, 1987b), la glutamine synthétase et la glutamate déshydrogénase des *Bifidobacterium* participeraient à l'assimilation des composés azotés chez ces microorganismes.

##### **I.1.4.5.2. Oligoéléments :**

*B. bifidum* est une espèce particulièrement étudiée en ce qui concerne les oligoéléments. BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN (1981a, 1983) et UEDA et coll. (1983) ont montré que *B. bifidum* ne croît qu'en présence de magnésium et de manganèse, et surtout de fer. Le fer peut être assimilé par *B. bifidum* sous ses deux formes d'oxydation selon l'acidité du milieu (BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN, 1983; BEZKOROVAINY et coll., 1986) :

- le fer ferreux  $Fe^{2+}$  est utilisé à pH 5.

Les conditions physicochimiques (pH voisin de 5 et forte anaérobiose) réunies dans l'intestin des nourrissons allaités au sein favorisent la réduction du fer. Les *Bifidobacterium* peuvent alors l'assimiler, créant ainsi un déficit du milieu en fer et diminuant de ce fait, la croissance des autres genres bactériens ayant besoin de fer. Le transport dépendrait d'une ATPase membranaire et son incorporation serait inhibée compétitivement par le zinc.

- le fer ferrique  $Fe^{3+}$  est utilisé uniquement à pH neutre.

Par l'intermédiaire de ferro-enzymes, le fer participerait, chez *B. bifidum*, à la production d'acide acétique, entraînant une diminution du pH. Ce processus serait l'une des explications à la répression des bactéries potentiellement pathogènes (*E. coli*, *Bacteroides*) observée chez l'enfant nourri au sein.

### **I.1.4.5.3. Vitamines :**

Il est impossible d'établir une règle pour le genre *Bifidobacterium* quant à l'exigence de ses espèces en vitamines.

TERAGUCHI et coll. (1984) et DEGUCHI et coll. (1985) ont cependant établi que les souches d'origine humaine auraient besoin de thiamine (B1), pyridoxine (B6), acide folique (B9), cyanocobalamine (B12) et acide nicotinique (PP) pour leur croissance.

### **I.1.4.5.4. Facteurs de croissance :**

POCH et BEZKOROVAINY (1988) ont complété en facteurs de croissance un milieu de base minimum entièrement synthétique afin de déterminer ceux indispensables au développement des différentes espèces de *Bifidobacterium*. Seuls *B. adolescentis* et *B. longum* sont capables de se développer sur le milieu non complété. Toutes les autres espèces nécessitent la présence de facteurs de croissance de natures diverses.

#### **I.1.4.5.4.1. Facteurs dits bifidigènes :**

En 1953, GYÖRGY (1953) découvre un mutant de *B. bifidum* (nommé à l'époque *L. bifidus*) qui ne peut cultiver qu'en présence de lait humain, et plus précisément de dérivés de N-acétylglucosamine (GAUHE et coll., 1954; MONTREUIL, 1957). Ce mutant est un *B. bifidum* variant b.

RAYNAUD (1959a) montre peu après que la souche *B. bifidum* TISSIER a besoin de facteurs protéiques et non de sucres N-acétylés pour se développer.

En fait, l'espèce *B. bifidum* se divise en deux variants : le variant "a" ou *B. bifidum* TISSIER retrouvé chez l'homme adulte et le variant "b" ou *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* de GYÖRGY isolé chez le nourrisson. Ces constatations suggèrent que les différentes souches de la même espèce *B. bifidum* ont des besoins nutritionnels particuliers.

*B. bifidum* var. a serait effectivement insensible aux dérivés de la N-acétylglucosamine et nécessiterait des facteurs protéiques, à l'image de *B. longum* et *B. infantis*, alors que *B. bifidum* variant b exigerait les facteurs glucidiques du lait de femme, en quantité plus ou moins importante selon les souches (NEUT et coll., 1981; ROMOND et coll., 1980; BEERENS et coll., 1980).

La plupart des espèces du genre *Bifidobacterium* ne peuvent se développer en milieu totalement synthétique et demandent des produits biologiques non définis tels que le digestat

Nom du facteur "bifidigène"	Espèce sur laquelle il est actif	Localisation	Résistance			Structure active	
			Chaleur	Irrad.	Lyoph.		
<b>BB</b>	BF1	<i>B. bifidum</i> var. b	Lait et colostrum Hydrolysats tryptiques de caséine humaine Mucines	+	+	N-acétylglucosamine glycoprotéines	
	BF2	<i>B. bifidum</i> var. a	Hydrolysats enzymatiques de caséine	+	+	Peptides non glycosylés	
	Glycoprotéines	<i>B. bifidum</i> var. a <i>B. bifidum</i> var. b	Lactosérum de lait et de colostrum humain			Fraction glucidique	
<b>BI</b>		<i>B. infantis</i>	Extraits végétaux Extraits de foie Laits	+/-	+/-	-	Partie protéique
<b>BL</b>		<i>B. longum</i>	Extraits végétaux Extraits de foie Laits	-	-		Nature protéique différente de celle des facteurs BB

**Tableau 3 :** Caractéristiques des principaux facteurs dits "bifidigènes".

de caséine bovine, le lactosérum de lait bovin, la mucine gastrique de porc ou l'extrait de levure (POCH et BEZKOROVAINY, 1988; PETSCHOW et TALBOTT, 1990).

Ces facteurs de croissance nécessaires au développement des *Bifidobacterium* sont appelés facteurs bifidigènes. Actuellement, nous pouvons distinguer trois grands groupes de facteurs bifidigènes différents selon l'espèce à laquelle nous nous intéressons (MODLER, 1990) : Les facteurs BB (BF1, BF2 et glycoprotéines) d'une part et les facteurs BI et BL d'autre part (tableau 3).

#### a. facteurs BB :

Les facteurs BBa et BBb sont caractérisés par BEERENS et coll. (1980) comme les éléments du lait de femme qui, après chauffage ou irradiation, ne perdent pas leur activité stimulante pour respectivement *B. bifidum* var. a (essentiellement retrouvé chez l'adulte) et *B. bifidum* var. b (isolé chez l'enfant).

Les facteurs BBa se trouvent principalement dans les extraits de levure et les extraits de foie, les laits lyophilisés, l'hydrolysate de caséine bovine et la mucine de porc (RAYNAUD, 1959a; NICHOLS et coll., 1974; BEZKOROVAINY et coll., 1979) tandis que les colostrums de femme puis de rate, les laits de femme et de rate (GYÖRGY et coll., 1954a, 1954b), les hydrolysats de caséine humaine (NICHOLS et coll., 1974) et la mucine de porc (RAYNAUD, 1959a) renferment de facteurs BBb.

Il convient de distinguer trois groupes de facteurs BB naturels :

##### - "Bifidus factor I de GYÖRGY" ou facteurs BF1 :

Ils agissent surtout sur le variant b. Le facteur BF1 du lait ou du colostrum est sous forme de gynolactose. Il semble que la présence d'un motif N-acétylglucosamine dans la structure oligosaccharidique soit indispensable mais non suffisante à l'expression de l'activité bifidigène (SEKA ASSY, 1982).

Par ailleurs, DESJARDINS et ROY (1990) notent que *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* possède une activité N-acétyl-D-glucosaminidase bien supérieure à celle détectée chez les autres bifidobactéries.

La caséine humaine native (SEKA ASSY, 1982) ou son hydrolysate tryptique (BEZKOROVAINY et coll., 1979) formé de glycoprotéines seraient efficaces sur *B. bifidum* var. b. L'hydrolyse tryptique ou chymotryptique de la K-caséine humaine native donne naissance à des fractions contenant 60 à 70% de glucides tels que galactose, glucosamine et galactosamine, elles-mêmes actives.

Tous ces résultats sont encore à prendre avec une certaine réserve.

Les mucines (glycoprotéines du mucus) sont produites et secrétées par les cellules à mucus des glandes salivaires, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon. Leur poids moléculaire dépasse un million de daltons (ALLEN, 1984). Constituants majeurs du mucus (FORSTNER et coll., 1984), les mucines sont formées en majorité de sucres (les mucines de l'intestin grêle, par exemple, contiennent cinq fois plus de sucres que de protéines) (ALLEN, 1981) puisque 70 à 80% du poids est dû aux carbohydrates. Les chaînes oligosaccharidiques contiennent de 2 à 20 résidus monosaccharidiques qui peuvent être les suivants : galactose, fucose, N-acétyl galactosamine, N-acétylglucosamine et acide sialique. Ces chaînes oligosaccharidiques sont reliées à des segments peptidiques représentant 20% du poids de la molécule et constitués de plus de 70% de proline, sérine et thréonine.

Les mucines gastrointestinales de porc ou le méconium sont une source abondante de facteurs BB. L'activité du méconium *in vitro*, par exemple, est de 1,2 à 2 fois plus importante que celle du lait humain (GYÖRGY, 1953). L'hydrolyse ménagée des mucines donne naissance à des oligosaccharides proches de ceux du lait de femme (KUHN et coll., 1953; KUHN et KIRSCHENLOEHR, 1954; TOMARELLI et coll., 1954).

Des modèles animaux ont permis de montrer que certains composés sont également actifs *in vivo*. Ainsi, le mucus relargué dans la lumière intestinale de souris axéniques est consommé par *B. bifidum* qui peut ainsi coloniser l'intestin.

- facteurs BF2 :

Leur nature a été décrite essentiellement par RAYNAUD (1959a) à partir d'une souche de *B. bifidum* var. a : Il s'agirait de peptides non glycosylés, obtenus par exemple par action d'une protéase sur la caséine. L'hydrolysate enzymatique de caséine est, de loin, le composé le plus actif.

- glycoprotéines :

Les glycoprotéines isolées du lactosérum de lait et de colostrum humain semblent efficaces sur les deux types de variants (SEKA ASSY, 1982). Il semble que l'activité de ces structures soit à relier à leur fraction glucidique.

#### b. facteurs BI et BL :

Le facteur BI stimulant la croissance de *B. infantis* est détruit par la lyophilisation tandis que le facteur BL activant la croissance de *B. longum* est sensible à un chauffage ou à une irradiation.

Les facteurs BI et BL sont particulièrement abondants dans de nombreux extraits végétaux, l'extrait de foie et les laits (ROMOND et coll., 1980).

Les facteurs BI du lait de femme sont de deux types : BI thermo et radiolabiles et BI thermo et radiostables. La partie protéique des substances favorables à la croissance de *B. infantis* semble jouer un rôle important. Le support des facteurs BL du lait de femme semble également être de nature protéique (BEERENS et coll., 1980) et est tout à fait différent de la structure des facteurs BB (SEKA ASSY, 1982) mais la structure complète de ces facteurs n'est pas connue.

#### c. composants actifs des facteurs bifidigènes :

Les meilleurs facteurs pour toutes les espèces sont le digestat de caséine bovine et l'extrait de levure plutôt que le lactosérum de lait humain. Les autres facteurs de croissance : lactosérums de laits humains ou bovins, mucine gastrique de porc et digestat de sérum albumine bovine sont actifs sur certaines espèces mais pas sur d'autres (POCH ET BEZKOROVAINY, 1988).

La caséine bovine est un promoteur de croissance; en fait, c'est la fraction K.caséine qui serait active. Ses résidus disulfide/sulphydryl seraient des composants biologiquement actifs importants, responsables de ce phénomène chez *B. bifidum* et *B. longum*. La K.caséine doit être digérée par la trypsine pour être active et c'est dans la portion p-K.caséine et non dans la partie carbohydrate que réside l'activité de promotion de la croissance. Les résidus disulfide ou sulphydryl sont essentiels pour cette activité. Peut-être s'associeraient-ils avec un facteur de croissance des bifidobactéries non encore identifié? En tous cas, il semble que la combinaison des résidus disulfide/sulphydryl avec quelque chose d'autre soit la base de l'activité de promoteur de croissance microbienne dans les digestats de caséine, de mucine de porc gastrique et d'extrait de levure (POCH et BEZKOROVAINY, 1991).

Les composants actifs de ces produits biologiques complexes n'ont pas été identifiés.

#### d. rôle des facteurs bifidigènes et conclusion:

In vivo, l'administration à des nourrissons d'un aliment lacté supplémenté en facteur BF1 ou BF2 restaurerait en partie la flore bifide (LEVESQUE et coll., 1959b). Ces travaux déjà anciens devraient cependant être repris en s'appuyant sur les connaissances récentes de la taxonomie des *Bifidobacterium* et de la biochimie des facteurs bifidigènes, ceux-ci apparaissant très complexes. En effet, l'adéquation existant entre un facteur donné et une espèce donnée est un élément important de l'étude des facteurs bifidigènes. Il serait important de s'intéresser à la spécificité de ces facteurs vis-à-vis des espèces de *Bifidobacterium* colonisant l'intestin, la variabilité existant entre les souches de collection et les souches rencontrées dans la nature étant sans doute importante. De plus, les études

effectuées l'ont été in vitro ou in vivo sur des animaux axéniques ou monoxéniques et elles demandent à être extrapolées à l'homme. Mais quelle est l'influence de ces facteurs dits bifidigènes sur les autres genres bactériens de la flore intestinale et surtout de la flore humaine?

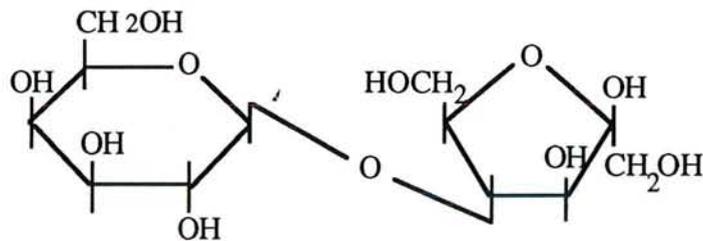
#### I.1.4.5.4.2. Lactoferrine :

La lactoferrine est une glycoprotéine combinée au fer que l'on trouve en grande quantité dans le colostrum.

SHIMAMURA (1989) a combiné la lactoferrine (LF) à plusieurs métaux (Fe, Cu, ou Zn). Il a ensuite testé l'activité de ces complexes lactoferrine-métaux sur différentes bactéries et montré une activité antibactérienne de la lactoferrine et de ses composés Cu - LF et Zn - LF à l'égard de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. En revanche, la lactoferrine et ses trois complexes métalliques possèdent un effet promoteur sur la croissance de huit espèces de *Bifidobacterium*, cinq d'origine humaine et trois d'origine animale, et ceci en début de phase de croissance logarithmique.

#### I.1.4.5.4.3. Lactulose et lactitol :

Le lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-fructose) n'est pas métabolisé par les organismes humains ou animaux.



Non détecté dans le lait cru, le lactulose est présent dans les produits laitiers traités thermiquement.

MANCIAUX (1958) rapporte que PETUELY (1956) a isolé le lactulose du lait de femme. Ce composé est capable, in vivo, d'augmenter le développement de *B. bifidum*. Cependant, ce facteur n'est pas actif in vitro et n'existe pas à l'état libre dans le lait maternel. D'après PETUELY, son action serait due au fait qu'il résiste mieux que le lactose à la dégradation par les lactases du tube digestif, d'où la possibilité d'utilisation massive par les bifidobactéries. Le lactulose n'est pas utilisé spécifiquement par les bifidobactéries et peut être métabolisé par d'autres bactéries intestinales, comme ce doit être le cas pour les facteurs bifidigènes (YAZAWA et coll., 1978).

En revanche, le lactitol, bien que préparé à partir du lactose et considéré comme facteur bifidigène, aurait un effet moins important (MITSUOKA, 1987).

#### **I.1.4.5.4.4. Oligoholosides et polyholosides :**

- le raffinose, le stachyose et l'inuline (polyfructose) de poids moléculaire inférieur à 4500 sont utilisés exclusivement par *B. infantis* et non par les autres bactéries intestinales telles que *E. coli*, *L. acidophilus* et *S. faecalis*.

- les oligosaccharides supérieurs au trisaccharide d'inuline et les tri- à pentasaccharides de dextrane sont également métabolisés spécifiquement par *B. infantis*.

- en revanche, les oligosaccharides d'amylose et de cellulose ne sont pas spécifiques de *B. infantis* et de *B. breve* (YAZAWA, 1978).

Il faudra tenir compte de ces résultats et des conditions d'absorption de ces sucres par l'homme avant d'envisager leur administration orale en vue de favoriser une flore bifide intestinale.

#### **I.1.4.5.4.5. Fructooligosaccharides (FOS) :**

Ces polymères de fructose (leur degré de polymérisation est compris entre 2 et 35) possèdent une action stimulante sur la croissance des bifidobactéries (HIDAKA et coll., 1986). Métabolisés par les bifidobactéries (et également par d'autres genres bactériens) mais non par les enzymes digestives humaines ni par la plupart des microorganismes indésirables du système digestif, ces fructooligosaccharides sont incorporés dans le régime alimentaire en tant qu'édulcorants non nutritifs.

La source la plus importante de FOS est le tubercule d'artichaut de Jérusalem (MITSUOKA, 1987). Puisque les bifidobactéries métabolisent plus facilement les courtes chaînes de FOS d'artichaut, les longues chaînes seront hydrolysées dans les sirops et farines produits à partir de ces tubercules. Aujourd'hui, il est plus facile de préparer un produit similaire par voie enzymatique à partir de sucre (HIDAKA et coll., 1986, 1988) que de purifier les FOS à partir de sources naturelles (YAMASAKI et DILAWRI, 1990).

### **I.1.5. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES :**

La connaissance des antibiotiques auxquels résistent les bifidobactéries revêt un double intérêt : - Possibilité de maintenir les bifidobactéries dans le tube digestif sans les aggraver, en particulier au cours d'un traitement antibiotique;

Antibiotique	MATTEUZZI et coll. (1983) chez <i>B. longum</i>		MAHIEDINNE et coll. (1989) pour 64 souches de <i>Bifidobacterium</i>	
	CMI 50* (µg/ml)	CMI 90* (µg/ml)	CMI 50* (µg/ml)	CMI 90* (µg/ml)
Acide nalidixique	345	446		
Ampicilline			0,5	1
Bacitracine	0,30	0,66	0,25	4
Chloramphénicol	2,5	3,6		
Erythromycine	0,11	0,26	inf à 0,03	0,125
Gentamicine	283	sup à 500		
Kanamycine	297	sup à 1500	64	128
Métronidazole	sup à 500	sup à 500		
Minocycline			0,25	1
Néomycine	53	95		
Pénicilline G	0,32	0,55		
Streptomycine	157	1147		
Tétracycline	inf à 3,0	3,8		

\* : CMI 50 : concentration minimale d'antibiotique inhibant 50% d'une population  
CMI 90 : concentration minimale d'antibiotique inhibant 90% d'une population.

**Tableau 4** : CMI de différents antibiotiques vis-à-vis du genre *Bifidobacterium*  
(MATTEUZZI et coll., 1983; MAHIEDINNE et coll., 1990).

- Possibilité d'incorporer les antibiotiques comme agent sélectif dans les milieux de culture en vue de l'isolement des bifides à partir de flores complexes issues de prélèvements médicaux ou alimentaires.

Pourtant, la sensibilité des bifidobactéries aux antibiotiques a été peu étudiée et les recherches antérieures à la publication d'une norme internationale sont difficilement comparables car les conditions expérimentales varient.

Nous pouvons néanmoins retenir les points suivants:

- La plupart des bifidobactéries sont résistantes à de nombreux antibiotiques, et notamment à l'acide nalidixique, la gentamicine, la kanamycine, le métronidazole, la néomycine, la polymyxine B et la streptomycine mais la sensibilité varie, selon les espèces de 10 à 500 ou plus µg d'antibiotique/ml.

En revanche, ampicilline, bacitracine, chloramphénicol, clindamycine, érythromycine, lincomycine, nitrofurantoïne, oléandomycine, pénicilline G et vancomycine sont fortement inhibiteurs de la majorité des espèces (SCARDOVI, 1986).

La sensibilité à la tétracycline varie d'une espèce à l'autre et même d'une souche à l'autre (MATTEUZI, non publié) (LAVERGNE et coll., 1959).

Ces résultats complètent ou confirment ceux obtenus par LAVERGNE et coll. (1959) chez *B. bifidum*, par MILLER et FINEGOLD (1967) chez *B. bifidum*, *B. longum* et *B. adolescentis*, et par MATTEUZI et coll. (1983) chez 459 souches appartenant à 15 espèces.

- MATTEUZI et coll. (1983) et MAHIEDINNE et coll. (1989) ont étudié les concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) chez les bifidobactéries.

Leurs résultats rassemblés dans le tableau 4 corroborent ceux obtenus précédemment par d'autres auteurs.

- Correspondance entre zones d'inhibition (en milieu solide) et sensibilités aux différents antibiotiques (en milieu liquide) (LAVERGNE et coll., 1959) :

Antibiotique	Diamètres d'inhibition	Sensibilités
Erythromycine	inf. à 15 mm sup. à 20 mm	sup. à 4 unités : R inf. à 2 unités : S
Néomycine	inf. à 30 mm	sup. à 10 unités : R
Pénicilline	inf. à 15 mm sup. à 25 mm	sup. à 0,3 unité : R inf. à 0,2 unité : S
Streptomycine	inf. à 25 mm sup. à 30 mm	sup. à 10 unités : R inf. à 5 unités : S

## **I.1.6. MILIEUX DE CULTURE ET CARACTERES CULTURAUX :**

Le choix du milieu de culture est important car il influe qualitativement et quantitativement sur l'isolement des bifidobactéries à partir de flores complexes.

Il convient de distinguer trois types de milieux élaborés pour l'isolement, la culture et la caractérisation des bifidobactéries : les milieux complexes, les milieux semi-synthétiques et les milieux synthétiques.

### **I.1.6.1. Les milieux complexes :**

Ces milieux riches élaborés à base d'extraits de foie ou de viande, d'une grande variété de peptones, d'extrait de levure, de jus de tomate, de sang de cheval ou de lait humain permettent la croissance d'un maximum de souches de *Bifidobacterium* (RASIC et KURMANN, 1983). Ils sont supplémentés en substances à faible potentiel rédox : cystéine, cystine, acide ascorbique ou sulfite de sodium.

Une grande variété de milieux de culture complexes a été proposée ces dernières années.

Nous retiendrons :

- le milieu BL agar décrit par OCHI et coll. (1964) puis par MITSUOKA et coll. (1965, 1982) et enfin légèrement modifié par TERAGUCHI et coll (1978), est considéré comme le milieu de culture optimal pour la détection des bifidobactéries.

- le milieu Tryptone Phytone Yeast (TPY) de SCARDOVI (1981, 1986) permet la culture et l'isolement des bifides (mais également des autres bactéries lactiques) à partir de tous les habitats.

A signaler également les milieux YN-6 (RESNICK et LEVAIN, 1981a) et YN-17 (MARA et coll., 1983). Ces milieux sont peu performants puisque le milieu YN-6 est inhibiteur de certaines espèces de *Bifidobacterium* et laisse d'autres genres se développer (CARILLO et coll., 1985) tandis que le milieu YN-17 inhibe une partie des bifidobactéries (MUNOA et coll., 1985). Toutes les colonies isolées sur ces milieux devront donc être identifiées.

### **I.1.6.2. Milieux de culture semi-synthétiques :**

Des éléments complexes de composition connue font partie de ces milieux.

Nous retiendrons particulièrement :

- Milieu de TOMARELLI (1949b) pour la culture de *B. bifidum*;
- Milieu de NORRIS (NORRIS et coll., 1950) qui est une modification du milieu de TOMARELLI;
- Milieu de GYÖRGY (1954a), également un milieu de TOMARELLI modifié.

#### **I.1.6.3. Milieux de culture entièrement synthétiques :**

Tous les composés de ces milieux sont chimiquement définis.

- PETUELY (1956) fut le premier à proposer un milieu de culture synthétique pour la culture des *Bifidobacterium* à partir de selles.
- Le milieu de HASSINEN contient uniquement : acétate d'ammonium, acétate de sodium,  $K_2HPO_4$ , cystéine, lactose, biotine, pantothénate de calcium et une solution de sels (HASSINEN et coll., 1951).
- GYLLENBERG a modifié le milieu de PETUELY (GYLLENBERG et NIEMELÄ, 1959).
- TANAKA et MUTAI (1980) ont défini un milieu d'isolement de bifidobactéries à partir de selles.
- UEDA (1983) a mis au point un milieu synthétique pour la culture de la souche ES5 de *B. bifidum*.
- POCH et BEZKOROVAINY (1988) ont défini un milieu de culture synthétique pour *Bifidobacterium*.

#### **I.1.6.4. Milieux de culture sélectifs :**

Si les milieux précédemment cités sont performants pour l'entretien de souches pures, ils le sont moins en ce qui concerne l'isolement à partir de flores complexes car ils permettent souvent la croissance d'autres genres, des bactéries lactiques en particulier.

Les besoins physiologiques de croissance des bifidobactéries étant extrêmement variés, il est difficile de définir un milieu sélectif approprié à toutes les espèces (SCARDOVI, 1986). C'est pourquoi, depuis l'engouement des dernières années à incorporer les bifidobactéries dans les produits laitiers fermentés, plusieurs substances et milieux sélectifs ont été proposés pour différencier les *Bifidobacterium* des autres bactéries lactiques et pour isoler les bifidobactéries à partir des flores intestinales :

- Initialement, l'acide ascorbique (puissant agent réducteur) et l'azide de sodium (inhibiteur respiratoire qui prévient la réduction des cytochrome-oxydases oxydées en se combinant avec elles) étaient utilisés comme substances sélectives.

- BECK (1967) isole les *Bifidobacterium* sur un milieu enrichi en facteurs de croissance bifidigènes (N-acétyl-D-glucosamine). Le pH relativement bas de ce milieu (5,8) et la culture en anaérobiose permettent l'élimination de la majorité des entérobactéries.

- SHIMADA et coll. (1977) numèrent les *Bifidobacterium* dans les produits laitiers en supplémentant les milieux Agar Rogosa ou BL agar de propionate de sodium, sulfate de paramomycine, sulfate de néomycine et chlorure de lithium.

- TERAGUCHI obtient les mêmes résultats que SHIMADA sur NPNL-agar c'est-à-dire BL agar supplémenté en sulfate de néomycine, sulfate de paramomycine, acide nalidixique et chlorure de lithium (TERAGUCHI et coll., 1978).

- TANAKA et MUTAI (1980) isolent une grande quantité de bifidobactéries à partir de selles sur un milieu minéral contenant de la riboflavine, des bases d'acides nucléiques, de l'acide pyruvique et de l'acide nalidixique.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est la seule source d'azote.

- TERAGUCHI et coll. (1982) séparent les *Bifidobacterium* des *Lactobacillus* ou *Streptococcus* (mais pas les *Entérocooccus*) en supplémentant le milieu de GARCHE avec du chlorure de lithium additionné ou non de pénicilline G.

- CHANG et coll. (1983) ont modifié le milieu MRS agar et le nouveau milieu contenant de la cystéine, de l'azide de sodium et de l'encre de chine permet d'isoler de nombreuses espèces de *Bifidobacterium*.

- MATTEUZZI (1983) suggère d'ajouter au milieu 80  $\mu\text{g}$  de kanamycine/ml. Cependant, les variations intraspécifiques concernant les résistances sont si importantes que l'isolement de souches inconnues avec un tel milieu serait peu fiable.

- USHIJIMA et coll. (1985) peuvent isoler sélectivement *B. adolescentis* d'une flore gastrique complexe par l'utilisation d'agents sélectifs : polymyxine, propionate et linoléate. Notons qu'à cette époque, l'identification de l'espèce *adolescentis* était peu fiable et que les autres espèces de *Bifidobacterium* n'ont pas été testées.

- SONOIKE et coll. (1986) s'appuient sur le fait que les bifidobactéries sont capables de métaboliser les carbohydrates tels que les fructo- et galactosyl-oligosaccharides. Vingt-deux espèces de *Bifidobacterium* peuvent se développer sur un milieu contenant des oligosaccharides trans-galactosylés comme source de carbone alors que les *Streptococcus* et *Lactobacillus* en sont incapables.

- MUNOA et PARES (1988) proposent de quantifier les *Bifidobacterium* de l'eau sur un nouveau milieu sélectif : le *Bifidobacterium* iodoacétate medium 25 (BIM-25). Ce milieu est

un milieu Reinforced Clostridial Medium (R.C.M.) additionné d'antibiotiques (acide nalidixique, polymyxine B, kanamycine), d'acide iodoacétique et de 2,3,5-triphényltétrazolium chloride (TTC). L'iodoacétate, en inhibant la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, réduit considérablement la croissance des bactéries non bifides. Le TTC permet de différencier les *Bifidobacterium* des autres espèces puisque les bifidobactéries se développent en grandes colonies blanches.

- POCH et BEZKOROVAINY (1988) ont supplémenté un milieu de base synthétique avec différents substrats afin de déterminer les facteurs de croissance nécessaires à chaque espèce de *Bifidobacterium*. Le milieu de base est inspiré du milieu de NORRIS (POUPARD et coll., 1973).

- C'est le propionate que MITSUOKA utilise comme l'un des agents sélectifs qu'il ajoute au milieu BL agar pour la numération sélective de bifidobactéries intestinales. Le milieu BS agar ainsi obtenu ne donne pas entière satisfaction pour retrouver les bifidobactéries dans les selles.

- BEERENS (1990) propose un milieu sélectif et électif en ajoutant à un milieu de base 5 g/l d'acide propionique et en ajustant à pH 5,0. Ce milieu est contesté.

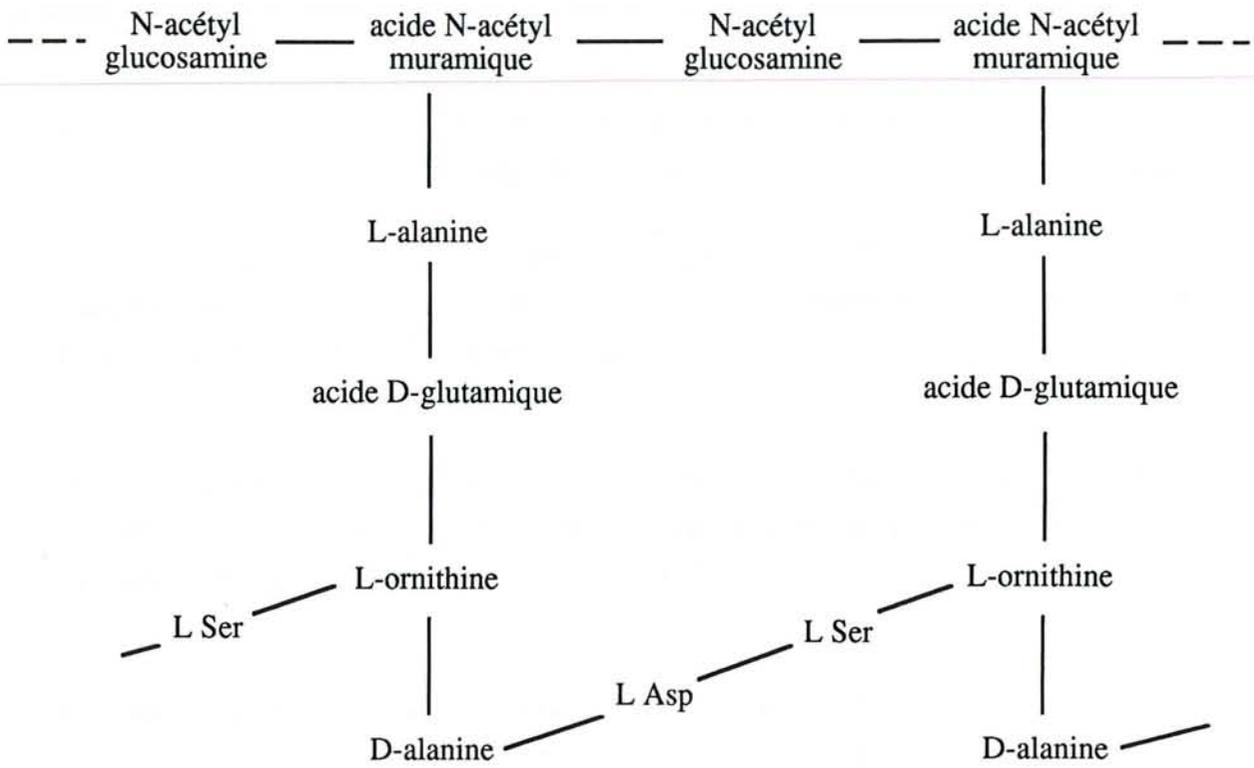
#### **I.1.6.5. Caractères cultureux :**

L'aspect des colonies de *Bifidobacterium* cultivés sur milieu gélosé en anaérobiose peut varier selon le milieu utilisé, selon les espèces, mais également à l'intérieur d'une même espèce. En effet, si d'une façon générale, les colonies sont sphériques, mates ou brillantes et de diamètres variables (SCARDOVI, 1986), BOVENTER (1938) a pu distinguer deux types de colonies différents pour *B. bifidum* : d'une part des colonies lisses, semi-bombées, blanches et brillantes et d'autre part des colonies rugueuses aux limites floues et mates. Une même souche, de plus, donne fréquemment naissance à trois ou quatre types de colonies d'aspect, de taille et de couleur différents.

### **I.1.7. COMPOSITION DE LA PAROI ET DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE:**

#### **I.1.7.1. La paroi :**

Le composant principal de la paroi des bactéries du genre *Bifidobacterium* (Gram +) est le mucopeptide ou peptidoglycane ou muréine. C'est une macromolécule composée de chaînes polysaccharidiques linéaires reliées entre-elles par des ponts tétrapeptides associés à



**Figure 4** : Structure du peptidoglycane de *Bifidobacterium bifidum*.

des peptides. La chaîne polysaccharidique est constituée d'une alternance de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Les tétrapeptides sont reliés aux résidus NAM d'une part et entre-eux d'autre part par l'intermédiaire de peptides (figure 4).

Les acides aminés qui constituent ces différents peptides sont l'alanine, l'acide glutamique et l'ornithine ou la lysine associés à un ou deux des acides aminés suivants : glycine, sérine, acide aspartique et thréonine (CUMMINS et coll., 1957; VEERKAMP et coll., 1965).

D'une souche à l'autre, les acides aminés peuvent être différents ou identiques mais dans ce cas, leur séquence dans le tétrapeptide et les types de leurs liaisons (cross-linkage) peuvent différer (KANDLER et LAUER, 1974; RASIC et KURMANN, 1983), c'est-à-dire être un résidu acide aminé simple, un dipeptide ou même un tripeptide. *B. longum*, par exemple, possède un tétrapeptide de type ornithine et le peptide de liaison est : L Ser - L Ala - L Thr - L Ala (RASIC et KURMANN, 1983).

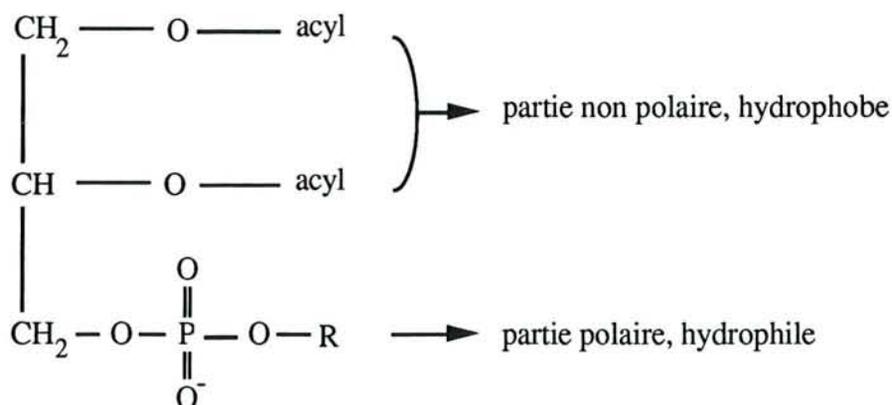
Ce macropeptide est relié par covalence à d'autres macromolécules telles que :

- des polysides : glucose, galactose et rhamnose composent la partie polysaccharidique de la paroi;
- des acides teichoïques qui sont des polymères de glycérolphosphate.

Ces acides teichoïques sont attachés au squelette NAG-NAM du peptidoglycane.

### I.1.7.2. La membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, sous la paroi des bactéries. Elle est formée d'une double couche de phospholipides qui ont la structure suivante (ce sont des dérivés du glycérol-3-P) :



Les protéines de la membrane, qui constituent 60 à 70% du poids total sec de la membrane, sont intercalées dans la bicouche phospholipidique.

## I.1.8. CARACTERES DU GENOME :

### I.1.8.1. Composition en bases de l'ADN :

Le pourcentage en G + C (G + C %) des bactéries du genre *Bifidobacterium* est compris entre 57,2 et 64,5 % (SEBALD et coll., 1965, SCARDOVI, 1986) .

### I.1.8.2. Plasmides :

Parmi les 24 espèces de *Bifidobacterium*, seules 5 espèces possèdent des plasmides (SGORBATI et coll., 1982b, 1986) :

- *B. longum* (espèce du genre *Bifidobacterium* la plus fréquente dans l'intestin humain) renferme treize modèles plasmidiques (1,25 à 9,5 MDa) (SGORBATI et coll., 1983, 1986).

- *B. globosum* (bifidobactérie d'origine animale la plus courante) contient un plasmide de chacune des trois classes de poids moléculaires (13,5-24,5 et 46 MDa).

- *B. asteroïdes* (exclusivement trouvé dans l'intestin d'abeille) possède quatorze types de plasmides (1,2 à 22 MDa) structurellement très hétérogènes (SGORBATI, non publié).

- *B. indicum* (provenant également uniquement d'intestin d'abeille) : 60% des souches isolées contiennent un plasmide unique de 22 MDa.

- *B. breve* (espèce fréquente dans l'intestin d'enfant) : C'est dans le but d'utiliser cette souche pour des recherches en génie génétique que IWATA et MORISHITA (1989) se sont intéressés à *B. breve* et y ont mis en évidence des plasmides dans 40 % des souches de cette espèce. Cependant, SGORBATI et coll. (1982b) n'avaient pas trouvé de plasmide chez *B. breve*. L'équipe d'IWATA expliquerait cette différence par l'origine écologique des souches testées, les siennes provenant bien d'intestins humains.

Pour certaines souches, ces plasmides seraient des phages tempérés, mais cela resterait, en fait, exceptionnel (SGORBATI et coll., 1983).

Très curieusement, *B. infantis* qui constitue un continuum avec *B. longum* comme nous le verrons dans le paragraphe I.2.1.2.3 (page 38) (NEUT et coll., 1981; SGORBATI et LONDON, 1982a), ne possède pas de plasmide. Aucune caractéristique phénotypique n'est, à ce jour, corrélée à la présence de plasmides (SGORBATI et coll., 1982b).

### **I.1.9. ECOLOGIE DES *BIFIDOBACTERIUM* :**

Parmi les 24 espèces de *Bifidobacterium* aujourd'hui reconnues, 9 sont isolées essentiellement chez l'homme, à savoir : *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* et *B. dentium*.

Ces espèces sont préconisées par certains auteurs pour être recherchées en tant que témoins de contamination fécale humaine dans les eaux résiduaires (RESNICK ET LEVIN, 1981b; MARA et ORAGUI, 1983). Cette méthode est fortement controversée car les espèces d'origine humaine peuvent être retrouvées parfois chez les animaux (veau, porc, ...) et donc provenir d'élevages animaux. De plus, leur caractère anaérobie strict implique une survie à l'air ou dans l'eau de courte durée.

Les méthodes d'hybridation ADN-ADN ont permis à SCARDOVI (1986) de bien différencier ces espèces de celles d'origine purement animale.

Chez l'homme, elles colonisent les cavités naturelles et principalement le colon, le vagin et la bouche (RASIC et KURMANN, 1983).

#### **I.1.9.1. Implantation chez le nouveau né :**

Il est généralement admis que jusqu'au moment de la naissance, le foetus baigne dans un environnement parfaitement stérile. Après la naissance, la colonisation bactérienne du tractus digestif est très rapide (MORO, 1900b; MITSUOKA, 1974; BEZIRTZOGLU, 1985). 48 heures après la naissance, le côlon contient de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries par gramme de selles correspondant principalement à des entérobactéries, des staphylocoques et des streptocoques (MITSUOKA, 1974; BEZIRTZOGLU, 1985; MOREAU et coll., 1986).

Les bifidobactéries n'apparaissent qu'entre le deuxième et le cinquième jour (MITSUOKA et coll., 1974) et deviennent dominantes ( $10^{10}$  à  $10^{11}$  par gramme de selles) à peine une semaine après la naissance. Elles atteignent 99 % de la flore fécale tandis que le taux des autres bactéries (coliformes, lactobacilles, entérocoques) diminue considérablement, près de 1000 fois (FRISEL, 1951; MAYER, 1956; HOFFMAN, 1966). Les anaérobies telles que *Bacteroides* et *Clostridium* et autres bactéries putréfiantes sont énormément réduites et peuvent disparaître.

##### **I.1.9.1.1. Origine de la colonisation :**

Cette invasion rapide du tube digestif stérile à la naissance pose la question de l'origine des bactéries, et plus particulièrement des anaérobies telles que les *Bifidobacterium* dont la survie est précaire dans l'atmosphère.

Les bactéries envahissent-elles le tube digestif en commençant par la bouche ou le rectum? Plusieurs études (NAUJOKS, 1921; LAUTER, 1921) s'opposent à l'hypothèse de la colonisation du tube digestif par voie rectale et tendent à prouver que c'est au contraire par voie orale que les bifidobactéries pénètrent dans l'organisme du nouveau-né :

- KLEINSCHMIDT (1925, 1949) a constaté la présence de *B. bifidum* dans le segment supérieur du tube digestif d'un enfant opéré pour absence de perforation anale.

- BOVENTER (1938, 1949) a clairement montré que l'implantation des *Bifidobacterium* dans le tube digestif se faisait par voie descendante, le rectum demeurant stérile jusqu'à l'achèvement de la colonisation.

- MUTAI et TANAKA (1987) isolent des *Bifidobacterium* de la bouche de nouveaux-nés, dix minutes après leur naissance.

D'où proviennent ces bactéries retrouvées dans la partie supérieure du tube digestif des nouveaux-nés?

La flore bifide buccale du nourrisson (BERGHOLM, 1902; HARRISON et coll., 1953) semble très proche de la flore vaginale (LEVESQUE, 1959a; WALCH, 1956) ou fécale de la femme et est constituée principalement de *B. breve*, *B. longum* et *B. adolescentis*. Cependant, les espèces isolées chez l'enfant ne correspondent pas nécessairement à celles de sa mère (BEZIRTZOGLU, 1985). BLAUROCK (1940) cultivant la flore vaginale de cent soixante femmes, avait déjà mis en évidence *B. bifidum* dans 95 % des cas.

Il est donc évident que la colonisation orale du nouveau-né puisse provenir de la flore vaginale au moment de l'accouchement. Les mains des sage-femmes et des accouchées représenteraient également des modes de diffusion de *B. bifidum* (BLAUROCK, 1940).

Un argument de poids intervenant encore en faveur de l'hypothèse d'une colonisation par la flore vaginale ou fécale de la mère est la constatation par de nombreux auteurs d'un envahissement du tube digestif du nouveau-né beaucoup plus rapide en cas de naissance par voie basse que lors d'une naissance par césarienne :

- MITSUOKA et coll. (1974) isolent des bifidobactéries dans 41% des naissances par voie basse alors que BEZIRTZOGLU (1985) les retrouve chez 21% de nourrissons âgés de quatre jours, nés par césarienne (41% au bout de 15 jours).

- MUTAI et TANAKA (1987) observent dans la bouche de 23 nouveaux-nés, 10 minutes après la naissance par voie basse, des *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Enterobacteriaceae* alors qu'après césarienne chez 8 des 9 nouveaux-nés étudiés, ils n'isolent que des *Propionibacterium* et des *Enterococcus*.

	enfants au sein*	enfants au biberon*
Enterobacteriaceae	8,6	9,5
Streptococci	7,9	9,8
Staphylococci	5,8	5,5
Lactobacilli	7,0	5,9
<b>Bifidobacteria</b>	<b>10,7</b>	<b>10,0</b>
Eubacteria	3,1	7,3
Bacteroidaceae	6,1	9,9
Peptococcaceae	2,4	7,9
<i>Cl. perfringens</i>	1,0	6,4
autres <i>Clostridium</i>	1,3	0,9
Veillonellae	5,8	5,9

\* : log de c.f.u.

**Tableau 5** : Comparaison de la flore fécale entre enfants nourris au sein et enfants au biberon (d'après MITSUOKA, 1982).

### **I.1.9.1.2. Facteurs influençant la colonisation :**

Outre le mode de naissance qui, nous venons de le voir, intervient directement sur la rapidité d'invasion des bifidobactéries, d'autres facteurs influencent cette colonisation :

**I.1.9.1.2.1. la prématurité** est une cause de difficulté d'implantation des *Bifidobacterium* en raison d'un manque de récepteurs et/ou de substrats endogènes alors que les entérobactéries et les *Bacteroides* colonisent facilement le côlon. (FRISEL, 1951; MAYER, 1956; HOFFMAN, 1966; STARK et LEE, 1982; STEVENSON et coll., 1985).

#### **I.1.9.1.2.2. le mode d'allaitement :**

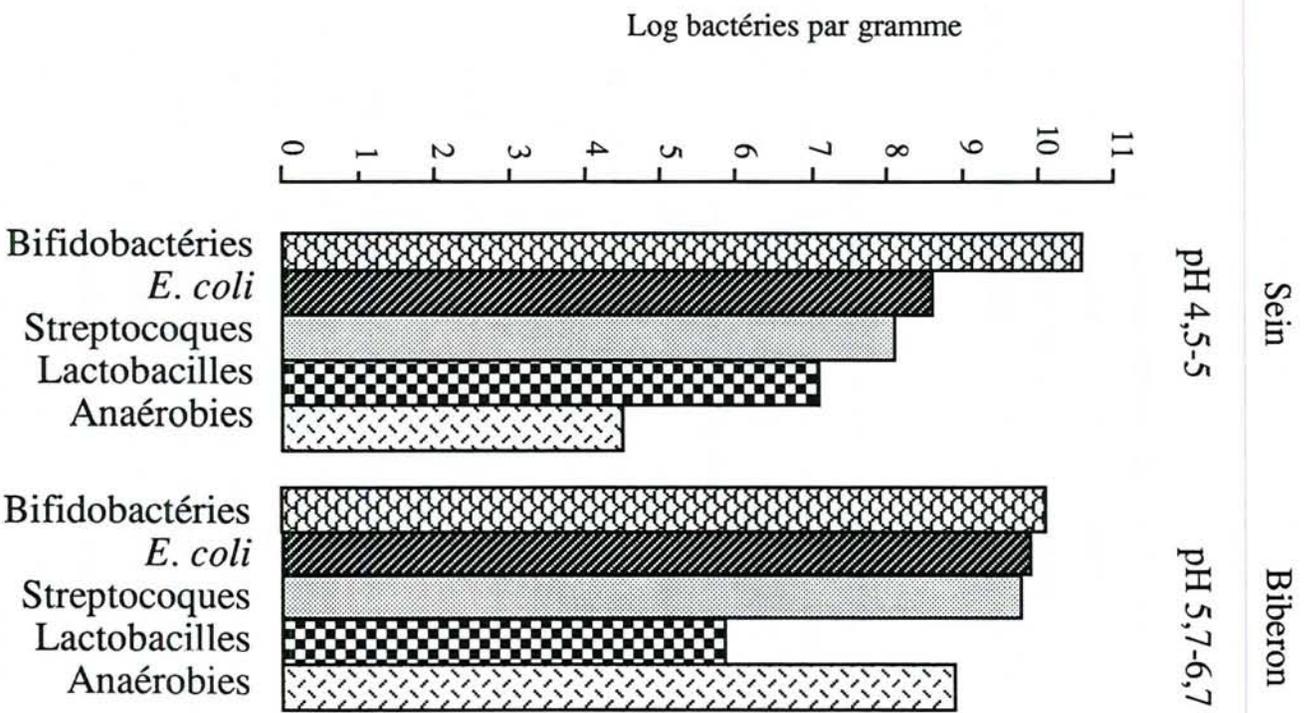
Les recherches de bifidobactéries dans le lait maternel se sont toujours révélées négatives (BEZIRTZOGLU, 1985) sauf pour MAYER et MOSER (1950) qui isolaient *B. bifidum* de colostrum et de lait de femme avant toute tétée, excluant la possibilité de contamination par la bouche de l'enfant. Ils admettent dès lors sa présence dans la glande mammaire mais cette hypothèse reste inexplicée, sauf peut-être par une mauvaise identification du genre bactérien isolé due à la pauvreté des méthodes de détection à cette époque.

##### a. Influence du type d'allaitement sur la composition de la flore intestinale de l'enfant :

La comparaison des effets de l'allaitement au sein et de l'allaitement au biberon a fait l'objet de très nombreux travaux. Déjà au début du siècle, TISSIER écrivait que la flore du nouveau-né élevé au sein était constituée exclusivement de *Bifidobacterium*, tandis que les lactobacilles étaient prédominants dans la flore de l'enfant nourri au biberon. Il ressort des recherches qui ont suivi qu'il n'existe pas de différence dans la distribution qualitative des espèces entre les deux types d'allaitement. La différence se situe au niveau quantitatif dans le rapport entre *Bifidobacterium* et les autres espèces qui est nettement favorable aux *Bifidobacterium* pour les enfants allaités au sein chez qui on observe des niveaux élevés de *Bifidobacterium*, en général supérieurs à ceux des entérobactéries et des *Bacteroides*, et ceci dans la première semaine de la vie (tableau 5 et figure 5) (BOURRILLON et coll., 1980; NEUT et coll., 1980a, 1980b, 1984; BRAUN, 1981; MITSUOKA, 1982; YUHARA et coll., 1983; BENNO et coll., 1984; MOREAU et coll., 1986).

ROMOND et coll. (1980) dénombrent chez l'enfant nourri au lait de femme,  $10^{10}$  *Bifidobacterium* par gramme de selles et seulement  $10^8$  entérobactéries par gramme.

Les selles d'un enfant nourri au sein se caractérisent d'ailleurs par un aspect granuleux, une odeur aigrelette et une acidité marquée (pH 4,8 à 5,2) (NEIMANN et coll., 1965),



**Figure 5 :** Comparaison des flores fécales d'enfants au sein et au biberon (d'après MITSUOKA, 1982).

probablement due à l'abondance des *Bifidobacterium* et donc à une production importante d'acétate (NEIMANN et coll., 1965; MATA et URRUTIA, 1971; MITSUOKA et coll., 1974; BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN, 1981b).

En revanche, les selles d'un enfant nourri artificiellement se rapprochent de celles de l'adulte (pH 6,4 à 7,0) (ROMOND et coll., 1980), ce qui indique la présence d'organismes putréfiants.

Ainsi, dans l'allaitement artificiel, la différence fondamentale est constituée par le maintien à haut niveau des espèces aérobies facultatives (colibacilles et streptocoques) ayant initialement colonisé le tube digestif et par le développement d'anaérobies (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacteria*, *Peptostreptococcaceae*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*) (MITSUOKA et KANEUCHI, 1977; MITSUOKA, 1989). Les *Bifidobacterium* apparaissent tardivement et sont toujours retrouvés dans les selles en moindre proportion (NEUT, 1981).

Certains auteurs (ROSE, 1984; LUNDEQUIST et coll., 1985), au contraire, notent que l'allaitement n'augmente pas le taux de *Bifidobacterium* dans les premiers jours suivant la naissance, la population prédominante étant représentée par les entérobactéries et non par les anaérobies strictes. BENNO et coll. (1984) remarquent que dans les deux types d'allaitement, les *Bifidobacterium* constituent le genre prédominant (leur taux est légèrement inférieur dans les selles de l'enfant au biberon). Les conditions d'expérimentation et d'analyses bactériologiques de ces auteurs, en particulier le choix des milieux d'isolement, sont contestées.

Lors du sevrage, une modification brutale de la flore fécale suit la première prise de biberon (NEUT et coll., 1985) ou de nourriture solide. Chez certains enfants, la flore bifide diminue rapidement; en revanche, pour d'autres elle reste stable. On assiste à une remarquable prolifération de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* et *Clostridium* (MITSUOKA, 1989). Dans tous les cas, le rapport *Bifidobacterium* / *Bacteroides* + *Enterobacteriaceae*, voire *Clostridium* ("flore putréfiante") diminue et s'inverse.

Jusqu'à présent, aucune formule lactée industrielle ne permet de conserver l'équilibre observé sous allaitement maternel.

#### b. Influence du type d'allaitement sur les espèces de *Bifidobacterium* retrouvées :

Les proportions des différentes espèces de *Bifidobacterium* varient également selon le type d'allaitement (BRAUN, 1981) (tableau 6).

	Total	allaitement artificiel	allaitement maternel
nombre total de <i>Bifidobacterium</i>	232	153	79
<i>B. bifidum</i> %	33	13	72
<i>B. longum</i> %	48,7	60	28
<i>B. infantis</i> %	12	18	0
<i>B. breve</i> %	5	8	0
<i>B. adolescentis</i> %	0,8	1	0

**Tableau 6** : Distribution des différentes espèces de *Bifidobacterium* suivant le type d'allaitement (d'après NEUT et coll., 1980b).

NEUT et coll. (1980b) et BEERENS et coll. (1980) constatent que *B. bifidum* est l'espèce dominante sous allaitement maternel.

Au Japon, YUHARA et coll. (1983) arrivent à la même conclusion concernant *B. bifidum* biovar b mais BENNO et coll. (1984), en revanche, mettent en évidence un portage plus élevé de *B. breve* biovar a, toujours sous allaitement maternel.

A l'opposé, en Italie, BIAVATI et coll. (1984) ne constatent aucune différence dans la répartition des espèces chez les enfants au sein ou au biberon :

<i>B. bifidum</i> :	3 %
<i>B. longum</i> :	8 %
<i>B. infantis</i> :	12%
<i>B. breve</i> :	11%.

Les divergences de résultats s'expliquent probablement par des techniques différentes d'identification des souches; les équipes françaises et japonaises s'appuient sur les fermentations des carbohydrates alors que les auteurs italiens identifient les espèces par hybridation ADN-ADN.

MITSUOKA (1989) constate que les différences de composition des espèces entre les deux types d'allaitement ne sont pas significatives. *B. breve* est l'espèce dominante dans les deux groupes.

#### c. Eléments du lait de femme intervenant dans l'équilibre de la flore de l'enfant :

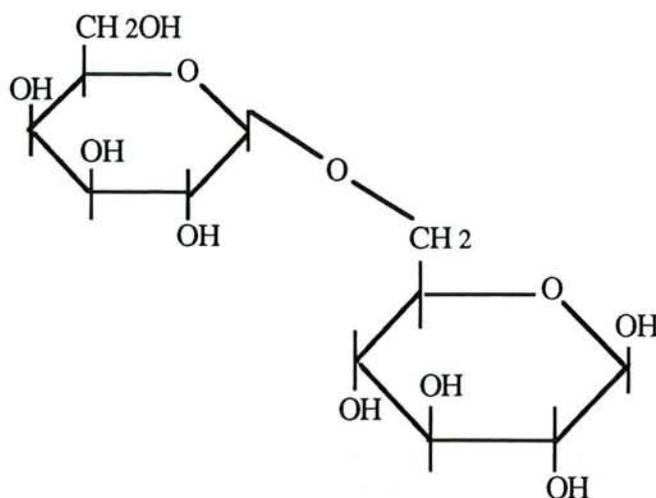
Chez le nourrisson élevé au lait maternel, le maintien de l'équilibre des microorganismes est assuré en partie par les caractéristiques physicochimiques du lait de femme, à savoir (BULLEN et coll., 1977) :

- concentration élevée en lactose;
- présence de lactoferrine et de lactulose;
- faible concentration en protéines utilisées par les germes de putréfaction;
- faible pouvoir tampon.

Les laits maternisés possèdent ces propriétés mais restent cependant incapables de créer les conditions favorables aux bifidobactéries de l'enfant nourri au sein. Il semble donc que ces seules caractéristiques physicochimiques ne suffisent pas au maintien de cette flore et que le lait maternel apporte des facteurs indispensables au développement intestinal des *Bifidobacterium*.

Plusieurs études ont été menées dans le but de comprendre quels sont les facteurs du lait maternel qui agissent ainsi sur la flore intestinale :

- En 1930, POLONOWSKI et LESPAGNOL (1930) isolent du lait de femme des oligosaccharides différents du lactose qu'ils nomment gynolactose (constitué de molécules de petits poids moléculaires) et allolactose ( $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-6)-D-glucopyranose) :



- LEVESQUE et coll. (1960) administrent des quantités relativement élevées de N-acétylglucosamine à des nourrissons possédant peu de *B. bifidum* dans la flore. Ils constatent alors une apparition de cette espèce dans les selles et une disparition de celle-ci en cas d'arrêt d'administration.

- Chez des enfants alimentés par un lait additionné de mucine de porc, le pH des selles diminue et le niveau de population bifide augmente (INOUE et NAGAYAMA, 1970).

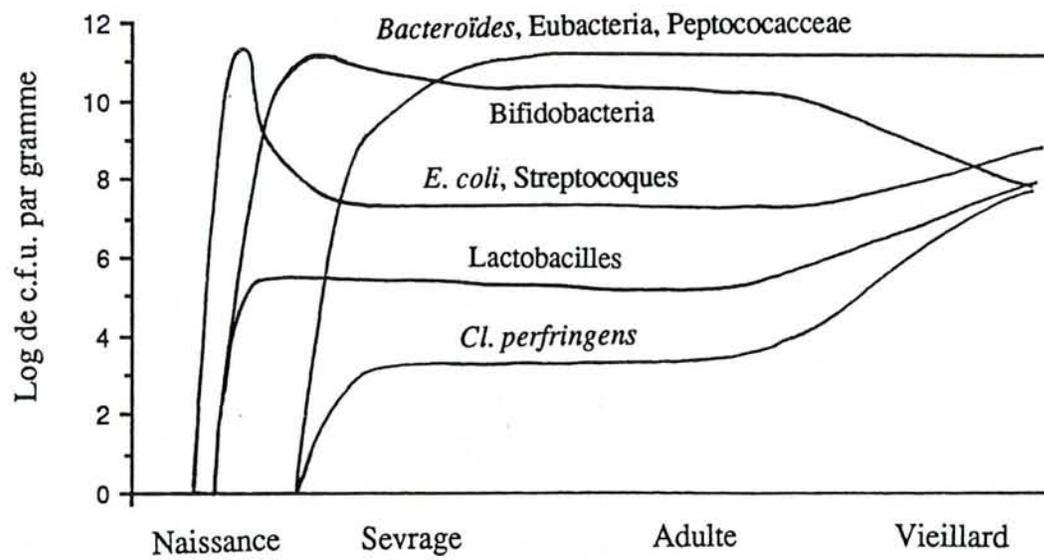
Il semble donc que de nombreux substrats puissent être impliqués dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale du nourrisson. Jusqu'à présent, aucune molécule formellement active n'a pu être identifiée.

#### 1.1.9.1.2.3. les substrats endogènes :

Les substrats endogènes sont des substances qui existent dans le tube digestif en dehors de tout apport alimentaire. Ils sont produits par l'hôte et peuvent être utilisés par les bactéries.

Certaines bactéries anaérobies strictes produisent des enzymes capables de dégrader les antigènes de groupes sanguins et les oligosaccharides des mucines. Parmi ces bactéries, on retrouve des espèces du genre *Bifidobacterium* : *B. bifidum* et *B. infantis* (HOSKINS et BOULDING, 1976; HOSKINS et coll., 1985). Elles ont la possibilité de prélever les résidus N-acétyl-D-galactosamine du groupe sanguin A et secrètent également des  $\alpha$ -L-fucosidases, des sialidases et des  $\beta$ -glycosidases (NEUTRA et FORSTNER, 1987).

Les *Bifidobacterium* peuvent donc trouver une partie de leurs facteurs de croissance, dénommés facteurs bifidigènes endogènes, directement chez l'hôte.



**Figure 6** : Modifications de la flore intestinale de la naissance à la vieillesse  
(d'après MITSUOKA, 1984).

#### **I.1.9.1.2.4. l'environnement :**

Le pays, l'hôpital et même le service dans lequel a lieu l'accouchement influent sur la rapidité de colonisation par les *Bifidobacterium* et sur les espèces présentes.

Les biotypes retrouvés varient également dans le temps. MITSUOKA et coll. (1974), en 1974, isolaient essentiellement *B. infantis* des selles de nourrissons japonais mais dix ans plus tard, c'est *B. breve* qui est reconnu espèce dominante.

De nombreuses observations permettent de penser que l'environnement, et en particulier les habitudes obstétricales et thérapeutiques (utilisation de plus en plus fréquente des antibiotiques), jouent un rôle non négligeable dans la colonisation des nouveaux-nés par les bifidobactéries. Il semblerait même que des conditions d'hygiène très strictes freinent l'implantation des *Bifidobacterium* (SIMHON et coll., 1982; YOSHIOKA et coll., 1984; LUNDEQUIST et coll., 1985).

#### **I.1.9.2. Evolution du sevrage à l'âge adulte :**

##### **I.1.9.2.1. Influence de l'âge :**

De nombreux auteurs constatent que le nombre de *Bifidobacterium* chute d'une manière significative dans les selles des adultes et surtout des personnes âgées alors que le nombre de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Clostridium*, Enterobacteriaceae, *Streptococcus* et *Lactobacillus* augmente (ORLA-JENSEN et coll., 1945; HAENEL et MULLER-BEUTHOW, 1963; HOFFMANN, 1966; DRASAR et HILL, 1974; MITSUOKA, 1984). Cette variation est due habituellement à la diminution de la sécrétion gastrique dans ce groupe d'âge. La décroissance des *Bifidobacterium* s'accélère chez le vieillard où l'on observe une remontée des Clostridia et des aéro-anaéro facultatifs.

La figure 6 représente l'évolution de la flore intestinale au cours de la vie.

Les proportions des différentes espèces au sein du genre *Bifidobacterium* varient également selon l'âge et chaque tranche d'âge possède ses espèces caractéristiques (tableau 7).

Ainsi, chez l'enfant de moins de 7 mois, MITSUOKA et coll. (1974) et BIAVATI (1984) isolent *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* variant b et *B. bifidum* variant b. Ces espèces, à l'exception de *B. longum* biovar b, ne sont présentes que chez les jeunes enfants et disparaissent de la flore d'enfants plus âgés et d'adultes. *B. infantis* serait l'espèce spécifique du nouveau-né (BIAVATI et coll., 1986) et sa fréquence serait plus élevée dans les selles d'enfants au sein.

Chez les enfants et les adultes, *B. longum* biovar a, *B. adolescentis*, et les espèces proches par leurs caractères fermentaires (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*) sont bien

	espèces dominantes	espèces secondaires
nourrissons au sein	<i>B. infantis</i> et <i>B. breve</i>	
enfants au biberon et au sein	<i>B. adolescentis</i> et <i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i> biovar b
enfants	<i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> biovar b, <i>B. longum</i>	
adultes	<i>B. adolescentis</i> biovars a et b, <i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i> biovar a
personnes âgées	<i>B. adolescentis</i> biovar b, <i>B. longum</i>	

**Tableau 7** : Distribution des espèces et biovars du genre *Bifidobacterium* dans le côlon (d'après RASIC et KURMANN, 1983).

représentées. En revanche, *B. infantis* et *B. breve* n'apparaissent pas dans cette tranche d'âge (MITSUOKA, 1974; BIAVATI et coll., 1984, 1986).

*B. adolescentis* est l'espèce caractéristique de la flore adulte et la proportion de *B. adolescentis* type b augmente considérablement chez les vieillards (MITSUOKA et coll., 1974, 1984).

La bactérie la plus répandue dans tous les groupes d'âge est *B. longum*. L'utilisation de cette bactérie dans la conception de laits fermentés paraît donc tout à fait judicieuse.

#### **I.1.9.2.2. Influence de l'alimentation :**

A la grande variabilité de la flore intestinale du nourrisson selon l'alimentation, il faut opposer une apparente stabilité de celle de l'adulte malgré les variations de régime alimentaire. Il semble que les aliments agissent peu sur la constitution de la flore dominante intestinale (HAENEL, 1970; BERNIER; STARK et LEE, 1982). En revanche, MITSUOKA (1984) note une décroissance du taux de *Bifidobacterium* après administration d'un régime occidental à des personnes habituées à une nourriture japonaise.

#### **I.1.9.2.3. Pathogénicité :**

*B. dentium* (ancien *Actinomyces eriksonii*) est isolé de caries dentaires, voire d'abcès. D'autres espèces sont parfois retrouvées dans des pus : *B. adolescentis*, *B. breve* ou *B. longum* (SCARDOVI, 1984). Cependant, leur responsabilité dans l'étiologie de ces affections reste mise en doute.

## I.2. METHODES D'IDENTIFICATION

Lors de la découverte, au début de ce siècle, des bifidobactéries par TISSIER, la taxonomie reposait uniquement sur des observations morphologiques. Ce manque de critères de différenciation explique les nombreuses controverses qui ont précédé la création du genre *Bifidobacterium*. La taxonomie s'est appuyée sur des caractéristiques phénotypiques de plus en plus nombreuses et aujourd'hui, elle peut bénéficier des progrès de la génotypie.

### I.2.1. PHENOTYPIE :

#### I.2.1.1. Identification du genre *Bifidobacterium* :

Jusqu'aux années 60, les seuls critères d'identification étaient phénotypiques. Nous citerons :

##### I.2.1.1.1. Morphologie :

L'aspect ramifié pouvant se rencontrer dans d'autres genres bactériens (*Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomyces*), il ne peut être considéré comme caractère spécifique mais seulement comme critère d'orientation (SCARDOVI et TROVATELLI, 1965).

##### I.2.1.1.2. Conditions de culture :

Les *Bifidobacterium* se développent en anaérobiose, à 37°C s'il s'agit d'espèces d'origine humaine ou 42°C et plus pour des espèces d'origine animale, et nécessitent un temps d'incubation de 48 heures (SCARDOVI, 1986).

##### I.2.1.1.3. Métabolites :

La détermination par chromatographie en phase gazeuse des acides organiques produits en fin de fermentation et notamment d'un rapport acide acétique sur acide lactique proche de 3/2, constitue un excellent critère d'identification du genre *Bifidobacterium*. De plus, il est important de remarquer que les bifidobactéries produisent l'isomère L(+) de l'acide lactique.

#### **I.2.1.1.4. Recherche d'enzymes :**

L'association d'une morphologie ramifiée et de la présence de **fructose-6-phosphate phosphocétolase** (F6PPK) chez une souche indique l'appartenance au genre *Bifidobacterium*.

La détection de la F6PPK peut être complétée par la recherche d' **$\alpha$ -galactosidase**. Le système API ZYM permet de mettre en évidence une activité  $\alpha$ -galactosidase chez les bifidobactéries (ROY et coll., 1989) et non chez les lactobacilles (LEE et coll., 1986). Ce test peut donc être utilisé comme orientation d'identification et comme méthode de différenciation des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (CHEVALIER et coll., 1990).

#### **I.2.1.1.5. Etude des profils électrophorétiques :**

Tous les profils électrophorétiques de protéines cellulaires solubles possèdent une bande qui migre à la même distance, à l'exception de *B. boum* chez qui cette bande est retrouvée à une distance de l'anode légèrement plus grande (BIAVATI et coll., 1982).

La présence de cette bande semble donc être un critère d'identification du genre non négligeable.

#### **I.2.1.1.6. Lipides et composants de la membrane cellulaire et de la paroi :**

Les *Bifidobacterium* possèdent les acides gras suivants : C14:0 (acide myristique), C16:0 (acide palmitique), C16:1 (acide palmitoléique), C18:0 (acide stéarique) et C18:1 (acide oléique).

L'acide stéarique est absent chez les *Lactobacillus*.

De plus, si les deux genres contiennent du diphosphatidylglycérol et du phosphatidylglycérol, seuls les *Bifidobacterium* possèdent des polyglycérolphospholipides et leurs lysodérivés, de l'alanylphosphatidylglycérol et des lysodérivés du diphosphatidylglycérol (EXTERKATE, 1971; RASIC et KURMANN, 1983).

L'analyse de la composition des cellules en lipides et phospholipides constitue donc un bon critère de différenciation du genre *Bifidobacterium* par rapport aux Lactobacillaceae.

Il faut noter que la température de croissance et la composition du milieu de culture influent énormément sur la répartition en lipides et phospholipides.

En ce qui concerne la paroi, RASIC et KURMANN (1983) ont montré que la structure du peptidoglycane des *Bifidobacterium* se rapproche davantage des Lactobacillaceae que des Actinomycetaceae (KANDLER et coll., 1970, 1974).

#### **I.2.1.1.7. Autres critères d'identification :**

D'autres tests peuvent servir à l'identification du genre *Bifidobacterium*, à savoir (BEERENS et coll., 1957; PREVOT, 1961; RASIC et KURMANN, 1983) :

- la coagulation, rapide et complète, du lait sans formation de gaz;
- la fermentation du glucose, lactose, levulose, fructose et galactose accompagnée d'une forte acidification;
- pas de production d'acide à partir du rhamnose, sorbose, adonitol, dulcitol, érythritol et glycérol;
- le développement de ces microorganismes dans l'eau peptonée;
- une catalase négative;
- l'absence de réduction des nitrates;
- pas de formation d'indole;
- pas de liquéfaction de la gélatine;
- pas de fermentation du glycérol;
- pas d'attaque des protéines coagulées.

#### **I.2.1.2. Identification des espèces :**

Il suffit d'observer les multiples remaniements taxonomiques effectués depuis quelques dizaines d'années pour comprendre combien l'identification d'espèce est délicate au sein du genre *Bifidobacterium*.

##### **I.2.1.2.1. Fermentation des sucres :**

Ce critère a certainement été le plus utilisé dans la caractérisation et la définition de nouvelles espèces.

Jusqu'en 1957, la plupart des chercheurs confondaient toutes les bifidobactéries en une seule espèce : *Bifidobacterium bifidum*. En 1957, DEHNERT (1957) est le premier à montrer l'existence de plusieurs biotypes de *Bifidobacterium* et utilise la fermentation de 24 sucres pour classer les différentes espèces en 5 groupes. Quelques années plus tard, REUTER (1963,1971) associe les propriétés sérologiques à la fermentation des sucres pour caractériser de nouvelles espèces humaines, isolées de selles d'enfants et d'adultes, et leurs différents biotypes :



- *B. bifidum* var. a et b au profil fermentaire caractéristique
- *B. infantis*
- *B. parvulorum* var. a et b
- *B. breve* var. a et b
- *B. lactentis*
- *B. liberorum*
- *B. adolescentis* var. a, b, c, et d
- *B. longum* var. a et b.

C'est également grâce aux profils fermentaires et à la capacité de croître à 46,5°C que MITSUOKA en 1969 (1969) sépare les souches humaines des souches animales (porc, poulet, veau, mouton, rat, souris, cobaye et abeille). Il propose deux nouvelles espèces : *B. thermophilum* var. a, b, c et d, *B. pseudolongum* var. a, b, c et d et un nouveau variant : *B. longum* subsp. *animalis* a et b.

*B. ruminale* (synonyme de *B. thermophilum*) et *B. globosum* puis *B. asteroïdes*, *B. indicum* et *B. coryneforme* ont été isolés la même année (SCARDOVI et coll., 1969a; SCARDOVI et TROVATELLI, 1969b).

L'aptitude d'une souche à fermenter certains sucres est certainement le test mis en oeuvre en premier lieu pour identifier une espèce.

De nombreux sucres sont testés et les résultats obtenus sont comparés avec ceux des tableaux d'identification de MITSUOKA (1982 et 1984) et de SCARDOVI (1986) (tableaux 8, 9 et 10). Cette technique, si elle ne comporte pas de difficulté d'exécution majeure, présente néanmoins de multiples inconvénients : Elle est longue et fastidieuse car, pour être interprétable, elle nécessite l'étude de 30 sucres pendant 10 jours. De plus, l'interprétation des résultats à l'aide des tableaux d'identification reste ensuite sujette à discussion et ne peut donner, en tous cas, qu'une orientation d'identification basée sur des caractéristiques fondamentales et non remises en doute, par exemple :

- *B. longum* fermente le mélézitose alors que *B. animalis* est incapable de fermenter ce sucre;
- *B. pseudolongum* fermente les pentoses et l'amidon, tandis que *B. thermophilum* ne fermente pas les pentoses mais fermente l'amidon;
- *B. breve* fermente le ribose, le mannitol, l'esculine et l'amygdaline mais il ne fermente ni l'arabinose ni le xylose;
- *B. infantis* ne fermente pas l'arabinose alors que *B. longum* fermente l'arabinose et le mélézitose.

Espèces et sous-espèces	Gluconate	Arabinose	Xylose	Ribose	Mannose	Fructose	Galactose	Saccharose	Maltose	Cellobiose	Lactose	Trehalose	Melibiose	Raffinose	Melezitose	Amidon	Glycogène	Inuline	Mannitol	Sorbitol	Inositol	Esculine	Salicine	Amygdaline
<i>B.bifidum</i>	-	-	-	-	-	+	+	v	-	-	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.minimum</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.choerinum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.thermophilum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	v	v	v	+	+	v	+	+	v	-	-	-	(+)	(+)	(+)
<i>B.infantis</i>																								
<i>ss.infantis</i>	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	(-)	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	-	-	-	v	-	+	-
<i>ss.liberorum</i>	-	-	+	+	(+)	+	+	+	+	-	+	(+)	+	+	-	w	-	-	-	-	+	(+)	(+)	-
<i>ss.lactentis</i>	-	-	+	(+)	(+)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	w	-	-	-
<i>B.breve</i>																								
<i>ss.breve</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	v	v	v	w	+	+	-	+	+	+
<i>ss.parvulorum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	v	+	+	v	-	-	-	+	+	+
<i>B.cuniculi</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.longum</i>	-	+	+	+	v	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.animalis</i>	-	+	+	+	v	+	+	+	+	-	+	v	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.pullorum</i>	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>B.pseudolongum</i>	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	v	v	-	+	+	v	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.gallinarum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>B.adolescentis</i>	v	+	+	+	v	+	+	+	+	v	+	v	+	+	v	v	v	v	v	v	v	-	+	+
<i>B.coryneforme</i>	v	+	+	+	-	+	v	+	v	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B.indicum</i>	+	-	-	+	v	+	v	+	v	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B.subtile</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	v	+	+	+	+	+	v	-	+	-	-	v	-

**Tableau 9** : Caractères fermentaires de différenciation des espèces et des sous-espèces du genre *Bifidobacterium* (MITSUOKA, 1984).

+ : positif

- : négatif

v : variable

w : faible

	D-ribose	L-arabinose	Lactose	Cellobiose	Melezitose	Raffinose	Sorbitol	Amidon	Gluconate	Xylose	Mannose	Fructose	Galactose	Saccharose	Maltose	Trehalose	Melibiose	Mannitol	Inuline	Salicine
<i>B.bifidum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	-	-	v	-	-	-
<i>B.longum</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	v	v	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.infantis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	v	v	+	+	+	+	-	+	-	v	-
<i>B.breve</i>	+	-	+	v	v	+	v	-	-	-	+	+	+	+	+	v	+	v	v	+
<i>B.adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	v	+	+	+	+	v	+	v	v	+
<i>B.angulatum</i>	+	+	+	-	-	+	v	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>B.catenulatum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	v	+	v	v	+
<i>B.pseudocatenulatum</i>	+	+	+	v	-	+	v	+	v	+	+	+	+	+	+	v	+	-	-	+
<i>B.dentium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B.globosum</i>	+	v	+	-	-	+	-	+	-	v	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B.pseudolongum</i>	+	+	v	v	v	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.cuniculi</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.choerinum</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.animalis</i>	+	+	+	v	v	+	-	+	-	+	v	+	+	+	+	v	+	-	-	+
<i>B.thermophilum</i>	-	-	v	v	v	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	v	+	-	v	v
<i>B.boum</i>	-	-	v	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>B.magnum</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.pullorum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B.suis</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	v	v	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>B.minimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>B.subtile</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	v	+	-	v	v
<i>B.coryneforme</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+		+	+	-	+	-		+
<i>B.asteroides</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	v	+	-	+	v	+	v	-	+	-	-	+
<i>B.indicum</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	v	+	v	+	v	-	+	-	-	+

**Tableau 10 :** Caractères fermentaires de différenciation des espèces du genre *Bifidobacterium* (SCARDOVI, 1986).

+ : positif

- : négatif

v : variable

Espèces	Distance de migration en cm
<i>B. bifidum</i>	15
<i>B. longum</i>	15
<i>B. infantis</i>	15
<i>B. breve</i>	15
<i>B. adolescentis</i>	15
<i>B. angulatum</i>	15
<i>B. catenulatum</i>	15
<i>B. pseudocatenulatum</i>	
<i>B. dentium</i>	15
<i>B. globosum</i>	10
<i>B. pseudolongum</i>	10
<i>B. cuniculi</i>	
<i>B. choerinum</i>	
<i>B. animalis</i>	10
<i>B. thermophilum</i>	10
<i>B. boum</i>	
<i>B. magnum</i>	10
<i>B. pullorum</i>	10
<i>B. suis</i>	10
<i>B. minimum</i>	10
<i>B. subtile</i>	10-15
<i>B. coryneforme</i>	16
<i>B. asteroides</i>	16
<i>B. indicum</i>	16

**Tableau 11** : Distances de migration, après électrophorèse en gel d'amidon, de la F6PPK de différentes espèces de *Bifidobacterium* (d'après SCARDOVI, 1986).

En 1989, ROY et coll. (1989) affirment avoir mis au point une méthode d'identification rapide des espèces de bifidobactéries basée sur la fermentation des sept sucres : arabinose, cellobiose, lactose, mannose, mélézitose, ribose et salicine. L'utilisation de ces sept sucres mélangés ensemble est quantifiée par chromatographie en phase gazeuse et permettrait d'identifier six à huit souches types de *Bifidobacterium* en moins de 24 heures.

#### **I.2.1.2.2. Etude des isoenzymes de la F6PPK :**

La recherche, par réaction colorimétrique après électrophorèse en gel d'amidon, des trois isoenzymes de la F6PPK peut orienter une identification d'espèce (BIAVATI et coll., 1986). Ces isoenzymes catalysent la même réaction mais se distinguent par des profils électrophorétiques différents. Les distances de migration sont liées à l'origine écologique des espèces : humaine (15 cm), animale (10 cm) ou abeille (SCARDOVI, 1986) (tableau 11). De plus, les préparations purifiées de F6PPK de *B. globosum* (origine animale) et de *B. dentium* (origine humaine) présentent des activités variables qui concernent le pH optimal, la nature du métal induisant une activité maximale, l'inactivation par la chaleur, le poids moléculaire et la spécificité de substrat (SGORBATI et coll., 1986).

#### **I.2.1.2.3. Etude des profils protéiques :**

Une souche bactérienne, mise en culture dans des conditions standard, fournit toujours les mêmes profils protéiques. La séquence des aminoacides, le poids moléculaire et la charge électrique nette de chaque protéine sont déterminés par la séquence des nucléotides dans l'ADN. Le profil protéique de chaque souche est donc une "empreinte digitale" du génome. Les protéines cellulaires sont dissoutes au moyen de détergents tels que le SDS mais beaucoup d'études ont été réalisées avec uniquement la fraction soluble de cellules désintégrées (DELLAGLIO, 1989).

Deux types d'études peuvent être envisagées pour comparer les espèces de *Bifidobacterium* entre elles :

1. L'électrophorèse en gel d'amidon (zymogramme) des 14 enzymes de transaldolase et des 19 isoenzymes de 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) permet de comparer les mobilités électrophorétiques de ces enzymes en fonction de la souche d'origine (tableau 12). Une méthode colorimétrique appliquée à la 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase permet d'identifier encore d'autres souches (SCARDOVI et coll., 1979b).

Si les distances de migration électrophorétiques des F6PPK semblent liées à l'origine écologique des espèces, il n'en est pas de même pour les autres enzymes du métabolisme du

glucose des *Bifidobacterium*, à savoir la transaldolase, la transcétolase, la 6 phosphogluconate déshydrogénase et l'aldolase (SCARDOVI et SGORBATI, 1974c).

2. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide du lysat d'une souche fournit les profils électrophorétiques des protéines cellulaires solubles. La répartition des bandes protéiques est ensuite comparée à celles des souches de référence (MOORE et coll., 1980; BIAVATI et coll., 1982, 1986).

Cette méthode est sans doute la plus discriminante, elle est fiable et sensible puisqu'elle permet de différencier des souches possédant des taux d'homologie ADN-ADN allant jusqu'à 80% (BIAVATI et coll., 1982), mais sa mise en oeuvre est lourde, elle nécessite des souches de référence et son interprétation est délicate.

L'utilisation de ces deux types d'électrophorèses a fourni les résultats suivants :

- L'homologie entre *B. dentium* (seule espèce soupçonnée d'être pathogène) et *B. eriksonii* (anciennement *Actinomyces eriksonii*) fut établie par comparaison des profils électrophorétiques (zymogrammes identiques) (SCARDOVI et coll., 1979b). Ceci est en accord avec le fort pourcentage d'homologie ADN-ADN (80 à 100%).

- L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a permis à BIAVATI et coll. (1982) de reconnaître quatre espèces nouvelles : *B. minimum*, *B. subtile*, *B. coryneforme* et *B. globosum*, désormais séparé de *B. pseudolongum*.

- *B. adolescentis* et *B. dentium* qui possèdent des profils phénotypiques identiques peuvent également être différenciés par leurs zymogrammes (électrophorèses en gel d'amidon) qui sont totalement différents (SCARDOVI et coll., 1979b). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide corrobore d'ailleurs ces résultats (BIAVATI et coll., 1982).

- La comparaison des zymogrammes et des profils électrophorétiques des protéines en gel de polyacrylamide de *B. infantis* et de *B. longum* est intéressante :

Ces deux espèces possèdent les mêmes isoenzymes de transaldolases, c'est-à-dire trois isoenzymes différents qui migrent à une distance de 5, 6 ou 8 unités. Seules les fréquences au sein des souches diffèrent : l'isoenzyme migrant à 5 est retrouvé plus souvent chez *B. infantis* et celui migrant le plus loin, à 8, est plus fréquent chez *B. longum* (SCARDOVI et coll., 1979b). Les bandes obtenues sur les diagrammes électrophorétiques de ces deux espèces se répartissent de façon identique. Seules les concentrations des protéines diffèrent (BIAVATI et coll., 1982, 1986).

Espèces	Profils électrophorétiques	
	transaldolase	6 PGD
<i>B. bifidum</i>	7	7-(8)
<i>B. longum</i>	(5)-6- <b>8</b>	5-(6)
<i>B. infantis</i>	5-(6)-(8)	(3)-4-(5)
<i>B. breve</i>	6	(5)-6-7
<i>B. adolescentis</i>	8	5
<i>B. angulatum</i>	5	5
<i>B. catenulatum</i>	5	6-8
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4-(5)	1-3
<i>B. dentium</i>	4	(2)
<i>B. globosum</i>	2	(3)-(4)-(5)-6-(7)
<i>B. pseudolongum</i>	2	7
<i>B. cuniculi</i>	1	4
<i>B. choerinum</i>	3	4
<i>B. animalis</i>	5	8-9
<i>B. thermophilum</i>	(7)-8	7-8-9
<i>B. boum</i>	6	8-9
<i>B. magnum</i>	5	7
<i>B. pullorum</i>	2	Absent
<i>B. suis</i>	6	5-8
<i>B. minimum</i>	10	6
<i>B. subtile</i>	3	2
<i>B. coryneforme</i>	6	6
<i>B. asteroides</i>	(6)-(7)-8-(9)	(9)-10-(11)-(12)-(13)
<i>B. indicum</i>	(6)-7-8-9	6-(7)-8-(9)

**Tableau 12** : Distances de migration des transaldolases et 6PGD de différentes espèces de *Bifidobacterium* (d'après SCARDOVI, 1986).

Les nombres en **gras** correspondent aux isoenzymes des souches types.  
Les nombres entre parenthèses correspondent aux isoenzymes retrouvés chez moins de 10% des souches étudiées.

Nous sommes donc face à un phénomène bien particulier : ces souches, bien qu'appartenant à des espèces différentes, présentent des profils proches, définissant ainsi un "continuum".

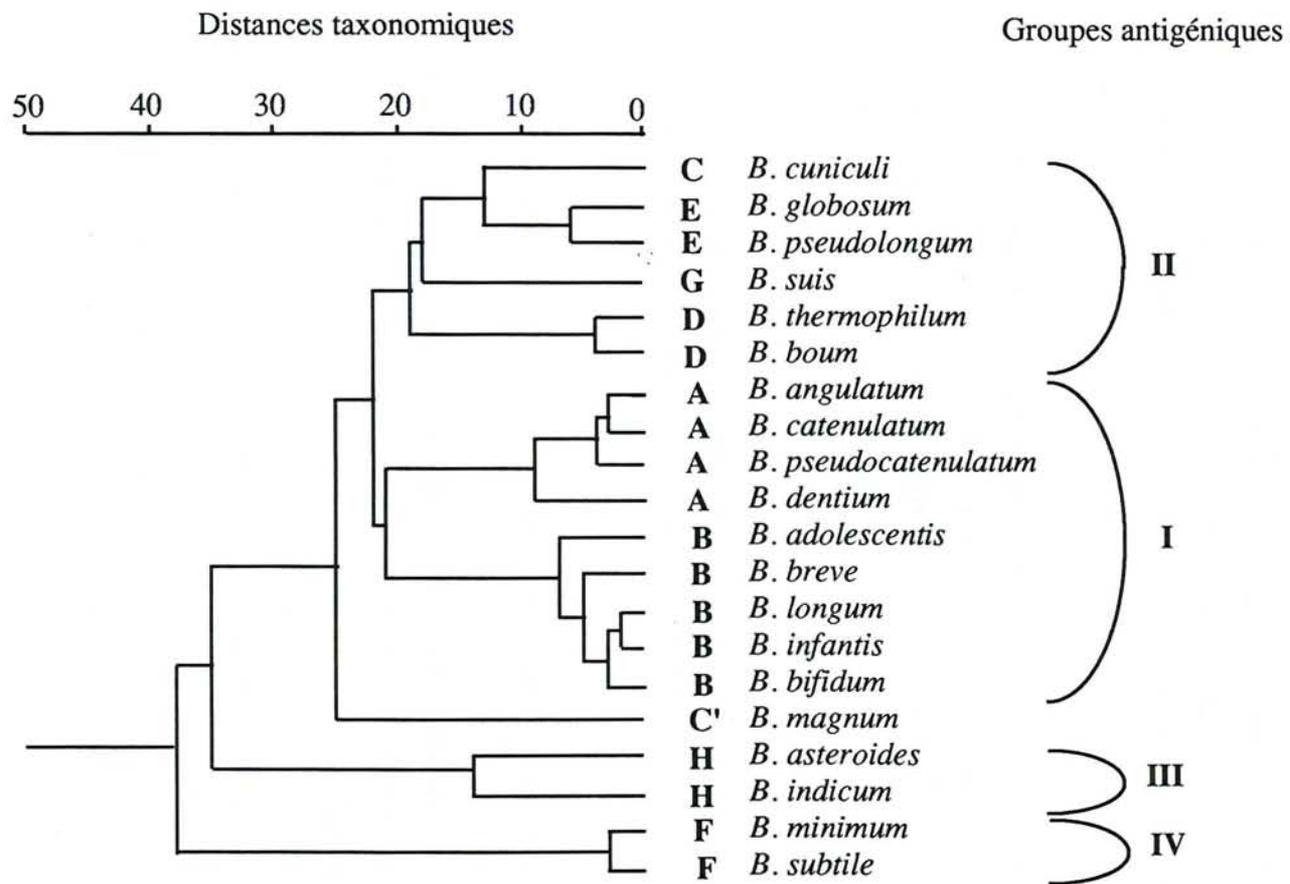
- Le tableau 12 permet de constater que des transaldolases et 6PGD de *B. adolescentis* de mobilités électrophorétiques 8 et 5 respectivement, sont retrouvées chez 50% des souches de *B. longum* et chez de nombreux *B. infantis*, mettant ainsi en relief une parenté certainement importante entre ces espèces. En revanche, les profils électrophorétiques des protéines cellulaires de ces trois souches sont distincts, confirmant qu'il s'agit bien de trois espèces différentes (SCARDOVI et coll., 1971a; BIAVATI et coll., 1982).

- Le zymogramme de *B. bifidum* est, en revanche, bien spécifique. Cette espèce est la seule à présenter une distance de migration de la transaldolase et de la F6PPK de 7 unités. Seules quelques souches de *B. thermophilum* d'origine bovine s'en approchent. Dans ce cas, la différence s'effectue grâce à la mobilité de la 3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase.

L'étude des profils protéiques apporte de précieux renseignements sur une souche donnée et l'analyse quantitative numérique d'un grand nombre de souches permet (KERSTER et DE LEY, 1975) :

- de grouper rapidement ces souches;
- d'emmagasiner un grand nombre de modèles dans une banque de données pour référence;
- d'attribuer des bactéries inconnues à un groupe et éventuellement de les identifier;
- de décider rapidement si deux types de colonies dans une culture sont dues à une variation ou à une contamination;
- de déterminer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des taxa;
- de fournir des renseignements sur la diffusion épidémiologique d'agents pathogènes animaux et végétaux;
- et surtout de sélectionner une souche de référence de chaque groupe de protéines pour faire une hybridation ADN-ADN avec gain de temps et moins de travail.

Quand les conditions de préparation des extraits et leurs électrophorèses sont bien standardisées, une très grande reproductibilité (supérieure à 96%) peut être obtenue.



**Figure 7** : Relations évolutives chez les *Bifidobacterium*.

Résultats obtenus avec 8 sérums antitransaldolases

(d'après SGORBATI et LONDON, 1982 a).

#### I.2.1.2.4. Sérologie des transaldolases :

Une approche immunologique par étude de la sérologie des transaldolases permet également de différencier les espèces à l'intérieur du genre *Bifidobacterium*. La figure 7 est la conclusion d'une étude menée en 1982 par SGORBATI et LONDON (SGORBATI et SCARDOVI, 1979; SGORBATI, 1979; SGORBATI et LONDON, 1982a).

Cette méthode consiste à préparer des immunsérums contre les transaldolases hautement purifiées de huit espèces de *Bifidobacterium* : *B. infantis*, *B. angulatum*, *B. globosum*, *B. thermophilum*, *B. suis*, *B. cuniculi*, *B. minimum* et *B. asteroïdes* et à les essayer vis-à-vis de vingt et une espèces bactériennes différentes appartenant à ce genre afin de déterminer les distances immunologiques. Ce sont ces résultats, exprimés en distance taxonomique, qui sont représentés sur la figure 7. Ce schéma fait apparaître les interrelations existant au sein du genre et permet de remarquer que les sept groupes A, B, C, D, E, F et G définis par SGORBATI et LONDON (1982a) et mis en évidence avec cette méthode, peuvent être rassemblés en quatre groupes distincts étroitement liés à l'origine écologique des espèces. Ces quatre groupes antigéniques (I, II, III, IV) coïncident avec l'arrangement des espèces de *Bifidobacterium* basé sur les mobilités électrophorétiques (SCARDOVI et coll., 1971a; SGORBATI, 1979) et sont également confirmés par les études d'hybridation ADN-ADN.

De plus, ce dendogramme permet de distinguer deux sous-groupes A et B parmi les souches humaines (I):

- d'une part : *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* et *B. dentium*,
- d'autre part : *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis* et *B. bifidum*

(SGORBATI, 1979).

Les espèces associées aux habitats animaux (II) appartiennent aux groupes C, D, E et G.

Les deux espèces trouvées uniquement chez l'abeille (groupe H) sont très éloignées antigéniquement des autres membres du genre (III).

Les deux espèces les plus séparées (IV) (groupe F) ont été isolées d'eaux usées.

#### I.2.1.2.5. Enzymes :

*B. breve* est l'une des rares espèces à produire une activité  $\beta$ -glucuronidase (DESJARDINS et ROY, 1990). Cette enzyme est soupçonnée convertir les procarcinogènes en carcinogènes (KURMANN, 1988). De plus, *B. longum* est la seule espèce à ne pas posséder d'activité  $\beta$ -glucosidase ni N-acétyl-glucosaminidase et le système API ZYM peut donc permettre de différencier cette espèce, dans la mesure où les conditions expérimentales sont suffisamment éprouvées pour assurer une bonne fiabilité à la méthode.

Espèces	Origine	Type de peptidoglycane  (liaison entre les térapeptides)	Polysaccharide		
			Glucose	Galactose	Rhamnose
<i>B. bifidum</i>	selles adulte	Orn-Ser-Asp-Ala	+	+	+
<i>B. infantis</i>	selles enfant	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. breve</i>	selles enfant	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. liberorum</i>	selles enfant	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. parvulorum</i>	selles enfant	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. asteroïdes</i>	abeille	Lys-Gly	+	+	-
<i>B. suis</i>	porc	Orn ou (Lys)-Ser- Ala-Thr-Ala	+	+	(+)
<i>B. longum</i>	selles adulte	Orn ou (Lys)-Ser- Ala-Thr-Ala	+	+	+
<i>B. thermophilum</i>	porc	Orn-(Lys)-Glu	+	+	+
<i>B. adolescentis</i>	selles adulte	Lys ou (Orn)-Asp	+	+	-
<i>B. indicum</i>	abeille	Lys-Asp	-	+	+
<i>B. pseudolongum</i>	porc	Orn ou (Lys)-Ala	+	+	+

**Tableau 13** : Composition de la paroi de différentes espèces de *Bifidobacterium* (d'après KANDLER et LAUER, 1974).

#### **I.2.1.2.6. Besoins nutritionnels :**

NEUT et coll. (1981) ont ébauché une approche d'identification des espèces par l'étude des exigences nutritionnelles mais actuellement, seul *B. bifidum* peut être caractérisé par cette technique, *B. infantis* et *B. longum* étant trop hétérogènes dans leurs besoins.

#### **I.2.1.2.7. Composition de la paroi :**

La composition en sucre de la paroi varie selon les souches, et tout particulièrement dans le pourcentage en rhamnose et glucose (RASIC et KURMANN, 1983) (tableau 13). La séquence des acides aminés du peptidoglycane peut varier d'une espèce à l'autre, permettant ainsi de séparer des espèces relativement proches telles que *B. boum* de *B. thermophilum* ou *B. minimum* de *B. subtile* (KANDLER et LAUER, 1974).

D'autre part, BEZIRTZOGLU (1985) note qu'au niveau des acides lipoteichoïques, seule l'espèce *B. bifidum* comporte un squelette poly (1, 2) glycérolphosphate substitué en position terminale par un polysaccharide. L'équipe d'OP DEN CAMP (1985) prépare des anticorps anti-acides lipoteichoïques de *B. bifidum* par couplage avec une protéine immunogène. Ils sont spécifiques du core polyglycérolphosphate (essentiellement 1, 2) et pour une faible part, de la portion polysaccharidique.

Les essais de réactions croisées avec des extraits phénoliques d'acides lipoteichoïques de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* montrent que seuls les premiers réagissent, permettant ainsi d'envisager un sérogroupage avec, comme antigènes de groupe, les acides lipoteichoïques.

#### **I.2.1.2.8. Traitement des résultats :**

Tous ces critères phénotypiques d'identification donnent des réponses qui doivent être classées et interprétées. La plupart des problèmes de traitement de tableaux de données qui résultent de l'examen des propriétés physiologiques et biochimiques des bactéries sont résolus par la taxonomie numérique assistée par ordinateur.

L'utilité de la taxonomie numérique dépend de plusieurs critères : (DELLAGLIO, 1989).

- sélection des souches;
- nombre de caractères examinés (supérieur à 50);
- standardisation rigoureuse des méthodes d'analyse;
- poids donné à chaque caractère dans l'évaluation;
- codification des réactions en positives (1), négatives (2) ou non comparables (3);
- type de programme employé avec l'ordinateur.

## I.2.2. GENOTYPIE :

### I.2.2.1. Identification du genre *Bifidobacterium* :

La composition en bases de l'ADN du chromosome des *Bifidobacterium* diffère de celle des *Lactobacillus* (SEBALD et coll., 1965) et des autres bactéries lactiques.

Genre	% (G + C)
<i>Lactobacillus</i>	34,7 - 50,8
<i>Streptococcus</i>	33 - 44
<i>Leuconostoc</i>	39 - 42
<i>Bifidobacterium</i>	57,2 - 64,5

Cependant, deux organismes ayant des pourcentages en G + C semblables ne sont pas forcément étroitement apparentés. Le pourcentage en G + C ne pourra donc être considéré, dans la taxonomie bactérienne, que comme caractéristique d'exclusion.

Par ailleurs, le pourcentage en G + C de l'ADN des souches d'origine animale est globalement différent de celui des souches d'origine humaine. Cependant, la sensibilité de ce test reste trop faible pour permettre de caractériser les espèces et il sera réservé à l'identification de genre.

### I.2.2.2. Identification des espèces :

#### I.2.2.2.1. Composition en bases de l'ADN :

*B. longum* se distingue de *B. animalis* et *B. pseudolongum* par son pourcentage en G + C. Celui de *B. longum* est de 58 tandis que celui de *B. animalis* et de *B. pseudolongum* est de 60.

#### I.2.2.2.2. Hybridation ADN-ADN :

L'homologie ADN-ADN est la mesure moyenne de la similarité, dans laquelle tout le génome d'un organisme est comparé à celui d'un autre. Un fragment d'ADN dénaturé d'une souche de référence est marqué puis utilisé comme sonde pour hybrider avec l'ADN simple brin de la souche à identifier. Plus les appariements entre les bases des ADN des deux souches sont nombreux, plus celles-ci sont proches génétiquement.

	B. bifidum	B. longum	B. infantis	B. breve	B. adolescentis	B. angulatum	B. catenulatum	B. pseudocatenulatum	B. dentium	B. globosum	B. pseudolongum	B. cuniculi	B. choerinum	B. animalis	B. thermophilum	B. boum	B. magnum	B. pullorum	B. suis	B. minimum	B. subtile	B. asteroides	B. indicum
B. bifidum	100	*	*	*	0	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	0	0
B. longum	/	88	63	*	0	*	*	*	0	*	*	*	*	0	*	*	*	*	0	*	*	0	0
B. infantis	/	65	88	*		*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	0	0
B. breve	*	/	/	100		*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	0	0
B. adolescentis	*		*	*	86	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
B. angulatum	*	*	*	*	*	88	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*
B. catenulatum	*	*	*	*	/	*	90	65	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. pseudocatenulatum	*	*	*	*			67	97				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. dentium	*	*	*	*	*	*	*	*	90	*	*	*	*	*	*	0	*	0	*	*	*	0	*
B. globosum	*	*	*	*	*	*	*	*		100	75	/	/	/	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. pseudolongum	*	*	*	*	*	*	*	*		67	100	*	/	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. cuniculi	*	*	*	*	*	*	*	*		/	*	98	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. choerinum	*	*	*	*	*	*	*	*		/	/	*	98	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B. animalis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	86	*	*	*	0	*	*	*	*	0
B. thermophilum	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	98	/	*	*	*	*	*	*	0
B. boum	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	/	82		0	*	*	*	*	0
B. magnum	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	90	*	*	*	*	*	*
B. pullorum	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	102	*	*	*	*	*
B. suis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	100	*	*	*	*
B. minimum	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	102	*	0
B. subtile	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	0	0	*	*	*	*	85	*
B. coryneforme	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	0	*	*	*	0	/
B. asteroides	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	/	*	0	0	*	*	0	0	*	100	*
B. indicum	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	*	*	*	10	*	*	*	*	0	0	*	*	100

\* : valeur inférieure à 40

/ : valeur comprise entre 40 et 60

**Tableau 14** : Pourcentage d'homologie ADN/ADN entre différentes espèces du genre *Bifidobacterium* (d'après BALLONGUE, 1989).

SCARDOVI et coll. furent les premiers en 1970 à utiliser les techniques d'hybridation ADN-ADN pour faire progresser la taxonomie des bifidobactéries (SCARDOVI et coll., 1970, 1971b). En s'appuyant sur les pourcentages d'homologie ADN-ADN confirmés par les critères phénotypiques, ils ont décrit 11 espèces différentes : *B. indicum*, *B. coryneforme*, *B. asteroïdes*, *B. ruminale*, *B. globosum*, *B. suis*, *B. pullorum*, *B. magnum*, *B. catenulatum*, *B. dentium* et *B. angulatum* (SCARDOVI et TROVATELLI, 1969b; MATTEUZI et coll., 1971; SCARDOVI et CROCIANI, 1974a; SCARDOVI et ZANI, 1974b; TROVATELLI et coll., 1974). L'appartenance à deux espèces différentes de *B. bifidum* et *B. longum* a été confirmée mais les espèces suivantes ont été réunies en une seule: - *B. lactentis*, *B. liberorum* et *B. infantis* sous le nom de *B. infantis*;  
 - *B. ruminale* et *B. thermophilum*;  
 - *B. breve* et *B. parvulorum* sous le nom de *B. breve*;  
 - *B. pseudolongum* et *B. globosum* (SCARDOVI et coll., 1971b).

L'année suivante, et à l'aide des mêmes techniques, HOLDEMAN et MOORE (1972) divisent *B. infantis* en trois sous-espèces et *B. adolescentis* en quatre groupes. De plus, ils décrivent deux nouvelles espèces : *B. cornutum* et *B. eriksonii*.

En 1974, SCARDOVI et TROVATELLI (1974d) observent des différences génétiques entre *B. longum* ss. *longum* et *B. longum* ss. *animalis* et proposent d'élever ce dernier au rang d'espèce *B. animalis*. Désormais, *B. longum* et *B. animalis* sont deux espèces bien distinctes.

Quelques années plus tard, de nouvelles espèces sont décrites par SCARDOVI (1981) : *B. pseudocatenulatum*, *B. cuniculi*, *B. choerinum* et *B. boum* puis, en 1982, par BIAVATI et coll. (1982) : *B. minimum* et *B. subtile*.

Les résultats des hybridations ADN-ADN réalisées entre les différentes espèces de *Bifidobacterium* sont rapportés dans le tableau 14. L'observation de ce tableau permet de définir deux continuums parmi les souches humaines : D'une part *B. infantis* et *B. longum* (50 à 76% d'homologie) déjà révélé par le zymogramme, l'électrophorèse des protéines solubles et les exigences en facteurs de croissance (NEUT, 1981) et déjà soupçonné par SCARDOVI (1971b) et d'autre part *B. catenulatum* et *B. pseudocatenulatum* (60 à 80% d'homologie) (SCARDOVI et coll., 1979a).

Ces résultats génotypiques soulèvent néanmoins quelques questions :

- les mobilités électrophorétiques des transaldolases et 6PGD avaient suggéré la proximité de *B. adolescentis*, *B. longum* et *B. infantis*. Or si les hybridations ADN-ADN entre ces trois souches confirment la parenté entre *B. longum* et *B. infantis*, *B. adolescentis* au contraire semble très éloigné génétiquement de *B. longum* (0% d'hybridation).

- la sérologie des transaldolases permet de séparer les souches d'origine humaine en deux sous-groupes et *B. adolescentis* appartient au même sous-groupe que *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis* et *B. bifidum* (et non au sous-groupe *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* et *B. dentium*). Les hybridations remettent ce résultat en question puisque, génétiquement, *B. adolescentis* serait éloigné de ces quatre espèces (moins de 20% d'homologie) et proche, en revanche, des espèces de l'autre sous-groupe et en particulier de *B. dentium* (certaines souches ont jusqu'à 49-57% d'homologie). Au contraire, les résultats obtenus par l'électrophorèse des protéines solubles et les zymogrammes tendent, quant à eux, à séparer *B. adolescentis* de *B. dentium*.

L'hybridation ADN-ADN a donc fait énormément progresser la classification bactérienne et en particulier la taxonomie des bifidobactéries mais son inconvénient majeur reste la minutie qu'elle requiert et sa lourdeur puisque son utilisation en identification nécessite de tester les ADN des souches inconnues contre de nombreux ADN de référence.

#### **I.2.2.2.3. Recherche de plasmides :**

Le nombre de plasmides mis en évidence dans une souche de *Bifidobacterium* peut orienter l'identification vers certaines espèces puisque seules quelques unes d'entre elles en possèdent (SGORBATI et coll., 1983, 1986). Cette technique est particulièrement utile pour séparer *B. longum* de *B. infantis*.

#### **I.2.2.2.4. Nouvelles méthodes :**

Aujourd'hui, les espoirs reposent sur de nouvelles techniques qui devraient encore provoquer bientôt de nouveaux changements :

- L'ADN bactérien total peut être traité par des enzymes de restriction (BOVE et SAILLARD, 1979). Mais même si le génome est de taille relativement faible, les fragments de restriction sont trop nombreux pour que le profil électrophorétique soit facilement lisible. Si cette technique peut permettre d'affirmer que deux souches sont différentes, elle ne peut en aucun cas certifier la similitude de deux bactéries. L'utilisation successive de plusieurs enzymes de restriction permet d'affiner l'identification.

- GRIMONT et GRIMONT (1986) proposent d'inclure dans les paramètres de description des espèces et des souches, la taille des fragments de restriction des ADNr : L'ADN est clivé par diverses enzymes de restriction, soumis à l'électrophorèse en agarose et transféré à des filtres de nylon. Les fragments d'ADN portant les gènes (ADNr) codant pour

les ARN ribosomiaux (ARNr) sont ensuite localisés sur les filtres par hybridation avec soit un ARNr 16 + 23S de *Escherichia coli*, marqué au  $^{32}\text{P}$ , soit une sonde d'ADN qui code pour les parties très conservées des ARN ribosomiaux 5S ou 16S. Un profil de fragments hybridés est ainsi obtenu pour chaque ADN testé.

- L'électrophorèse en champ pulsé nécessite l'obtention de grands fragments d'ADN. Des travaux ont été entrepris pour rechercher des enzymes de restriction coupant l'ADN à des sites de restriction peu fréquents.

- Des études plus nombreuses doivent encore être effectuées avant de définir le niveau d'identification qui pourra être atteint par le séquençage des ARNr 5S et 16S qui sont des molécules extrêmement conservées dans tout le règne animal.

La comparaison de ces séquences avec celles de souches de référence devrait être très enrichissante pour l'identification (GRIMONT et GRIMONT, 1986).

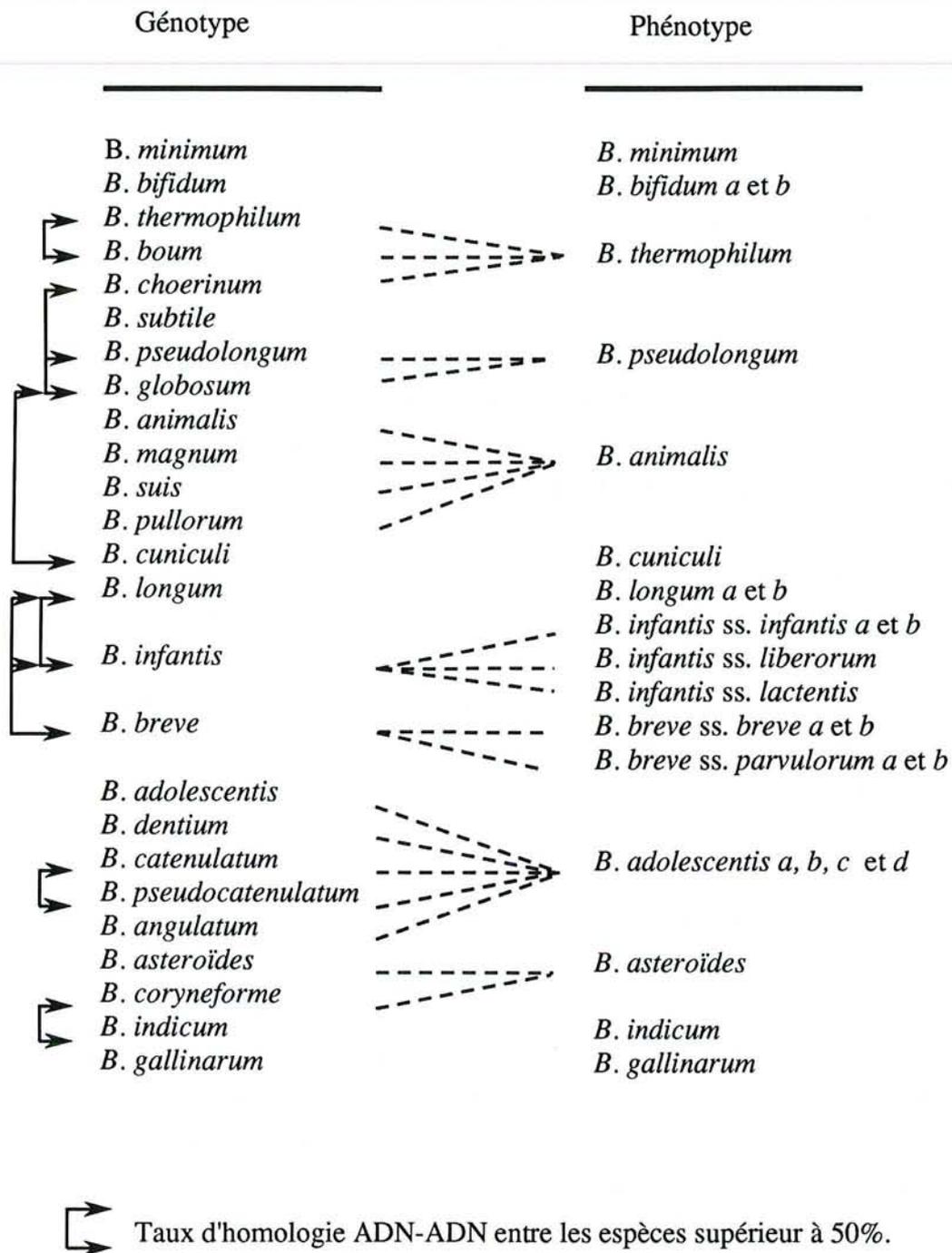
- L'hybridation ADN-ARNr est également une méthode dont la valeur dans l'amélioration de la classification des bifidobactéries reste à expérimenter.

Plusieurs de ces nouvelles méthodes d'étude des relations phylogénétiques entre les microorganismes ont été testées chez les *Bifidobacterium* à Nancy et elles pourraient compléter l'hybridation ADN-ADN.

### **I.2.3. CONCLUSION :**

Ainsi, l'identification du genre *Bifidobacterium* mais surtout des espèces au sein du genre est délicate. Les kits et les tests commerciaux apportant des éléments à l'identification phénotypique ne sont pas adaptés à cette bactérie et leur utilisation ne fournit pas de réponse suffisamment fiable. C'est avec les 149 caractères phénotypiques à notre disposition à ce jour que chaque souche devrait être identifiée!

La génotypie permet aujourd'hui une approche plus précise et plus fiable de la taxonomie bactérienne. L'hybridation ADN/ADN maintenant largement utilisée est une technique particulièrement bien adaptée puisqu'elle permet l'étude de tout le génome bactérien, y compris des parties ne codant pas pour des protéines. Les nouvelles techniques génomiques à l'étude sont prometteuses d'une identification encore plus précise et plus rapide.



**Tableau 15** : Relation entre l'homologie ADN-ADN et la phénotypie  
(d'après MITSUOKA, 1984).

#### **I.2.4. RELATIONS ENTRE LE PHENOTYPE ET LE GENOTYPE :**

Le tableau 15 (MITSUOKA, 1984) met en relief la finesse et la précision d'identification obtenues grâce à la génotypie. Plusieurs espèces non différenciables en phénotypie le sont par leurs caractères génétiques. En effet, les techniques d'hybridation ADN-ADN prennent en compte le génome dans sa totalité tandis que l'analyse phénotypique n'implique que les segments de ce génome dont l'expression phénotypique peut être mesurée (OWEN et PITCHER, 1985), soit environ 10% du génôme.

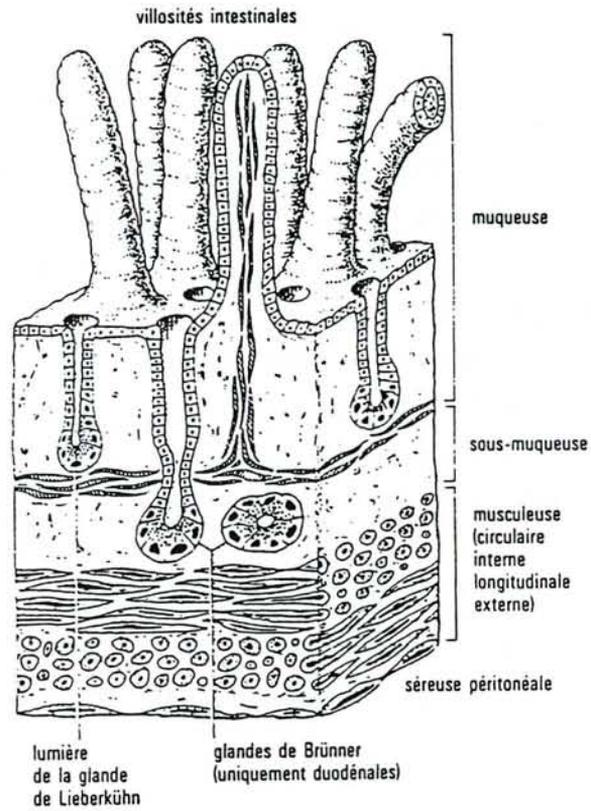
Cependant, l'observation du tableau 15 permet de soulever une question importante : Nous devons noter que les taux d'homologie ADN-ADN sont souvent inférieurs à 50 % entre les espèces de ce même genre, certains taux sont même voisins de 0 %. Pouvons-nous alors parler de genre pour regrouper ces espèces? L'étude immunologique des transaldolases réalisée par l'équipe de SCARDOVI sur vingt et une espèces (figure 7 page 59) a en effet montré que le genre pourrait éclater en quatre sous-genres. Dans ce contexte, il est légitime de se poser la question de la validité du caractère principal qui relie actuellement les espèces de ce genre, à savoir la présence de fructose-6-phosphate phosphocétolase.

Toutefois, la phénotypie reste largement utilisée du fait de sa mise en oeuvre beaucoup plus aisée que les techniques d'hybridation ADN-ADN. De plus, toute hybridation doit être précédée d'une orientation d'identification phénotypique.

#### **I.2.5. PROBLEMES ENGENDRES PAR LES DIFFICULTES D'IDENTIFICATION :**

L'absence de système d'identification totalement fiable a des implications directes sur la connaissance des espèces utilisées, tant au niveau industriel où les problèmes de protection des marques dans les laits fermentés sont importants qu'au niveau médical où il est nécessaire d'identifier les espèces pour comprendre leur rôle sur la flore intestinale.

Par ailleurs, une espèce, *B. dentium*, est reconnue comme pathogène opportuniste. Or, *B. dentium*, identifié par l'utilisation des caractères phénotypiques décrits par MITSUOKA, est assimilé à *B. adolescentis*. Un cas récent vient d'ailleurs d'être décrit sur une septicémie à *B. adolescentis*. Il est en fait probable que ce cas soit dû à *B. dentium*.



**Figure 8** : Les quatre couches de la paroi intestinale.  
 (d'après NEMETH, 1975)

### **I.3. ROLE DES *BIFIDOBACTERIUM* EN SANTE HUMAINE**

#### **I.3.1. PHYSIOLOGIE INTESTINALE ET DIGESTION :**

L'intestin relie l'estomac à l'anus et se divise en deux parties : l'intestin grêle et le côlon qui lui fait suite par l'intermédiaire du caecum (FLOREY, 1962; TONER, 1968; NEMETH, 1975; BERNIER; GEBBERS et LAISSUE, 1984).

##### **I.3.1.1. La paroi intestinale :**

La paroi intestinale est constituée de cinq couches successives, à savoir, de la partie externe vers la lumière intestinale : (figure 8)

- une séreuse : feuillet viscéral du péritoine;
- une musculuse formée de fibres musculaires lisses;
- une sous-muqueuse formée d'un tissu lâche conjonctivo-vasculaire.
- la musculaire muqueuse ("muscularis mucosae") qui est une couche mince de fibres musculaires lisses;

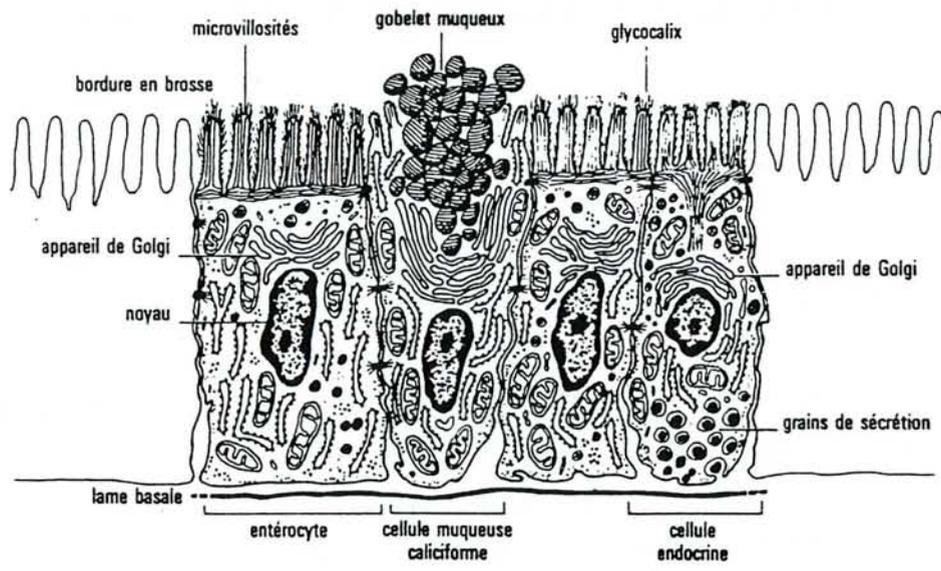
- la muqueuse constituée de la lamina-propria ou chorion (tissu conjonctif) recouverte d'un épithélium unistratifié. La muqueuse intestinale participe à la digestion des nutriments mais constitue également un filtre essentiel contre la charge antigénique. Elle joue un rôle important dans l'étude des relations entre l'hôte et les microorganismes.

Nous passerons en revue les différents types de cellules rencontrées dans l'épithélium de recouvrement de cette muqueuse qui assure deux fonctions essentielles à la digestion : l'absorption d'une part et la sécrétion d'autre part. Nous nous intéresserons ensuite aux mécanismes de défense de cette barrière muqueuse, constitués par le mucus.

##### **I.3.1.2. Histologie de l'épithélium de recouvrement de la muqueuse intestinale :**

L'épithélium de recouvrement est une couche unicellulaire reposant sur la lamina-propria de la muqueuse. Il comprend quatre types cellulaires (figure 9) :

- **Les cellules endocrines;**
- **Les cellules de Paneth;**



**Figure 9** : Epithélium de recouvrement de l'intestin grêle.  
 (d'après NEMETH, 1975)

### - Les entérocytes :

Ils représentent 80 % de la population totale des cellules de l'épithélium et possèdent plusieurs fonctions :

- l'importance du réticulum endoplasmique de ces cellules reflète leur intense activité d'absorption des ions et nutriments tels qu'acides aminés ou glucose;

- l'intervention dans la digestion des peptides et des sucres par la présence d'hydrolases et de disaccharidases;

- la présence de nombreux récepteurs de toxines, bactéries, virus et facteurs de croissance lui confère une position clé dans les interactions hôte-microorganismes (KIM et coll., 1984). La reconnaissance par une bactérie d'un site de fixation sur la cellule cible est une étape fondamentale dans le processus de colonisation de l'intestin, c'est la raison pour laquelle nous nous intéresserons plus particulièrement à cette fonction.

Les récepteurs sont identifiés comme des glycoprotéines ou des glycolipides membranaires. Les glycolipides, molécules complexes composées d'une fraction lipidique et de chaînes oligosaccharidiques, sont des constituants structuraux de la microvillosité et représentent 20% des lipides totaux membranaires (KIM et coll., 1984). Les glycoprotéines sont à la fois des composés structuraux et des produits de sécrétion. Leurs chaînes oligosaccharidiques sont fixées aux protéines, soit par une liaison N-glycosidique (une molécule de N-acétylglucosamine est liée par la fonction amine à une molécule d'asparagine), soit par une liaison O-glycosidique (type mucine) (KIM et coll., 1984). Au niveau de la microvillosité, les oligosaccharides se répartissent majoritairement sur les protéines (85%), les sucres restant sur la fraction lipidique (15%) (KIM et coll., 1984).

De nombreux travaux ont montré que la composition en glycoconjugués de la membrane des microvillosités change lors de la différenciation cellulaire. Par exemple, les essais d'agglutination des entérocytes par la concanavaleine A montrent des différences entre :

- les cellules des cryptes et des villosités (PODOLSKI et coll., 1973), témoignant d'une différence de composition en glycopeptides entre ces cellules (HERSCOVICS et coll., 1980; QUARONI et coll., 1980);

- les cellules des cryptes de l'intestin grêle et du côlon (LAMONT et coll., 1974) expliquées par des modifications des glycoprotéines et protéines membranaires observées le long du côlon (MORITA et coll., 1981) et entraînant des différences d'affinité à diverses lectines (ETZLER, 1984);

- les cellules intestinales foetales et adultes (WEISER, 1972). La maturation des récepteurs entérocytaires, par exemple, favoriserait l'infection par *Clostridium difficile* (WILKINS et coll., 1985).

Cette évolution des récepteurs serait sans doute à rapprocher de l'évolution de la composition de la flore intestinale observée au cours de la vie.

### **- Les cellules caliciformes ou cellules à gobelet :**

Ces cellules représentent 15 % de la population totale et sont de plus en plus nombreuses le long de l'intestin : de 10 % dans le duodénum à 90 % dans le rectum. Elles secrètent des grains de mucus dont le rôle peut être de faciliter le glissement et l'enrobage du bol alimentaire. L'importance du rôle du mucus nous conduit à l'étudier plus en détail.

#### **I.3.1.3. Le mucus :**

La couche de mucus est une couche protectrice couvrant les cellules épithéliales qui, en association avec le péristaltisme intestinal, joue un rôle important dans l'élimination des antigènes.

##### **I.3.1.3.1. La sécrétion de mucus :**

Le mucus est sécrété dans la lumière intestinale par fusion de la membrane d'un granule de sécrétion avec celle de la cellule; ce mode de sécrétion est proche des exocytoses décrites chez la plupart des cellules exocrines.

##### **I.3.1.3.2. Composition du mucus :**

Les mucines sont les constituants majeurs du mucus (FORSTNER et coll., 1984). Ces molécules de poids moléculaire supérieur à un million de Daltons (ALLEN, 1984) sont composées en majorité de sucres (JABBAL et coll., 1976). Les seuls monosaccharides présents sont : le galactose, le fucose, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine et l'acide sialique (FORSTNER et coll., 1984; SLOMIANY et SLOMIANY, 1984). Les segments peptidiques auxquels sont liées les chaînes oligosaccharidiques, sont constitués de plus de 70 % de proline, sérine et thréonine. La liaison de type O-glycosidique met en jeu une sérine ou une thréonine par son radical hydroxyle et une N-acétylgalactosamine. Les mucines natives sont chargées négativement mais à des degrés divers, qui dépendent de leur composition en acide sialique et en sulfates. Ces deux types de résidus sont des sites d'attachement possibles pour différents pathogènes (DI GIROLAMO et coll., 1977). Ainsi, la quantité de l'un ou l'autre des résidus entrant dans la constitution des mucines natives peut affecter les interactions fonctionnelles entre mucus et pathogènes.

##### **I.3.1.3.3. Fonctions du mucus :**

Le mucus est le siège de fonctions importantes dans le cadre des relations hôte-microorganismes et ses propriétés physico-chimiques sont idéales pour assurer la protection de l'hôte vis-à-vis d'agents chimiques drastiques.

- a . Les fonctions de barrière et de filtre :

D'une part, l'épaisse couche muqueuse constitue une barrière efficace vis-à-vis de toxines, de microorganismes et même de molécules très petites telles que les ions H<sup>+</sup> (ALLEN, 1984) grâce aux multiples protéines immobilisées dans le gel muqueux (immunoglobulines, inhibiteurs de protéases et enzymes) (WALKER et ISSELBACHER, 1974).

D'autre part, elle doit être suffisamment perméable pour permettre l'accès des nutriments aux enzymes digestives et aux systèmes de transports présents à la surface de la bordure en brosse entérocytaire. Des pores ou des points de rupture dans la couche muqueuse permettent le passage de ces nutriments sans détruire le rôle de barrière (FORSTNER et coll., 1984).

- b . La fonction de piège :

La viscosité du mucus permet la capture des microorganismes, les empêchant ainsi d'accéder aux récepteurs membranaires des entérocytes (FORSTNER et coll., 1984).

- c . La fonction de récepteur :

La similitude existant entre les chaînes oligosaccharidiques de la surface des cellules intestinales et celles des glycoprotéines du mucus permet à ces dernières de servir de leurre pour les toxines et les bactéries adhérentes (FORSTNER et coll., 1984).

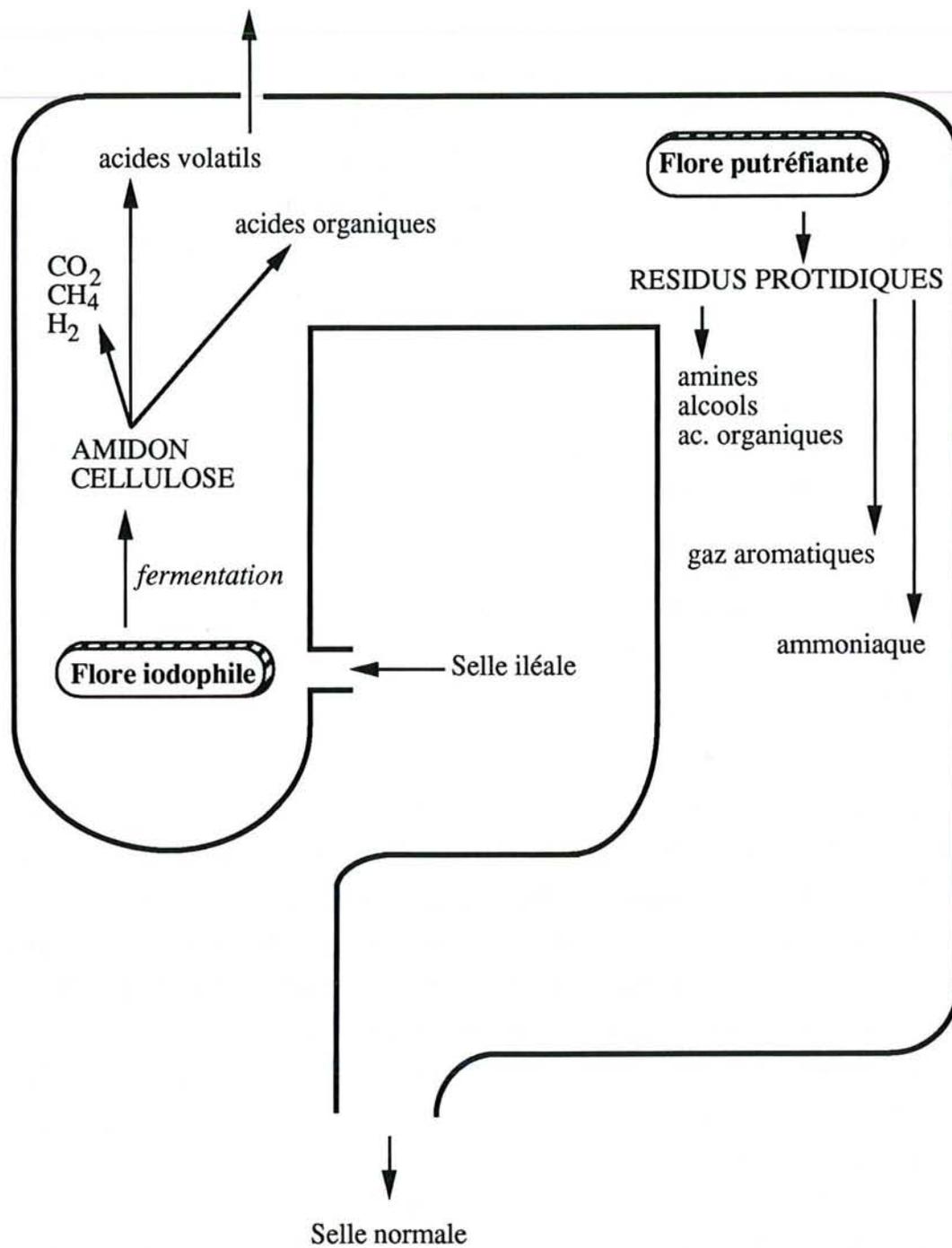
- d . La fonction de substrat :

HOSKINS et coll. (1985) ont mis en évidence, dans le côlon, la présence de glycosidases bactériennes telles que  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase et N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase (MACFARLANE, 1989) capables de cliver le mucus. Parmi les espèces responsables de ces activités nous pouvons citer *B. bifidum* qui reconnaît des substrats oligosaccharidiques non seulement d'origine humaine mais également murine ou porcine (HOSKINS et coll., 1985). Les oligosaccharides de mucines sont des macromolécules qui doivent être hydrolysées dans le côlon en molécules plus petites, en sous-unités plus facilement assimilables. Ces réactions sont effectuées par toute une variété d'enzymes hydrolytiques incluant les protéases, peptidases et glycosidases.

Il n'est pas encore défini si les protéases et les peptidases des bactéries intestinales sont constitutives ou inductibles mais il semble clair que la plupart des glycosidases sont inductibles et que leur expression est contrôlée par la disponibilité du substrat (WILLIAMS et WITHERS, 1982; SALYERS et LEEDLE, 1983).

En présence de mucine, les protéases sont majoritairement extra-cellulaires et les glycosidases sont à la fois intra- et extra-cellulaires (MACFARLANE et coll., 1989).

D'autres espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Bacteroides* ou *Peptococcus* semblent nettement plus spécifiques du mucus de l'hôte qui les héberge (ROBERTSON et STANLEY, 1982; GUSTAFSON et CARLSTEDT-DUKE, 1984).



**Figure 10** : La digestion colique.

La consommation du mucus, et donc la disparition de récepteurs, pourrait anihiler la fonction de leurre vis-à-vis des toxines ou des bactéries. En fait, il semble que l'utilisation du mucus ne soit pas totale et que seules certaines structures disparaissent.

- e . La fonction de lubrifiant :

Le mucus joue un rôle de lubrifiant facilitant le transit des matières contenues dans le tube digestif.

**I.3.1.4. La digestion :**

Au niveau du côlon, il faut distinguer deux étapes dans la digestion :

- la fermentation des sucres qui a lieu essentiellement dans le côlon ascendant sous l'action de la flore iodophile,
- la dégradation par la flore de putréfaction des résidus protidiques dans le côlon descendant (figure 10).

**I.3.2. RELATIONS ENTRE FLORE INTESTINALE ET CELLULES INTESTINALES. MECANISMES D'ADHESION ET DE COLONISATION :**

L'étude des mécanismes d'adhésion a été facilitée par le développement des techniques d'investigation et peut être réalisée aujourd'hui in vivo par prélèvement de biopsie colique humaine ou animale puis étude en microscopie électronique et in vitro par culture de tissus ou cellules intestinales maintenues en survie, mises en contact avec des bactéries puis observées au microscope électronique.

**I.3.2.1. Conditions de la colonisation :**

Pour obtenir un effet probiotique ou au contraire pathogène selon l'espèce bactérienne invasive, il faut que les bactéries adhèrent aux surfaces cellulaires du tube digestif. Plusieurs conditions doivent être réunies pour permettre l'implantation d'une bactérie :

- la possibilité de se multiplier liée à la présence de substrat et d'un potentiel d'oxydoréduction adaptés à ses exigences de croissance;
- la capacité de résider in situ, c'est-à-dire d'adhérer aux cellules ou au mucus pour éviter son expulsion (SAVAGE, 1984).

### **I.3.2.2. Mécanisme de l'adhésion :**

De nombreuses thèses s'affrontent quant à l'implantation éventuelle des microorganismes ingérés. Soit les bactéries ne font que transiter, soit elles colonisent l'intestin en adhérant à la paroi cellulaire et appartiennent alors à la flore sous-dominante.

Dans la plupart des cas, il existe, entre la bactérie et la cellule hôte, un interstice uniforme mesurant moins de 40 nm, rempli par du matériel fibrillaire (GUERINA et NEUTRA, 1984). La bactérie peut être encerclée complètement par la membrane du pôle apical de la cellule, ou seulement partiellement et parfois même, l'association a lieu sans pénétration.

Cette adhésivité est dépendante de trois éléments :

#### **I.3.2.2.1. les adhésines :**

Ces structures impliquées dans le processus d'attachement, rencontrées chez certaines bactéries, peuvent être :

##### - de nature protéique :

Ce sont soit des protéines externes de membrane, soit des structures individualisées comme les pili ou fimbriae des bactéries Gram - (COSTERTON et coll., 1981). Les pili peuvent se lier aux glycoprotéines et glycolipides de la membrane cellulaire de nombreux vertébrés (GUERINA et NEUTRA, 1984; SAVAGE, 1984).

Ces structures non protéiques pourraient être également des structures fibrillaires autres que les fimbriae. Elles furent décrites dans les processus d'adhésion en surface de *E. coli* entéropathogène (KNUTTON et coll., 1987).

Récemment, des éléments appelés fimbriosomes ont également été mis en évidence dans des souches de mutants hyperadhésifs. Les fimbriosomes sont des structures arrondies étroitement associées aux fimbriae (ABRAHAM et BEACHEY, 1988). Il n'a encore pas été déterminé si ces structures potentialisent l'effet des fimbriae ou agissent indépendamment.

##### - de nature non protéique :

Ce sont alors les polysaccharides de la capsule ou du slime. La fraction polysaccharidique de *B. infantis* intervient dans l'adhésion de cette bactérie aux cellules épithéliales de l'iléon, ou bien encore les Acides Lipo-Teichoïques (ALT) des bactéries Gram+ (SATO, 1982; CONTREPOIS, 1988).

De nombreuses études ont montré que les ALT des bactéries à Gram positif possèdent une grande affinité de fixation aux membranes des cellules épithéliales de mammifères (BEACHEY et coll., 1979, 1981; SIMPSON et coll., 1980; COURTNEY et coll., 1981).

La liaison se fait spontanément par l'intermédiaire de la fraction lipidique des ALT (COURTNEY et coll., 1981).

La liaison des ALT de bifidobactéries aux cellules épithéliales humaines en culture est dépendante de la concentration cellulaire et du temps et semble réversible. L'ALT se lie via les acides gras liés aux esters (OP DEN CAMP et coll., 1985).

Un phénomène important à souligner est la "variation de phase" qui permet à une bactérie de modifier sa surface et ainsi son pouvoir d'adhésion selon la phase dans laquelle elle se trouve. Ce phénomène est bien connu chez *E. coli* in vitro et in vivo (GUERINA et NEUTRA, 1984).

#### **I.3.2.2.2. les récepteurs des adhésines:**

Selon certains auteurs, le récepteur le plus probable sur la membrane des cellules de l'épithélium intestinal serait une protéine ou une glycoprotéine possédant des sites de fixation des acides gras (OP DEN CAMP et coll., 1985). Certains enzymes de la bordure en brosse de la membrane entérocytaire sont d'ailleurs des glycoprotéines.

Cependant, l'adhérence de *E. coli* aux cellules uroépithéliales et à des cellules humaines de côlon isolées se ferait par l'intermédiaire de glycolipides (les glycolipides représentent environ 20% des lipides membranaires de l'entérocyte) renfermant des résidus gal  $\alpha$  1-4 gal  $\beta$  ainsi que par l'intermédiaire de récepteurs sensibles au mannose qui pourraient être composés d'une ou plusieurs glycoprotéines (WADOLOWSKI et coll., 1988). Il apparaît que des récepteurs Gal  $\alpha$  1-4 Gal  $\beta$  sont effectivement distribués irrégulièrement parmi les cellules intestinales (KRIVAN, 1986).

Les récepteurs de surface piègent les bactéries dans les sécrétions du mucus.

#### Facteurs influençant la réceptivité membranaire :

La réceptivité membranaire des cellules-hôtes est fortement influencée par la maturation cellulaire (WALKER, 1985), l'âge de l'hôte (ABRAHAM et coll., 1985; DARFEUILLE, 1987) et la portion du tube digestif. Ceci est la conséquence de différences de structure et de composition des entérocytes de l'hôte, matures chez l'adulte et immatures chez le jeune (CHENEY et BOEDECKER, 1984).

Les différences rencontrées dans la composition de la flore intestinale chez le nourrisson, l'enfant et l'adulte seraient peut-être à rapprocher de cette évolution des récepteurs en fonction de l'âge.

Le type et la quantité de récepteurs glycolipidiques spécifiques sont également déterminés génétiquement (ITOH et coll., 1988).

### **I.3.2.2.3. le mucus :**

Il recouvre toute la muqueuse du tube digestif depuis l'estomac jusqu'au côlon et est constitué par une sorte de gel visqueux et élastique protecteur fait de glycoprotéines. Si sa fonction la plus évidente reste d'assurer une protection spécifique contre la pénétration bactérienne, sa présence est néanmoins indispensable dans les mécanismes d'adhésion bactérienne. CROUCHER et coll. (1983), par la microscopie électronique, ont d'ailleurs confirmé l'association étroite des bactéries avec la couche de mucus.

Le phénomène d'adhésion a lieu lorsqu'il existe une complémentarité entre l'adhésine et le récepteur membranaire, facilitée par le mucus.

### **I.3.2.3. Analyse de la flore adhérente:**

Comparée à la diversité de la flore intraluminaire, la flore adhérente à l'épithélium est généralement limitée à quelques espèces bactériennes. Les concentrations bactériennes sont généralement inférieures d'un ou deux log de 10 par rapport aux populations intraluminales. Si l'on prélève des biopsies du duodénum ou du jéjunum en différents points, la population bactérienne apparaît également distribuée le long d'un segment donné du tractus gastro-intestinal (JONES, 1977).

En dépit de la forte prédominance des bactéries anaérobies dans la partie basse du tractus gastro-intestinal, leur relation avec l'épithélium du côlon ou du rectum n'a pas été réellement étudiée. Seules les capacités d'adhésion des anaérobies facultatifs (par exemple les entérobactéries) ont été étudiées et peu d'études ont été développées à ce sujet. L'adhésion de *E. coli* et d'autres entérobactéries a été démontrée par microscopie électronique et par des cultures quantitatives de prélèvements de biopsies (HARTLEY et coll., 1979; BERGOGNE-BEREZIN et coll., 1986). La densité bactérienne varie de  $10^6$  à  $10^7$  cfu/gramme de tissu frais. Les espèces trouvées sont surtout *E. coli* ou *Klebsiella* et parfois *Bacteroides* et *Clostridia*.

L'examen en microscopie de biopsies de côlon a permis à HARTLEY et coll. (1979) de montrer que la même souche d'*E. coli* est étroitement associée à la paroi intestinale tout au long du côlon. Il semble que les bactéries accrochées à la paroi soient les mêmes que celles retrouvées dans la lumière intestinale.

#### **I.3.2.4. Adhésion des bifidobactéries :**

SATO et coll. (1982) ont mis en évidence le rôle des polysaccharides dans l'adhésion des bifidobactéries en inhibant ce phénomène par des anticorps dirigés contre les polysaccharides. La coloration de Gram devient négative chez les *Bifidobacterium* liés aux cellules. Ce phénomène rend compte d'une augmentation de la perméabilité membranaire de ces bactéries. Les liaisons permettant cette adhésion sont probablement fortes.

Les caractéristiques du complexe "cellule épithéliale du côlon humain-acides lipoteichoïques (ALT) de *B. bifidum* ont été étudiées par mesure de la radioactivité des ALT marqués au carbone 14 après interaction avec les colonocytes en suspension. Le récepteur le plus probable sur la membrane des colonocytes serait une protéine ou une glycoprotéine possédant des sites liant les acides gras (HUUB et coll., 1985).

L'adhésion des *Bifidobacterium* et plus spécialement les interactions hydrophobes seraient favorisées par un taux élevé d'acides gras dans les ALT entraînant une forte hydrophobicité de la bactérie. L'importante charge électrostatique des polysaccharides des bactéries à Gram positif favorise également l'adhésion (SAVAGE, 1984).

#### **I.3.2.5. Modifications de l'adhésion :**

Plusieurs études ont montré que certaines espèces bactériennes pouvaient modifier les sites récepteurs des cellules épithéliales, entraînant une inhibition de l'adhésion des microorganismes qui les utilisent. Ainsi, des enzymes extracellulaires de *Bifidobacterium* peuvent dégrader des sites spécifiques des germes pathogènes ou de leurs toxines (GUERINA et NEUTRA, 1984; SAVAGE, 1984; HOFSTAD et KALVENES, 1985). Ces enzymes, dont certaines seraient des glycosidases, dégraderaient les récepteurs, soit cellulaires, soit du mucus, éliminant en même temps les bactéries qui y étaient fixées (WALKER, 1985).

#### **I.3.2.6. Exemples de conséquences de l'adhésion :**

Ce phénomène d'adhésion permet la colonisation par les espèces bactériennes commensales ou bénéfiques mais également par des pathogènes qui seraient à l'origine de processus pathologiques. *Clostridium difficile*, par exemple, ne serait pathogène pour l'homme que s'il est étroitement associé à la paroi intestinale (BORRIELLO). La gravité des infections urinaires, également, est fonction de la facilité d'adhésion de *Escherichia coli* aux cellules uroépithéliales (MC NEISH et coll., 1975).

### **I.3.2.7. Moyens de contrer l'adhésion :**

L'hôte dispose de nombreux moyens pour contrer la stase bactérienne. La température, les mouvements péristaltiques, la motilité des villosités, le turn-over épithélial et la sécrétion de mucus ne facilitent pas l'adhésion. Le phénomène de desquamation fait que les cellules de la paroi du tube digestif desquament et s'éliminent. Elles le font avec leurs récepteurs et les bactéries qui y sont collées. Enfin, les aliments ingérés, en avançant le long du tube digestif, frottent la paroi cellulaire et décrochent les bactéries qui y sont agrippées.

### **I.3.3. LA FLORE INTESTINALE :**

La connaissance de la flore intestinale a évolué parallèlement aux méthodes d'étude tant pour le mode de prélèvement que pour l'analyse de la flore.

#### **I.3.3.1. Techniques d'évaluation :**

##### **I.3.3.1.1. Mode de prélèvement :**

Le classique recueil de selles ne permet l'étude que de la flore terminale du tube digestif. Des modes de prélèvement plus élaborés telles que la biopsie de muqueuse intestinale et le recueil de liquide d'aspiration luminale avec sonde de Camus, ou tube lesté, ont permis une exploration fine de toutes les portions du tube digestif.

##### **I.3.3.1.2. Dénombrement et identification :**

La flore dominante est constituée de microorganismes très anaérobies donc difficiles à isoler et à maintenir en survie. Les nouvelles techniques de prélèvement ainsi que la conception de milieux de culture plus adaptés aux différentes espèces permettent aujourd'hui une bonne approche directe de la connaissance de la flore bactérienne intestinale, par l'identification et le dénombrement des espèces prélevées.

L'importance et le rôle de la flore microbienne au sein de l'hôte peuvent également être appréciés de façon indirecte, par détermination des métabolites bactériens produits.

Le métabolisme intestinal peut être apprécié par différentes méthodes :

- la mesure de l'hydrogène expiré par un sujet après ingestion de lactulose :

La fermentation d'un substrat (le lactulose par exemple qui est un sucre non digéré par l'hôte) au niveau du côlon par les bactéries intestinales provoque la production de gaz, parmi lesquels figure l'hydrogène, extrêmement diffusible. Une partie de l'hydrogène ainsi formé traverse la paroi colique, passe dans la circulation sanguine et est excrétée dans l'air

Groupes bactériens	enfants âgés de 1 à 4 jours	enfants âgés de 5 à 90 jours	enfants âgés de 4 à 6 ans	adultes âgés de 20 à 64 ans	adultes âgés de 65 à 86 ans
Numération totale *	10,1	10,5	10,8	10,8	10,5
<u>Microorganismes aérobies</u>					
<u>stricts ou facultatifs :</u>					
Entérobactéries	9,3	8,8	8,0	8,2	7,8
Streptocoques	8,5	8,1	7,8	7,7	8,2
Lactobacilles	6,4	7,3	7,0	6,7	8,0
Staphylocoques	6,2	6,8	4,0	4,4	4,3
Levures	3,5	4,0	4,2	3,7	4,6
<u>Bactéries anaérobies :</u>					
<i>Bacteroides</i>	8,6	8,2	10,4	10,3	10,0
Eubactéries	0	9,7	9,9	9,9	9,5
Bifidobactéries	9,3	9,9	10,1	9,8	9,4
Peptocoques	0	9,0	8,1	8,9	7,7
<i>Clostridium perfringens</i>	5,9	6,9	5,7	4,8	6,6
Veillonellae	5,6	6,3	5,2	4,8	6,1

\* : log de c.f.u.

**Tableau 16** : Flore fécale de différents groupes humains (valeurs moyennes)  
(d'après MITSUOKA, 1984).

alvéolaire. Ceci est la base du test à l'hydrogène expiré (ou breath-test) dans l'étude des fermentations coliques;

- la mesure des activités de différents enzymes bactériens dans les prélèvements intestinaux ou dans les milieux de culture;

- la recherche des acides gras excrétés dans les selles. Le profil de chromatographie en phase gazeuse (CPG) des acides organiques reflète le métabolisme bactérien.

SALYERS (1989) a rapporté une nouvelle technique de numération d'une espèce donnée dans les selles proposée par KURITZA (1986) pour *Bacteroides*. Une mixture d'ADN bactérien isolé directement des selles est mise en contact avec une sonde marquée d'ADN spécifique de l'espèce à quantifier. Ainsi, les bactéries sont dénombrées sans culture. Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les bactéries viables des non viables et une vérification du pourcentage de bactéries vivantes reste à faire par la technique classique de culture sur boîte.

### **I.3.3.2. Composition :**

La flore intestinale d'un homme pèse environ 1 à 2 kilogrammes, soit à peu près le poids d'organes comme le foie, le cerveau ou les poumons. Le tube digestif abrite environ  $10^{14}$  bactéries, ce qui signifie qu'il y a plus d'entités vivantes dans la flore qu'il n'y a de cellules dans un organisme humain normal. La flore colique est quantitativement et qualitativement la plus abondante ( $10^{11}$  cellules par gramme de contenu intestinal) du tube digestif. Environ 10 à 30 % de la masse fécale est constituée par les bactéries (GOLDIN, 1986) qui se répartissent parmi 500 espèces. Les anaérobies sont 10 à 100 fois plus nombreuses que les aérobies et aéro-anaérobies.

Cette flore peut être divisée en deux catégories :

- la population dominante, constituée principalement par des bactéries anaérobies strictes (95%) et dont les effets sur l'hôte sont les plus anciennement connus.

- la population sous-dominante qui représente moins de 1% de la population bactérienne totale mais qui, selon des études récentes (HOSKINS et coll., 1985), jouerait un rôle non négligeable dans l'équilibre de l'écosystème intestinal.

De nombreux travaux ont été effectués pour définir la composition de la flore intestinale. Les principaux résultats, rassemblés dans le tableau 16, présentent quelques différences facilement expliquées par le choix des techniques de culture, des milieux d'isolement, des techniques de dénombrement mais surtout par la définition d'une flore adulte "normale". Globalement, la population la plus nombreuse est représentée, chez l'adulte, par les

	Estomac	Jéjunum	Iléon	Côlon
Concentrations microbiennes totales	0 - 10 <sup>3</sup> *	0 - 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>7</sup>	10 <sup>11</sup> - 10 <sup>12</sup>
<u>Microorganismes aérobies stricts ou facultatifs :</u>				
Entérobactéries	0 - 10 <sup>2</sup>	0 - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>10</sup>
Streptocoques	<b>0 - 10<sup>3</sup></b>	<b>0 - 10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>2</sup> - 10<sup>6</sup></b>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>10</sup>
Staphylocoques	0 - 10 <sup>2</sup>	0 - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>7</sup>
Lactobacilles	<b>0 - 10<sup>3</sup></b>	<b>0 - 10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>2</sup> - 10<sup>5</sup></b>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>10</sup>
Champignons	0 - 10 <sup>2</sup>	0 - 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>6</sup>
<u>Bactéries anaérobies :</u>				
<i>Bacteroides</i>	rare	0 - 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>6</sup>	<b>10<sup>10</sup> - 10<sup>12</sup></b>
Bifidobactéries	rare	0 - 10 <sup>3</sup>	<b>10<sup>3</sup> - 10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>8</sup> - 10<sup>12</sup></b>
Peptocoques	rare	0 - 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	<b>10<sup>8</sup> - 10<sup>12</sup></b>
Clostridies	rare	rare	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>11</sup>
Fusobactéries	rare	rare	rare	10 <sup>9</sup> - 10 <sup>10</sup>
Eubactéries	rare	rare	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	<b>10<sup>9</sup> - 10<sup>12</sup></b>
Veillonellae	rare	0 - 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>

\* : Nombre de microorganismes par millilitre de contenu intestinal.

**Tableau 17** : Composition de la flore gastrointestinale humaine  
(d'après MITSUOKA, 1984 et GOLDIN, 1986).

*Bacteroides* (environ  $10^{10,3}$  par gramme de fèces). Viennent immédiatement ensuite, par ordre décroissant, les eubactéries et les bifidobactéries, puis les peptococcaceae. Parmi les aéro-anaérobies, on retrouve les entérobactéries ( $10^{8,2}$ ), puis les streptocoques, les lactobacilles aérobies et enfin les staphylocoques ( $10^{4,4}$ ) (MITSUOKA, 1982).

### **I.3.3.3. Facteurs agissant sur la flore :**

#### **I.3.3.3.1. Facteurs assurant l'équilibre de la flore intestinale :**

La diversité des espèces bactériennes ainsi que leur quantité aux différents niveaux du tractus digestif peuvent être conservées grâce à des mécanismes de régulation physiques, chimiques et biologiques :

- le péristaltisme intestinal provoque l'élimination d'un nombre important de microorganismes. La colonisation du tube digestif ne peut donc être effective que si les bactéries se fixent sur la paroi intestinale.

- l'acidité de l'estomac maintient une faible concentration bactérienne dans la partie haute du tube digestif et détruit certains germes pathogènes.

- les interactions existant entre les différentes espèces bactériennes jouent également un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. On peut observer des symbioses entre espèces, par la production de vitamines, d'acides aminés ou d'autres métabolites assimilables par d'autres espèces, ou des antagonismes par la libération de molécules antibiotiques, de bactériocines agissant directement sur les autres cellules bactériennes, ou de facteurs agissant sur le milieu, tels que les acides gras volatiles toxiques par eux-mêmes, mais également par la diminution du pH sur les germes pathogènes.

#### **I.3.3.3.2. Localisation et physiologie :**

La composition de la flore intestinale diffère selon la vitesse du transit et les sécrétions luminales mais aussi selon le segment d'intestin (ABRAMS, 1980). Ainsi, à chaque portion du tractus correspond une flore résidente bien déterminée.

Les différents facteurs agissant le long du tractus digestif entraînent des variations qualitatives et quantitatives de la flore digestive (tableau 17). Ainsi, la flore présente dans le grêle proximal (duodénum et jéjunum) est constituée de microorganismes à Gram positif aérobies (streptocoques et staphylocoques) et de quelques champignons. Cette flore aéro-anaérobie fait ensuite place, au niveau de l'iléon, à une flore à gram négatif majoritaire comprenant des coliformes, des anaérobies tels que *Clostridium*, *Fusobacterium* et *Bacteroides* ( $10^6$  bactéries totales par ml) (MITSUOKA, 1982).

Ce passage d'une population dominante aérobie au niveau de l'estomac à anaérobie stricte dans le côlon peut s'expliquer si l'on admet que les bactéries aéro-anaérobies utilisent l'oxygène présent, créant ainsi les conditions rédox pour l'implantation des anaérobies en aval.

Il convient enfin de distinguer deux parties dans le côlon : (figure 10, page 51)

- le côlon ascendant qui abrite principalement des bactéries à gram positif dont le rôle majeur est la fermentation des sucres.

- le côlon descendant dont la flore dite de putréfaction est constituée majoritairement de bactéries à gram négatif mais également de quelques Gram + (*Clostridium*, *Bacteroides*).

Cette thèse classique associant une région du côlon à une fonction bactérienne, et par conséquent à des espèces particulièrement dominantes (ABRAMS, 1980) est remise en question par les travaux de CROUCHER et coll. (1983). En effet, leurs travaux sur des biopsies de côlon humain tendent à montrer qu'il n'existe pas de localisation précise de ces différentes espèces au niveau du côlon.

#### **I.3.3.3.3. Age :**

Stérile à la naissance, le tube digestif est rapidement colonisé. En deux jours, la flore microbienne est quantitativement équivalente à celle de l'adulte, bien que qualitativement très différente. Le problème de la colonisation initiale du tube digestif par les espèces aéro-anaérobies facultatives est le même que celui de la colonisation par les bifidobactéries, déjà souligné. Cette évolution de la flore est étroitement liée à la maturation du système digestif, soulignant encore l'importance du rapport réciproque hôte-bactéries.

Le régime alimentaire étant étroitement associé à l'âge du sujet, nous envisagerons l'influence, sur la flore, de ces deux facteurs, en parallèle.

#### **I.3.3.3.4. Régime alimentaire :**

L'examen bactériologique des fécès prouve que le régime alimentaire n'a que peu ou pas d'effet sur la constitution de la flore dominante intestinale (BERNIER; SIMON et GORBACH, 1986).

En revanche, le métabolisme bactérien est affecté par un changement de régime. En effet, une ingestion massive de lactulose est suivie d'une forte augmentation d'hydrogène expiré (mesuré par la technique du breath-test), celui-ci provenant de la fermentation de ce sucre par les bactéries coliques qui possèdent une hydrogénase. Ainsi, cet aliment non dégradé dans l'intestin grêle intervient sur le métabolisme de la flore intestinale du côlon.

#### **I.3.3.3.5. Autres facteurs :**

- sécrétion de mucus;
- système immunitaire de l'hôte;
- microorganismes exogènes;
- climat;
- régime alimentaire et médicaments;
- stress émotionnel (MITSUOKA, 1982).

#### **I.3.3.4. Rôle et effets de la flore intestinale :**

Les bactéries intestinales influent sur l'ensemble des bactéries de la flore intestinale. Certaines sont probiotiques, d'autres simplement commensales et d'autres encore, pathogènes. L'effet global de la flore microbienne sur l'hôte est généralement évalué par comparaison d'un animal axénique et d'un animal holoxénique dont la flore est normalement développée. C'est également cet outil qui se révèle être le meilleur moyen pour mettre en évidence les effets d'une espèce donnée, ou d'un petit groupe d'espèces, sur l'hôte, et les effets des espèces entre elles in vivo.

"Le tractus gastrointestinal est un écosystème complexe dont les caractéristiques dépendent à chaque instant d'un équilibre dynamique entre l'hôte et les bactéries autochtones" (ABRAMS, 1980).

##### **I.3.3.4.1. Action sur la physiologie de la paroi intestinale et dans la défense immunitaire :**

La flore intestinale modifie la morphologie de la muqueuse ainsi que la vitesse de renouvellement et la différenciation des cellules épithéliales. Elle permet également la maturation entérocytaire et le développement des villosités chez le nouveau-né (LUCKEY, 1965; COATES et FULLER, 1977; ABRAMS, 1980).

Chez l'animal axénique, SIMON et GORBACH (1986) notent une augmentation de l'activité des enzymes entérocytaires et en particulier la phosphatase alcaline, la disaccharidase et la  $\beta$ -glucosidase.

Tous ces travaux ont permis de révéler l'importance du rôle de la flore puisqu'elle conditionne l'absorption des nutriments et permet la formation de site écologique pour d'autres bactéries.

Un autre rôle important de la flore est son action dans la maturation cellulaire, observée par le développement normal des plaques de PEYER. Révélées d'abord par des études

histologiques de la paroi intestinale, ces observations ont été confirmées par la suite par de nombreux travaux qui ont montré que la résistance à divers agents pathogènes est conditionnée par l'existence d'une flore.

En effet, les bactéries intestinales assurent le maintien du statut immunitaire en exerçant des stimulations antigéniques répétées tout au long de la vie de l'homme.

#### **I.3.3.4.2. Les bactéries en tant que nutriment :**

La masse bactérienne de l'intestin constitue par elle-même une source importante de nutriments : thiamine, riboflavine, acide folique, vitamine B12, acide pantothénique, acides gras à chaîne courte, acides aminés et protéines qui sont partiellement absorbés et utilisés par l'hôte (RASIC, 1983; TERAGUCHI, 1984; DEGUCHI et coll., 1985).

#### **I.3.3.4.3. Effets métaboliques :**

Les microorganismes du tractus digestif possèdent une grande activité métabolique. Ils possèdent divers systèmes enzymatiques constitutifs ou inductibles, capables de nombreuses réactions métaboliques.

Chaque composé pris oralement, toute substance pénétrant dans l'intestin via le tractus biliaire ou le flux sanguin ou toute substance sécrétée dans la lumière intestinale est un substrat potentiel pour une transformation bactérienne (GOLDIN, 1986).

Les enzymes intestinaux clivent des composés alimentaires ou endogènes, y compris les acides aminés, les carbohydrates non digérés, les glucosides, les composés biliaires et produisent certaines vitamines.

La flore bactérienne produit une quantité très importante et diversifiée d'enzymes utilisés par elle-même mais également par l'hôte. Tous les domaines du métabolisme intestinal de l'hôte sont influencés par l'activité enzymatique des bactéries qu'il héberge, et plus particulièrement les bactéries anaérobies.

Nous citerons ici quelques exemples des effets du métabolisme bactérien sur l'hôte :

- a. Ces bactéries sont capables de compenser une carence enzymatique de l'hôte si elles sont introduites en nombre élevé dans le tube digestif. C'est le cas notamment des lactobacilles ingérés avec le yaourt qui peuvent exercer l'activité lactasique absente chez le sujet intolérant au lactose (DUCLUZEAU et RAIBAUD, 1979).

- b. Une autre action importante des bactéries intestinales est leur intervention dans le cycle entérohépatique et la détoxification de nombreuses substances et

médicaments (GOLDMAN, 1985). Ainsi, le cholestérol est transformé en coprostanol, les sels biliaires en acides biliaires puis en acide lithocholique et autres dérivés conjugués à des acides aminés, tels la glycine et la taurine facilitant leur détoxification et leur élimination (RASIC, 1983). ROWLAND et GRASSO (1975) ont étudié la dégradation des N-nitrosamines par la flore intestinale.

- c. Production de substances nuisibles :

A l'inverse, il est probable que certains microorganismes produisent des substances toxiques pour l'hôte, parmi lesquelles nous pouvons citer l'histamine, la tyramine, l'agmatine, la cadavérine, l'ammonium, les phénols, les N-nitrosamines et les toxines bactériennes.

**I.3.3.4.4. Action tumorale :**

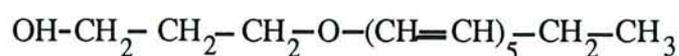
Le cancer du côlon est la deuxième cause de décès en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis. Il semble que 90% des cancers humains soient dus à l'environnement et pourraient donc être évités. De grandes différences ont été constatées en ce qui concerne le risque de cancer selon les pays mais il semble que ni le lieu de vie ni la race des habitants ne soit en cause mais que l'étiologie de la maladie soit plutôt à rapprocher du régime alimentaire (BORRIELLO). De nombreuses recherches sont effectuées pour identifier les agents cancérigènes.

Si un régime pauvre en fibres et riche en graisses animales semble favoriser l'apparition de cancer du côlon, aucun agent carcinogène directement actif n'a pu en être isolé. ARIES et coll. (1969) pensent donc que les carcinogènes seraient produits in situ, probablement par l'action enzymatique des bactéries de la flore digestive sur un substrat bénin procarcinogène provenant de l'alimentation. Il est raisonnable de penser que la flore intestinale pourrait produire ou potentialiser des carcinogènes ou procarcinogènes.

I.3.3.4.4.1. Composés carcinogènes :

Plusieurs composés sont soupçonnés de pouvoir carcinogène :

- VAN TASSEL et coll. (1982) ont isolé un mutagène dont la composition est la suivante:



Il est produit par cinq souches de *Bacteroides* couramment trouvées dans les selles humaines.

- Une corrélation a pu être établie entre les taux élevés de stéroïdes fécaux et en particulier la concentration fécale moyenne d'acide dihydroxycholannique et le cancer colorectal. Les bactéries capables de métaboliser ces stéroïdes en dérivés insaturés sont les Nuclear Dehydrogenating Clostridia (NDH Clostridia).

- D'autres substances ont été démontrées carcinogènes ou mutagènes, en particulier les produits du métabolisme microbien d'acides biliaires primaires et plus précisément les acides déoxycholique et lithocholique. Ce sont les NDH Clostridia qui seraient encore à l'origine de la transformation des acides biliaires primaires en acide lithocholique.

- Ces acides biliaires primaires ne sont pas les seules substances endogènes pouvant être métabolisées par les bactéries digestives en carcinogènes potentiels. D'autres substances peuvent servir de substrat à la production microbienne de carcinogènes : le cholestérol, le tryptophane, la méthionine et la tyrosine.

- Les N-nitrosamines sont des carcinogènes extrêmement puissants formées par la réaction d'amines secondaires avec des nitrites en milieu acide en présence de bactéries. La nitrosation peut se produire dans l'estomac des mammifères si les nitrites et les amines (ingérées sous forme de produits carnés dont les protéines sont transformées en amines par l'action des bactéries intestinales) sont présents (MIRVISH, 1970).

Les bactéries et les amines nitrosables sont présents dans le côlon. La présence de nitrite (ou de nitrate qui est facilement réduit en nitrite par une nitro-réductase bactérienne produite par la plupart des espèces microbiennes) dans le côlon est, par contre, plus difficile à prouver. En effet, chez l'homme, les nitrates alimentaires (apportés par les végétaux, l'eau et les additifs alimentaires) sont rapidement absorbés et excrétés dans l'urine. De plus, si une faible quantité de nitrate ou nitrite peut atteindre le côlon, il est probablement rapidement dégradé par les nitrate- et nitrite réductases bactériennes.

Par ailleurs, la N-nitrosamine est un procarcinogène qui doit être activé pour former le carcinogène aussi pouvons-nous penser que la N-nitrosamine serait formée à d'autres endroits du corps et qu'elle rejoindrait le côlon où elle serait alors activée. Quoiqu'il en soit, le lien entre le taux de nitrates alimentaires ou de nitrosamines et le cancer du côlon n'a pas pu être démontré formellement.

#### I.3.3.4.4.2. Enzymes :

De nombreux enzymes bactériens de la flore colique sont impliqués dans la production de mutagènes, carcinogènes et promoteurs de tumeurs :  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, nitroréductase, azoréductase, 7- $\alpha$ -stéroïde-déshydrogénase, cholestérol déshydrogénase et 7- $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydroxylase (WILKINS et VAN TASSEL, 1983; GOLDIN, 1986).

La plupart des enzymes bactériens sont inductibles et augmentent considérablement suite à une sollicitation prolongée par un substrat déterminé. Si ce substrat est un procarcinogène, il y aura augmentation de la production de dérivés carcinogènes. Ainsi, les régimes riches en viandes et en graisse, en augmentant l'activité des enzymes bactériens coliques, interviennent sur la transformation de procarcinogènes en produits carcinogènes.

La détermination, au sein d'une flore intestinale extrêmement complexe, des espèces bactériennes impliquées dans ces synthèses enzymatiques ou des espèces inhibant ces synthèses, ne fait que débiter. Les bactéries anaérobies seraient impliquées et plus particulièrement les *Bacteroides*. En effet, des études récentes montrent que la concentration des composés mutagènes augmente énormément après incubation des selles en anaérobiose, alors que leur maintien en aérobie n'entraîne pas de variation. Cette observation suggère que les fractions cancérigènes sont produites plus particulièrement par les bactéries anaérobies, une addition de *Bacteroides* à des selles augmentant notablement la quantité de ces composés.

#### **I.3.3.4.5. Effet de barrière anti-infectieuse vis-à-vis d'agents pathogènes :**

Il est aujourd'hui reconnu qu'il existe des interactions entre les différentes espèces de microorganismes (WILHELM et coll., 1987) et que la population microbienne du tractus gastro-intestinal forme une barrière contre la prolifération des pathogènes exogènes. Une des explications à ce phénomène pourrait être la colonisation de la flore endogène qui maintient les pathogènes à un niveau infra-clinique en prévenant la colonisation de la flore indésirable par compétition pour le substrat ou pour les sites d'attachement (récepteurs) à l'épithélium (SAVAGE, 1977).

La colonisation par la flore endogène paraît donc être un élément clé dans ce phénomène de barrière anti-infectieuse.

Les travaux de HOSKINS et coll. (1985) et de ROMOND (1987) menés chez la souris ont permis de mettre en évidence un rôle important de la flore intestinale dite sous-dominante. Il s'agit, dans certains cas, d'un phénomène de symbiose où une bactérie fabrique les nutriments dont l'autre a besoin pour sa croissance. Les bactéries de la flore sous-dominante produisent des enzymes extra-cellulaires qui agissent sur les substrats endogènes libérant ainsi de petites molécules qui pourront alors être assimilées par d'autres bactéries de la flore intestinale. Ainsi, les mucines synthétisées par l'hôte et non directement assimilables sont clivées par des enzymes de bactéries intestinales en petites molécules alors assimilables par les autres constituants de la flore intestinale. De cette façon, cette flore sous-dominante facilite la colonisation par les bactéries intestinales non pathogènes, jouant ainsi un rôle essentiel dans le maintien à un niveau élevé des populations bactériennes de la flore intestinale.

Ce rôle découvert récemment remet en question la théorie de l'effet de barrière anti-infectieuses proposée par DUCLUZEAU et RAIBAUD (1979), selon laquelle l'effet de barrière ne peut être observé que par des bactéries appartenant à la flore dominante et la pathogénicité ne prend effet qu'au delà d'un certain seuil de colonisation par des bactéries invasives. En fait, la flore sous-dominante utilise les substrats endogènes pour son propre métabolisme mais également pour la population dominante, empêchant ainsi la prolifération des bactéries pathogènes.

Une autre explication serait la libération, par certains microorganismes, dans leur environnement, de molécules pouvant empêcher l'adhésion d'autres germes ou la production d'agents bactériostatiques ou bactéricides (FAURE et coll., 1982; OKAMURA et coll., 1986). Les microorganismes intestinaux pourraient inhiber la croissance de pathogènes invasifs par la production d'acides organiques, particulièrement d'acides gras volatils à partir de carbohydrates, par la déconjugaison d'acides biliaires (et relarguer des acides biliaires libres plus inhibiteurs des bactéries pathogènes que leurs formes conjuguées) et par la production de bactériocines.

Le métabolisme bactérien peut également avoir un effet de barrière moins direct. En effet, les acides produits par les bactéries intestinales stimulent le système intestinal, ce qui entraîne une augmentation des mouvements péristaltiques. Ainsi, les matières de dégradation produites par les bactéries toxiques porteront moins atteinte à l'organisme.

### **I.3.4. LE YAOURT ET SON INFLUENCE SUR LA FLORE INTESTINALE :**

Selon la définition FAO-OMS de 1977, "Le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide, due à *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, du lait (...) avec ou sans addition (...). Les microorganismes du produit final doivent être viables et abondants".

Les ferments lactiques du yaourt ne font pas partie naturellement de la flore intestinale mais y transitent vivants lors de l'ingestion de yaourt (BIANCHI-SALVADORI et BRUGHERA, 1978; BIANCHI-SALVADORI, 1984). Les bactéries du yaourt ne s'installant pas dans le tube digestif, il est nécessaire d'avaler de façon continue ces bactéries vivantes pour observer un effet bénéfique (HITCHINS et MCDONOUGH, 1989) de leurs enzymes dans le tube digestif (RAIBAUD, 1983).

#### **I.3.4.1. Effet sur la composition de la flore intestinale :**

Durant le passage de bactéries lactiques lors de l'ingestion de yaourt chez des enfants, il se produit une augmentation de la flore lactique autochtone (BIANCHI-SALVADORI et BRUGHERA, 1978). Cette modification de la flore s'accompagne d'effets antimicrobiens vis-à-vis des bactéries à Gram négatif attribués à trois facteurs : l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les antibiotiques naturels synthétisés par ces microorganismes (FERNANDES et coll., 1987). Cependant, ces résultats ne permettent pas de lier l'effet clinique bénéfique à une action antibactérienne spécifique.

#### **I.3.4.2. Stimulation du système immunitaire :**

L'ingestion de yaourt entraîne également une stimulation du système immunitaire : des souris axéniques nourries avec du yaourt ont vu leur quantité d'immunoglobulines G augmenter, renforçant ainsi leur capital immunitaire. De plus, les lactobacilles ont transloqué à travers la paroi intestinale de ces animaux puisqu'ils sont retrouvés vivants dans les ganglions mésentériques (PERDIGON et coll., 1988; LEMMONIER, 1988).

#### **I.3.4.3. Effets métaboliques :**

**I.3.4.3.1 :** GOLDIN et GORBACH (1977) ont montré que l'ingestion par le rat de *Lactobacillus acidophilus* abaisse les quantités de  $\beta$ -glucuronidase, azoréductase et nitroréductase formées par la flore. *Lactobacillus acidophilus* s'est également montré actif dans la dégradation de nitrosamines (ROWLAND et GRASSO, 1975).

#### **I.3.4.3.2 : Suppression de l'intolérance au lactose :**

Le lactose ingéré lors de la prise de lait n'est assimilable que s'il est hydrolysé par deux enzymes de la muqueuse intestinale dont la principale est la  $\beta$ -galactosidase. Or une grande partie de la population mondiale adulte présente un déficit en cette enzyme. Chez ces personnes, le lactose non hydrolysé parvient dans le côlon où il est fermenté par la flore endogène, avec production d'acides organiques et de gaz (gaz carbonique, méthane et hydrogène).

Plusieurs travaux ont montré que des sujets déficients ne présentent aucune intolérance au yaourt (SYNDIFRAIS, 1987; LEMONNIER, 1988). Deux explications peuvent être avancées : soit l'activité  $\beta$ -galactosidase bactérienne persisterait dans l'intestin où une fraction du lactose présent pourrait être métabolisée soit l'ingestion de yaourt entraînerait une stimulation de la lactase intestinale encore active.

D'après DRIESSEN et DEBOERS (1989), la fermentation du lactose aurait lieu avant l'ingestion mais cette thèse n'est pas valable pour les laits fermentés. En fait, dans les laits fermentés, seule une partie du lactose du lait a été dégradée. Selon d'autres auteurs, la  $\beta$ -galactosidase intracellulaire est relâchée dans l'intestin (GILLILAND, 1989) durant la digestion des laits fermentés (SAVAINO et LEVITT, 1985) et agit sur la lactose.

Cependant, la  $\beta$ -galactosidase est affectée par la bile et son action *in vivo* est certainement de courte durée.

#### **I.3.4.3.3 : Effet hypocholestérolémique :**

Plusieurs travaux tendent à établir une relation entre la présence d'une microflore lactique et une diminution du cholestérol plasmatique chez les animaux (THAKUR et JHA, 1981; RAO et coll., 1981; GRUNEWALD, 1982; KIYOSAWA et coll., 1984) et les hommes (HARRISSON et PEAT, 1975; HEPNER et coll., 1979). HEPNER et coll. (1979), par exemple, ont observé une diminution du cholestérol sérique pendant la période d'ingestion de yaourt chez l'homme. FERNANDES et coll. (1987) ont mis en évidence, chez les animaux de laboratoire, qu'en supplémentant une ration alimentaire à haute teneur en cholestérol avec du yaourt, la cholestérolémie et la surface athéromateuse sont nulles à l'issue de l'expérimentation.

L'activité peut se manifester soit par assimilation du cholestérol par les cellules bactériennes, soit par accumulation de métabolites en état d'empêcher les processus qui mènent à la formation de cholestérol grâce à l'inhibition d'hydroxyméthyl-Co-A-réductase.

D'autres études n'ont pu prouver aucun effet hypocholestérolémiant (PAYENS et coll., 1976; HOWARD et MARKS, 1982; THOMPSON et coll., 1982; GRUNEWALD et MITCHELL, 1983; PULUSANI et RAO, 1983; MASSEY, 1984).

Selon certains auteurs, l'activité hypocholestérolémique serait présente également dans le lait non fermenté (THAKUR et JHA, 1981; THOMPSON et coll., 1982).

Ces différences seraient dues à des variabilités entre les souches étudiées et à la difficulté de mettre en évidence de faibles variations de cholestérolémie. FERNANDES et coll. (1987) ont rassemblé toutes ces hypothèses.

#### **I.3.4.4. Activité anticarcinogène :**

L'activité anticarcinogène des bactéries du yaourt peut être classée en trois catégories :

- élimination des procarcinogènes :

Certaines souches de *L. acidophilus* peuvent cliver les nitrites in vitro (DODDS et COLLINS-THOMPSON, 1985).

- modulation des enzymes procarcinogènes :

Certaines enzymes retrouvées dans les fécès ( $\beta$ -glucuronidase, azoréductase et nitroréductase) convertissent les procarcinogènes en carcinogènes. La connaissance des espèces bactériennes intestinales possédant ces enzymes pourrait permettre une étude plus approfondie du pouvoir antitumoral (GOLDIN et GORBACH, 1977; GOLDIN et coll., 1980; FERNANDES et coll., 1987)

- suppression des tumeurs par stimulation du système immunitaire :

Les bactéries du yaourt stimuleraient la production d'interféron par les lymphocytes humains (DE SIMONE et coll., 1986).

#### **I.3.5.RELATIONS BIFIDOBACTERIES-FLORE INTESTINALE. ROLE PROBIOTIQUE DES *BIFIDOBACTERIUM* :**

Au début du siècle, TISSIER (1923) constatait une relation étroite entre l'immunité de l'enfant au sein et sa flore spécifique. Depuis longtemps déjà, les bactéries lactiques et les bifidobactéries étaient reconnues comme des bactéries possédant des fonctions nutritionnelles, thérapeutiques et probiotiques, c'est-à-dire montrant la capacité intrinsèque d'agir positivement sur la santé de leur hôte.

Un effet probiotique ne peut avoir lieu que si les bifidobactéries survivent au passage de l'estomac. BERRADA et coll. (1989) ont établi que certaines souches de *Bifidobacterium* résistaient à l'acidité gastrique et que cette résistance était augmentée par le bol alimentaire. La production bactérienne d'acides organiques, en particulier d'acides lactique et acétique, de bactériocines et même d'antibiotiques, ainsi que la sécrétion d'enzymes, de vitamines et d'autres facteurs de croissance sont, avec la stimulation du système immunitaire et

l'accumulation de métabolites particuliers, les éléments déterminants de l'action probiotique.

Aujourd'hui, nous pouvons reconnaître aux bifidobactéries les fonctions suivantes :

#### **I.3.5.1. Pouvoir d'adhésion épithéliale dans différentes parties du tractus alimentaire :**

L'adhésion des bactéries lactiques et des bifidobactéries aux cellules épithéliales du tractus digestif permet la formation de véritables niches écologiques au sein desquelles la croissance des bactéries est préservée quelque soient les modifications de l'habitat, leur permettant ainsi d'exercer une véritable action. En effet, le biofilm de bactéries, fixé sur les parois épithéliales, maintient efficace le mécanisme de production sur place de différents métabolites bactériens, tels que : acides organiques, enzymes, vitamines ou bactériocines qui vont eux-mêmes avoir une action sur les autres genres bactériens et même sur l'hôte. De plus, il exerce une fonction de défense contre les bactéries pathogènes et limite les dégradations causées par la flore de putréfaction. L'équilibre de toute la flore intestinale est ainsi préservé.

#### **I.3.5.2. Action sur la morphologie et la physiologie de la paroi du tube digestif :**

Les bifidobactéries influent sur la maturation et le cycle de renouvellement de l'entérocyte et le développement des villosités intestinales (ABRAMS, 1980; SIMON et GORBACH, 1986). Elles interviennent également dans la dégradation et le renouvellement des mucines intestinales (SALYERS et coll., 1977; VERCELLOTTI et coll., 1977; MILLER et HOSKINS, 1981; HOSKINS et BOULDING, 1976, 1981; HOSKINS et coll., 1985). Enfin, elles possèdent une action sur le système immunitaire annexé au tube digestif.

#### **I.3.5.3. Effets nutritionnels :**

La production de vitamines (B1, B6, B9, B12 et PP) et d'acides aminés (alanine, valine, acide aspartique et thréonine) (RASIC, 1983; TERAGUCHI et coll., 1984; DEGUCHI et coll., 1985) confère aux *Bifidobacterium* un certain attrait nutritionnel qui est renforcé par le fait que ce genre ne produit que l'acide lactique L+ parfaitement métabolisable par l'homme.

#### **I.3.5.4. Effets métaboliques :**

##### **I.3.5.4.1 : Suppression de l'intolérance au lactose :**

Les bifidobactéries, contrairement aux *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont résistants aux sels biliaires (RAO et coll., 1989) et de ce fait, peuvent avoir une action sur le métabolisme du lactose.

##### **I.3.5.4.2 : Effet hypocholestérolémique :**

Plusieurs travaux tendent à établir une relation entre la présence d'une microflore lactique et une diminution du cholestérol plasmatique.

L'administration à des hommes hypercholestérolémiques, de laits fermentés avec des *Bifidobacterium* en très grandes quantités ( $10^9$  bactéries par gramme) entraîne une chute du cholestérol total de 3 à 1,5 g/l (HOMMA et coll., 1967). HOMMA (1988) confirme cette donnée chez le rat.

La consommation de produits laitiers fermentés pourrait conduire à une réduction du cholestérol sérique. Les bactéries produisant de l'acide lactique produisent de l'hydroxyméthylglutaryl-Co A réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol (MANN et SPOERRY, 1974). Plus récemment, RAO et coll. (1981) ont montré que les métabolites produits à partir de l'acide orotique durant la fermentation de produits fermentés pourrait être responsable de l'effet hypocholestérolémique. Les acides orotiques et hydroxyméthylglutariques diminuent le cholestérol sérique tandis que l'acide urique inhibe la synthèse de cholestérol (JASPERS et coll., 1984). In vitro, les bifidobactéries affectent apparemment l'activité de la HMG-CoA réductase (HOMMA, 1988).

Quoiqu'il en soit, la part à attribuer aux bifidobactéries est difficile à estimer et des travaux en cours sont menés pour démontrer l'implication des bifidobactéries dans la réduction du cholestérol.

##### **I.3.5.4.3 : Déconjugaison des acides biliaires, réduction des nitrosamines, inhibition de la réduction des nitrates :**

Les acides biliaires sont sécrétés dans le duodénum sous leur forme conjuguée avec la glycine ou la taurine. La plupart des souches du genre *Bifidobacterium* sont capables d'hydrolyser les taurocholate et glycocholate de sodium dans le côlon (FERRARI et coll., 1980). Les hydrolases impliquées sont constitutives et extracellulaires (RASIC, 1983).

#### **I.3.5.4.4 : Autres effets métaboliques :**

L'ingestion de lait fermenté à *Lactobacillus acidophilus* et *B. bifidum* durant trois semaines ne modifie pas la production d'hydrogène et de méthane ni les activités des  $\beta$ -galactosidases fécales mais augmente celle de la  $\beta$ -glucosidase fécale, ces quatre paramètres étant de bons indicateurs de la capacité fermentaire de la flore colique (MARTEAU et coll., 1990).

#### **I.3.5.5. Effet de barrière anti-infectieuse vis-à-vis des bactéries pathogènes :**

##### **I.3.5.5.1 : Observations :**

Depuis longtemps déjà, des relations étroites entre les actions probiotiques et thérapeutiques des bifidobactéries ont pu être mises en évidence mais peu de travaux ont été réalisés chez l'être humain :

- FAURE et coll. (1982) ont montré l'effet de barrière exercé par *B. longum* contre *Escherichia coli* chez le rat axénique. Ils ont constaté que l'implantation d'une souche de *E. coli* pathogène chez des rats axéniques entraîne 20% de mortalité chez ces animaux. L'administration de *B. longum* avant *E. coli* annule la mortalité mais si *B. longum* est donné après *E. coli*, plusieurs administrations sont nécessaires pour observer une baisse significative de la mortalité.

- Des souris axéniques mono-associées à *B. longum* vivent plus longtemps que des souris réellement axéniques après administration intraveineuse ou intragastrique de fortes doses de *E. coli* viables. Le nombre de *E. coli* vivants dans les organes 24 heures après l'injection est significativement plus faible chez les souris mono-associées à *B. longum* (YAMAZAKI et coll., 1982).

- La flore intestinale de leucémiques est modifiée par la chimiothérapie et des bactéries habituellement rares chez le sujet sain se multiplient considérablement. Ce déséquilibre de la microflore intestinale est contré par une administration orale de *Bifidobacterium* (KAGEYAMA et coll., 1984).

- Chez des nourrissons atteints de diarrhées à rotavirus, l'apport concomitant au traitement antibiotique de lait fermenté au *B. longum* entraîne une réduction du nombre de selles, du nombre de *Bacteroides* et une reprise de poids plus rapide comparée au traitement antibiotique seul (ROMOND, 1988).

### I.3.5.5.2 : Explications :

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cet effet probiotique :

- Prévention de la colonisation de l'intestin par les pathogènes par compétition pour les nutriments (ROMOND, 1987) et pour les sites d'attachement aux surfaces épithéliales (DUCLUZEAU et RAIBAUD, 1979; DUCLUZEAU et coll., 1980; RASIC, 1983; OKAMURA et coll., 1986).

- Production d'acides organiques lactique et acétique lors de la fermentation des hydrates de carbone par les bifidobactéries qui entraîne une diminution du pH de l'intestin et par conséquent, inhibe la croissance des bactéries indésirables (RASIC, 1983).

Plusieurs observations ont été faites dans ce sens :

L'implantation des bifidobactéries est favorisée, chez le nourrisson, par l'allaitement maternel. L'acidité permanente du contenu intestinal qui résulte du développement des bifidobactéries a un effet bactériostatique sur les *E. coli* et les bactéries Gram - (BULLEN et coll., 1977).

KNOCKE et HANNELORE (1984) ont étudié les interactions existant, in vitro, entre *B. adolescentis* et *Bacteroides ovatus*. Dans un milieu complexe renouvelé en continu, ils constatent que l'inhibition des *Bacteroides* par les bifidobactéries semble être due à la production de certains métabolites par ces dernières.

L'acidification a un pouvoir bactéricide surtout sur les bactéries Gram - . L'acide acétique possède un effet antagoniste plus fort contre les bactéries Gram - que l'acide lactique et il est produit en plus grande quantité par les *Bifidobacterium* (RASIC, 1983). Cette différence serait due plutôt à la quantité d'acide non dissocié qu'au type d'acide. En effet, le pK<sub>a</sub> de l'acide acétique est égal à 4,756 tandis que celui de l'acide lactique est de 3,860. 8,4% de l'acide acétique et 1,1% de l'acide lactique sont présents sous forme non dissociée à un pH intestinal de 5,8. Les acides acétique et lactique sont produits chez les bifidobactéries dans un rapport de 3/2, ce qui revient à environ 11 fois plus d'acide acétique non dissocié que d'acide lactique.

MAYER (1969) et SAVAGE (1977) affirment de plus que cette acidité stimule les mouvements péristaltiques de l'intestin, ce qui facilite l'élimination des germes pathogènes éventuellement présents.

- Inhibition des translocations bactériennes en faisant intervenir l'immunité cellulaire. YAMAZAKI et coll. (1985) ont étudié la capacité de translocation de *E. coli* chez la souris axénique. Une inoculation intragastrique de *E. coli* à des doses sublétales entraîne, quinze jours plus tard, une apparition de cette souche dans le foie, la rate, les reins et les poumons des animaux mono-associés. En revanche, l'implantation préalable de *B. longum* chez la souris axénique lui permet de survivre et produit la disparition de *E. coli* de tous les organes envahis en une semaine, alors qu'ils demeurent au niveau du côlon à un taux élevé. L'explication la plus probable à ce phénomène serait l'existence d'un renforcement des barrières immunologiques. *B. longum* serait capable d'agir aussi bien sur l'immunité humorale que sur l'immunité cellulaire (FAURE et coll., 1982).

- Antibiose par bactériocines et antibiotiques :  
Les bifidobactéries ne produisant pas de CO<sub>2</sub>, celui-ci ne peut être incriminé dans une activité antimicrobienne.  
L'activité antagoniste des bactéries lactiques et bifidobactéries envers d'autres bactéries peut être due à la production de différents métabolites : les bactériocines et les antibiotiques.  
Les bactériocines sont des molécules qui présentent une grande hétérogénéité et qui ne sont regroupables ni par leurs poids moléculaires, ni par leurs propriétés biochimiques, ni par leur mode d'action, ni par leur spectre d'activité.

TAGG et coll. (1976) ont établi les critères suivants pour définir une bactériocine :

- mode d'action bactéricide;
- partie biologiquement active de nature protéique;
- spectre d'activité étroit centré sur les espèces taxonomiquement proches;
- adsorption à des récepteurs spécifiques;
- nature plasmidique des déterminants de production et d'immunité.

En fait, TAGG propose de ne retenir que les deux premiers critères.

Deux caractéristiques différencient les bactériocines des antibiotiques :

Tout d'abord, les bactériocines, contrairement aux antibiotiques, ne sont pas des métabolites secondaires puisque leur synthèse s'effectue pendant la phase de croissance bactérienne. Mais surtout, la biosynthèse des bactériocines emprunte le système traductionnel classique ce qui n'est pas le cas des antibiotiques polypeptidiques.

La production de bactériocines par les bifidobactéries a été étudiée par MEGHROUS et coll. (1990) sur treize souches de *Bifidobacterium*. La substance antimicrobienne mise en évidence est de nature protéique, stable à la chaleur et active à pH compris entre 2 et 10 contre d'autres espèces Gram positif dont certaines souches de Clostridia.

### I.3.5.6. Effets thérapeutiques :

#### I.3.5.6.1. Action antitumorale :

Les recherches effectuées jusqu'à l'heure actuelle ont porté essentiellement sur l'action antitumorale directe ou indirecte des streptocoques, lactobacilles et bifidobactéries et a été étudiée surtout chez les animaux et rarement chez l'homme (GOLDIN et coll., 1980; GOLDIN et GORBACH, 1984) :

- MIZUTANI et MITSUOKA (1979) ont montré l'inhibition par effet direct de tumeurs du foie par *B. longum* chez la souris.

MIZUTANI et MITSUOKA (1979) ont effectué des travaux de prophylaxie tumorale chez la souris : à un lot de souris axéniques, ils inoculent *Cl. paraprutificum*, *S. faecalis* et *E. coli*. En une année, tous les animaux développent des nodules tumoraux à localisation hépatique. Si *B. longum* est ajouté aux trois espèces microbiennes précédentes, les souris ne présentent pas de tumeurs hépatiques. Il semblerait que *B. longum* soit capable de détruire les diphénylnitrosamines produites par les espèces précédentes.

- Chez la souris, *B. infantis* exerce un effet antitumoral indéniable (KOHWI, 1978).

- Le nombre de tumeurs développées par les souris dont la flore intestinale comprend *E. coli*, *Enterococcus faecalis* et *Clostridium paraprutificum* diminue considérablement si *Bifidobacterium* est présent (MITSUOKA, 1989).

- Après ingestion de lait fermenté contenant *B. bifidum* durant trois semaines, les concentrations fécales humaines d'azoréductase et de  $\beta$ -glucuronidase restent constantes, tandis que celle de nitroréductase diminue. Ces enzymes seraient impliquées dans les phénomènes de cancérisation du colon (MARTEAU et coll., 1990).

De nombreuses recherches (FERNANDES et SHAHANI, 1990) ont permis d'établir que l'action antitumorale peut être obtenue grâce à :

- la suppression directe des procarcinogènes :

Par ce moyen, les bifidobactéries réduisent de beaucoup la mutagénicité des nitrosamines (HOSONO et coll., 1990). *B. breve*, par exemple, possède une forte capacité d'absorption de carcinogènes produits au cours de la dégradation de la viande (MITSUOKA, 1989). TANAKA et coll. (1983) ont observé une diminution à la fois des carcinogènes excrétés et

des enzymes bactériens procarcinogènes chez la souris après administration de *B. breve* et de fructooligosaccharides.

- la réduction ou la suppression indirecte des procarcinogènes ou des enzymes bactériens qui conduisent à leur formation.

- l'activation du système immunitaire de l'hôte :

Des injections de fragments de membrane cellulaire de *B. infantis* dans des tumeurs induit une régression de celles-ci et une activation du système immunitaire (TOIDA et coll., 1990).

- la diminution du pH intestinal peut avoir un effet direct sur la formation de carcinogènes dans le côlon. En effet, la production d'acides acétique et lactique par les bifidobactéries s'oppose à la croissance des bactéries "putréfiantes", réduisant ainsi la production des oxydoréductases responsables de la formation de composés N-nitroso, de métabolites de stéroïdes biliaires et des autres carcinogènes potentiels du côlon (GOLDIN et coll., 1980; GOLDIN et GORBACH, 1984; MITSUOKA, 1982; HASHIMOTO, 1985; MIZOTA et coll., 1987).

De plus, les nitrosamines peuvent être synthétisées in vivo à partir d'amines secondaires et de nitrites, mais les lactiques et les bifidobactéries sont efficaces dans la réduction de ces composés (ROWLAND et GRASSO, 1975).

#### **I.3.5.6.2. Prévention et thérapie d'autres maladies :**

- En 1966, BAMBERG (1966) traite avec succès les troubles digestifs provoqués par l'antibiothérapie grâce à une culture lyophilisée de *B. longum*. HALLER et KRÄUBIG (1960), NEUMEISTER et SCHMIDT (1963) avaient obtenu le même résultat chez des sujets traités par des rayons.

- Des bifidobactéries ont été administrées avec succès à des prématurés dont la flore intestinale est perturbée après prise d'antibiotique (KOZLOVA, 1976).

- SEKI et coll. (1978) ont mis au point un traitement de la constipation des personnes âgées à base de *Bifidobacterium*. Ils constatent que le nombre de selles augmente alors significativement. L'examen de la flore fécale révèle une augmentation du nombre des bifidobactéries après arrêt de l'ingestion, augmentation qui se maintient plusieurs semaines après arrêt du traitement.

- COLOMBEL et coll. (1987) ont étudié sur des sujets soumis à différentes antibiothérapies, l'influence de la prise de lait fermenté au *B. longum*. Les patients n'absorbant aucun lait fermenté ou du yaourt classique présentaient des troubles digestifs non observés chez les patients ingérant du lait fermenté au *B. longum*. De plus, la prise d'antibiotique entraîne une forte diminution des bifidobactéries dans les selles sauf si elle est concomitante à une prise de B'A. Cette prise de B'A entraîne également une diminution des spores clostridiennes.
- EBISSAWA (1987) a réussi à régulariser le transit digestif de la femme enceinte (diminution des ballonnements abdominaux, des phénomènes diarrhéiques ou de la constipation) par l'ingestion de lait fermenté au *B. longum*.
- La flore intestinale et l'état de santé d'enfants atteints de diarrhées ont été rétablis plus rapidement après ingestion de lait fermenté à *B. breve* (HOTTA et coll., 1987).
- La prise d'un lait fermenté à *B. longum* (B'A) joue un rôle, non seulement de prévention chez le sujet sain en maintenant un taux élevé de bifidobactéries dans la flore et en prévenant diarrhées et constipation, mais aussi un rôle thérapeutique chez le malade atteint de diarrhées (ASSELIN, 1988).
- Les troubles intestinaux de trente quatre cosmonautes soviétiques ont été traités avec succès par la consommation de bifidobactéries (LIZKO, 1987).

Cette revue non exhaustive met en évidence que, dans tous les cas, le rôle bénéfique a été induit par des bifidobactéries d'origine humaine, et plus particulièrement *B. longum*.

## I.4. MUTANTS DE *BIFIDOBACTERIUM*

### I.4.1. MUTANTS OBTENUS CHEZ *BIFIDOBACTERIUM* :

Les seuls mutants de *Bifidobacterium* obtenus furent des mutants hyperproducteurs d'isoleucine de *Bifidobacterium ruminale* résistant à l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, obtenus par mutation à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (CROCIANI, 1977). Des mutants de *Bifidobacterium bifidum* auxotrophiques pour des acides aminés, bases pyrimidiques et vitamines ont été sélectionnés à la NTG (UEDA, 1983).

A notre connaissance, aucun mutant de *B. longum* n'est cité dans la littérature.

Plusieurs cribles de sélection peuvent être utilisés pour isoler des mutants. Nous citerons ici la résistance à des substrats toxiques et la résistance au Carbonyl Cyanide m-ChloroPhénylhydrazone (CCCP).

### I.4.2. UTILISATION DU CCCP :

Le Carbonyl Cyanide m-ChloroPhénylhydrazone (CCCP) est un découplant de la phosphorylation oxydative, empêchant la formation d'ATP. Des mutants de *Bacillus subtilis* (GUFFANTI et coll., 1987) et de *Bacillus megaterium* (DECKER et LANG, 1977) résistant à 5  $\mu$ M de CCCP ont été isolés. Certains mutants résistent à des concentrations de CCCP bien supérieures : 50  $\mu$ M (ITO, 1983) et même 250  $\mu$ M pour un mutant spontané de *E. coli* (SEDGWICK et coll., 1984).

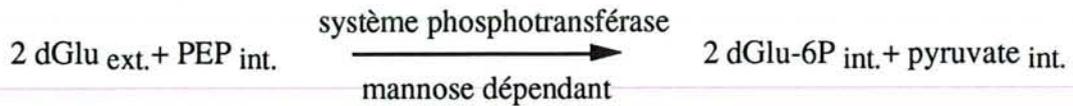
### I.4.3. UTILISATION DE SUBSTRATS SUICIDES :

Les substrats suicides sont des composés toxiques quand ils sont métabolisés par la cellule. Seuls les mutants ne possédant pas les enzymes nécessaires à la métabolisation du substrat survivent en sa présence et sont sélectionnés. Nous ne retiendrons dans ce chapitre que les composés pouvant être utilisés pour notre étude.

#### I.4.3.1. Analogue de sucre :

L'addition de 2-déoxy-D-glucose (2 dGlu) à des cultures de *Streptococcus lactis* 133 en phase exponentielle sur sucrose ou lactose, réduit le taux de croissance de 95%. Cette inhibition n'existe pas si le sucre de croissance est le glucose ou le mannose. Un mécanisme

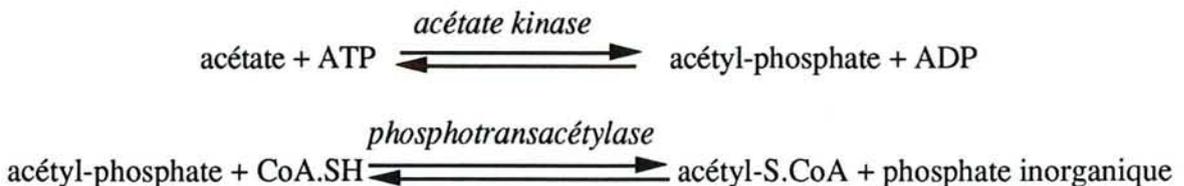
d'inhibition de la croissance par le 2 dGlu a été proposé : le 2 dGlu extérieur à la cellule (ext.) serait incorporé dans la cellule selon la réaction suivante :



Le phosphoénol pyruvate (PEP) présent à l'intérieur (int.) de la cellule étant ainsi utilisé dans cette réaction ne peut servir à la régénération de l'ATP via la pyruvate kinase et ce déficit en ATP est incompatible avec les besoins énergétiques nécessaires à une croissance normale. (THOMPSON et CHASSY, 1982).

#### I.4.3.2. Analogue de l'acétate de sodium :

BROWN et coll. (1977) et GUEST (1979) ont isolé des *Escherichia coli* résistant à 10 ou 50 mM de fluoroacétate de sodium. Ce sont des mutants de *Clostridium thermosaccharolyticum* déficients dans la production d'acétate que ROTHSTEIN (1986) a isolé. L'action de cet analogue chez les bactéries utilisant la voie de la glycolyse est simple : l'activation de l'acétate a lieu en deux étapes séparées catalysées par l'acétate kinase et la phosphotransacétylase.

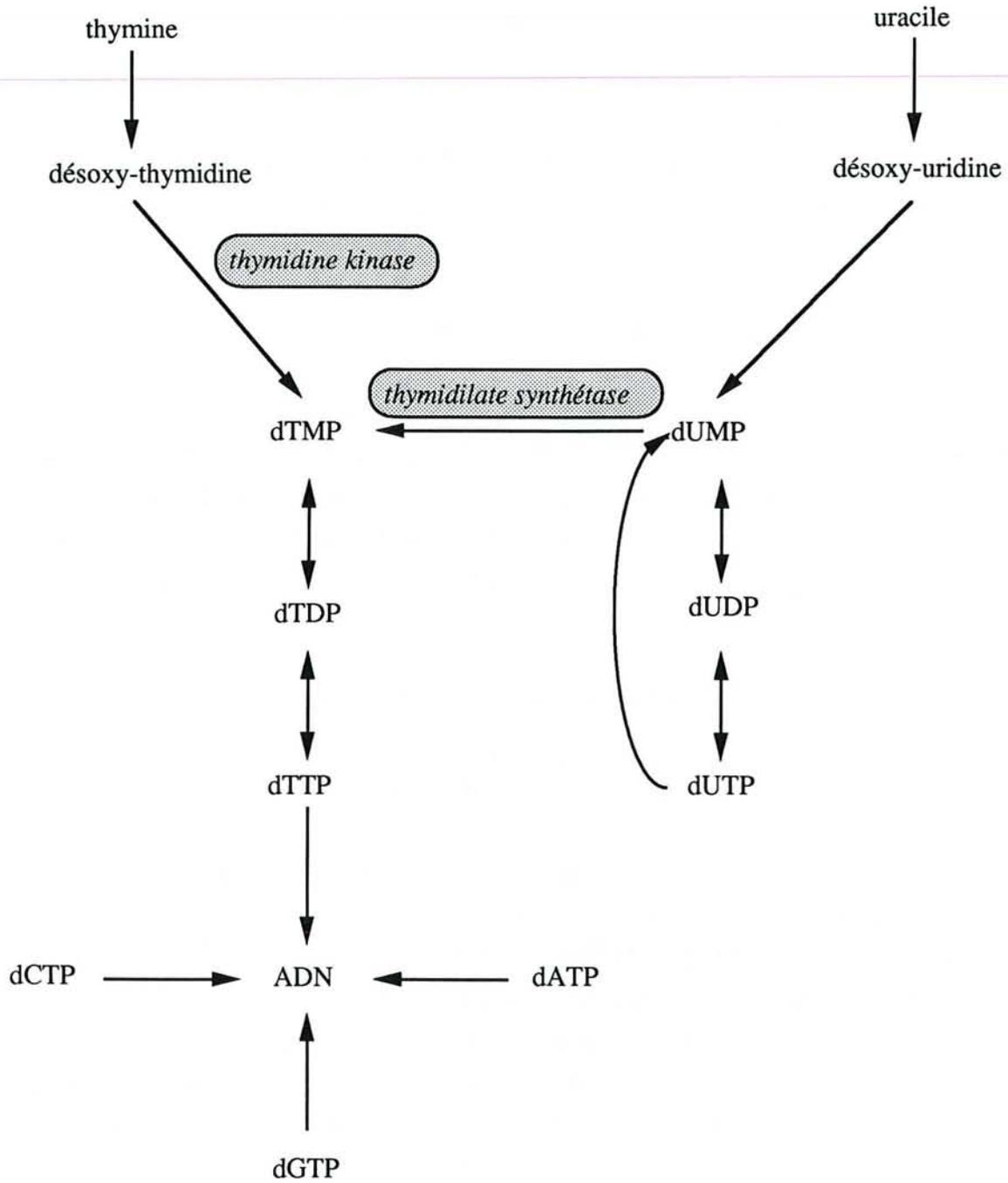


Ces deux étapes sont réversibles. Le fluoroacétate est létal lorsqu'il est métabolisé car il peut être converti en fluoroacétylphosphate et fluoroacétylcoenzyme A, et éventuellement en fluorocitrate, qui bloque le cycle de Krebs à l'étape de l'acide citrique en interférant avec l'aconitase (MAGER et coll., 1955; MARCUS et ELLIOT, 1959).

Le fluoroacétate est un très fort inhibiteur du métabolisme de l'acétate (KALNITSKY et GUZMAN BARRON, 1947). Seuls les mutants présentant des modifications dans le système affectant la prise de l'acétate sont tolérants au fluoroacétate (BROWN et coll., 1977). Nous pouvons nous demander quelle serait l'action de ce composé chez les *Bifidobacterium* au métabolisme si particulier.

#### I.4.3.3. Analogues de bases :

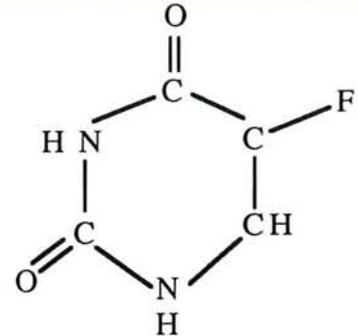
BISHOP et SUEOKA (1972) ont obtenu des mutants de *Bacillus subtilis* tolérants à 10 µg/ml de 5-bromouracile. Ce sont également des mutants de *Bacillus subtilis* que SAXILD et NYGAARD (1987) ont isolé, ils résistent à 2 µM de 2-fluoroadénine, à 0,5 µM de 8-azaguanine et à 2 µM de 8-azaxanthine. KNOX et HARRIS (1988) ont isolé des bactéries méthanogènes résistant au 5-fluorouracile, au 6-azauracile et à la 8-azaguanine.



**Figure 11** : Biosynthèse de la désoxy-thymidine triphosphate (dTTP).

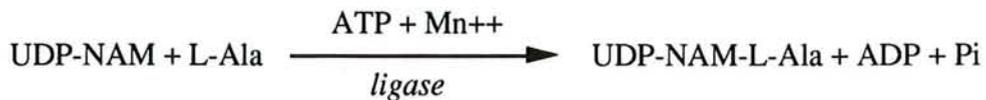
Une souche de *Methanobacterium thermoautotrophicum* résistant au 5-fluorouracile a été étudiée (NAGLE et coll., 1987).

Mode d'action du 5-fluorouracile (5FU) :

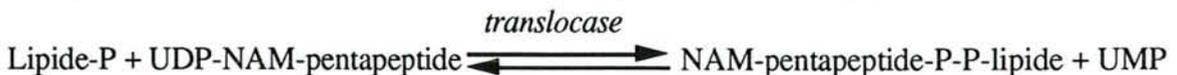


Le fluorouracile inhibe de façon irréversible la thymidilate synthétase (E.C. 2.1.1.45) : son analogie de structure avec la désoxyuridine monophosphate (dUMP) entraîne un blocage de la désoxythymidine monophosphate (dTMP), inhibant de ce fait la synthèse de l'ADN (figure 11). Récemment, TSUKAMOTO et KOJO (1991) ont confirmé cette action d'inactivation de la thymidilate synthétase par le 5-fluorouracile et ont démontré que ce composé inhibait également l'activité de la thymidine kinase (TK) (E.C. 2.7.1.21) mais par un mécanisme d'action certainement différent.

Mais l'incorporation dans les acides nucléiques n'est pas la seule réaction du 5FU. Il affecte également la synthèse de la paroi cellulaire et produit des sphéroplastes chez *Staphylococcus aureus* (TOMASZ et BOREK, 1960) en inhibant la formation du mucopeptide : la séquence normale de formation du mucopeptide de *Staphylococcus aureus* est la suivante :



De la même façon qu'a été additionnée l'alanine, les acides aminés suivants sont ajoutés : D-Glu, L-Lys, D-Ala, D-Ala, formant ainsi un pentapeptide. A l'étape suivante, la NAM-pentapeptide translocase introduit la moitié lipidique au NAM-pentapeptide.



Si *Staphylococcus aureus* a poussé en présence de 5-FU, celui-ci s'accumule dans la cellule car cet analogue agit comme compétiteur de la NAM-pentapeptide translocase (WORK, 1971).

Une mutation de résistance à un composé peut résulter de changements dans les gènes pour :

- le transport de ce composé;
- le site d'action;
- l'activation du composé en forme inhibitrice;
- rendre déficient un process d'activation entrainant une résistance à un analogue de métabolite.

## *OBJECTIFS*

Le premier lait fermenté au *Bifidobacterium* fut produit en 1986, en France, par Saint-Hubert Industrie Laitière, sous la marque B'A. Devant le succès de ce produit aux qualités organoleptiques nouvelles et agréables, de nombreuses autres sociétés ont ajouté des bifidobactéries aux *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dans leurs yaourts.

Mais qu'advient-il de ces produits lorsqu'ils sont ingérés par l'homme? Les conséquences de leur ingestion sur la santé devraient être aujourd'hui un critère déterminant dans le choix d'une souche par l'industriel. En effet, ce genre étant présent naturellement dans l'intestin humain à tous les âges de la vie, il est satisfaisant d'imaginer qu'une bactérie isolée chez l'homme puisse y jouer un rôle bénéfique.

Comme nous avons vu dans l'étude bibliographique précédente, plusieurs travaux ont déjà été entrepris qui montrent, au niveau microscopique, que l'ingestion de certains laits fermentés au *Bifidobacterium* par l'homme induit une augmentation du nombre des bifidobactéries dans les selles (ASSELIN, 1988). Parallèlement, au niveau clinique, la consommation de ces produits permet de prévenir ou de soigner des déséquilibres de la flore du tractus gastro-intestinal humain.

Cependant, il est important de souligner que toutes les espèces de *Bifidobacterium* ne possèdent pas des propriétés similaires, ne serait-ce que par leur origine écologique, ce qui entraîne des différences, non seulement au niveau organoleptique, mais également et surtout lorsque l'on s'intéresse à leurs qualités thérapeutiques. En effet, de nombreux produits ont été introduits sur le marché des laits fermentés mais leurs rôles probiotiques sur l'intestin humain sont controversés.

Saint-Hubert Industrie Laitière m'a demandé de montrer que le lait fermenté B'A se différencie des produits concurrents également présents sur le marché par le fait que la souche BB 536 qui entre dans sa composition est douée de propriétés probiotiques.

Notre premier travail a consisté à analyser quantitativement la flore de sept laits fermentés commercialisés, à isoler les souches de *Bifidobacterium* de ces produits et à identifier, à l'aide de techniques fiables, les espèces auxquelles elles appartiennent. En effet, *Bifidobacterium adolescentis* est une espèce pathogène qui a parfois été confondue avec d'autres espèces, qui peut l'être encore, mais qui ne doit en aucun cas entrer dans une fabrication. La législation française est encore très floue quant à l'utilisation des différentes espèces de *Bifidobacterium* dans les produits laitiers, c'est la raison pour laquelle l'étude d'une souche de *Bifidobacterium* isolée d'un produit commercial doit débiter par une identification précise d'espèce. A cette fin, nous avons dû adapter aux bifidobactéries les méthodes d'identification génétiques décrites dans la littérature pour d'autres genres.

Les conséquences de l'ingestion de laits fermentés avec différentes souches de *Bifidobacterium* sur la flore intestinale humaine ont ensuite été analysées et nous ont amené à axer la suite de nos travaux sur *B. longum* ATCC 15707 et BB 536. Des études physiologiques ont été réalisées sur plusieurs milieux de culture. Deux études cliniques nous ont permis de préciser les effets probiotiques de la souche BB 536 sur la flore intestinale humaine. L'étude et le suivi du comportement de cette souche dans le côlon a pu être réalisée grâce à la mise au point d'une méthode de marquage.

## *II. MATERIEL ET METHODES*

## II.1. LAITS FERMENTES ET SOUCHES ETUDIÉS :

### II.1.1. Lait fermentés étudiés :

Sept laits fermentés actuellement commercialisés ont fait l'objet de cette étude. Par souci d'homogénéité, et pour ne pas citer les marques de ces produits, nous les nommerons LF 1, LF 2, LF 3, LF 4, LF 5, LF 6 et LF 7.

Le lait fermenté LF 1, objet principal de notre étude, correspond à celui qui était fabriqué jusqu'en septembre 1991 par les laiteries Saint-Hubert sous la marque B'A. Ce produit est à l'origine du phénomène "bifidus" qui est apparu en France depuis 1986.

Le produit LF 4 correspond à une marque distributeur de B'A.

B'A est un lait fermenté au *Bifidobacterium* dont la composition est la suivante :

#### - Composition microbiologique :

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*;

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;

*Bifidobacterium longum* souche BB536.

#### - Composition physicochimique (en mg pour 100 grammes de produit) :

Sodium 42,00

Potassium 140,70

Calcium 176,50

Magnésium 8,6

Phosphate 133,2

Cuivre 0,07

Fer 0,07

Zinc 1,03

### II.1.2. Souches étudiées :

Les 11 souches de référence du genre *Bifidobacterium* utilisées pour nos études proviennent de la collection American Type Culture Collection (ATCC). Elles appartiennent à 4 espèces d'origine humaine et 3 espèces d'origine animale :

<i>B. bifidum</i>	ATCC 15696
	ATCC 29521
<i>B. longum</i>	ATCC 15707
	ATCC 15708
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697
	ATCC 25962
<i>B. breve</i>	ATCC 15698
	ATCC 15700

et

<i>B. pseudolongum</i>	ATCC 25526
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527
<i>B. thermophilum</i>	ATCC 25525

Les souches entrant dans la composition des laits fermentés LF 2 à LF 7 ont été nommées avec le même numéro de code que le produit dont elles ont été isolées.

Pour la souche du lait fermenté B'A, nous utiliserons la nomenclature déposée : BB 536.

## II.2. CHOIX D'UN MILIEU D'ISOLEMENT ET DE DENOMBREMENT POUR *BIFIDOBACTERIUM* :

Trois milieux gélosés ont été testés pour l'isolement et le dénombrement des bactéries du genre *Bifidobacterium* : le milieu BL agar, le milieu TPY et le milieu TPY modifié par BEERENS (BEERENS, 1990) (compositions en annexe).

Les échantillons suivants ont été testés :

- les sept laits fermentés commerciaux LF 1 à LF 7 choisis pour notre étude;
- des suspensions renfermant  $10^7$  à  $10^8$  cellules de cultures pures de *Bifidobacterium*
  - *B. bifidum* ATCC 29521
  - *B. longum* ATCC 15707
  - *B. longum* ATCC 15708
  - *B. infantis* ATCC 15697
  - *B. infantis* ATCC 25962
  - *B. breve* ATCC 15698
  - *B. pseudolongum* ATCC 25526
  - *B. animalis* ATCC 25527
  - *B. thermophilum* ATCC 25525;
- des suspensions renfermant  $10^7$  à  $10^8$  cellules de cultures pures de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

1 ml de produit est prélevé au coeur du pot (pour les laits fermentés) ou prélevé dans la suspension (pour les cultures pures) et, sans délai, des dilutions en série de raison 10 sont réalisées en milieu TS anaérobie (composition en annexe). 100 µl de chacune de ces dilutions sont étalés sur chacun des milieux. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C, pendant 48 heures, en jarre anaérobie équipée du système Gaspack (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) avec catalyseur au palladium ou en chambre anaérobie (10% H<sub>2</sub> et 90% N<sub>2</sub>). Après 4 jours d'incubation (temps préconisé par BEERENS, 1990), les différentes colonies sont identifiées par observation microscopique et dénombrées.

## **II.3. ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES BACTERIES DE LAITS FERMENTES :**

### **II.3.1. Isolement et dénombrement des *Streptococcus* et *Lactobacillus*:**

Les *Streptococcus* et *Lactobacillus* des sept laits fermentés sont isolés et dénombrés respectivement sur les milieux BHI et MRS acidifié dont la composition figure en annexe. Ces souches sont maintenues en culture sur lait autoclavé 15 minutes à 110°C puis conservées à - 80°C comme suit :

0,4 ml d'une culture poussée sur lait + 0,4 ml de lait + 0,8 ml de glycérol 20%.

### **II.3.2. Isolement et dénombrement des *Bifidobacterium* :**

B'A étant le seul produit commercialisé en pot imperméable à l'oxygène, ce qui permet une bonne survie des bactéries anaérobies, nous nous sommes contraints à travailler sur des échantillons jeunes pour tous les produits, soit au plus tard, 15 jours avant la date limite de consommation.

Des dilutions en série de raison 10 sont réalisées en milieu TS anaérobie à partir d'1 ml de lait fermenté. 100 µl de chacune de ces dilutions sont étalés sur milieu BL agar supplémenté en sang de cheval à raison de 50 ml par litre de milieu. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C, pendant 48 heures, en atmosphère anaérobie. Après incubation, les colonies couleur "ocre" sont dénombrées puis repiquées sur bouillon TPY.

Après 36 heures d'incubation, les souches sont purifiées par étalements en stries sur milieu BL agar (pour le maintien en culture des souches pures, la supplémentation en sang de cheval du milieu BL agar ne nous est pas apparue utile). Une seule colonie est alors récupérée et ensemencée sur milieu de Rosenow (composition en annexe). 36 heures plus tard, après vérification de l'appartenance au genre *Bifidobacterium* par coloration de Gram et présence de F6PPK (paragraphe II.4.1.2 page 85), ces tubes sont congelés et conservés à - 18°C.

Tous les essais de dénombrement sont effectués en double.

### **II.3.3. Isolement et dénombrement des *Bifidobacterium* de LF1 et LF4:**

Les isolements et numérations sont effectués selon le même protocole que pour les autres souches de bifidobactéries mais, la souche BB536 isolée de B'A et de LF 4 (marque distributeur de B'A) résistant à la pénicilline G, le milieu BL agar est additionné d'une solution de cet antibiotique, solution préparée par dilutions successives et stérilisée par filtration, à raison de 2 unités d'antibiotique pour 100 ml de milieu BL autoclavé. Les lactobacilles et les streptocoques susceptibles de se développer ne sont pas retrouvés sur ce milieu.

## **II.4. IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE *BIFIDOBACTERIUM* ISOLEES :**

### **II.4.1. Identification du genre *Bifidobacterium* :**

#### **II.4.1.1. Galeries API ZYM :**

Le protocole préconisé par le fabricant pour la mise en évidence d'une activité  $\alpha$ -galactosidase des *Bifidobacterium* a été respecté.

#### **II.4.1.2. Test de mise en évidence de la F6PPK :**

##### **Réactifs:**

- 1) tampon phosphate  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  0,05 M, pH 6,5 additionné de 500 mg de cystéine par litre;
- 2) une solution de fluorure de sodium 0,14 mM et d'iodoacétate de potassium ou de sodium 0,048 mM;
- 3) hydroxylamine HCl 2M neutralisée extemporanément avec NaOH 1M à pH 6,5;
- 4) 15% (p/v) d'acide trichloracétique (TCA) dans l'eau;
- 5) HCl 4M;
- 6) 5% (p/v) de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  dans HCl 0,1 M;
- 7) fructose-6-phosphate 0,2 M.

##### **Principe:**

L'acétyl phosphate provenant de l'action de la F6PPK sur le fructose-6-phosphate, réagit avec l'hydroxylamine-HCl pour former un acétyl hydroxamate qui, en se combinant avec le chlorure ferrique, prend une coloration rouge-violacée mise en évidence par un dosage spectrophotométrique à 505 nm (LIPMANN et TUTTLE, 1945).

**Méthode:**

Les cellules recueillies à partir de 10 ml de bouillon TPY sont lavées deux fois dans le tampon 1 et resuspendues dans 1,0 ml du même tampon. Elles sont ensuite cassées par sonication à froid et 0,25 ml de chacun des réactifs 2 et 7 sont ajoutés au sonicat. Après 30 mn d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée avec 1,5 ml de réactif 3. Après 10 mn à température ambiante, 1,0 ml de chacun des réactifs 4 et 5 sont additionnés. L'addition de 1,0 ml du réactif 6 permet le développement de la coloration. Toute couleur rouge-violacée qui se développe immédiatement est considérée comme positive.

Un tube sans fructose-6-phosphate sert de blanc pour faciliter la comparaison visuelle.

**II.4.2. Identification des espèces :**

Elle est effectuée par étude de la fermentation des sucres.

**Principe :**

L'acidification d'un milieu sucré, due à sa fermentation par la bactérie, est mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré présent dans le milieu.

Mitsuoka (1982) préconise d'étudier la fermentation des 25 sucres suivants : amidon, amygdaline, arabinose, cellobiose, dextrine, esculine, fructose, galactose,  $\alpha$ -méthylglucoside, glycogène, inositol, inuline, lactose, maltose, mannitol, mannose, mélézitose, mélibiose, raffinose, ribose, saccharose, salicine, sorbitol, tréhalose et xylose.

**Technique :****- Préparation du milieu :**

Le milieu de base est le milieu TPY privé de sucre mais additionné d'un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol à 0,04 g/l. 2,5 à 3 ml de ce milieu et 0,3 ml de solution à 5% de chaque sucre sont répartis dans de petits tubes stériles.

**- Préparation de la suspension bactérienne :**

10 ml d'une culture de 24 h sur milieu TPY lactosé sont centrifugés à 10000 g pendant 15 min. Le culot est lavé avec 10 ml de liquide de Ringer cystéiné régénéré. Après une nouvelle centrifugation, le culot est remis en suspension dans 10 ml de Ringer cystéiné régénéré. Les tubes de la galerie sont ensemencés avec 0,2 ml de cette suspension.

Les essais sont effectués en triple.

**- Lecture :**

Elle a lieu à 5 jours par appréciation de la couleur (virage si acidification) et à 9 jours par mesure du pH, par comparaison avec un témoin négatif sans sucre. L'identification se fait par référence à des tables indiquant le comportement des souches-type.

## II.5. IDENTIFICATION GENOTYPIQUE DES ESPECES :

### II.5.1. Extraction de l'ADN :

La composition des solutions utilisées est reportée en annexe.

Dans cette méthode adaptée à nos souches, les quantités de réactifs sont valables pour 2 à 3 grammes de cellules humides soit environ un litre de culture.

- Une culture en phase exponentielle de croissance est centrifugée 20 mn à 10000 g. Le culot est dissout dans 20 ml de tampon TE (Tris-EDTA). En complexant les ions  $Mg^{2+}$ , l'EDTA empêche toute dégradation de l'ADN par des nucléases. La suspension est centrifugée 20 mn à 10000 g.

- Le culot est dissout dans 10 ml de milieu Tris 50 mM + saccharose 25%.

- La paroi cellulaire est attaquée par 50 mg de lysozyme en solution dans du TE. Le mélange est incubé à l'étuve à 37°C avec une très légère agitation pendant 60 mn.

- La désintégration de la membrane cytoplasmique, l'inhibition de l'action des enzymes et la dénaturation de certaines protéines sont obtenues par l'action d'un détergent anionique : le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 25% qui est ajouté pour obtenir une solution à 2% final. Celle-ci est placée au bain-marie à 60°C pendant 10 mn.

- La digestion du lysozyme et des protéines membranaires et intracellulaires, principalement celles liées à l'ADN est le résultat de l'addition de 10 mg de protéinase K en solution dans 0,5 ml de tampon Tris 50 mM, pH 7,4, suivie d'une incubation à 37°C avec une légère agitation pendant au moins 1h30 (jusqu'à clarification).

- La lyse bactérienne est suivie d'extractions des protéines au phénol :

1 volume de lysat visqueux est mélangé à 1/2 volume de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et 1/2 volume de phénol saturé par Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Après 30 mn à température ambiante avec une légère agitation, le mélange est centrifugé 5 mn à 4000g.

L'émulsion qui en résulte se divise en trois couches : la phase inférieure renferme le mélange phénol/chloroforme et la phase intermédiaire blanche contient des protéines. La phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est aspirée.

Ces opérations sont répétées jusqu'à ce qu'il n'y ait pratiquement plus de protéines à l'interface.

- L'élimination du phénol est effectuée par dialyse du surnageant contre du TE pH 8,0 pendant environ 24 heures au froid.

- Traitement à la RNase :

50 µg de RNase préalablement portée 3 minutes à 100°C pour détruire les DNases, sont ajoutés par ml de lysat dialysé. Incubation 30 mn à 37°C.

- A nouveau déprotéinisation au phénol + chloroforme et dialyse des surnageants.

- L'ADN est purifié et concentré par précipitation à l'éthanol :

A 1 volume de contenu de sac à dialyse sont ajoutés 1/10<sup>ème</sup> de volume de chlorure de lithium (ou de sodium) 4M puis 2 volumes d'éthanol 95% froid. L'ADN situé à l'interface doit pouvoir s'enrouler autour d'une pipette Pasteur. Sinon, le mélange est mis à précipiter une nuit à -20°C puis centrifugé 20 mn à 10000 g. Le surnageant est éliminé, le culot séché sous vide 10 mn maximum puis repris avec 4 ml de TE pH 8,0 jusqu'à obtenir une solution homogène. L'ADN est conservé dans du TE à 4°C.

### **Contrôle de qualité de l'ADN :**

- Contrôle de la pureté par mesure des densités optiques à 230, 260 et 280 nm (MANIATIS, 1982) :

La concentration en ADN double brin de la solution mesurée exprimée en µg/ml est égale à 50 x DO 260. La contamination par les sucres est estimée par le rapport DO 260/DO 230 qui est égal à 2,2 pour l'ADN pur. Le rapport DO 260/DO 280 qui est égal à 1,8 pour l'ADN pur est significatif de la contamination par les protéines ou le phénol.

- Contrôle de la taille de l'ADN par migration en gel :

5 µl de solution d'ADN + 0,7 µl de tampon de charge (saccharose ou bleu de bromophénol) sont déposés par puits sur un gel d'agarose à 0,5%. Le témoin utilisé est le phage lambda coupé par Hind III. La plus petite bande se situe à 0,125 kb et la plus grande à 23,13 kb.

### **II.5.2. Hybridation ADN/ADN :**

Notre méthode est inspirée de celle de SCARDOVI et coll. (1970) et a été adaptée à nos souches et au matériel de notre laboratoire. L'ADN simple brin des souches de référence est fixé sur des filtres. Une sonde est réalisée par fragmentation d'ADN double brin des souches à tester puis marquage au <sup>32</sup>P. Après dénaturation, cette sonde est hybridée avec l'ADN fixé sur les filtres. Un comptage de la radioactivité fixée sur les filtres après lavage permet d'estimer l'homologie existant entre les ADN des souches à identifier et ceux des souches de référence. Le choix des souches de référence est donc capital.

La composition des solutions utilisées est reportée en annexe.

### II.5.2.1. Préparation des ADN et fixation sur les filtres :

#### - Préparation de l'ADN :

- Les ADN des souches de référence destinés à être fixés sur filtre sont conservés dans du tampon TE après l'extraction et ils doivent être repris dans du tampon 1xSSC : à 1 volume de solution d'ADN dans du TE est ajouté 1/10<sup>ème</sup> de volume de LiCl 4M puis, à 1 volume de mélange solution d'ADN + LiCl, sont ajoutés 2 volumes d'éthanol froid. Le mélange final est laissé à précipiter une nuit à -20°C puis centrifugé à 4°C pendant 30 mn à 10000 g. Le culot est lavé avec 10 ml d'éthanol 70% froid. Après une nouvelle centrifugation de 20 mn dans les mêmes conditions, le culot est séché sous vide puis dissout, éventuellement à 37°C avec une légère agitation, dans du tampon 1xSSC pour obtenir 160 µg d'ADN/ml. 160 µg étant la quantité d'ADN à fixer sur chaque filtre, nous préparerons ainsi 1 ml de solution d'ADN par souche de référence et par filtre.

- L'ADN en solution dans du tampon 1xSSC est dénaturé par ajout d'1 volume de NaOH 1M à 1 volume de solution d'ADN puis incubé 20 mn à température ambiante.

- La solution d'ADN simple brin ainsi obtenue est neutralisée par 8 volumes d'une solution tampon : NaCl 1M, HCl 1M, Tris 1M pH 8.

- La densité optique des solutions finales d'ADN est mesurée à 260 nm.

Les ADN seront conservés dans la glace pour éviter toute réhybridation.

Toutes les manipulations ultérieures se feront à 4°C avec du matériel froid.

#### - Préparation des filtres :

Nous utilisons des filtres de nitrocellulose 0,22 µ GSWP Millipore de 25 mm de diamètre dont la surface de filtration est de 2 cm<sup>2</sup>. Les membranes sont préincubées par immersion pendant 30 mn dans du tampon 2xSSC.

#### - Filtration :

- La membrane de nitrocellulose est placée sur un support filtre en verre froid. L'équivalent de 160 µg d'ADN par filtre est filtré à vitesse modérée (1ml/mn), dans une enceinte à 4°C.

- Le support filtre est rincé par ajout de 3 fois 3 ml de tampon 2xSSC froid. La DO à 260 nm des filtrats permet, par comparaison avec celle des solutions avant filtration, de calculer le poids d'ADN fixé par filtre et de vérifier que plus de 85% de l'ADN est fixé.

Cette opération est répétée autant de fois qu'il faut de filtres pour chaque ADN.

- Les filtres sont posés sur papier Whatmann et séchés à l'air à température ambiante une nuit, puis 2 à 4 heures à 80°C sous vide avant d'être stockés sous vide à 4°C.

### II.5.2.2. Marquage des sondes par nick-translation :

Pour des filtres bien chargés en ADN, soit environ 160 µg par filtre, un rapport de 1/100 est préconisé pour la quantité de sonde soit 1,6 µg par filtre. Une quantité de sonde trop importante entrainerait des risques de réhybridation sonde-sonde. Si les filtres ont retenu peu d'ADN (30 µg par filtre par exemple), la quantité de sonde est calculée dans un rapport pouvant aller jusqu'à 1/20 au lieu de 1/100. Sachant que lors de la purification de la sonde, 10 à 30% sont perdus, une quantité d'ADN plus importante sera marquée.

#### - Morcellement par US de l'ADN à marquer :

Les ADN double-brins sont fragmentés pour faciliter la recombinaison et éviter la formation de faux hybrides : La quantité de chaque ADN prévue pour la sonde est reprise avec du TE puis fragmentée aux ultra-sons 3 fois 15 secondes avec 15 secondes d'intervalle, à 50% d'intensité maximale.

#### - Reprise des ADN dans du TE :

A 1 volume de solution d'ADN est ajouté 1/10<sup>ème</sup> de volume de LiCl, puis à 1 volume de ce mélange, sont ajoutés 2 volumes d'éthanol 70% à +4°C. Après une nuit de précipitation, le mélange est centrifugé 15 mn à 10000 g. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% à +4°C. Une nouvelle centrifugation permet de récupérer un culot qui sera séché sous vide.

#### - Marquage des sondes par nick-translation :

Les réactifs suivants sont ajoutés successivement :

- 61 µl d'ADN dans du TE.
- 5 µl de dATP + 5 µl de dGTP + 5 µl de dTTP
- 10 µl de tampon
- 4 µl soit 27,5 µCi de (<sup>32</sup>P) dCTP à 400 Ci/mmol (élément limitant)
- 10 µl de mélange enzymatique (DNA-polymérase I et DNase I).

Après incubation à 15°C pendant 35 mn, la réaction est stoppée par ajout de 10 µl d'EDTA 0,2 M pH 8,0 et chauffage à 65°C pendant 10 mn.

#### - Purification de la sonde sur colonne de G 50 dans du tampon STE :

- Un tampon de laine de verre siliconné stérile est placé dans une seringue stérile de 1 ml dont on a enlevé le piston. La seringue est ensuite remplie avec une suspension de Séphadex G 50 dans du tampon STE, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- 3 minutes de centrifugation à faible vitesse dans une centrifugeuse à godets mobiles en plaçant la seringue dans un tube Corning conique permettent d'éliminer les bulles d'air.
- L'opération de remplissage par centrifugation est répétée jusqu'à ce que la seringue soit pleine.

- Le gel est rincé 2 fois en déposant 100 µl de tampon STE sur la colonne et en centrifugeant comme déjà décrit.

- Le tube conique est vidé et un eppendorf stérile dont on a coupé le couvercle est placé au fond de ce tube.

- La solution de sonde est chargée sur la seringue et centrifugée 3 mn.

- L'ADN est ainsi récupéré dans du tampon STE.

- 10% du volume en LiCl et 2 volumes d'éthanol sont ajoutés.

Après 2 heures à - 20°C, une centrifugation au froid permet d'écarter le surnageant (l'absence de radioactivité est contrôlée). Le culot est lavé avec de l'éthanol 70 % à 4°C. Une nouvelle centrifugation fournit un culot qui est repris dans de l'eau pyrodistillée.

- Comptage de la radioactivité pour estimation de la radioactivité spécifique (RAS) de la sonde sur une fraction aliquote de chaque ADN : 50 ng sont prélevés, ajustés à 0,5 ml final avec de l'eau et 10 ml de liquide scintillant PCS II sont ajoutés. Après une bonne homogénéisation, un comptage est effectué. La RAS doit être supérieure à 5000 cpm/µg.

- Témoins de comptage pour chaque sonde :

Ils serviront à ramener les comptages effectués dans différentes solutions à des valeurs qui auraient été obtenues dans l'eau.

- comptage dans l'eau (référence) :

10 µl de sonde dans l'eau + 0,5 ml d'eau + 10 ml de PCS II.

- comptage dans le tampon d'hybridation (mélange réactionnel) :

0,2 ml de tampon + 10 µl de sonde dans l'eau + 0,3 ml d'eau + 10 ml de PCS II.

- comptage dans le tampon de rinçage (2xSSC) :

0,5 ml de tampon + 10 µl de sonde dans l'eau + 10 ml de PCS II.

- comptage dans le mélange de dissolution du filtre :

1/4 de filtre dissout pendant 1 heure dans 0,5 ml de THF + 10 µl de sonde dans l'eau + 0,5 ml d'eau + 10 ml de PCS II.

### **II.5.2.3. Hybridation :**

- Les filtres contenant l'ADN sont découpés à l'emporte-pièce puis en 4 au scalpel stérile avant répartition dans les fioles stériles.

4 tests identiques seront donc réalisés pour chaque mesure.

- Les filtres sont préincubés avec 0,2 ml de mélange de Denhardt pendant 4 heures à la température d'hybridation : 33°C (saturation des sites aspécifiques).

La température d'hybridation est calculée d'après un tableau de correspondance entre le pourcentage en G+C et la température d'hybridation (OWEN et PITCHER, 1985). Le G+C% des souches de *Bifidobacterium* étudiées est de l'ordre de 58 à 60 %, ce qui correspond à une température d'hybridation de 78°C. Le mélange réactionnel comportant 50% de formamide, la température d'hybridation utilisée sera :  $78 - (50 \times 0,9) = 33^\circ\text{C}$ .

Remarque : Si la quantité d'ADN fixé sur le filtre est trop faible, nous incorporons de l'ADN de sperme de hareng au mélange de Denhardt à raison de 1,2 mg d'ADN de hareng pour 30 ml de Denhardt. L'ADN de hareng est préalablement dissout (1,2 mg dans 1ml d'eau), coupé par passage à travers une aiguille fine puis dénaturé par la chaleur (10 mn à 100°C) avant d'être incorporé au mélange de Denhardt. Nous évitons ainsi la fixation de la sonde sur des sites du filtre aptes à fixer l'ADN mais qui n'en auraient pas encore fixé.

- L'excès de mélange de Denhardt est éliminé puis remplacé par 200 µl de mélange réactionnel.

- La sonde est dénaturée à la chaleur (10 mn à 100°C) puis refroidie rapidement à la température de la glace fondante.

- 0,4 µg de sonde sont ajoutés dans les mélanges réactionnels correspondants.

- L'hybridation est réalisée pendant 20 heures à 33°C dans un bain-marie à agitation va et vient réglé à 25 oscillations/mn.

- Après hybridation, les mélanges réactionnels sont récupérés et un comptage de la radioactivité est effectué.

- Les filtres sont lavés 3 fois par ajout de tampon 2xSSC froid pour éliminer les hybridations non spécifiques. Les 2 premiers lavages au moins sont comptés.

- Les traces de formamide sont éliminées par séchage des filtres dans une étuve sous vide à 70°C. Les filtres sont ainsi prêts à la dissolution.

- Les filtres sont dissous pendant au moins 1 h dans 0,5 ml de THF.

0,5 ml de THF sont ajoutés à 10 ml de PCS II pour le comptage.

- Témoins pour évaluation du bruit de fond :

- 0,5 ml de 2xSSC;

- 0,5 ml de tampon d'hybridation;

- 0,5 ml de THF.

### II.5.3. Exploitation des résultats :

Soit : Rt : radioactivité totale

M : mélange réactionnel

L : 2 lavages

F : filtre

B : bruit de fond du mélange réactionnel + bruit de fond des lavages + bruit de fond du filtre (valeurs ramenées à celles dans l'eau),

nous calculons  $R_t = M + L + F - B$ .

Le pourcentage de radioactivité est égal à la radioactivité du filtre multipliée par 100 et divisée par la radioactivité totale. Une moyenne de ces pourcentages est effectuée sur les 4 essais. De cette moyenne des pourcentages est déduite la moyenne des pourcentages du témoin. Les hybridations hétérologues sont alors estimées en fixant l'hybridation homologue à 100%.

## II.6. PHYSIOLOGIE DE *B.LONGUM* ATCC 15707, BB 536, *B.ANIMALIS* ATCC 25527 ET *B.BIFIDUM* ATCC 29521 :

Nous avons jugé intéressant d'étudier le comportement de *B. animalis* ATCC 25527 et *B. bifidum* ATCC 29521 parallèlement à celui des deux souches sur lesquelles est centrée notre étude : *B. longum* ATCC 15707 et BB 536. En effet, *B. animalis* permet une comparaison de nos souches avec une souche d'origine animale. *B. bifidum* est étudié car cette espèce a fait l'objet de nombreux travaux, en particulier en ce qui concerne les milieux de culture chimiquement définis et elle nous servira de témoin. Ces quatre souches sont cultivées en milieu liquide en flacons de verre de 500 ml bouchés hermétiquement avec des bouchons en caoutchouc. Le milieu de culture est le milieu TPY additionné de lactose à 20g/l afin que la source carbonée ne soit pas limitante.

### II.6.1. Technique de culture en anaérobiose :

Les milieux sont portés à ébullition 20 minutes et soumis à un fort bullage d'azote. Les flacons sont ensuite fermés hermétiquement puis autoclavés. Les dernières traces d'oxygène sont éliminées dans la phase liquide et la phase gazeuse du flacon par courant d'azote stérile, avant refroidissement du milieu. Les précultures sont cultivées en jarre anaérobie et introduites dans les flacons à l'aide d'une seringue piquée à travers les bouchons en caoutchouc. Les prélèvements se font à la seringue et sont suivis d'un bullage d'azote stérile.

### II.6.2. Evaluation de la biomasse :

L'estimation de la biomasse au cours de la fermentation est effectuée par la mesure de l'absorption à 600 nm (spectrophotomètre Beckman 34) et du pH.

La relation entre l'absorption et le poids sec de la biomasse est établie : 10 ml de culture sont prélevés en phase exponentielle de croissance, centrifugés 20 minutes à 6000 g (Beckman J2-21) puis lavés deux fois. Le culot bactérien est séché dans une cupule tarée pendant quatre jours à 42°C. La masse bactérienne est alors déterminée par pesée et rapportée à la mesure d'absorption correspondante.

### II.6.3. Détermination des paramètres de croissance :

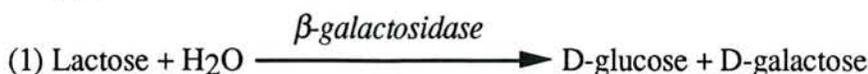
La vitesse de croissance spécifique maximale  $\mu_{\max}$  est déterminée à l'endroit où la courbe DO 600 nm en fonction du temps, exprimée en coordonnées semi-logarithmiques présente la pente la plus forte.

$\mu = dX / X \times dt$  où  $\mu$  est exprimé en  $h^{-1}$  et X représente la concentration en biomasse à l'instant t exprimée en g/l.

Le temps de génération T exprimé en heures est défini ainsi :  $T = \ln 2 / \mu$ .

### II.6.4. Dosage enzymatique du lactose résiduel et du galactose formé:

Principe : Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose en présence de  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) (1). Le D-galactose est oxydé par le nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) en acide galactonique en présence de  $\beta$ -galactose déshydrogénase (Gal-DH) (2).

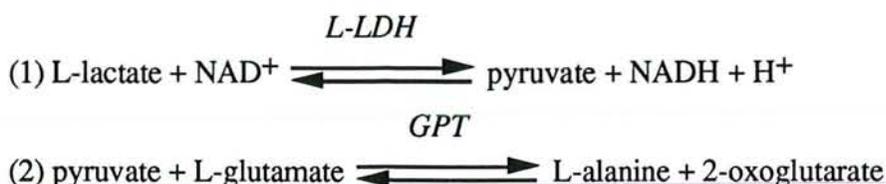


La quantité de NADH formé dans la réaction (2) est stœchiométriquement équivalente à la quantité de lactose et de D-galactose. L'apparition du NADH est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm.

Protocole : le mode opératoire suivi est celui préconisé par le fabricant du coffret (Boehringer 176303).

### II.6.5. Dosage enzymatique de l'acide lactique produit :

Principe : L'acide L-lactique est oxydé par le NADH en présence de L-lactate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.27) (L-LDH) et forme du pyruvate (1). Afin de favoriser la réaction dans le sens de l'oxydation, le pyruvate est piégé par du L-glutamate et il se forme, en présence de glutamate-pyruvate-transaminase (E.C. 2.6.1.2) (GPT) de la L-alanine et du 2-oxoglutarate (2).



La quantité de NADH formé dans la première réaction est proportionnelle à la quantité d'acide L-lactique présent dans l'essai et la détection est effectuée par spectrophotométrie à 340 nm.

Protocole : le mode opératoire suivi est celui préconisé par le fabricant du coffret (Boehringer 139084).

### II.6.6. Dosage de l'acide acétique produit :

La quantité d'acide acétique formé est évaluée par dosage en chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe (Intersmat IGC 121 FL) est muni d'une colonne en verre Pyrex de 2 mm de diamètre et 2 m de longueur dont le support est du Chromosorb 101 80-100 Mesh. La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme. Un intégrateur Intersmat ICR IB enregistre les impulsions produites. Le gaz vecteur est l'azote sous une pression de 1,8 bar. L'appareil est étalonné avec une solution qui contient l'acétate à 2,0 g/l et le butanol 1 qui est l'étalon interne.

1 ml de surnageant de culture est acidifié avec 50 µl d'HCL 6N contenant le butanol 1. Le volume injecté est 2 µl. Les concentrations en acétate sont calculées par rapport à l'aire du pic du butanol 1.

### II.6.7. Vitesses spécifiques de formation et de consommation de métabolites :

Si X représente la concentration en biomasse à l'instant t, exprimée en g/l;  
 $ac_1$  représente la concentration en acide acétique à l'instant  $t_1$ , exprimée en g/l;  
 $ac_2$  représente la concentration en acide acétique à l'instant  $t_2$ , exprimée en g/l;  
 $lac_1$  représente la concentration en acide lactique à l'instant  $t_1$ , exprimée en g/l;  
 $lac_2$  représente la concentration en acide lactique à l'instant  $t_2$ , exprimée en g/l;  
 $lactose_1$  représente la concentration en lactose à l'instant  $t_1$ , exprimée en g/l;  
 $lactose_2$  représente la concentration en lactose à l'instant  $t_2$ , exprimée en g/l;  
 $t = (t_2 - t_1) / 2$ ;

nous pouvons définir :

- vitesse spécifique de formation d'acide acétique :  $\pi_{ac} = (ac_2 - ac_1) / X (t_2 - t_1)$ .
- vitesse spécifique de formation d'acide lactique :  $\pi_{lac} = (lac_2 - lac_1) / X (t_2 - t_1)$
- vitesse spécifique de consommation de lactose :  $v_{lactose} = (lactose_2 - lactose_1) / X (t_2 - t_1)$

Ces vitesses spécifiques sont exprimées en g de métabolite / g de biomasse x h.

### **II.6.8. Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu tamponné :**

La croissance bactérienne pouvant être limitée par une diminution trop rapide du pH en milieu non régulé, le milieu TPY a été additionné successivement des deux tampons suivants : - un tampon acétate de sodium / acide acétique à 20 g/l qui agit à des valeurs de pH proches de 5,6;

- le tampon MOPS : acide 3-(N-Morpholino) PropaneSulfonique à 10 g/l qui agit à des valeurs de pH proches de 6,4.

## **II.7. RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE DE COMPOSITION CHIMIQUEMENT DEFINIE :**

Ce milieu nous permettra de définir un composé toxique pour les bactéries intestinales mais auquel résisteront des mutants de *B. longum*.

### **II.7.1. Techniques de culture :**

1 ml de culture en milieu de Rosenow est prélevé pour ensemer 9 ml de milieu TPY. Après 24 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, un contrôle de pureté des souches est effectué par examen microscopique de la culture et après étalement sur milieu BL agar.

Cette culture est alors centrifugée 10 minutes à 10000 g, le culot est lavé avec du milieu TS anaérobie puis repris dans 10 ml de milieu à tester. Cette suspension servira à effectuer des cultures en milieu liquide ou solide. Cette étape permet l'élimination de toute trace de milieu complexe et l'adaptation des souches à leurs nouveaux milieux.

#### II.7.1.1. Culture en milieu liquide :

1 ml de cette suspension sert à ensemer 9 ml de milieu à tester. Après 48 heures d'incubation à 37°C, les cultures de *B. longum* seront repiquées sur le même milieu. Des prélèvements seront effectués régulièrement tout au long de la croissance bactérienne. L'évolution de la biomasse est suivie par la mesure de la DO à 600 nm, la cinétique de l'acidification par celle du pH.

#### II.7.1.2. Culture en milieu solide :

Elle permet la description et le comptage des colonies. Des dilutions au dixième de la suspension précédemment réalisée, ajustée à une valeur de DO fixée, sont effectuées en milieu TS anaérobie jusqu'à  $10^{-8}$ . La culture initiale, ainsi que chaque dilution, servent à ensemer une boîte de milieu gélosé à tester ou témoin. Le développement bactérien est suivi par l'observation de la pousse des colonies sur les boîtes, leur taille et leur nombre.

Parallèlement, les mêmes souches sont cultivées dans les mêmes conditions mais sur milieu TPY ou BL agar, milieux riches qui serviront de témoin.

Nous avons effectué 4 essais par milieu.

### **II.7.2. Milieux de culture synthétiques :**

La composition des milieux de HASSINEN et coll. (1951), PETUELY (1956), GYLLENBERG et NIEMELÄ (1959) et UEDA et coll. (1983) figure en annexe.

### **II.7.3. Milieux de culture semi-synthétiques :**

La composition du milieu de TOMARELLI et coll. (1949b) figure en annexe. NORRIS et coll. (1950) ont apporté les modifications suivantes au milieu de Tomarelli :

acide ascorbique (vit. C)	2,0	g
cyanocobalamine (vit. B12)	0,020	mg
acide folique (vit. B9)	0,400	mg
pancréatine	0,400	g
tween 80	4	ml
pH 6,8.		

La modification effectuée par GYÖRGY et coll. (1954 a) sur le milieu de Tomarelli consiste à additionner du lait humain dégraissé.

## **II.8. ISOLEMENT DE MUTANTS :**

Les mutants étant destinés à la fabrication des laits fermentés qui seront testés sur des volontaires, nous avons été contraints d'abandonner les marquages de résistance aux antibiotiques et ceux faisant intervenir la radioactivité ou les manipulations génétiques. Nous nous sommes donc orientés vers la sélection de mutants naturels résistant à un composé toxique pour les autres bactéries de la flore intestinale.

### **II.8.1. Recherche de cribles de sélection :**

#### **II.8.1.1. Méthodologie d'utilisation du CCCP :**

$10^7$  cellules de chacune des souches-mères sontensemencées sur des boîtes de milieu Tomarelli dans lequel le glucose est remplacé par du DL-malate à 50 mM additionné de Carbonyl Cyanide m-ChloroPhénylhydrazone (CCCP) à des concentrations finales de 0, 1, 5, 10, 20 ou 50  $\mu$ M.

### **II.8.1.2. Etude de la toxicité du 2-désoxyglucose et du 2-désoxygalactose sur *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 :**

$10^3$  cellules de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sont étalées sur des boîtes de milieu Tomarelli contenant des concentrations en xylose ou mannose de 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 ou 2 g/l. Pour chacune de ces concentrations, six concentrations différentes de 2-désoxyglucose (2 dGlu) et de 2-désoxygalactose (2 dGal) ont été ajoutées : 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 ou 2 g/l.

Nous avons noté l'apparition ou non de colonies et leur taille.

### **II.8.1.3. Etude de la toxicité du fluoroacétate de sodium et des analogues de bases :**

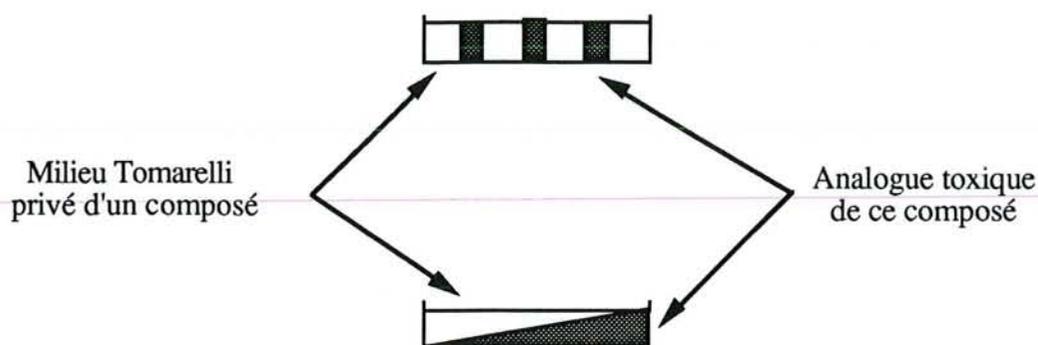
La démarche est légèrement différente de celle utilisée pour les analogues de sucre. Un des composés  $C_1$  du milieu de Tomarelli sera remplacé par un analogue toxique  $C_1^*$ . Sur ce nouveau milieu Tomarelli\*, *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 ne doivent pas se développer. Seuls des mutants résistant à  $C_1^*$  pousseront. Pour cela, il faut que le composé  $C_1$  ne soit pas indispensable à leur croissance, donc que les souches-mères se développent sur le milieu Tomarelli privé de ce composé  $C_1$ . Ainsi, si  $C_1$  est présent dans le milieu, il est utilisé par la bactérie mais en son absence, la cellule emprunte une autre voie métabolique et est capable de le synthétiser à partir d'autres éléments du milieu.

La méthodologie est la suivante :

#### II.8.1.3.1. Etude en milieu gélosé :

Elle débute par une vérification par culture que le composé  $C_1$  choisi pour être remplacé par un analogue  $C_1^*$  n'est pas indispensable à la croissance. *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 seront cultivés sur Tomarelli gélosé privé successivement de chacun des substrats toxiques à tester. Nous avons effectué ensuite une recherche, selon deux méthodes, de la concentration minimale d'analogue  $C_1^*$  capable d'inhiber totalement la croissance de la souche sauvage sur milieu gélosé :

- 1<sup>ère</sup> méthode : Le milieu de Tomarelli gélosé privé du composé  $C_1$  est coulé en boîte de Pétri. Une solution dense de bactéries est étalée sur ces boîtes. Des puits sont ensuite formés dans la gélose et remplis avec des solutions concentrées de substrat toxique  $C_1^*$ . Après incubation, nous observons à partir de quelle concentration d'analogue la souche ne se développe plus.



- 2<sup>ème</sup> méthode : Une solution d'analogue toxique  $C_1^*$  fortement concentrée et additionnée d'agar est coulée en boîte de Pétri inclinée afin d'établir un gradient de concentration. Après refroidissement, le milieu de Tomarelli gélosé privé du composé  $C_1$ , est coulé horizontalement. Une solution dense de bactéries est étalée sur ces boîtes.

#### II.8.1.3.2. Etude en milieu liquide :

Une technique similaire est appliquée en milieu liquide : le milieu de Tomarelli privé du composé  $C_1$  mais additionné de différentes concentrations d'analogue  $C_1^*$  estensemencé avec une suspension lavée de *B. longum* ATCC 15707 ou BB 536. La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm.

#### **II.8.1.4. Toxicité du 5 FU sur la flore intestinale :**

Des échantillons de fécès de 8 personnes ont été prélevés. Des dilutions décimales dans du milieu TS anaérobie de 1 gramme de fécès sont immédiatement réalisées. 100  $\mu$ l de chacune de ces suspensions servent àensemencer des boîtes de BL agar, PCA, gélose nutritive et Tomarelli sans FU (compositions en annexe) pour les milieux témoins et Tomarelli + FU 1 g/l pour le milieu test. Cet essai est effectué en double : la moitié des boîtes est incubée en aérobiose et l'autre moitié en anaérobiose.

### **II.8.2. Techniques d'obtention de mutants :**

#### **II.8.2.1. Mutation spontanée :**

Nous avons effectué les premiers essais en mutation spontanée.

##### II.8.2.1.1. Sur 2-désoxygalactose :

0,5 ml d'une culture en phase exponentielle de cellules sur bouillon Tomarelli additionné de 0,1 g/l de xylose sont additionnés à 15 ml du même milieu mais gélosé et à 45°C. Après refroidissement, des puits sont effectués dans la gélose et 100  $\mu$ l de 2 dGal à 0,5 g/l sont coulés dans ces puits.

#### II.8.2.1.2. Sur 6-azauracile et 5-fluorouracile :

100 µl d'une suspension lavée et dense de *B. longum* ATCC 15707 est étalée sur milieu Tomarelli additionné de 6 AU à 2 g/l ou de 5 FU à 1 g/l. La même manipulation est répétée sur milieu Tomarelli additionné de 6 AU à 3 g/l ou de 5 FU à 1 g/l avec BB 536. Ces concentrations sont choisies car ce sont les concentrations les plus faibles à partir desquelles la croissance des souches sauvages est inhibée.

Le mutant de *B. longum* ATCC 15707 obtenu sur 5 FU est appelé ATCC 15707 m.42.

#### **II.8.2.2. Mutation aux U.V. :**

5 ml d'une culture de BB 536 en bouillon Tomarelli sont prélevés en phase exponentielle de croissance, centrifugés puis resuspendus dans 1/2 volume d'eau stérile additionnée de MgSO<sub>4</sub> 0,1M. La suspension placée dans une boîte de Pétri en verre stérile à l'abri de la lumière du jour est soumise à un rayonnement de longueur d'onde d'environ 254 nm pendant 10 à 120 secondes. Une agitation très douce assure une exposition uniforme. Un aliquot est alors prélevé et traité comme décrit pour la mutation spontanée, mais à l'obscurité, pour la résistance soit au 2 dGal, soit au 6 AU ou au 5 FU.

Le taux de survie de BB 536 est apprécié après différents temps d'irradiation par comptage des cellules vivantes par étalement de 9 dilutions successives de raison 10 sur milieu riche BL agar. Les différentes valeurs obtenues nous permettent de tracer une courbe.

#### **II.8.2.3. Mutation avec l'E.M.S. :**

1 ml de culture de BB 536 en bouillon TPY en phase exponentielle est additionné de 20 µl d'Ethyl Méthane Sulfonate (EMS). Après 30 mn, 1h, 1h30, 2 ou 3 heures d'incubation à 37°C sous agitation, 9 ml de milieu sont ajoutés pour diluer l'EMS et obtenir ainsi un arrêt de l'action mutagène. Après centrifugation, le culot est repris dans 10 ml de milieu. L'incubation 24 heures en anaérobiose est suivie du prélèvement d'un aliquot qui sera traité comme décrit pour la mutation spontanée.

Une courbe de survie est également tracée.

Le mutant de BB 536 obtenu sur 5 FU est nommé BB 536 m.15.

#### **II.8.2.4. Calcul du taux de réversion :**

20 repiquages consécutifs des mutants obtenus sont effectués sur Tomarelli complet sans analogue toxique puis sur milieu Tomarelli additionné du substrat toxique à la concentration à laquelle le mutant est supposé résister. Une souche qui a perdu sa résistance est un révertant et ne sera pas retenue.

## **II.9. ETUDE DES SOUCHES MARQUEES ATCC 15707 M.42 ET BB 536 M.15:**

### **II.9.1. Recouvrement des mutants :**

#### **II.9.1.1. En mélange avec leurs souches-mères :**

##### - sur milieux témoins :

Des cultures de 24 heures sur milieu TPY des souches sauvages à tester (*B. longum* ATCC 15707 ou BB 536) et des mutants de ces souches (ATCC 15707 m. 42 et BB 536 m.15) sont centrifugées, lavées puis remises en suspension dans 10 ml de milieu TS anaérobie. Une solution mélange est réalisée par addition volume à volume d'un aliquot de chacune de ces suspensions. Afin de connaître la concentration bactérienne de ces 3 suspensions, des dilutions de chacune d'elles sont effectuées jusqu'à  $10^{-8}$  et 100  $\mu$ l sont étalés sur boîtes de milieu BL agar, PCA, GN et Tomarelli.

##### - sur milieux toxiques :

100  $\mu$ l de chacune des trois suspensions réalisées précédemment sont étalés sur boîtes de milieu Tomarelli privé d'uracile et additionné de 5 FU aux concentrations 1, 2, 3 ou 4 g/l.

Après 48 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, nous comparons le nombre de colonies obtenues sur les milieux témoins et sur le milieu toxiques.

#### **II.9.1.2. Recouvrement des mutants en mélange dans des selles :**

Des mélanges de dilutions de selles + dilutions de suspensions de mutants en différentes proportions sontensemencés sur milieu BL agar, PCA, GN et Tomarelli sans FU pour les milieux témoins et Tomarelli additionné de FU à 1, 2, 3 et 4 g/l pour le milieu test. Les dilutions sont effectuées de 1 à  $10^{-7}$ , tant pour les selles que pour les mutants et toutes les combinaisons possibles entre ces dilutions sont analysées.

Après 48 heures d'incubation, les colonies seront dénombrées sur ces différents milieux.

#### **II.9.2. Physiologie comparée des mutants et de leurs souches-mères :**

La croissance et l'évolution des produits de fermentation des mutants sont étudiées selon les mêmes techniques que pour les souches-mères (paragraphe II.6 page 93) puis comparées avec les résultats obtenus avec les souches d'origine.

### **II.9.3. Résistance de *B. longum* ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 aux antibiotiques :**

- Une première étude a été effectuée à l'aide de disques antibiotiques : 100 µl d'une culture en phase exponentielle de croissance sur milieu TPY de la souche à tester sont étalés sur une boîte de milieu BL agar. Des disques antibiotiques de l'Institut Pasteur sont ensuite déposés à la surface de ces boîtes. Après 48 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré.

- Les résultats ont ensuite été affinés pour quelques antibiotiques : Des solutions d'antibiotiques sont préparées, filtrées sur filtre Dynagard et introduites dans du milieu BL agar en surfusion de façon à obtenir les concentrations finales désirées. Après refroidissement du milieu, les souches à tester sont ensemencées en surface et incubées en anaérobiose 48 heures à 37°C.

## **II.10. FABRICATION DE LAITS FERMENTES :**

### **II.10.1. Suivi de l'acidification de *B. longum* ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 sur lait :**

Les essais ont été effectués sur lait et sur Starlait + Mix LB qui est un lait renfermant des facteurs de croissance.

Nous avons ensemencé, pour chaque souche, 10 ml de lait additionné ou non de facteurs de croissance. Après incubation, ce lait coagulé sert à ensemencer une série de 9 tubes de 10 ml par dilutions au dixième. L'incubation est effectuée en aérobiose pour respecter les conditions de fabrication pratiquées en usine. 400 ml de lait sont ensuite ensemencés avec le dernier tube coagulé de la série de dilutions et l'évolution du pH à 37°C est suivie.

### **II.10.2. Suivi de la flore de laits fermentés avec *B. longum* ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 m.42 ou BB 536 m.15 :**

Dse laits fermentés ont été fabriqués avec chacune de ces quatre souches. Nous avons utilisé les techniques décrites dans le paragraphe II.3 page 84 pour suivre la composition de leur flore.

Des dilutions de 1 à 10<sup>-7</sup> de 1 ml de chacun de ces laits fermentés sont étalées sur milieux MRS acidifié, BHI (compositions en annexe), BL agar + sang et Tomarelli + 5 FU 1g/l.

MRS acidifié et BHI sont incubés à 37°C en aérobiose tandis que BL agar + sang et Tomarelli + 5 FU sont mis en anaérobiose.

## II.11. ETUDES CLINIQUES :

### II.11.1. Analyse bactériologique des fécès :

Des dilutions de raison 10 ont été réalisées à partir d'un gramme de selles en milieu TS anaérobie. 100 µl de chaque dilution ont été étalés sur ou incorporés à un milieu de culture approprié au genre bactérien recherché puis incubés à 37°C en aérobie ou anaérobie selon le genre recherché.

Afin de minimiser les incertitudes inhérentes à la numération bactérienne, chaque dénombrement a été effectué trois fois.

#### II.11.1.1. Flore anaérobie totale :

Elle fut dénombrée sur milieux glucose blood liver (BL) et Eggerth-Gagnon (EG) agar après incubation en anaérobie (MITSUOKA, 1969a, 1969b).

#### II.11.1.2. *Bifidobacterium* totaux :

Leur dénombrement a été effectué sur milieu BL agar + sang de cheval comme décrit précédemment (chapitre II.3 page 84). Les deux mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 ont été isolés sur milieu Tomarelli supplémenté de 5 FU à 1 g/l.

#### II.11.1.3. *Clostridium* totaux :

Ce genre fut dénombré sur milieu sulfite-polymixine-sulfadiazine (SPS) (composition en annexe). Après autoclavage et refroidissement du milieu à 56°C, 5 ml de solutions de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  à 5% stérilisées par filtration, 10 ml de sulfate de colistine à 0,1%, 4 ml de rouge neutre à 1% et 50 ml de lait de vache entier stérile sont ajoutés. Ce milieu incubé 72 heures en anaérobie inhibe la croissance des *Bifidobacterium* et *Bacteroides* (DE VOS, 1982).

#### II.11.1.4. *Bacteroides* totaux :

Nous avons employé la technique décrite par MEVISSSEN-VERHAGE et coll. (1987). Le milieu de culture est un milieu Reinforced Clostridial Medium agar (composition en annexe) supplémenté de 0,5 % de glucose, 7,5 % de sang de cheval et 0,03 % de bleu de Chine (ferri-ferrocyanide). Ce milieu n'inhibe pas la croissance des anaérobies mais les *Bacteroides* sont facilement discernables puisque leurs colonies sont les seules à apparaître bleues et transparentes.

#### II.11.1.5. Flore coliforme totale :

La composition de la gélose mFC sur laquelle la flore coliforme totale a été dénombrée figure en annexe (LECLERC et MORIAMEZ, 1980).

#### II.11.2. Action de 3 laits fermentés commerciaux sur la flore intestinale humaine :

Ces études ont été approuvées par le Comité d'éthique local.

- **Les laits fermentés** : Nous avons choisi d'étudier l'action des 3 laits fermentés au *Bifidobacterium* les plus vendus en France : Il s'agit des produits LF 1, LF 2 et LF 3.

- **Les personnes volontaires** : Leurs effets probiotiques ont été suivis chez 48 volontaires, membres de notre Université, âgés de 22 à 44 ans et n'ayant présenté aucun trouble intestinal durant les deux mois précédant notre expérience.

- **Le protocole expérimental** : Il comprend 3 étapes :

- 1<sup>ère</sup> étape : période basale : 4 semaines :

Les sujets volontaires s'abstiennent de consommer tout lait fermenté. Durant les deux dernières semaines, une analyse bactériologique est effectuée sur les selles tous les 2 jours.

- 2<sup>ème</sup> étape : consommation de lait fermenté : 3 semaines :

Les 48 volontaires ont été divisés en quatre groupes : A, B, C et D.

Les volontaires des groupes A, B, C et D ont ingéré chaque jour 3 pots de 125 g de lait fermenté, à savoir respectivement du yaourt, les laits fermentés au *Bifidobacterium* LF 1, LF2 et LF 3.

La première ingestion de lait fermenté fut concomitante avec la consommation de poire utilisée comme marqueur de transit. Durant cette période, nous avons poursuivi les analyses de selles tous les deux jours.

- 3<sup>ème</sup> étape : 3 semaines :

Retour à l'étape 1 avec arrêt de la consommation de lait fermenté et poursuite de l'analyse des selles tous les deux jours.

#### II.11.3. Action de laits fermentés à différentes souches de *B. longum* sur la flore intestinale humaine :

- **Les laits fermentés** : 3 types de laits fermentés ont été fabriqués puis testés :

- (I) : Yaourt classique renfermant les ferments du yaourt : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

- (II) : Aux deux ferments classiques du yaourt, a été associée la souche *B. longum* ATCC 15707.

- (III) : Produit commercial LF 1 déjà étudié, contenant la souche BB 536.

- **Les volontaires** : 45 volontaires sélectionnés sur les mêmes critères que pour la précédente étude ont accepté de se prêter à cette expérience.

- **Le protocole expérimental** : Nous avons respecté celui utilisé lors de la première expérience.

#### **II.11.4. Action de laits fermentés à ATCC 15707 m.42 ou BB 536 m.15 sur la flore intestinale humaine :**

- **Les laits fermentés** : 2 types de laits fermentés supplémentaires ont été fabriqués puis testés :

- (IV) : Lait fermenté élaboré avec la souche ATCC 15707 m.42.

- (V) : Lait fermenté fabriqué avec la souche BB 536 m.15.

- La sélection des **volontaires** et le **protocole expérimental** restent identiques.

## **II.12. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE :**

### **II.12.1. Souches testées et milieux de culture :**

L'effet bactériostatique de BB 536, *B. longum* ATCC 15707, des souches industrielles 2 et 3 (*B. animalis*) et de *B. animalis* ATCC 25527 a été testé envers 13 souches appartenant à 6 genres différents retrouvés dans l'intestin humain :

<i>Streptocoques</i> mésophiles	: 4 souches provenant de notre collection
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	: 3 souches provenant de notre collection
<i>Clostridium butyricum</i>	: 1 souche provenant de l'Institut Pasteur
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	: 1 souche de collection CNRZ
<i>Clostridium perfringens</i>	: 1 souche provenant de notre collection
<i>Klebsiella oxytoca</i>	: 1 souche provenant de notre collection
<i>Serratia marcescens</i>	: 1 souche provenant de notre collection
<i>Escherichia coli</i>	: 1 souche provenant de notre collection.

Les souches de streptocoques et de lactobacilles ont été entretenues respectivement sur milieu ELLIKER (ELLIKER et coll., 1956) et milieu MRS (DE MAN et coll., 1960). Les clostridia ont été cultivées sur milieu Reinforced Clostridia Medium (RCM), *Escherichia coli* sur gélose nutritive et les entérobactéries sur milieu R2A (REASONER et GELDREICH, 1985).

Les compositions de ces milieux figurent en annexe.

### **II.12.2. Mise en évidence de l'action inhibitrice des souches testées :**

Nous avons utilisé la méthode des puits pour mettre en évidence l'activité inhibitrice des souches testées.

Après deux repiquages successifs de la souche cible sur milieu approprié, 10 µl d'une culture renfermant environ  $10^8$  cellules/ml sont coulés avec du milieu gélosé en surfusion additionné de Tween 20 à raison de 1% v/v afin de faciliter la diffusion dans l'agar (TRAMER et FOWLER, 1964). Après refroidissement, des puits sont creusés dans la gélose. 40µl de surnageant de culture de souche à tester prélevés en phase exponentielle, dilués au centième, ajustés à pH 7,0 puis stérilisés par filtration sont déposés dans les puits. Les boîtes de Pétri sont placées à 4°C pendant 6 heures pour permettre la diffusion des substances inhibitrices puis incubées à la température préconisée pour la souche cible. Des halos sans culture autour des puits sont les témoins d'une activité bactériostatique.

### **II.12.3. Effets de la chaleur :**

2 ml d'une préparation filtrée d'un surnageant de culture de souche à tester sont portés à ébullition pendant 15 ou 30 minutes puis refroidis avant que leur activité ne soit étudiée.

### **II.12.4. Effets des enzymes protéolytiques :**

La sensibilité des bactériocines aux enzymes protéolytiques est déterminée à l'aide de solutions d'enzymes (trypsine, pepsine et pronase) dans un tampon phosphate 4 mM, pH 7,0, à des concentrations de 1, 2 et 5 mg/ml. La préparation filtrée de bactériocine est additionnée d'un volume équivalent de solution d'enzyme, incubée 1 heure à 37°C, puis l'activité de cette solution est testée. Un témoin sans enzyme est traité de la même façon.

### **II.12.5. Effets de la catalase :**

Des solutions de catalase (Boehringer) à 1, 2 et 5 mg d'enzyme/ml sont préparées par dissolution dans un tampon phosphate 0,05M, pH 7,0 puis stérilisées par filtration.

### **II.12.6. Effets du pH :**

Le pH des filtrats est ajusté à 2,0 et 4,0 à l'aide d'acide phosphorique ainsi qu'à 7,0 et 10,0 avec NaOH 3N.

### *III. RESULTATS ET DISCUSSION*

### III.1. ETUDE DE BACTERIES ISOLEES DE LAITS FERMENTES COMMERCIAUX AU *BIFIDOBACTERIUM*

Sept laits fermentés au *Bifidobacterium* vendus en France ont été analysés. Les trois genres bactériens retrouvés dans ces laits fermentés ont été isolés et dénombrés dans chaque produit. Une identification d'espèce a ensuite été conduite sur les huit souches de *Bifidobacterium* ainsi isolées.

#### III.1.1. ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES BACTERIES :

La qualité et la fiabilité de ces travaux repose avant tout sur un choix judicieux et approprié des milieux d'isolement et de culture des différents genres bactériens.

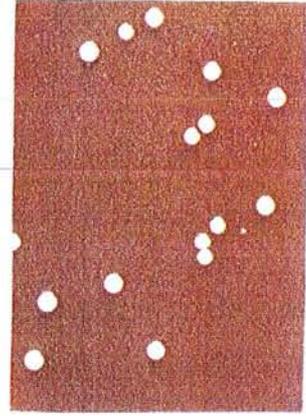
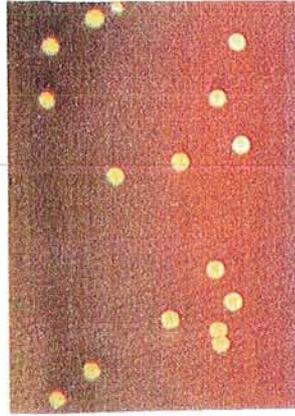
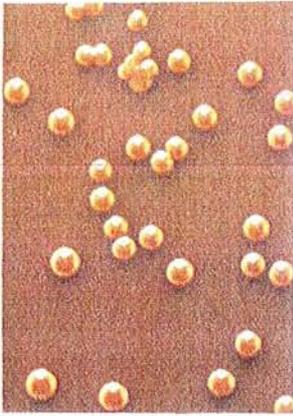
##### III.1.1.1. Choix des milieux d'isolement :

Les milieux BHI et MRS acidifié ont été choisis pour isoler respectivement les *Streptococcus* et *Lactobacillus* des sept laits fermentés à analyser.

Le choix fut plus délicat pour les *Bifidobacterium* puisqu'il n'existe aucun milieu réellement spécifique pour isoler et dénombrer ce genre bactérien au sein d'une flore complexe.

Nous avons néanmoins cherché un milieu sur lequel seuls les *Bifidobacterium* se développeraient. Nous avons sélectionné deux milieux riches et complexes afin de n'inhiber la croissance d'aucune espèce de *Bifidobacterium* : le milieu BL agar de MITSUOKA (1965), le milieu TPY de SCARDOVI (1986) ainsi qu'un nouveau milieu qui serait sélectif des *Bifidobacterium* : le milieu TPY modifié par BEERENS (1990). Des dénombrements ont été effectués sur ces trois milieux gélosés à partir de sept laits fermentés et de onze suspensions bactériennes de souches pures (tableau 18).

Les milieux BL agar et TPY permettent la croissance, dans les mêmes proportions, de toutes les espèces de *Bifidobacterium* testées qu'ils soient isolés de laits fermentés ou issus de suspensions de souches pures. En revanche, le milieu de BEERENS fournit, par rapport au dénombrement sur milieu BL agar ou TPY, une erreur par défaut d'environ 1 ou 2 log<sub>10</sub> par millilitre de produit à analyser. De plus, certaines souches de certaines espèces (par exemple *B. longum* et *B. infantis* pour lesquels nous observons une erreur par défaut de 4 à 6 log<sub>10</sub>) se développent très mal sur ce milieu, rendant celui-ci inutilisable pour le dénombrement. Un autre inconvénient majeur de ce milieu est qu'il permet la croissance d'un certain nombre de lactobacilles et de streptocoques. Ce milieu n'est donc pas totalement sélectif.

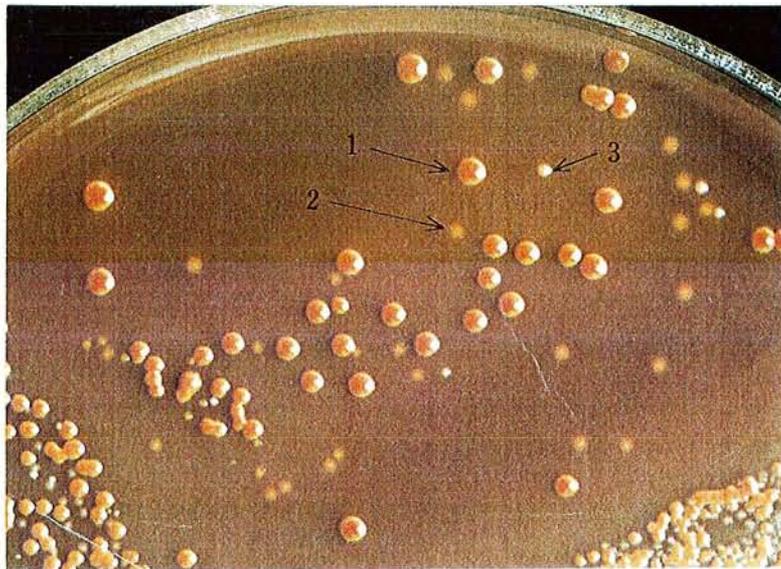


1 : *Bifidobacterium longum*

2 : *Lactobacillus delbrueckii*  
subsp. *bulgaricus*

3 : *Streptococcus salivarius*  
subsp. *thermophilus*

**Photo 1** : colonies obtenues à partir de cultures pures après 48 heures d'incubation à 37°C sur milieu BL agar plus sang de cheval ( x 1, 8 ).



1 : *Bifidobacterium longum*

2 : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

3 : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

**Photo 2** : colonies obtenues à partir du lait fermenté B'A sur milieu BL agar + sang de cheval après 48 heures d'incubation à 37°C ( x 1, 8 ).

De la même façon, si les milieux BL et TPY n'inhibent aucun *Bifidobacterium*, ils ont l'inconvénient de permettre également le développement des *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* présents dans les laits fermentés sans possibilité de différencier les colonies des différentes espèces. OCHI et coll. (1964) proposent de supplémenter le milieu BL agar de 50 ml de sang de cheval par litre de milieu. Les colonies de bifidobactéries prenant alors une couleur "ocre", il est facile de les isoler et de les dénombrer (photos 1 et 2). Ce milieu non sélectif nous permettra donc de dénombrer ce genre bactérien.

Une autre possibilité s'offre à nous : supplémenter le milieu BL agar en antibiotiques afin d'augmenter sa sélectivité mais cette démarche nous est apparue trop imprudente car les espèces et les souches de *Bifidobacterium* à isoler nous étant inconnues, nous risquons d'inhiber leur croissance.

Nous avons pourtant testé l'action de la pénicilline G : Les sept laits fermentés ont étéensemencés sur milieu BL agar supplémenté en pénicilline G. Aucune colonie n'est apparue sur les boîtesensemencées avec les laits fermentés LF 2, LF 3, LF 5, LF 6 et LF 7. Sur les boîtesensemencées avec les produits LF 1 et LF 4, un seul type de colonie s'est développé. Ces bactéries seront identifiées, par observation de leur morphologie et test à la F6PPK (paragraphe III.1.2.1 page 110), comme appartenant au genre *Bifidobacterium*.

Ce milieu semble donc sélectif de cette souche de bifidobactérie, mais n'inhibe-t-il pas la croissance d'une partie de ces bactéries?

Une numération comparée des bifidobactéries des produits LF 1 et LF 4 sur milieux BL agar + sang de cheval et BL agar + pénicilline G est alors effectuée : 5 échantillons de produits LF 1 et LF 4 ont été analysés et les résultats des numérations des bifidobactéries sont les suivants :

LF 1 lot :	BL + sang	BL + pénicilline	$\frac{\text{BL+pén.}-\text{BL+sang}}{\text{BL+sang}}$
A	$9,9 \cdot 10^7$	$10,1 \cdot 10^7$	+ 2,2 %
B	$7,4 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^7$	+ 5,40 %
C	$12,1 \cdot 10^7$	$11,9 \cdot 10^7$	- 1,65 %
D	$11,4 \cdot 10^7$	$10,7 \cdot 10^7$	- 6,14 %
E	$6,9 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	+ 2,90 %

Des résultats similaires ont été obtenus avec le produit LF 4.

Produit	Genre	Nombre d'u.f.c. par gramme de produit			
		3 jours	8 jours	15 jours	D.L.C.
LF 1	<i>Streptococcus</i>	12 +/- 4,1.10 <sup>7</sup>	14 +/- 3,2.10 <sup>7</sup>	9,1 +/- 3,7.10 <sup>7</sup>	6,8 +/- 2,8.10 <sup>7</sup>
	<i>Lactobacillus</i>	6,2 +/- 3,7.10 <sup>7</sup>	6,0 +/- 1,3.10 <sup>7</sup>	5,9 +/- 2,4.10 <sup>7</sup>	3,2 +/- 2,6.10 <sup>7</sup>
	<i>Bifidobacterium</i>	9,5 +/- 2,6.10 <sup>7</sup>	9,4 +/- 3,1.10 <sup>7</sup>	8,6 +/- 2,5.10 <sup>7</sup>	9,6 +/- 2,7.10 <sup>7</sup>
LF 2	<i>Streptococcus</i>	1,4 +/- 8,7.10 <sup>8</sup>	2,9 +/- 3,2.10 <sup>8</sup>	1,9 +/- 4,6.10 <sup>8</sup>	1,3 +/- 5,7.10 <sup>8</sup>
	<i>Lactobacillus</i>	3,2 +/- 6,0.10 <sup>7</sup>	4,5 +/- 5,3.10 <sup>7</sup>	4,0 +/- 7,2.10 <sup>7</sup>	2,9 +/- 2,5.10 <sup>7</sup>
	<i>Bifidobacterium</i>	8,1 +/- 9,2.10 <sup>7</sup>	9,2 +/- 6,1.10 <sup>6</sup>	4,5 +/- 3,8.10 <sup>5</sup>	1,3 +/- 4,0 10 <sup>5</sup>
LF 3	<i>Streptococcus</i>	1,9 +/- 7,2.10 <sup>8</sup>	1,1 +/- 4,1.10 <sup>8</sup>	1,6 +/- 6,5.10 <sup>8</sup>	9,0 +/- 8,2.10 <sup>7</sup>
	<i>Lactobacillus</i>	2,3 +/- 4,9.10 <sup>8</sup>	1,9 +/- 7,2.10 <sup>8</sup>	2,6 +/- 6,1.10 <sup>8</sup>	1,1 +/- 3,8.10 <sup>8</sup>
	<i>Bifidobacterium a</i>	6,2 +/- 3,8.10 <sup>7</sup>	4,3 +/- 6,5.10 <sup>6</sup>	9,4 +/- 7,3.10 <sup>4</sup>	2,7 +/- 5,4.10 <sup>4</sup>
	<i>Bifidobacterium b</i>	9,7 +/- 2,3.10 <sup>5</sup>	6,7 +/- 4,2.10 <sup>2</sup>	non retrouvé	non retrouvé

**Tableau 19 :** Evolution de la flore de trois laits fermentés aux *Bifidobacterium* au cours du temps.

Les différences observées en dénombrant sur milieu BL + pénicilline, négligeables en valeur absolue, le sont encore plus du fait qu'elles interviennent parfois par excès et parfois par défaut. Le milieu BL agar + pénicilline pourra être utilisé pour la numération des bifidobactéries des laits fermentés LF 1 et LF 4.

Les *Bifidobacterium* des sept laits fermentés ont été isolés et dénombrés sur milieu BL agar + sang de cheval par souci d'homogénéité des résultats.

### III.1.1.2. Résultats des isolements et dénombrements :

Les *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été isolés des sept laits fermentés. En ce qui concerne les *Bifidobacterium*, chaque produit renferme une souche de ce genre sauf le produit LF 3 pour lequel nous avons observé deux types de colonies de bifidobactéries pendant la première semaine qui suit la fabrication, appelées a et b. Après huit jours, seul le type a se développe. Une identification d'espèce sera effectuée sur les huit souches de *Bifidobacterium* (paragraphe III.1.2 page 110).

Le suivi de la composition bactérienne au cours de temps a été réalisé sur les produits LF 1, LF 2 et LF 3 qui sont les laits fermentés au *Bifidobacterium* les plus vendus en France aujourd'hui. Nous avons isolé et dénombré les trois genres bactériens dans quatre lots de fabrications différentes à 3, 8, 15 jours et D.L.C. (date limite de consommation fixée à 24 jours) (tableau 19).

Dans les trois laits fermentés, la population en *Streptococcus* et *Lactobacillus* est de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$  cellules/ml de produit et ce nombre est conservé au cours du temps.

L'observation du nombre de *Bifidobacterium*, en revanche, mérite plus d'attention. Au lendemain de la fabrication, nous dénombrons environ  $10^7$  cellules vivantes dans chacun des trois pots et  $10^5$  cellules de la souche b de LF 3. Le nombre de cellules de *Bifidobacterium* de LF 2 et de la souche a de LF 3 est divisé en moyenne par 10 chaque semaine jusqu'à la date limite de consommation. Le nombre d'entités vivantes de la souche b de LF 3 diminue rapidement et cette souche n'est plus retrouvée 2 semaines après la fabrication. En revanche, le produit LF 1 semble tout-à-fait différent puisque le nombre de *Bifidobacterium* vivants reste stable durant les trois semaines qui suivent la fabrication. Ce phénomène mérite d'être souligné car ce genre bactérien ne peut survivre qu'en anaérobiose. La conception originale du pot contenant le lait fermenté LF 1 qui est imperméable à l'oxygène assure la survie d'un grand nombre de *Bifidobacterium* et permet à ce produit de garder intactes toutes ses qualités probiotiques.

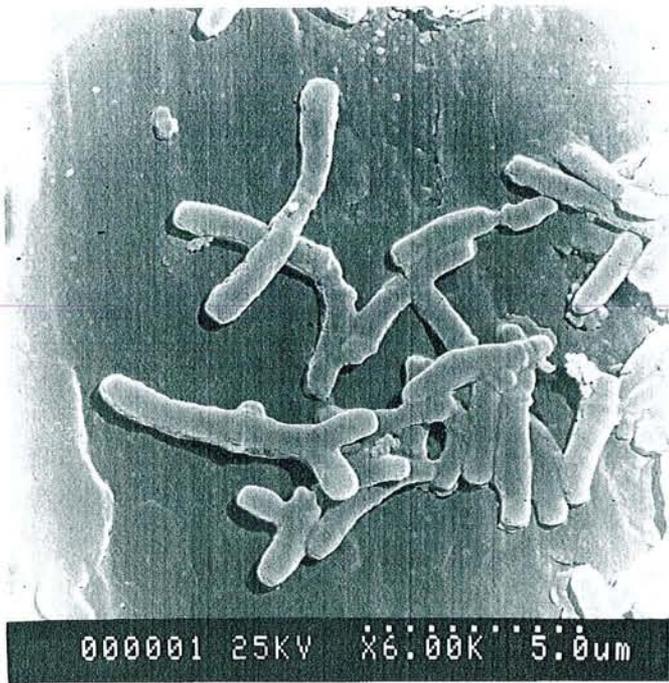


Photo 3 : *B. longum* ATCC 15707 (x 6000)  
Microscopie électronique à balayage.

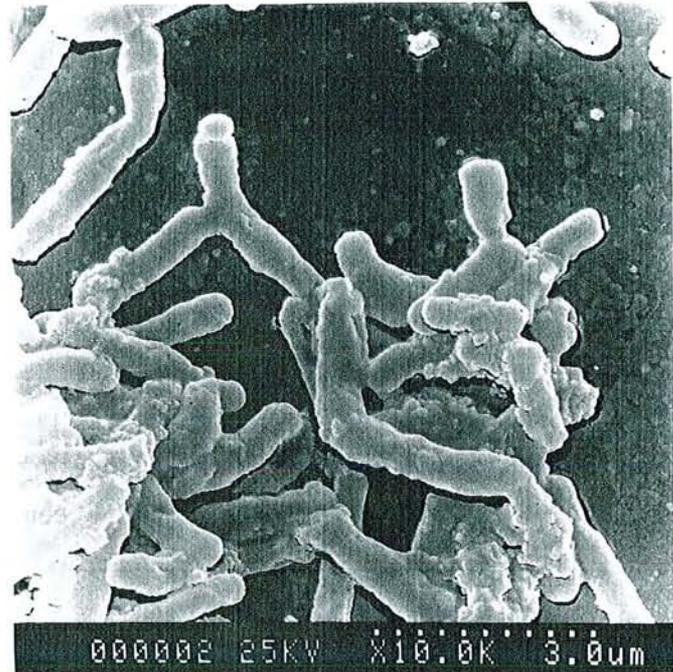


Photo 4 : BB 536 (x 10000)  
Microscopie électronique à balayage.

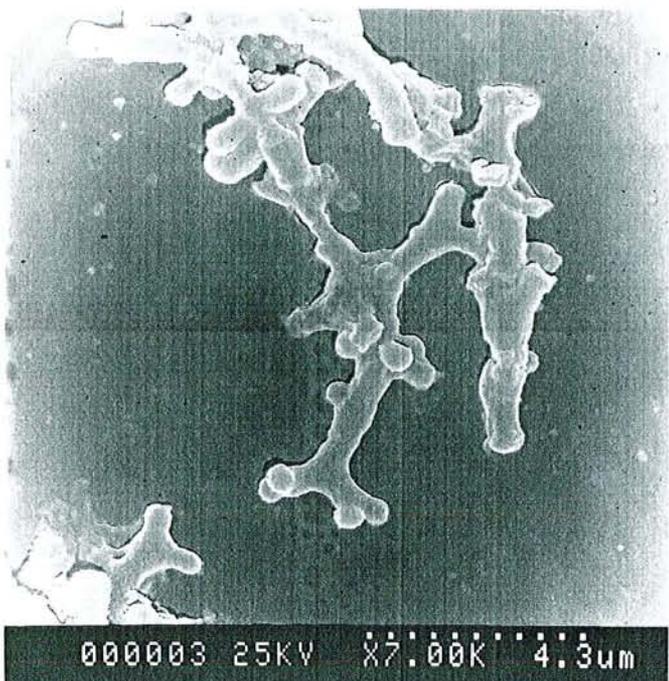


Photo 5 : *B. bifidum* ATCC 29521(x 4300)  
Microscopie électronique à balayage.

### **III.1.2. IDENTIFICATION DES SOUCHES DE BIFIDOBACTERIUM ISOLEES :**

Après vérification de l'appartenance des 8 souches isolées au genre *Bifidobacterium*, nous avons identifié phénotypiquement puis génotypiquement leurs espèces.

#### **III.1.2.1. Vérification phénotypique du genre *Bifidobacterium*:**

L'appartenance au genre *Bifidobacterium* des colonies couleur "ocre" sur BL agar supplémenté en sang de cheval a été vérifiée à l'aide des trois tests suivants :

- Les photographies en microscopie électronique à balayage réalisées à la Faculté des Sciences de Nancy nous ont permis d'observer une morphologie ramifiée pour les 8 souches isolées soupçonnées d'appartenir au genre *Bifidobacterium* (photos 3, 4 et 5).

- La recherche de l'activité  $\alpha$ -galactosidase par le système API ZYM a été effectuée pour différencier les bifidobactéries des lactobacilles. Les 11 souches de collection de *Bifidobacterium* tant d'origine humaine qu'animale ainsi que les 8 souches isolées ont été testées et se sont révélées posséder une activité  $\alpha$ -galactosidase tandis qu'aucune des 7 souches de lactobacilles isolées des produits commerciaux n'en possédait. Un seul enzyme parmi les 20 testés dans la galerie étant utile à notre identification, nous avons préféré abandonner ce test trop coûteux effectué en galerie et nous le réaliserons désormais en tube.

- Présence de F6PPK :

Effectué dans les conditions décrites dans le paragraphe II.4.1.2 page 85, ce test s'est révélé positif pour les 11 souches de collection de *Bifidobacterium* testées et les huit souches de *Bifidobacterium* isolées. En revanche, le test est resté négatif pour des souches de *Bacteroides*, *Bacteroides*, *Bacillus* et *Escherichia coli* ainsi que pour les souches de *Lactobacillus* et *Streptococcus* isolées des sept laits fermentés commercialisés.

#### **III.1.2.2. Identification phénotypique des espèces :**

Plusieurs méthodes étaient à notre disposition pour effectuer une approche d'identification d'espèce des 8 souches de *Bifidobacterium* isolées de produits commerciaux. Nous avons choisi celle la plus couramment employée, à savoir la fermentation des sucres. Les résultats obtenus pour la fermentation des 26 sucres par les 8 souches à identifier sont reportés dans le tableau 20 et interprétés comme suit :



### **Souche 1 :**

Le profil de cette souche est caractérisé par une non fermentation des polysaccharides supérieurs au trisaccharide et des polyalcools. Seuls *B. bifidum*, *B. longum* et *B. animalis* correspondent à ce profil. La fermentation du mélézitose nous oriente vers *B. longum*. Les caractères fermentaires relatifs aux autres sucres correspondent effectivement à *B. longum* à une exception près : notre souche ne fermente pas le ribose alors que la souche-type de *B. longum* le métabolise. Il est probable que la souche 1 appartienne à l'espèce *longum* bien qu'elle diffère par un caractère fermentaire de la souche de référence.

### **Souche 2 :**

Glycogène, inuline et polyalcools négatifs, associés à dextrine et amidon positifs nous orientent vers *B. parvulorum*, *B. thermophilum*, *B. longum*, *B. animalis* ou *B. pseudolongum*. Les trois monopentoses positifs éliminent *B. parvulorum* et *B. thermophilum*. La non fermentation du glycogène élimine *B. pseudolongum*. La différence entre *B. longum* et *B. animalis* est établie d'après la fermentation du mélézitose. La souche 2 ne le fermentant pas appartiendrait donc à l'espèce *animalis*. Le fructose est trouvé négatif mais sa fermentation étant signalée comme très lente pour cette espèce, nous avons sans doute un faux négatif.

### **Souche 3 a :**

Elle fournit le même profil que la souche 2 et appartiendrait à l'espèce *animalis*. La non fermentation de l' $\alpha$ -méthylglucoside est en fait une fermentation positive très lente.

### **Souche 3 b :**

Ce profil est caractérisé par le grand nombre de sucres non fermentés. Il est typique de l'espèce *bifidum*. Cette espèce est la seule facilement identifiable par galerie de sucres.

### **Souche 4 :**

Tous les polysaccharides et les polyalcools sont négatifs alors que le mélézitose est positif. Seul *B. longum* répond à ces critères. Les autres sucres de la galerie correspondent bien à ceux des tables sauf le cellobiose. Soit cette souche diffère réellement de la souche-type par ce caractère, soit nous sommes face à une erreur de manipulation, ce qui semble toutefois assez improbable puisque les tests sont effectués trois fois de façon indépendante. Ce résultat était attendu puisque le produit LF 4 correspond à une marque distributeur du lait fermenté LF 1.

### **Souche 5 :**

Elle possède exactement le même profil que la souche 2.

**Souche 6 :**

Arabinose, mélézitose, esculine et amygdaline négatifs ne sont rencontrés que chez *B.bifidum* ou *B.infantis*. La non fermentation de l'amidon observée à 9 jours correspond sans doute une fermentation tardive.

**Souche 7 :**

Elle possède les mêmes caractéristiques fermentaires que la souche 5 : *B. animalis*.

La caractérisation de ces souches par les galeries de sucres demande une extrême minutie dans les manipulations puisqu'une variation sur deux ou trois sucres peut orienter vers une autre espèce. La conduite en triple de tout essai est donc tout à fait indispensable. L'interprétation des résultats est également délicate puisque les tableaux d'identification qui font référence présentent quelques différences selon les auteurs : MITSUOKA et SCARDOVI, par exemple, ne tiennent pas compte d'exactly les mêmes sucres pour effectuer leur galeries d'identification. D'autre part, il arrive à plusieurs reprises qu'un auteur considère une espèce comme négative (ou positive) alors que l'autre la classe comme variable. Enfin, le comportement de nombreuses espèces vis-à-vis de plusieurs sucres est qualifié de variable, ces sucres ne pourront donc servir à identifier une souche inconnue. De plus, les souches de collection étant choisies de façon arbitraire, il est normal que quelques caractères d'une autre souche de la même espèce puissent différer. Ces résultats ne doivent être considérés que comme orientation d'identification et seront suivis d'une identification génotypique. L'importance de ce test préliminaire est grande puisque qu'il permet d'orienter le choix des souches de référence pour l'identification génotypique.

**III.1.2.3. Identification génotypique des espèces :**

L'hybridation ADN/ADN avec des souches de référence est reconnue comme étant la méthode la plus fiable, même si elle est lourde, pour une identification certaine et nous avons mis en oeuvre cette technique sur les souches précédemment isolées.

L'hybridation est précédée d'une extraction de l'ADN impliquant une lyse de la paroi des bifidobactéries.

**III.1.2.3.1. Mise au point de la méthode d'extraction d'ADN :****- Technique d'extraction :**

La mise au point de la méthode d'extraction a été effectuée sur *B. longum* ATCC 15707 et vérifiée sur la souche commerciale BB 536 et *B. animalis* ATCC 25527, ceci afin de détecter d'éventuelles différences de comportement.

Protocole	souche	DO 230	DO 260	DO 280	cc. ADN (µg/ml)	$\frac{DO\ 260}{DO\ 230}$	$\frac{DO\ 260}{DO\ 280}$
Marmur	<i>B. longum</i> ATCC 15707	/	0,258	/	12,9	/	/
	BB 536	/	0,054	/	2,7	/	/
	<i>B. animalis</i> ATCC 25527	/	0,492	/	24,6	/	/
+ lysozyme 10 mg 45 secondes	<i>B. longum</i> ATCC 15707	/	0,295	/	147	/	/
	BB 536	/	0,450	/	225	/	/
	<i>B. animalis</i> ATCC 25527	/	0,149	/	372	/	/
+ lysozyme 50 mg 60 secondes	<i>B. longum</i> ATCC 15707	0,129	0,220	0,159	550	1,71	1,38
	BB 536	0,220	0,328	0,293	820	1,49	1,12
	<i>B. animalis</i> ATCC 25527	0,138	0,274	0,285	685	1,99	0,96
+prot. K 10 mg	<i>B. longum</i> ATCC 15707	0,172	0,259	0,148	647	1,51	1,75
	BB 536	0,186	0,345	0,194	862	1,85	1,78
	<i>B. animalis</i> ATCC 25527	0,111	0,253	0,130	632	2,28	1,95

**Tableau 21** : Concentration et pureté des ADN  
de trois souches de *Bifidobacterium* selon la méthode d'extraction.

Les techniques habituelles de lyse cellulaire et d'extraction d'ADN ont d'abord été utilisées (MARMUR, 1961). Avec cette méthode appliquée à nos souches de bifidobactéries, nous ne constatons aucune augmentation de la viscosité ni clarification des préparations. Les mesures des DO à 260 nm sont reportées dans le tableau 21. Ces valeurs très faibles et des observations microscopiques confirment que les cellules ne sont quasiment pas lysées. La paroi épaisse des *Bifidobacterium*, comme toutes les bactéries à Gram positif est difficile à casser. Nous avons cependant choisi de travailler avec des cellules en phase exponentielle de croissance car c'est à ce stade que leur paroi est la plus fragile (voir paragraphe suivant : "Age des cultures").

Des modifications ont alors été apportées à cette méthode :

- 10 mg de lysozyme sont ajoutés au culot de centrifugation des cellules lavées pour un litre de culture initiale, ceci avant de faire agir le SDS (OWEN et PITCHER, 1985). Le mélange est incubé pendant 45 secondes à 37°C. Le lysozyme attaque la paroi mais pas la membrane cytoplasmique.

Avant le lavage, les cellules ont été reprises dans une solution Tris-EDTA et non saline-EDTA comme dans la méthode de MARMUR car dans une solution saline-EDTA, les bactéries Gram positif peuvent former des agrégats difficiles à disperser et par conséquent résistants aux traitements par le lysosyme ou le SDS. Le problème est résolu avec l'emploi d'un tampon Tris-EDTA (OWEN et PITCHER, 1985).

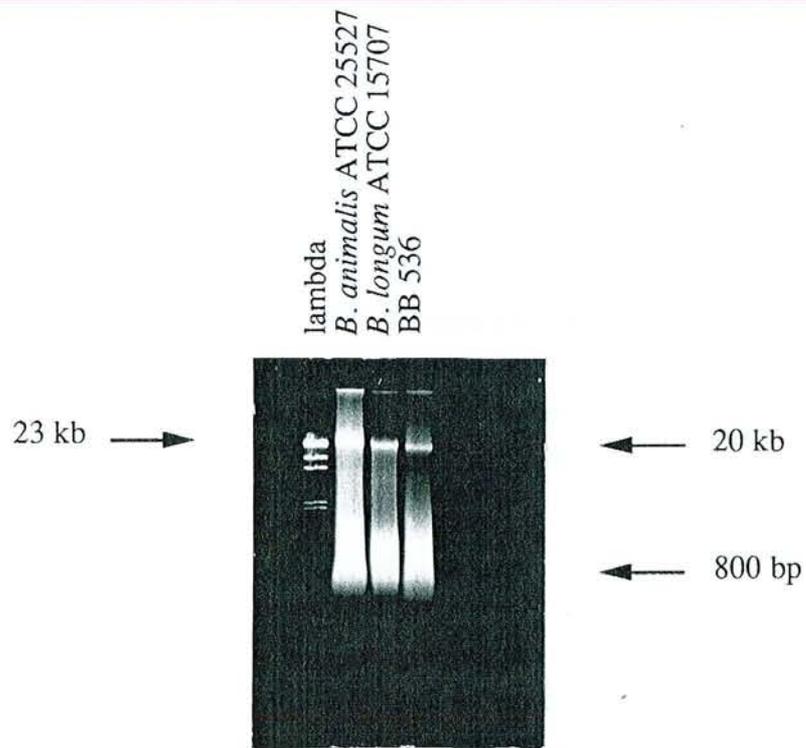
L'action du lysozyme a permis d'obtenir des solutions un peu plus visqueuses. Les concentrations en ADN obtenues sont légèrement supérieures à celles obtenues auparavant (tableau 21) mais elles ne sont pas satisfaisantes.

La quantité de lysozyme ajouté est alors multipliée par 5 et la durée d'action est portée à 60 secondes. Le mélange obtenu est maintenant bien visqueux, glaireux et translucide, témoin d'une bonne lyse. Les valeurs des DO à 260 nm obtenues (tableau 21) confirment cette observation.

La contamination des ADN par les sucres, rapportée par les rapports des DO 260/DO 230 qui sont assez proches de 2,2, peut être considérée comme négligeable. En revanche, les rapports des DO 260/DO 280 sont faibles, témoins d'une mauvaise élimination des protéines.

- La séparation des protéines de l'ADN et l'obtention d'un ADN de meilleure qualité sont facilités par l'addition de 10 mg de protéinase K.

La mesure du rapport DO 260/DO 280 (tableau 21) confirme que cette étape permet d'augmenter considérablement la qualité des ADN obtenus, tandis que leur pureté vis-à-vis des sucres reste bonne.



**Photo 6** : Electrophorèse en gel d'agarose des ADN de 3 souches de *Bifidobacterium*.

Cultures en fin de phase exponentielle.

- Notre méthode de déprotéinisation de l'ADN diffère de celle décrite par MARMUR (1961) par le fait que l'extraction des protéines se fait avec du phénol et non du perchlorate de sodium, méthodologie imposée par l'utilisation de la protéinase K.

Que ce soit avec les souches de collection *B. longum* et *B. animalis* ou avec la souche industrielle BB 536, nous ne notons aucune différence significative dans la facilité de lyse des cellules, d'extraction d'ADN et de qualité d'ADN.

#### **- Age des cultures :**

Après la mise au point de la méthode d'extraction d'ADN, nous avons effectué des essais de lyse bactérienne sur des cultures de *B. longum* ATCC 15707, BB 536 et *B. animalis* ATCC 25527 stoppées à différentes étapes de leur croissance.

- Pour des cultures en phase stationnaire, (plus de 20 heures) (figure 12), aucune lyse bactérienne n'a pu être obtenue par notre méthode.

- Des cultures de 15 heures ont fourni deux types de fragments d'ADN : un long fragment d'environ 20 kb et un léger "smear" de fragments de taille inférieure à 800 bp. avec une majorité située à 800 bp. (photo 6). La persistance de l'existence de ces petits fragments après traitement à la RNase et leur disparition après traitement à la DNase permettent de confirmer qu'il s'agit bien d'ADN. Le produit d'une telle extraction ne peut être retenu pour effectuer des hybridations en raison de la trop faible taille des fragments.

- Les extractions réalisées à partir de cellules jeunes en phase exponentielle de croissance (5 à 13 heures pour *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 et 10 à 18 heures pour *B. animalis*) ont permis d'obtenir une grande proportion d'un fragment d'ADN d'environ 20 kb (photos 7 et 8). C'est ce type de fragment de grande taille qui est intéressant pour les hybridations ADN/ADN. Toutes les manipulations seront réalisées sur des cellules prélevées en début ou milieu de phase exponentielle de croissance.

#### **III.1.2.3.2. Résultats des extractions d'ADN :**

Nous avons appliqué ces techniques d'extraction d'ADN aux huit souches commerciales étudiées et aux quatre souches de collection ATCC représentant les espèces auxquelles ces souches sont susceptibles d'appartenir. Pour chaque souche, nous avons pu extraire 2 à 3 mg d'ADN par gramme de cellules humides centrifugées. Pour les 8 souches de *Bifidobacterium* commerciales et les 4 souches de collection ATCC, la quantité et la qualité des ADN obtenus (tableau 22) sont satisfaisantes pour effectuer des hybridations entre ces ADN.

### III.1.2.3.3. Résultats des hybridations ADN/ADN :

Nous avons réalisé des hybridations croisées entre 8 souches industrielles inconnues et 4 souches témoins déposées à la collection ATCC : *B. longum* ATCC 15707, *B. animalis* ATCC 25527, *B. bifidum* ATCC 29521 et *B. infantis* ATCC 15697. Les résultats de ces hybridations sont reportés dans le tableau 23.

Nous pouvons remarquer que la fiabilité de cette technique est bonne puisque les résultats des hybridations entre les souches de référence, obtenus lors de nos essais, sont proches de ceux donnés dans le Bergey's Manual (SCARDOVI, 1986) (tableau 14 page 45).

Les techniques génétiques nous ont permis de définir l'appartenance de huit souches commerciales à des espèces du genre *Bifidobacterium*.

Les souches 1 et 4 sont identifiées comme appartenant à l'espèce *B. longum* (origine humaine), les souches 2, 3 a, 5 et 7 à l'espèce *B. animalis* (origine animale), la souche 3 b à l'espèce *B. bifidum* et la souche 6 à l'espèce *B. infantis* (origine humaine).

Ces résultats confirment les orientations d'identification obtenues pour les souches 1, 2, 3 a, 3 b, 4, 5 et 7 et permettent l'identification de la souche 6 pour laquelle les galeries de sucres n'avaient pas permis une identification complète.

souche	DO 230 (dilution au 1/50)	DO 260 (dilution au 1/50)	DO 280 (dilution au 1/50)	cc. ADN (µg/ml)	<u>DO 260</u> <u>DO 230</u>	<u>DO 260</u> <u>DO 280</u>
1	0,186	0,345	0,194	862	1,85	1,78
2	0,141	0,257	0,148	642	1,82	1,74
3 a	0,164	0,289	0,141	722	1,76	2,05
3 b	0,168	0,337	0,186	843	2,01	1,81
4	0,219	0,449	0,242	1122	2,05	1,85
5	0,176	0,374	0,180	935	2,13	2,08
6	0,135	0,264	0,146	660	1,96	1,81
7	0,122	0,230	0,140	575	1,89	1,64
<i>B. longum</i> ATCC 15707	0,172	0,259	0,148	647	1,51	1,75
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	0,111	0,253	0,130	632	2,28	1,95
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	0,179	0,384	0,253	960	2,14	1,52
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	0,209	0,402	0,242	1005	1,92	1,66

**Tableau 22** : Concentration et qualité des ADN extraits  
des 8 souches à identifier et des 4 souches de référence.

sonde	souches commerciales								souches de collection			
	BB 536	2	3 a	3 b	4	5	6	7	<i>B. * long</i>	<i>B. * anim</i>	<i>B. * bif.</i>	<i>B. * inf.</i>
filtre												
BB 536	100	13	19	47	96	/	52	/	98	11	/	/
2	14	100	95	18	/	/	8	/	6	98	/	/
3 a	22	93	97	6	/	/	19	82	16	100	18	25
3 b	29	6	11	100	/	/	14	/	32	9	95	31
4	93	18	33	48	100	/	68	/	95	2	42	57
5	/	/	/	/	/	100	/	/	13	94	23	2
6	55	19	3	15	/	/	100	/	61	24	38	96
7	/	/	91	/	/	/	/	100	21	96	11	8
<i>B. long.*</i>	99	4	12	57	98	19	68	20	100	6	59	61
<i>B. anim.*</i>	12	98	100	6	11	93	8	99	7	99	9	6
<i>B. bif.*</i>	/	/	17	91	39	16	13	4	/	/	100	19
<i>B. inf.*</i>	/	/	29	16	61	8	98	29	/	/	26	100

/ : non déterminé

\* : souches de collection

**Tableau 23** : Résultats des hybridations ADN/ADN entre huit souches industrielles

et quatre souches de collection : *B. longum* ATCC 15707

*B. animalis* ATCC 25527

*B. bifidum* ATCC 29521

*B. infantis* ATCC 15697.

Groupe bactérien	Tous groupes	Groupe A Yaourt classique						Groupe B LF 1 : <i>B.longum</i> BB 536						Groupe C LF 2 : <i>B.animalis</i>						Groupe D LF 3 : <i>B.animalis</i> + <i>B.bifidum</i>					
		Etape 1		Etape 2			Etape 3			Etape 2			Etape 3			Etape 2			Etape 3						
	(a) S 3 S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
Anaérobies tot.	(b) 8,4 ± 0,4	8,6	8,3	8,4	8,2	8,6	8,1	8,3	9,7	9,9	9,7	8,9	8,9	8,3	8,2	8,3	8,6	8,4	8,2	8,6	8,6	8,5	8,4	8,6	8,6
<i>Bifidobacterium</i>	6,3 ± 0,3	6,4	6,6	6,3	6,4	6,0	6,2	7,6	9,2	9,7	9,6	8,4	8,3	6,4	6,6	7,1	6,8	6,2	6,4	6,2	6,5	6,6	7,1	6,8	6,4
<i>Clostridium</i>	5,9 ± 0,4	6,3	5,9	6,1	5,8	5,7	6,1	5,3	4,8	3,6	3,8	4,6	5,4	5,9	5,9	6,0	5,8	5,9	5,7	5,4	5,2	4,8	5,4	5,7	5,9
<i>Bacteroides</i>	8,0 ± 0,6	8,2	7,9	8,1	8,0	7,8	8,1	6,2	4,6	4,3	5,4	5,9	6,6	8,3	7,9	8,0	8,1	8,3	8,1	7,9	8,3	8,0	7,8	8,1	8,3
Coliformes	7,5 ± 0,3	7,6	7,2	7,5	7,3	7,4	7,2	6,9	5,8	5,2	5,6	5,9	6,4	7,2	6,9	6,2	7,1	7,4	7,6	7,6	7,7	7,5	7,3	7,3	7,4

**Tableau 24** : Analyse de la flore fécale avant, pendant et après la consommation de laits fermentés au *Bifidobacterium*.

Nombre d'u.f.c. par gramme de selles.

a : numéro de la semaine (les analyses n'ont pas été effectuées pendant les semaines S 1 et S 2).

b : signifie  $\log_{10} \pm$  la déviation standard durant la période considérée.

## III.2. ACTION DE 3 LAITS FERMENTES SUR LA FLORE INTESTINALE HUMAINE

### III.2.1. CHOIX DU PROTOCOLE :

Pour les raisons évoquées précédemment, nous avons retenu les produits LF 1, LF 2 et LF 3 pour notre étude. Ces laits fermentés peuvent être classés en deux catégories selon l'origine écologique de la souche de *Bifidobacterium* utilisée :

- LF 1 : *B. longum* (origine humaine)
- LF 2 : *B. animalis* (origine animale)
- LF 3 : *B. animalis* quelque soit l'âge du produit, additionné de *B. bifidum* pendant la première semaine (origine mixte à la fabrication puis origine animale après huit jours).

Notre étude est centrée sur l'effet de l'ingestion du lait fermenté au *Bifidobacterium* sur l'homme et sa flore intestinale. Les laits fermentés étant destinés à l'homme, nous avons choisi, pour nos essais, de travailler directement sur le genre humain plutôt que chez les animaux, même si ce choix imposait d'importantes contraintes. Les résultats d'une étude réalisée sur l'animal ne peuvent jamais être transposés directement chez l'homme et c'est bien l'impact du lait fermenté sur l'homme qui nous préoccupe. Ces laits fermentés ont donc été ingérés par des volontaires suivant un protocole précis. Nous avons analysé les selles de ces personnes et l'évolution de la population de différents genres bactériens de la flore intestinale a été suivie pendant 8 semaines. Nous avons choisi de suivre la flore anaérobie totale qui représente plus de 90% de la flore totale chez l'homme adulte, les *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et coliformes qui font partie de la flore prédominante ainsi que les clostridies. Le tableau 24 rassemble les résultats obtenus.

### III.2.2. RESULTATS :

Le tableau 24 montre que le groupe A qui a consommé du yaourt traditionnel sans bifidobactéries présente une parfaite constance dans la composition de sa flore intestinale que ce soit avant, pendant ou après la consommation de yaourt. Une consommation journalière habituelle de yaourt ne permet pas aux lactobacilles d'induire de quelconques modifications dans les proportions des genres bactériens analysés.

La consommation de lait fermenté à *B. longum* souche BB 536, en revanche, induit de nombreux bouleversements dans les proportions relatives des différents genres bactériens.

En effet :

- si le nombre total de bactéries anaérobies reste inchangé pendant toute la période test, la population bifide est multipliée par 20 après une seule semaine d'ingestion puis par 2500 par rapport à la période basale après 3 semaines de consommation de lait fermenté à BB 536;

- le nombre de clostridia et de coliformes a diminué 200 fois à la semaine S 7 et celui des *Bacteroides* a chuté 150 fois la première semaine et 12600 fois après 3 semaines d'ingestion.

Il est important de remarquer que ces effets spectaculaires se poursuivent même après arrêt de l'ingestion de produit 1 puisqu'après 3 semaines sans apport de lait fermenté :

- les *Bifidobacterium* sont encore 100 fois plus nombreux qu'avant l'expérience;
- la population de clostridia reste amputée d'un tiers, il ne subsiste que 8% des coliformes et surtout 1,6% seulement des *Bacteroides* comptés en semaine S 3 sont retrouvés.

La consommation des laits fermentés LF 2 et LF 3 qui renferment l'espèce *animalis* additionnée ou non de *bifidum*, n'entraîne pas des tels changements dans l'équilibre intestinal :

- avec ces deux laits fermentés, la flore anaérobie totale reste strictement identique à celle dénombrée initialement;

- le nombre de *Bifidobacterium* est multiplié moins de 10 fois après 3 semaines. Cette augmentation peu significative ne se maintient pas après l'ingestion;

- les clostridia restent rigoureusement aussi nombreuses tout le temps de l'ingestion du produit LF 2. Par contre, elles sont divisées par 12 après 3 semaines d'ingestion de LF 3 mais leur nombre retourne rapidement à sa valeur initiale après l'arrêt de la consommation;

- 3 semaines d'ingestion de LF 2 provoquent une diminution du nombre des coliformes par 20 mais celle-ci ne persiste pas en absence de consommation. Ces modifications ne se font pas sentir avec LF 3;

- aucun des produits LF 2 ou LF 3 ne provoque de modification du nombre des *Bacteroides*.

L'analyse du rapport *Bifidobacterium* / *Bacteroides* est intéressante : d'une valeur de  $2 \cdot 10^{-2}$  à l'étape 1, il passe à  $2,5 \cdot 10^{+5}$  en semaine S 7 et est encore à 50 en semaine S 10 en cas d'ingestion de lait fermenté à BB 536. Si le lait fermenté absorbé contient une autre espèce de *Bifidobacterium*, ce rapport est de l'ordre de  $10^{-2}$  en S 7 et  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  en S 10.

De même, les rapports *Bifidobacterium* / *Clostridium* et *Bifidobacterium* / coliformes qui sont respectivement de 2,5 et  $6 \cdot 10^{-2}$  à l'étape 1, passent à  $1,3 \cdot 10^{+6}$  et  $3,2 \cdot 10^{+4}$  en semaine

S 7 et sont encore à 800 et 80 en semaine S 10 en cas d'ingestion de lait fermenté à BB 536. Si le lait fermenté absorbé contient une autre espèce de *Bifidobacterium*, ces rapports ne présentent que de faibles variations, de l'ordre de 1 à 100 en semaine S 7.

### III.2.3. DISCUSSION :

Nos résultats montrant qu'un apport oral de *Bifidobacterium* sous forme de lait fermenté entraîne une augmentation de la flore bifide et une régression des autres genres confirment ceux obtenus par d'autres auteurs dans d'autres circonstances : KAGEYAMA et coll. (1984) ont montré qu'un déséquilibre de l'écosystème intestinal provoqué par un traitement chimiothérapeutique chez les leucémiques avait nettement été amélioré lors de l'apport oral de lait fermenté à *B. longum*. COLOMBEL et coll. (1987) et ROMOND (1988) ont obtenu, avec la souche BB 536, des résultats allant dans le même sens chez des nourrissons atteints de diarrhées soumis ou non à un traitement antibiotique.

Chez tous ces malades, l'ingestion de lait fermenté à *B. longum* avait contribué à atteindre et à maintenir un taux élevé de bifidobactéries dans la flore intestinale.

Par ailleurs, nos résultats montrent que seul le lait fermenté LF 1 provoque de véritables modifications de la composition de la flore intestinale humaine en augmentant considérablement le nombre des *Bifidobacterium* aux dépens de celui de bactéries de la flore "putréfiante" et démontrent la supériorité de l'effet probiotique du lait fermenté LF 1 à BB 536 par rapport aux produits fabriqués avec des souches d'origine animale, sur la flore intestinale humaine. La diminution de 8% du nombre des clostridia après ingestion de LF 3 à *B. animalis* + *B. bifidum* peut être due à la présence de *B. bifidum* ou à une quelconque action antagoniste de *B. animalis*. Une explication à cette prédominance de l'action inhibitrice des souches d'origine humaine peut être la température de croissance. En effet, il semble évident qu'une espèce d'origine humaine dont la température idéale de croissance est 37°C s'adapte mieux chez l'homme qu'une espèce d'origine animale qui se développe à 42°C.

Nous avons donc choisi de centrer nos travaux ultérieurs sur *B. longum*, espèce d'origine humaine la plus couramment rencontrée dans toutes les tranches d'âge de la population en dehors de toute ingestion de lait fermenté. Deux souches ont été retenues : la souche-type *B. longum* de la collection ATCC numéro 15707 et la souche industrielle BB 536 entrant dans la composition du lait fermenté B'A que nous avons précédemment identifiée comme appartenant à cette espèce.

L'observation de l'augmentation de la flore bifide dans les selles soulève plusieurs questions.

### III.2.4. QUESTIONS :

La question de l'origine des souches de *Bifidobacterium* retrouvées dans les selles peut alors se poser.

- L'augmentation de la population bifide est-elle due aux bifidobactéries endogènes ou aux bifidobactéries ingérées avec le lait fermenté qui auraient survécu au passage dans le tractus digestif?

- Si les bifidobactéries surnuméraires proviennent de la flore endogène, peut-on penser à un effet "bifidigène"? Nous pouvons supposer que les *Bifidobacterium* ingérés ou le lait fermenté lui-même contiendraient des substances capables d'accroître le nombre de bifidobactéries endogènes.

- La persistance d'une population exogène serait-elle due à une colonisation par les bifidobactéries exogènes si l'on suppose que les bactéries se sont multipliées lors de leur transit dans l'intestin? Une persistance du nombre des bifidobactéries impliquerait une colonisation de l'intestin donc une adhésion des bactéries à la paroi intestinale.

- La souche BB 536 présente-t-elle un intérêt probiotique évident?

Il est donc nécessaire de pouvoir mieux cerner l'origine des bifidobactéries retrouvées dans la flore fécale. Afin d'être capable de distinguer les bactéries ingérées des bactéries endogènes, nous proposons de marquer les souches ingérées.

### III.2.5. CHOIX DU MARQUAGE :

#### III.2.5.1. Objectif :

Nous devons pouvoir reconnaître des souches particulières parmi d'autres du même genre et de la même espèce, et ceci au sein d'une flore aussi complexe que la flore fécale. En effet, notre but était de faire ingérer ces souches à des êtres humains en quantité définie et de pouvoir identifier et dénombrer celles-ci dans les selles. Notre étude a donc débuté par la recherche d'un marquage de *B. longum* (souche ATCC 15707 et souche industrielle BB 536).

#### III.2.5.2. Contraintes :

Le choix du type de marquage était réduit puisque la souche marquée devait pouvoir être ingérée sans aucun danger par l'homme. Tous les marquages introduisant de la radioactivité nous étaient par conséquent interdits, d'autant plus que l'intensité du marquage de l'ADN est divisée par deux à chaque division cellulaire et devient rapidement inexploitable. Les manipulations génétiques étaient également exclues, de même que l'obtention de souches résistantes à des antibiotiques.

Nous avons donc choisi de sélectionner des mutants résistant à un substrat toxique. Cette molécule doit être choisie pour que seules nos souches marquées puissent se développer sur un milieu la renfermant et que le comportement de ces souches soit le plus proche possible de celui des souches-mères. Il doit être létal pour la majorité des bactéries intestinales, y compris toutes les espèces de bifidobactéries. Ce composé peut être, par exemple, un découplant de la phosphorylation oxydative ou un analogue d'un composé d'un milieu de culture, toxique pour les autres bactéries mais pas pour les mutants.

Nous avons tout d'abord dû choisir un milieu de culture à composition parfaitement connue sur lequel *B. longum* se développe bien.

Mais avant de mettre au point un milieu de culture, il nous a paru primordial de préciser la physiologie du genre *Bifidobacterium* par l'étude d'un certain nombre de souches sur différents milieux.

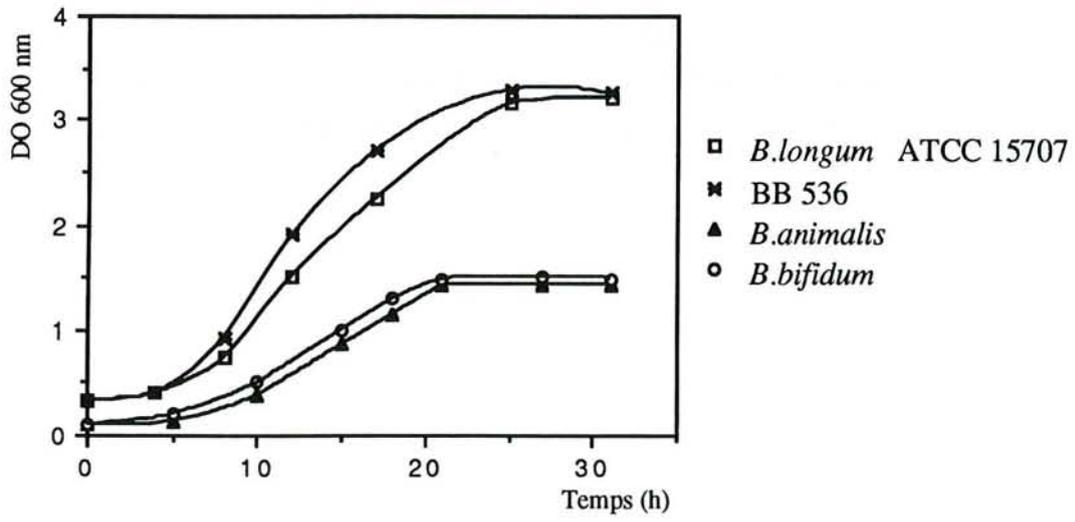


Figure 12 : Croissance de souches de Bifidobacterium sur milieu TPY

### III.3. ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DU GENRE *BIFIDOBACTERIUM*

#### III.3.1. CROISSANCE DE *B.LONGUM* ATCC 15707, BB 536, *B.ANIMALIS* ATCC 25527 ET *B.BIFIDUM* ATCC 29521 SUR TPY ET BL AGAR :

Afin de pouvoir juger de la qualité du développement de nos souches sur les milieux de culture que nous allons tester, il est indispensable de bien connaître les paramètres de la croissance de celles-ci sur les milieux témoins : le milieu TPY liquide et le milieu BL agar gélosé.

Nous avons étudié la croissance de 4 souches de *Bifidobacterium* sur milieu TPY : *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 pour les raisons décrites dans le paragraphe précédent, mais également *B. animalis* ATCC 25527 pour comparaison avec une souche d'origine animale et *B. bifidum* ATCC 29521 à titre de témoin puisque l'un des milieux de culture synthétique que nous testerons dans le paragraphe III.3.3.2 page 126 a été conçu pour cette espèce.

##### III.3.1.1. Evaluation de la biomasse :

Les courbes de croissance obtenues avec *B. longum* ATCC 15707, BB 536, *B. animalis* et *B. bifidum* sur milieu TPY sont reportées sur la figure 12. Les quatre souches cultivées se sont bien développées sur ce milieu complexe. De façon reproductible, *B. longum* est l'espèce qui se développe le plus rapidement et qui fournit la biomasse la plus élevée, la souche industrielle étant légèrement plus performante (DO = 3,3 en 24 h.) que la souche de collection (DO = 3,1 en 24 h.).

La relation entre l'absorption et le poids sec de la biomasse a été établie pour ces quatre souches :

-*B.longum* ATCC 15707 : 1 unité de DO correspond à  $0,43 \pm 0,03$  g biomasse/l de milieu fermentaire.

-BB 536 : 1 unité de DO correspond à  $0,43 \pm 0,03$  g biomasse/l de milieu fermentaire.

-*B.bifidum* : 1 unité de DO correspond à  $0,45 \pm 0,03$  g biomasse/l de milieu fermentaire.

-*B.animalis* : 1 unité de DO correspond à  $0,42 \pm 0,03$  g biomasse/l de milieu fermentaire.

Ces valeurs sont équivalentes pour les quatre souches de *Bifidobacterium* étudiées.

milieu de culture		TPY	TPY+acétate de sodium	TPY+MOPS	UEDA	TOMARELLI synthétique	TOMARELLI BIOKAR	TOMARELLI DIFCO	NORRIS
souche	paramètres								
<i>B.longum</i> ATCC 15707	$\mu$	0,16	0,18	0,17	pas de croissance	0,046	0,17	0,083	0,095
	T	4,3	3,8	4,1		15,1	4,0	8,3	7,3
	$\pi$ ac	0,19	0,18	0,15		0,30			
	$\pi$ lac	0,19	0,15	0,09		0,15			
	$\nu$ lactose	0,43	0,41	0,34		0,42			
BB 536	$\mu$	0,16			pas de croissance	pas de croissance	0,18	0,055	0,054
	T	4,3					3,9	12,6	12,8
	$\pi$ ac	0,16					0,18		
	$\pi$ lac	0,19					0,13		
	$\nu$ lactose	0,59					0,38		
<i>B.bifidum</i> ATCC 29521	$\mu$	0,15			0,037	pas de croissance	0,058	0,049	0,053
	T	4,6			18,7		11,9	14,1	13,1
<i>B.animalis</i> ATCC 25527	$\mu$	0,13			pas de croissance	pas de croissance	pas de croissance	pas de croissance	pas de croissance
	T	5,3							
ATCC 15707 m.42	$\mu$	0,14					0,096		
	T	5,0					7,2		
	$\pi$ ac	0,21					0,29		
	$\pi$ lac	0,18					0,13		
	$\nu$ lactose	0,39					0,39		
BB 536 m.15	$\mu$	0,15					0,14		
	T	4,6					5,0		
	$\pi$ ac	0,17					0,13		
	$\pi$ lac	0,17					0,09		
	$\nu$ lactose	0,57					0,27		

**Tableau 25** : Paramètres de croissance et vitesses spécifiques de formation d'acides acétique et lactique et de consommation de lactose pour 6 souches de *Bifidobacterium* sur 8 milieux différents.

$\mu$  exprimé en heure<sup>-1</sup>

T exprimé en heure

$\pi$  ac,  $\pi$  lac et  $\nu$  lactose exprimés en g d'acide x g de biomasse<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>

### III.3.1.2. Détermination des paramètres de croissance :

Les temps de génération T pour les quatre souches sont reportés dans le tableau 25. Nous constatons que les temps de génération de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sont équivalents (4,3 heures) tandis que ceux de *B. bifidum* et surtout *B. animalis* sont légèrement plus élevés (4,6 et 5,3 heures respectivement).

Sur milieu gélosé BL agar, les colonies obtenues en 48 heures présentent un aspect identique pour les 4 souches : blanches, lisses et régulières, opaques, de diamètre de 1,5 à 2 mm.

### III.3.1.3. Evolution des métabolites au cours de la fermentation du milieu TPY par *B. longum* :

Afin de mieux connaître l'espèce étudiée, nous avons suivi l'évolution des principaux métabolites dégradés ou formés au cours de la fermentation de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur milieu TPY + lactose 20 g/l. Les courbes obtenues sont reportées sur les figures 13, 14 et 15.

Nous constatons que :

- le pH passe en moyenne de 7,0 à 3,7;
- la quantité d'acide acétique formé atteint 4,0 à 4,7 g/l en fin de fermentation;
- la quantité d'acide lactique formé atteint 3,6 à 4,2 g/l en fin de fermentation;
- la quantité de lactose résiduelle est de l'ordre de 10 à 13 g/l.

Le rapport théorique acide acétique/acide lactique est de 1,5. Dans notre étude, cette valeur présente des variations selon le moment de la croissance mais la valeur finale serait plutôt légèrement inférieure à cette valeur théorique, aux alentours de 1,1. Par ailleurs, il est important de remarquer qu'environ les 2/3 des acides formés le sont pendant la phase stationnaire de croissance et non pendant la phase exponentielle. Notre étude confirme celle de DESJARDINS et coll. (1990).

Les vitesses spécifiques de formation des acides acétique ( $\pi_{ac}$ ) et lactique ( $\pi_{lac}$ ) et de consommation du lactose ( $v_{lactose}$ ) sont reportées sur le tableau 25 et nous constatons que pour ces deux souches, les vitesses spécifiques sont très proches l'une de l'autre ( $0,19 \text{ g acide} \times \text{g de biomasse}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ).

D'autre part, la croissance s'arrête alors qu'il reste encore plus de la moitié du lactose. La cause la plus probable de cet arrêt est le pH atteint qui est trop bas (environ 3,7 à 3,9). Nous avons essayé de ralentir cette diminution en ajoutant un tampon au milieu.

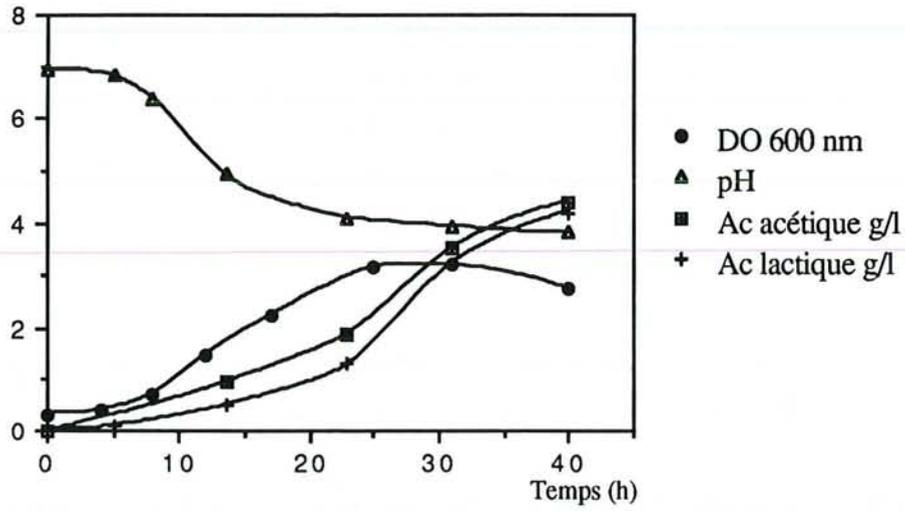


Figure 13 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY

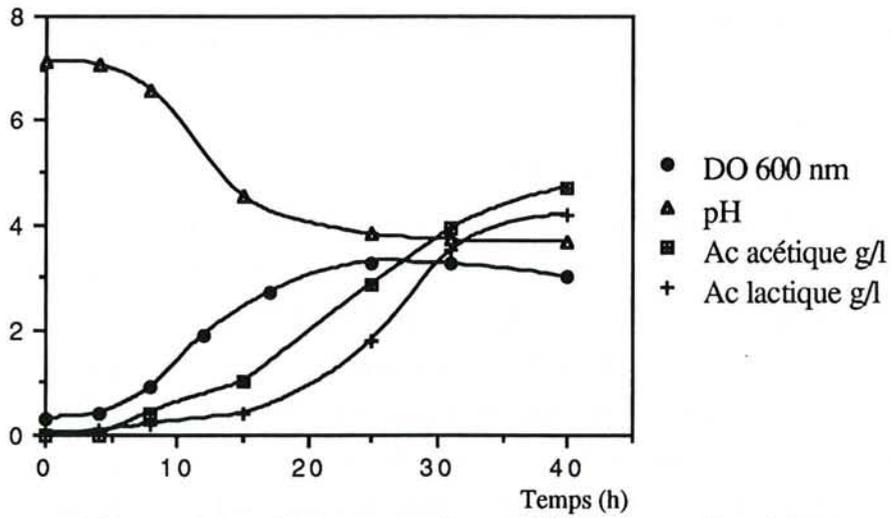


Figure 14 : Croissance de BB 536 sur milieu TPY

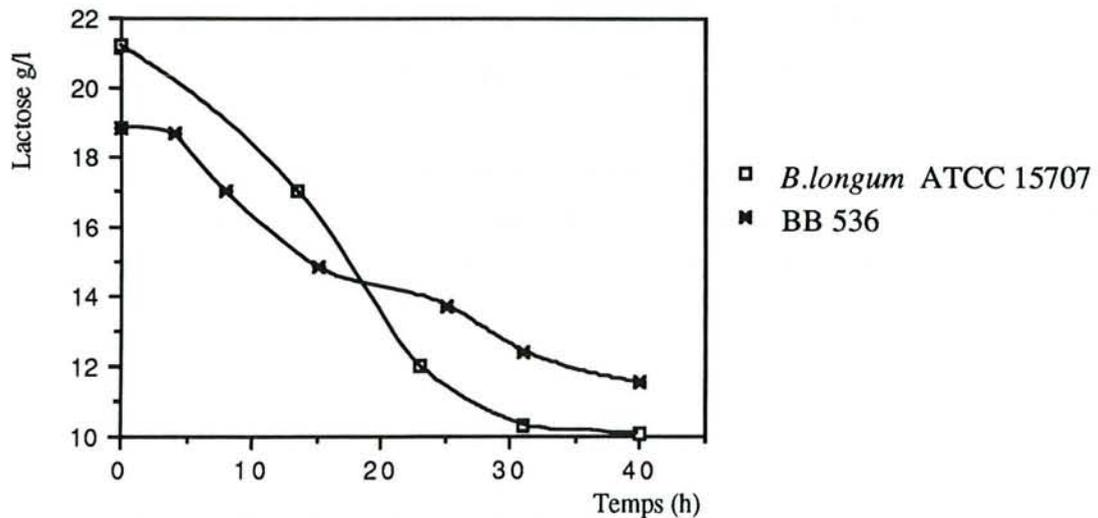


Figure 15 : Dégradation du lactose par 2 souches de *B. longum* sur milieu TPY

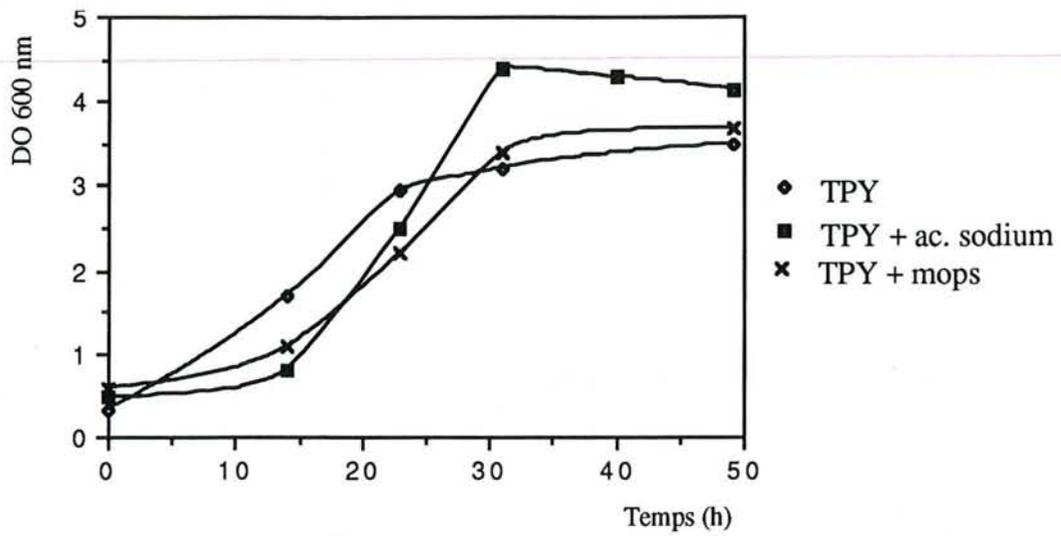


Figure 16 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY tamponné

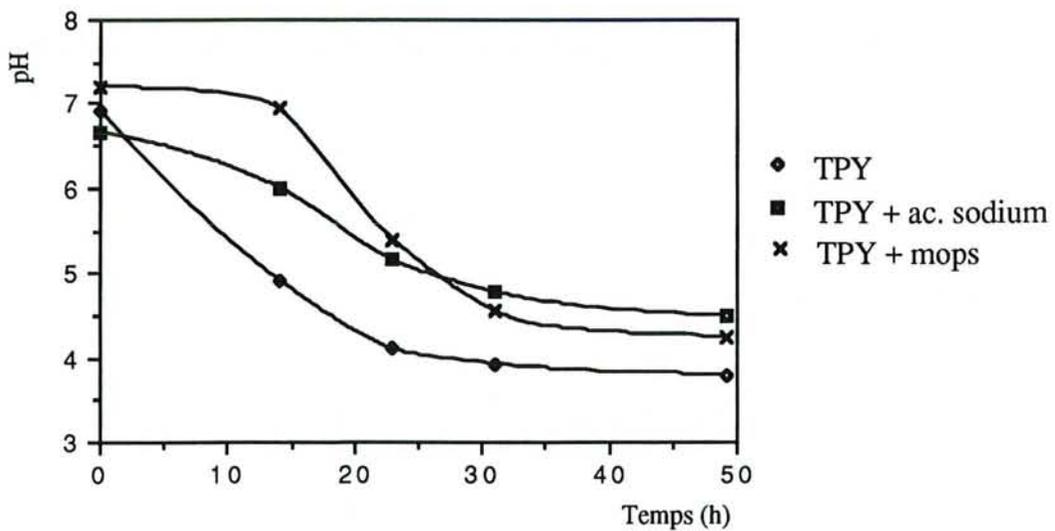


Figure 17 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY tamponné

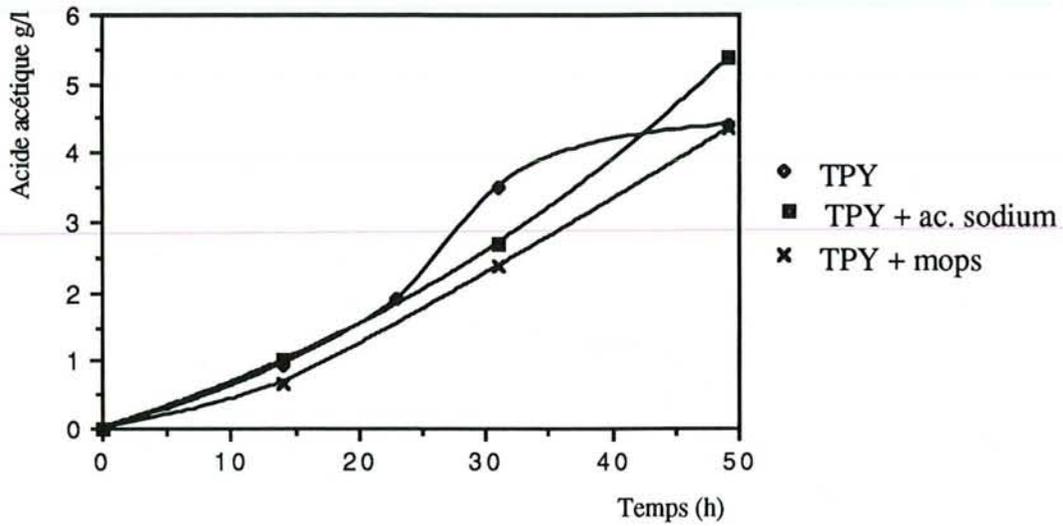


Figure 18 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY tamponné

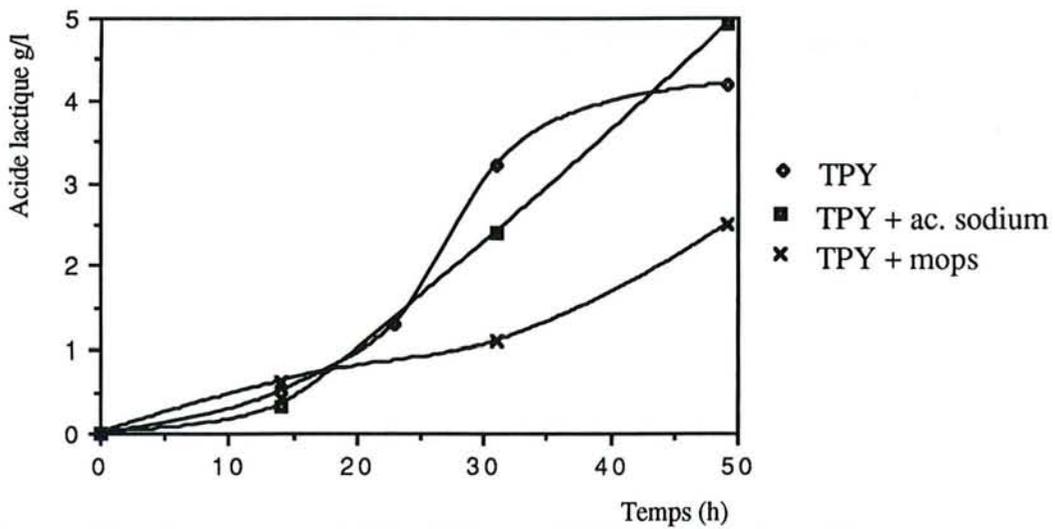


Figure 19 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY tamponné

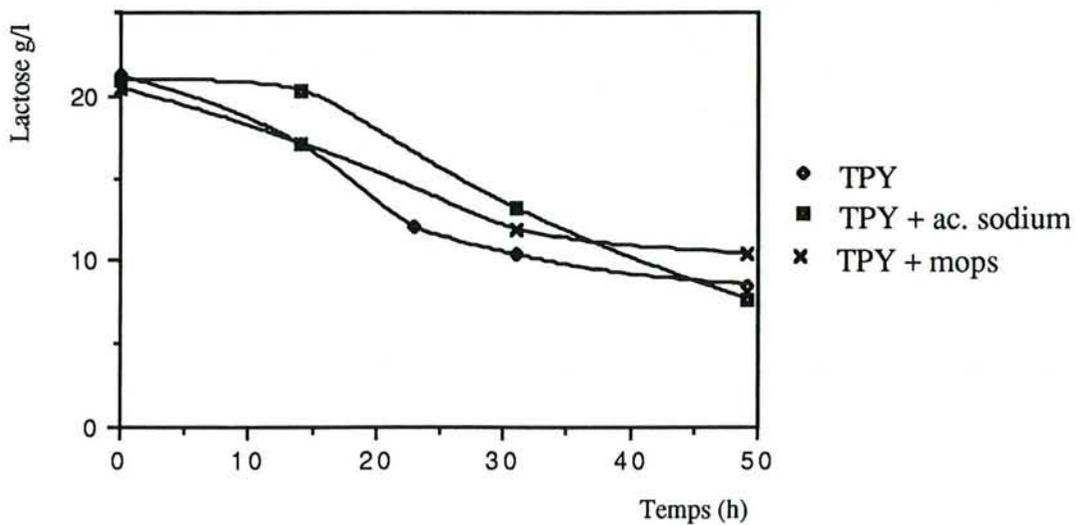


Figure 20 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu TPY tamponné

### III.3.2. CROISSANCE DE *B.LONGUM* ATCC 15707 SUR TPY TAMPONNE:

Deux tampons ont été testés : un tampon acide acétique/acétate de sodium à 20 g/l qui tamponne à un pH de 5,6 et le tampon MOPS qui régule aux environs de 6,4.

Les nouvelles courbes obtenues pour *B. longum* ATCC 15707 sont reportées sur les figures 16 à 20 et les paramètres de fermentation sur le tableau 25. Nous constatons que la biomasse la plus élevée (DO = 4,4 en 31 h.) et le temps de génération le plus court (4,1 h.) sont obtenus en présence d'acétate de sodium. L'effet des deux tampons se fait bien sentir puisque le pH final est plus élevé en leur présence. Le pouvoir tampon de l'acétate de sodium paraît toutefois être meilleur puisque le pH final est de 4,5 avec acétate de sodium, 4,2 avec mops contre 3,8 en milieu TPY non tamponné.

Les proportions de formes dissociées et non dissociées des acides acétique et lactique à ces trois valeurs de pH, calculées selon l'équation de HENDERSON-HASSELBALCH :

$\text{pH} = \text{pKa} + \log (\text{A}^-) - \log (\text{AH})$  sont rappelées ci-dessous :

pH	3,8	4,2	4,5
% acide acétique	90	78	64
% acide lactique	53	31	19

Une quantité plus importante (d'environ 20%) d'acides acétique et lactique est formée si l'on ajoute l'acétate de sodium et parallèlement, la quantité de lactose métabolisée est plus importante. Cependant, même avec acétate de sodium, il reste toujours en fin de croissance presque 8 grammes de lactose non dégradé. Cette inhibition de la croissance peut s'expliquer par l'accumulation d'une grande quantité d'acides acétique et lactique, en dehors de toute notion de pH.

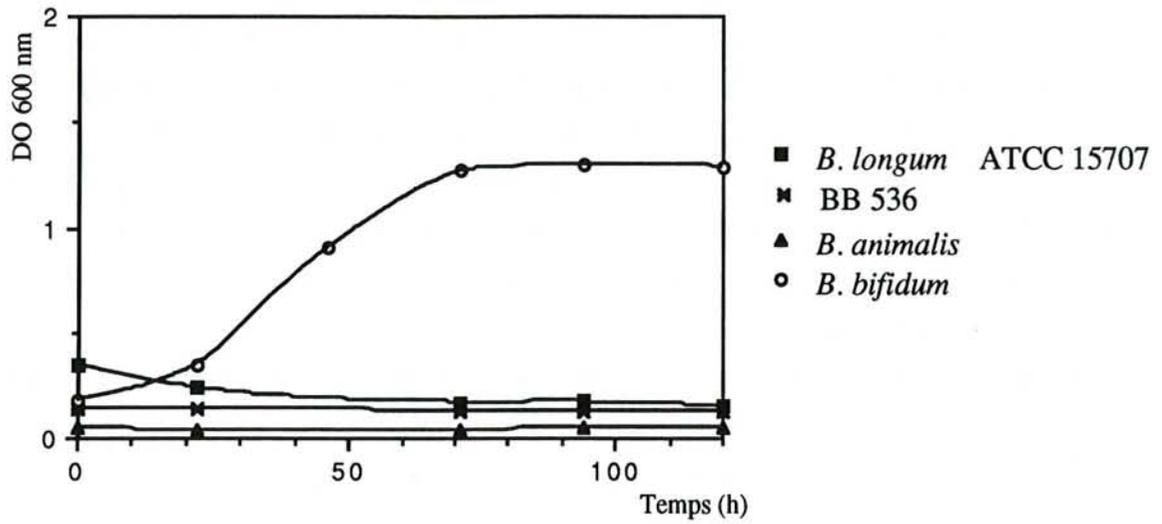


Figure 21 : Croissance sur milieu UEDA

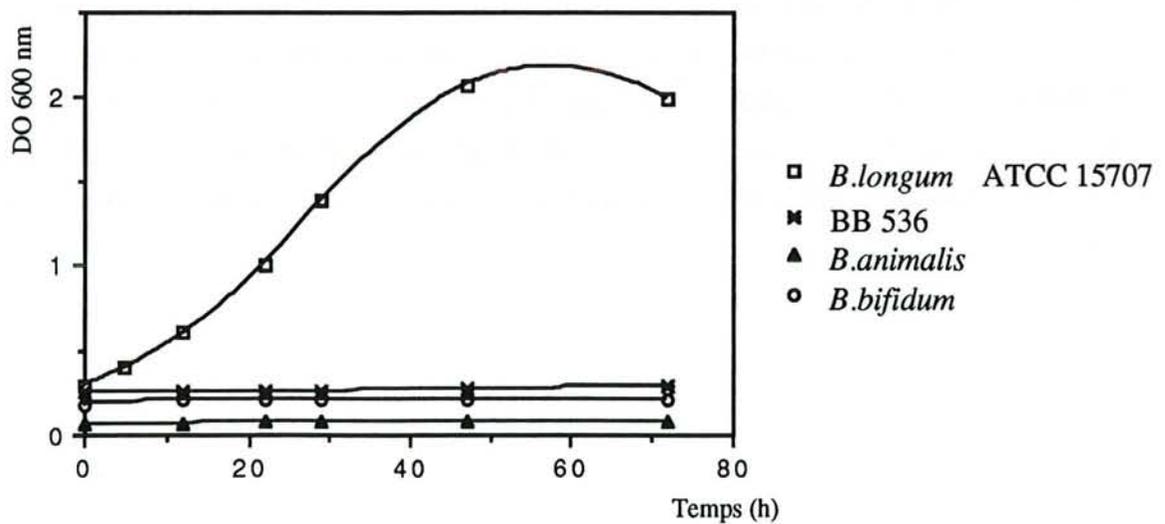


Figure 22 : Croissance sur milieu TOMARELLI synthétique

### III.3.3. MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE DE COMPOSITION DEFINIE :

Le danger de l'emploi d'un milieu complexe pour l'obtention de mutants réside dans le fait qu'un tel milieu est susceptible de contenir le composé choisi pour réaliser le marquage. Nous avons travaillé à la mise au point d'un milieu de culture le plus synthétique possible sur lequel nous pourrions essayer d'obtenir des mutants.

#### III.3.3.1. Milieux de culture témoins complexes :

Tous les résultats obtenus sur les nouveaux milieux testés seront comparés à ceux obtenus sur le milieu de référence : le milieu TPY. Les courbes de croissance obtenues avec *B. longum* ATCC 15707, BB 536, *B. animalis* et *B. bifidum* sur milieu TPY et les valeurs des paramètres de fermentation sont reportés sur la figure 12 page 122 et le tableau 25 page 123.

#### III.3.3.2. Milieux de culture entièrement synthétiques :

Notre choix s'est tout d'abord orienté vers un milieu de culture entièrement synthétique afin d'avoir une maîtrise parfaite de sa composition. Ainsi, nous serons certains que le composé qui sera remplacé par un analogue toxique n'entre pas dans la composition d'un des éléments complexes de ce milieu, faussant de ce fait les résultats de l'étude.

Le milieu de POCH et BEZKOROVAINY (1988) n'a pas été retenu puisque la majorité des souches de *Bifidobacterium* nécessite une supplémentation en facteurs de croissance à composition complexe pour se développer.

La croissance de *B. longum* ATCC 15707, BB 536, *B. animalis* et *B. bifidum* a été testée sur les milieux de HASSINEN et coll. (1951), PETUELY (1956), GYLLENBERG et NIEMELÄ (1959) et UEDA et coll. (1983).

Sur milieu de HASSINEN comme sur milieu de GYLLENBERG, aucune de ces quatre souches de bifidobactéries ne se développe de façon significative, tant en milieu liquide qu'en milieu gélosé, même après une semaine de culture.

Le milieu de UEDA permet la croissance de la souche de *B. bifidum* uniquement (figure 21). Cette croissance est lente ( $T = 18,7$  h.) (tableau 25) et reste faible (DO à 600 nm = 1,3 à 72 heures et, sur milieu gélosé, colonies de 1 mm de diamètre dans les mêmes délais). La croissance de cette souche n'est pas surprenante car le milieu de UEDA a été mis au point pour cette espèce. La croissance de cette espèce sert de témoin pour ces cultures et le fait que les trois

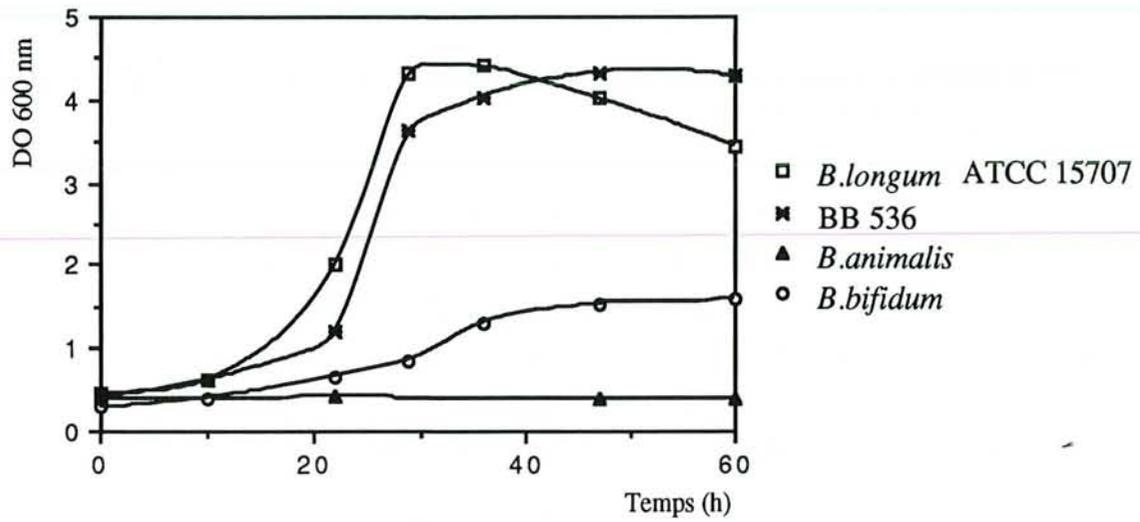


Figure 23 : Croissance sur milieu TOMARELLI avec hydrolysate BIOKAR

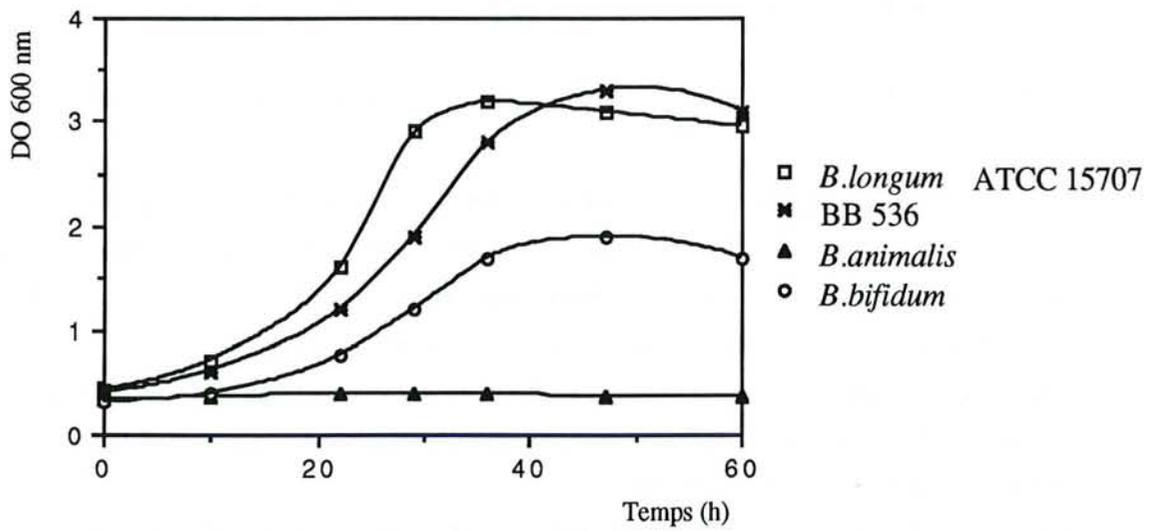


Figure 24 : Croissance sur milieu TOMARELLI avec hydrolysate DIFCO

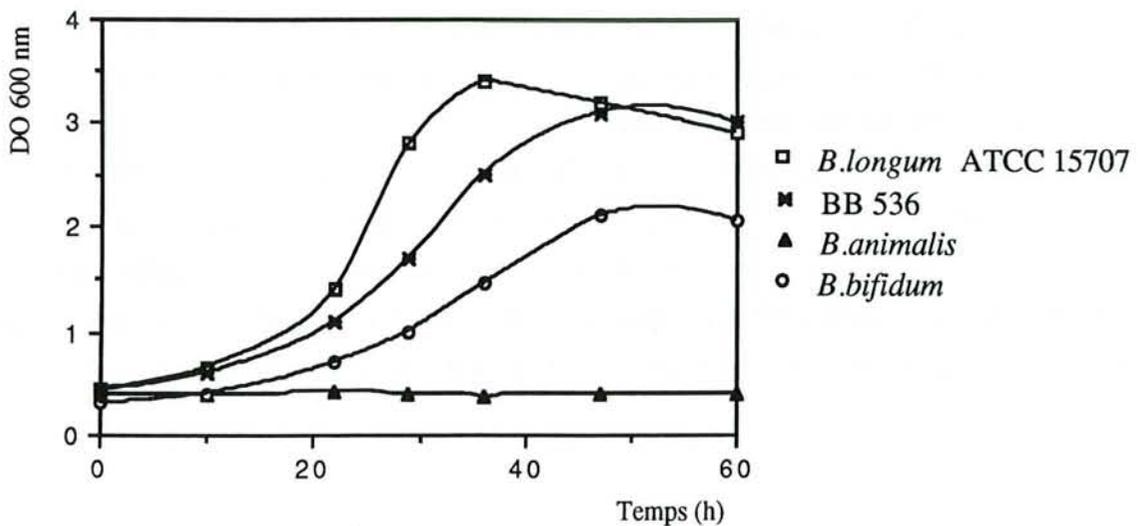


Figure 25 : Croissance sur milieu NORRIS

autres souches ne poussent pas sur ce même milieu nous rappelle que chaque espèce de *Bifidobacterium* présente un comportement différent vis-à-vis des facteurs de croissance indispensables à son développement.

Un autre milieu a ensuite été testé : le milieu de Tomarelli, milieu semi-synthétique, rendu synthétique en remplaçant, comme dans UEDA et coll. (1983), l'hydrolysate de caséine par la D-pantéthine (C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) à 50 mg/l et 2g/l d'acétate d'ammonium. Sur ce nouveau milieu Tomarelli synthétique, les résultats sont très hétérogènes (figure 22) : *B. animalis*, *B. bifidum* et la souche industrielle BB 536 ne se développent pas, seul *B. longum* ATCC 15707 montre une croissance (DO 600 nm = 2,1 en 48 heures et colonies de 1,5 mm de diamètre, crème et translucides) cependant nettement moins bonne (T = 15,1 h.) que sur milieu témoin TPY (T = 4,3 h.).

Ces milieux synthétiques se sont révélés insuffisants pour nos études car nous avons choisi de travailler sur les souches *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 qui doivent donc se développer sur ce milieu. Aussi nous sommes nous tournés vers des milieux semi-synthétiques.

### III.3.3.3. Milieux de culture semi-synthétiques :

Des éléments complexes entrent dans leur composition et nous avons utilisé des milieux de composition connue.

Le milieu de Tomarelli et coll. (1949b) et ses modifications successives par NORRIS et coll. (1950) puis par GYÖRGY et coll. (1954a), sont les milieux les plus fréquemment mentionnés dans la littérature.

Dans la composition du milieu de Tomarelli entre du N-Z-case pour lequel nous avons rencontré des difficultés d'approvisionnement. Nous l'avons remplacé par de l'hydrolysate de caséine provenant des laboratoires BIOKAR ou DIFCO. Nous possédons la composition exacte de ces deux éléments (voir annexe). En plus de ce milieu testé avec l'un ou l'autre de ces hydrolysats, nous avons travaillé avec la modification apportée par NORRIS sur ce milieu qui prévoit une supplémentation en vitamines C, B9 et B12, en pancréatine et en tween 80.

Nous avons constaté (figures 23, 24 et 25 et tableau 25 page 123) que *B. bifidum*, *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent très bien sur ces trois milieux, tant liquides que solides, et même mieux que sur le milieu témoin complexe TPY. *B. animalis*, par contre, ne pousse sur aucun de ces trois milieux et une autre voie de recherche serait nécessaire pour l'obtention de mutants de cette espèce. *B. animalis* ne nous intéresse qu'à titre de comparaison avec les souches d'origine humaine, nous arrêterons ici l'étude de cette espèce.

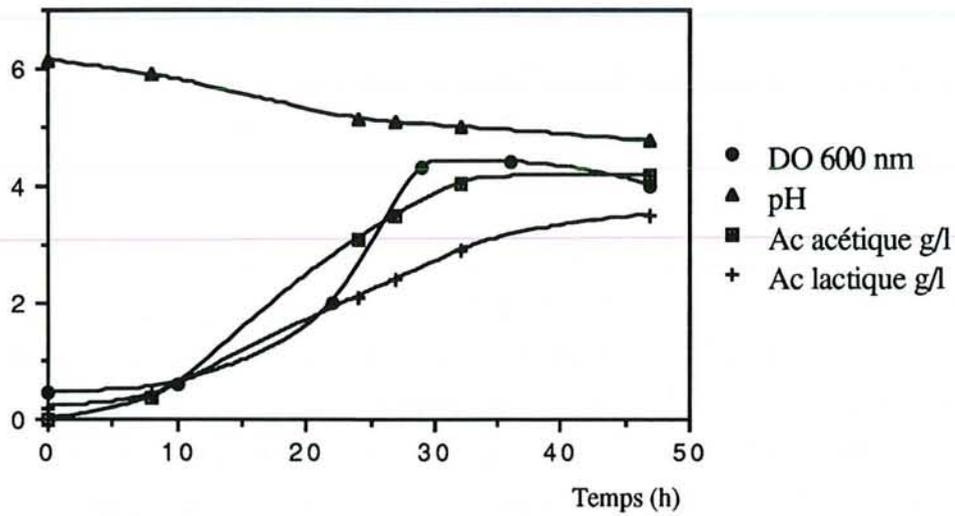


Figure 26 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu Tomarelli

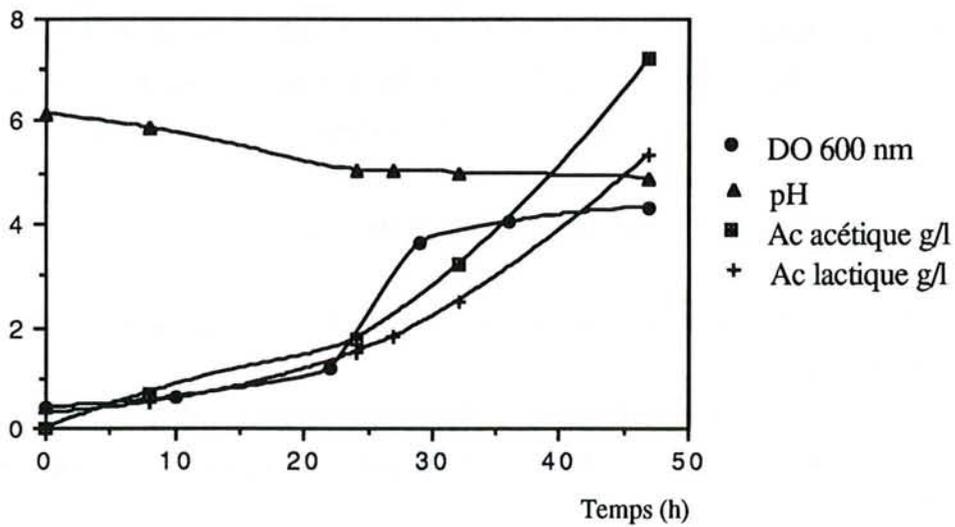


Figure 27 : Croissance de BB 536 sur milieu Tomarelli

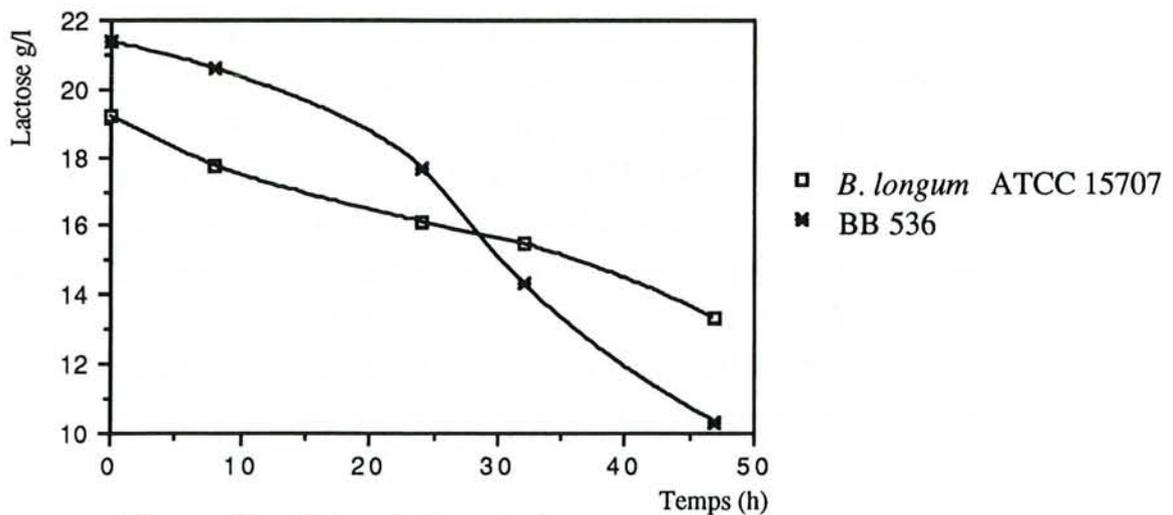


Figure 28 : Dégradation du lactose par 2 souches de *B. longum* sur milieu Tomarelli

Aucun milieu ne s'est révélé optimal pour l'ensemble des espèces et nous devons choisir le milieu de culture en fonction de l'espèce à étudier.

Ainsi, les deux souches qui nous intéressent pour notre étude ultérieure, à savoir *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent mieux (tableau 25) sur milieu Tomarelli avec hydrolysats BIOKAR (figure 23) ( $\mu$  respectifs de 0,11 et 0,15 h<sup>-1</sup>) que sur milieu Tomarelli avec hydrolysats DIFCO (figure 24) ( $\mu$  respectifs de 0,083 et 0,055 h<sup>-1</sup>) ou milieu de Norris (figure 25) ( $\mu$  respectifs de 0,095 et 0,054 h<sup>-1</sup>). Nous retiendrons donc le milieu Tomarelli avec hydrolysats BIOKAR pour la suite de notre travail et l'appellerons simplement "Tomarelli".

#### **III.3.3.4. Survie de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur milieu Tomarelli :**

Avant d'utiliser ce milieu pour essayer d'isoler des mutants de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536, il a fallu s'assurer que ces souches continueraient à se développer sur ce milieu même après plusieurs repiquages. Nous avons constaté qu'après 20 repiquages toutes les 48 heures sur ce milieu, les deux souches ne présentent, par rapport aux souches mères, aucune différence morphologique (aspect des colonies, aspect des cellules à l'observation microscopique) ni physiologique (caractéristiques de culture, courbe de croissance, paramètres de croissance, consommation de lactose et production d'acides).

#### **III.3.3.5. Croissance de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur milieu Tomarelli :**

Nous avons étudié le comportement de nos souches sur ce nouveau milieu en suivant les mêmes paramètres de fermentation que pour l'étude sur milieu TPY (figures 13, 14 et 15 page 124). Les courbes obtenues sur milieu Tomarelli sont reportées sur les figures 26, 27 et 28. Nous observons que sur ce milieu, *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent mieux (DO max proche de 4,4) ( $\mu$  respectifs de 0,17 et 0,18 h<sup>-1</sup>) que sur milieu TPY ( $\mu = 0,16$  h<sup>-1</sup>). Cette croissance plus importante peut être expliquée par la présence dans le milieu Tomarelli de 25 g/l d'acétate de sodium. En effet, l'efficacité du pouvoir tampon de ce composé sur la croissance de *B. longum* ATCC 15707 a été démontrée (paragraphe III.3.2). Les quantités d'acides produites sur les deux milieux, de même que leurs vitesses spécifiques de formation, sont du même ordre de grandeur sur milieu Tomarelli et milieu TPY.

## III.4. ISOLEMENT DE MUTANTS DE *B. LONGUM*

### III.4.1. RECHERCHE DE TECHNIQUES DE MARQUAGE :

Dans l'optique d'obtenir des mutants de *B. longum* ATCC 15707 et de BB 536, différents cribles de sélection ont été testés : un découplant de la phosphorylation oxydative : le CCCP et des analogues de substrat toxiques pour la cellule.

Parmi les analogues de composés du milieu Tomarelli, nous pouvions utiliser :

- des analogues du glucose : 2-désoxyglucose et 2-désoxygalactose;
- des analogues de l'acétate de sodium : fluoroacétate de sodium;
- des analogues de bases : adénine, guanine, uracile ou xanthine.

Les analogues d'acides aminés ne peuvent être utilisés car ils entrent dans la composition de l'élément complexe de ce milieu semi-synthétique : l'hydrolysate de caséine.

#### III.4.1.1. Résistance de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 au CCCP:

Le Carbonyl Cyanide m-ChloroPhénylhydrazone est un découplant de la phosphorylation oxydative, empêchant la formation d'ATP.

Des comptages bactériens de cultures de *B. longum* sur milieu gélosé Tomarelli additionné de CCCP à 0, 1, 5, 10, 20 ou 50  $\mu\text{M}$  nous ont permis de constater que *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent de façon tout à fait normale sur les milieux renfermant du CCCP, même pour 50  $\mu\text{M}$  de CCCP, concentration habituellement considérée comme fortement inhibitrice (DECKER et LANG, 1977; ITO et coll., 1983; GUFFANTI et coll., 1987). Puisqu'aucune inhibition de la croissance n'a été observée à 20  $\mu\text{M}$  et qu'aucun mutant n'a pu par conséquent être obtenu, nous n'avons pas persisté dans cette voie.

#### III.4.1.2. Analogues de sucre :

Deux analogues de sucres ont été testés : le 2-désoxyglucose (2 dGlu) et le 2-désoxygalactose (2 dGal).

Les bactéries doivent être cultivées sur un sucre qu'elles métabolisent lentement. Ainsi, en présence de 2-désoxyglucose (2 dGlu) ou 2-désoxygalactose (2 dGal), elles utilisent ce composé en priorité et inhibent leur croissance. Les souches n'incorporant pas ces analogues utiliseront le sucre lent et pousseront. Ce seront les mutants. Le 2 dGlu et le 2 dGal seront testés en tant que composés toxiques.

xylose (g/l)	0	0,05	0,1	0,5	1	2
2 dGlu (g/l)						
0	-	(+)	+	++	++	++
0,05	-	+	+	++	++	++
0,1	-	(+)	+	++	++	++
0,5	-	(+)	+	+	++	++
1	-	+	+	+	++	++
2	-	+	+	++	++	++

**Tableau 26 :** Croissance de *B. longum* ATCC 15707 ou BB 536 sur milieu Tomarelli avec différentes concentrations en xylose et 2 désoxyglucose.

xylose (g/l)	0	0,05	0,1	0,5	1	2
2 dGal (g/l)						
0	-	(+)	+	++	++	++
0,05	-	(+)	+	+	++	++
0,1	-	-	(+)	+	++	++
0,5	-	-	(+)	+	+	++
1	-	-	-	(+)	(+)	++
2	-	-	-	-	+	++

**Tableau 27 :** Croissance de *B. longum* ATCC 15707 ou BB 536 sur milieu Tomarelli avec différentes concentrations en xylose et 2 désoxygalactose.

**Légende des tableaux 26 et 27 :**

- : pas de colonie
- (+) : colonie en tête d'épingle
- + : colonie de 0,5 à 1 mm de diamètre
- ++ : colonie de diamètre supérieur à 1,5 mm.

Dans les publications relatives aux mutations avec 2 dGlu, les bactéries sont cultivées sur amidon. Les bifidobactéries n'utilisant pas cette source carbonée, nous avons dû en tester d'autres. Nous avons choisi un sucre métabolisé lentement par les bifidobactéries afin que l'analogue toxique soit utilisé en priorité. Tous les substrats habituellement utilisés en identification et métabolisés par nos souches ont été testés. Nous avons retenu le xylose et le mannose comme sucres lents, car sur milieu TPY gélosé contenant ces sucres, les colonies ne se développent qu'en quatre jours contre 36 heures pour les autres sucres.

Les résultats obtenus avec les deux souches sur un même milieu sont similaires. Aucune colonie ne s'est développée sur le milieu contenant du mannose même en l'absence de 2dGlu. Par ailleurs, nous observons que :

- sur milieu sans xylose, les bactéries ne se développent pas (témoin négatif);
- sur 0,05 et 0,1 g/l de xylose, des petites colonies apparaissent;
- à partir de 0,5 g/l, les colonies sont grosses (tableau 26).

Nous notons surtout que la concentration en 2 dGlu n'a aucune influence sur la pousse ou la taille des colonies et que seule la concentration en xylose intervient. Le 2dGlu n'a pas d'effet inhibiteur sur la culture et ne peut donc être utilisé comme substrat toxique de ces deux souches.

Nous avons alors suivi la même méthodologie en remplaçant le 2-désoxyglucose par le 2-désoxygalactose, avec toujours le xylose comme sucre lent (tableau 27) :

- en absence de 2-désoxygalactose et de xylose, les bactéries ne se développent pas (témoin);
- sur 0,05 et 0,1 g de xylose /l de petites colonies apparaissent;
- à partir de 0,5 g/l, les colonies sont grosses.

Par ailleurs, plus la concentration en 2-désoxygalactose augmente, plus la taille des colonies diminue jusqu'à leur entière disparition. L'absence de colonie se manifeste pour des concentrations en 2-désoxygalactose d'autant plus faibles que la concentration en xylose est faible.

Le 2-désoxygalactose est donc un analogue toxique sur lequel nous pourrions essayer d'obtenir des mutants. Nous choisirons des concentrations en xylose et 2 dGal telles que les colonies restent très petites c'est-à-dire 0,1 g/l de xylose et 0,5 g/l au maximum de 2 dGal.

### III.4.1.3. Analogue d'acétate de sodium :

Le fluoroacétate de sodium a été testé en remplacement de l'acétate de sodium. Nous avons effectué des cultures de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur Tomarelli privé d'acétate de sodium. La croissance est identique à celle obtenue sur Tomarelli complet.

Nous avons ensuite recherché la concentration minimale inhibant la croissance selon les deux méthodes exposées dans le paragraphe II.8.1.3.1 page 99. Les concentrations de fluoroacétate de sodium testées étaient de 0,1; 1; 2; 5 ou 10 g/l soit 1 à 100 mM. Nous avons obtenu des résultats semblables pour les deux méthodes, à savoir que *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent très bien même aux concentrations de fluoroacétate de sodium les plus élevées. Il est permis de penser que soit ces souches n'incorporent pas le fluoroacétate de sodium, soit celui-ci n'est pas toxique envers *B. longum*. Les souches sauvages résistant déjà à des concentrations de substrat toxique supérieures à celles auxquelles résistent les mutants obtenus par BROWN et coll. (1977) et GUEST (1979), nous ne pourrions donc pas, selon notre protocole, obtenir de mutant résistant au fluoroacétate de sodium.

Nous pouvions nous attendre à ce résultat puisque cet analogue est converti en fluoroacétylphosphate et fluoroacétylcoenzyme A, bloquant le coenzyme sous cette forme et par conséquent bloquant de nombreuses réactions métaboliques, comme par exemple la biosynthèse des acides gras.

### III.4.1.4. Analogues de bases :

Nous avons testé les analogues suivants : 8-azaguanine, 5-azauracile, 6-azauracile, 5-bromouracile, 5-fluorouracile et 8-azaxanthine.

- Les cultures de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 effectuées sur milieu Tomarelli privé de guanine, d'uracile ou de xanthine ont fourni des résultats semblables à ceux obtenus sur milieu Tomarelli complet, hormis un temps de latence plus long d'une dizaine d'heures. Les cellules sont donc capables de synthétiser ces composés manquants à partir de ceux fournis par le milieu.

- La recherche de la concentration minimale inhibant la croissance a été réalisée selon les deux méthodes précédemment exposées (paragraphe II.8.1.3.1 page 99). En gélose inclinée, les concentrations des solutions d'analogues de bases utilisées étaient de 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4 ou 5 g/l. Les solutions de substrats toxiques de la seconde méthode avaient les mêmes concentrations.

Sur 8-azaguanine, 5-azauracile, 5-bromouracile ou 8-azaxanthine, *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 se développent très bien même aux concentrations les plus élevées (5 g/l), tant en

Analogue de base	8 AG	5 AU	6 AU	5 BU	5 FU	8 AX
Concentration g/l						
0,1	++	++	++	++	++	++
0,5	++	++	+	++	+	++
1	++	++	+	++	-	++
2	++	++	-	++	-	++
3	++	++	-	++	-	++
4	++	++	-	++	-	++
5	++	++	-	++	-	++

**Tableau 28** : Taille des colonies de *B. longum* ATCC 15707 obtenues sur milieu Tomarelli additionné de différentes concentrations d'analogues de bases.

Analogue de base	8 AG	5 AU	6 AU	5 BU	5 FU	8 AX
Concentration g/l						
0,1	++	++	++	++	++	++
0,5	++	++	++	++	+	++
1	++	++	+	++	-	++
2	++	++	+	++	-	++
3	++	++	-	++	-	++
4	++	++	-	++	-	++
5	++	++	-	++	-	++

**Tableau 29** : Taille des colonies de BB 536 obtenues sur milieu Tomarelli additionné de différentes concentrations d'analogues de bases.

**Légendes des tableaux 28 et 29 :**

- : pas de colonie
- + : colonie de 0,5 à 1 mm de diamètre
- ++ : colonie de diamètre supérieur à 1,5 mm.

milieu liquide qu'en milieu gélosé. Soit ces analogues ne sont pas métabolisés soit ils ne sont pas toxiques pour nos souches et ne pourront pas être utilisés pour l'obtention de mutants.

Sur 6-azauracile, au contraire, la croissance est inhibée totalement sur gélose aux environs de 2 g/l (15,4 mM) pour *B. longum* ATCC 15707 et 3 g/l (23 mM) pour BB 536, tandis que sur 5-fluorouracile, elle l'est dès 1 g/l (7,7mM) pour *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 (tableaux 28 et 29).

Les courbes de croissance obtenues en milieu liquide pour les deux souches et avec différentes concentrations de chacun des deux analogues toxiques sont reportées sur les figures 29 à 32. Ces courbes confirment les résultats obtenus en milieu gélosé, à savoir que la croissance de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 est d'autant plus faible que la concentration en 6 AU ou 5 FU augmente et que la croissance est inhibée à 2 g/l de 6 AU ou 1 g/l de 5 FU pour *B. longum* ATCC 15707 et à 3 g/l de 6 AU ou 1 g/l de 5 FU pour BB 536.

Le 6-azauracile et surtout le 5-fluorouracile sont métabolisés et se comportent en analogues toxiques pour nos souches.

#### **III.4.1.5. Toxicité du 5 fluorouracile sur la flore intestinale :**

Nos études ont permis de constater que sur milieux gélosés BL, PCA, GN et sur milieu Tomarelli gélosé ou liquide, en absence de 5 FU, une grande partie des bactéries de la flore intestinale se développe. Sur ce milieu Tomarelli privé d'uracile et additionné de 5 FU à 1 g/l, aucun développement bactérien n'est observé, tant en milieu liquide que sur milieu gélosé, en aérobiose comme en anaérobiose, alors que sur les quatre milieux témoins, la pousse des bactéries intestinales est importante et de même ordre de grandeur quelque soit le milieu.

#### **III.4.2. OBTENTION DE MUTANTS :**

3 analogues toxiques ont été retenus : le 2 dGal, le 6 AU et le 5 FU.

Les premiers essais ont été effectués en mutation spontanée. Nous serons amenés ensuite à augmenter les taux de mutation par l'emploi des rayonnements ultra-violets ou d'Ethyl Méthane Sulfonate (E.M.S.). Une étude préliminaire permettra de tester la survie de nos deux souches lors du traitement par ces agents mutagènes.

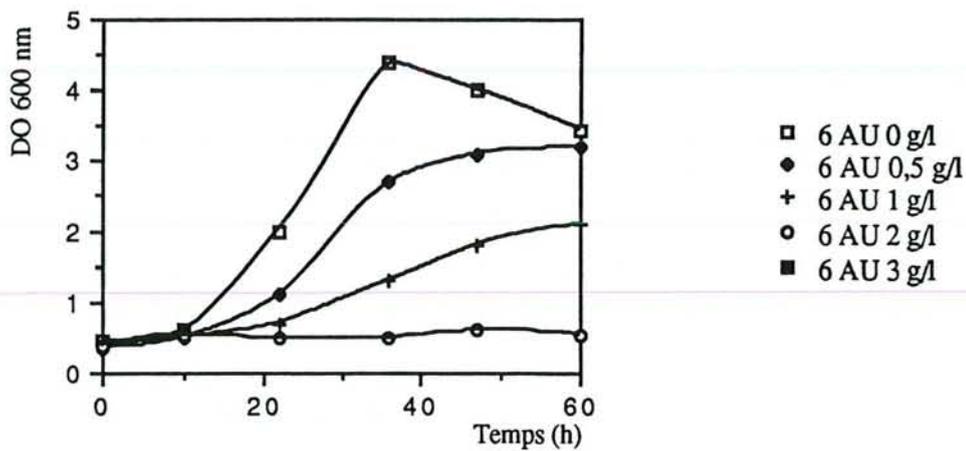


Figure 29 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu Tomarelli + 6 AU

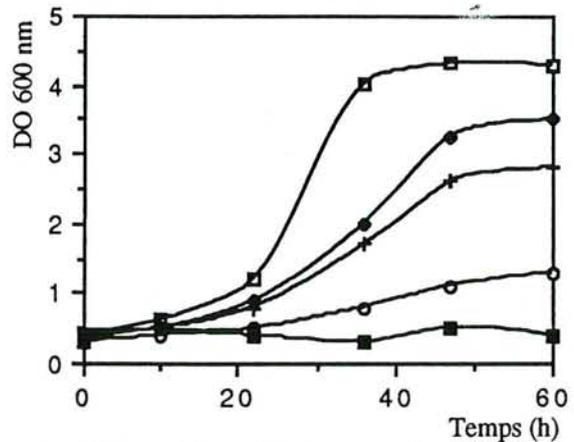


Figure 30 : Croissance de BB 536 sur milieu Tomarelli + 6 AU

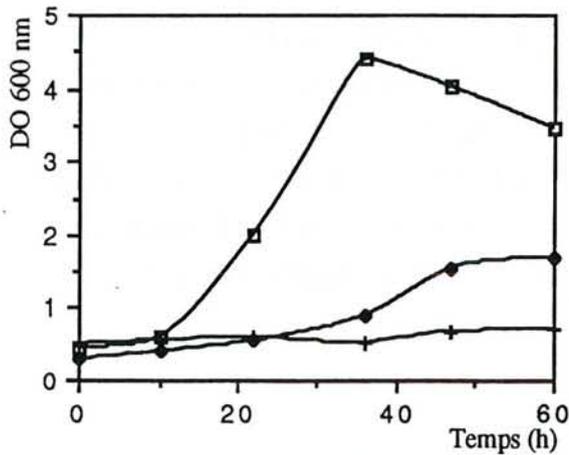


Figure 31 : Croissance de *B. longum* ATCC 15707 sur milieu Tomarelli + 5 FU

- 5 FU 0 g/l
- 5 FU 0,5 g/l
- + 5 FU 1 g/l

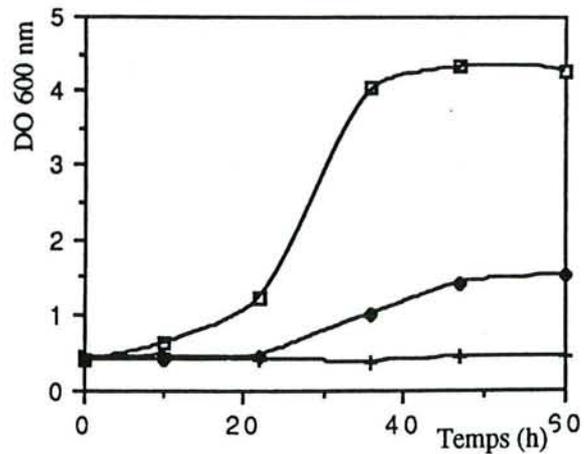


Figure 32 : Croissance de BB 536 sur milieu Tomarelli + 5 FU

### III.4.2.1. Mutation spontanée :

#### III.4.2.1.1. Obtention de mutants sur 2 dGal :

Environ  $10^{10}$  cellules de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 ont été étalées en masse dans du milieu TOMARELLI additionné de 0,1 g/l de xylose. Nous avons observé des halos autour des puits effectués et remplis de 2 dGal à 0,5 g/l, prouvant bien le pouvoir toxique du 2 dGal sur *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 mais aucune colonie ne s'est développée dans cette zone d'inhibition.

L'obtention de mutants spontanés sur 2 dGal semble difficile.

#### III.4.2.1.2. Obtention de mutants sur 6 AU et 5 FU :

##### - *B. longum* ATCC 15707 :

Environ  $10^{10}$  cellules de *B. longum* ATCC 15707 ont été étalées sur gélose Tomarelli contenant du 6 AU à 2 g/l ou du 5 FU à 1 g/l.

1 colonie de *B. longum* ATCC 15707 s'est développée sur milieu Tomarelli + 6 AU à 2 g/l et 3 colonies sur milieu Tomarelli + 5 FU à 1 g/l. Chaque colonie obtenue pour une concentration en substrat toxique donnée est repiquée :

- sur milieu à la même concentration en substrat toxique afin de conserver la colonie;
- sur milieu à concentration supérieure de 0,5 g/l en substrat toxique, le but de ce second repiquage étant d'augmenter la résistance au substrat toxique.

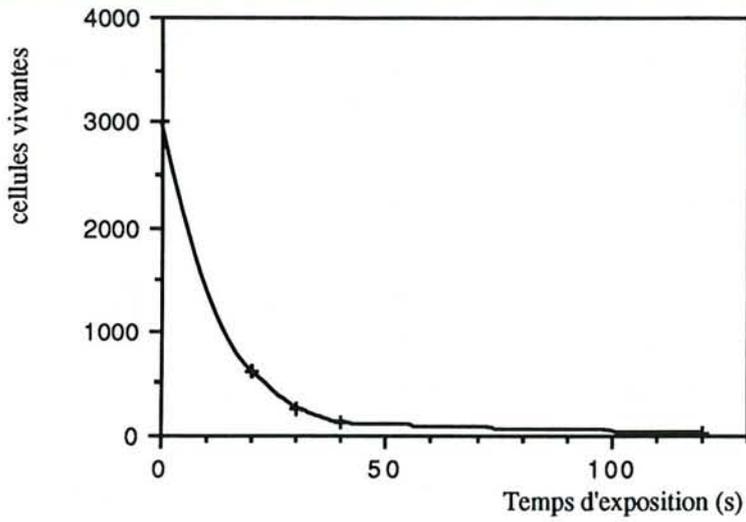
Parallèlement, et pour vérification, les souches sauvages ont été ensemencées sur les milieux toxiques sans qu'aucune pousse ne soit décelée.

Par cette méthode, nous avons ainsi obtenu 1 mutant spontané de *B. longum* ATCC 15707 résistant à 4 g/l de 6 AU et 2 résistant à 4 g/l de 5 FU, ce qui nous permet de discerner les mutants des souches sauvages.

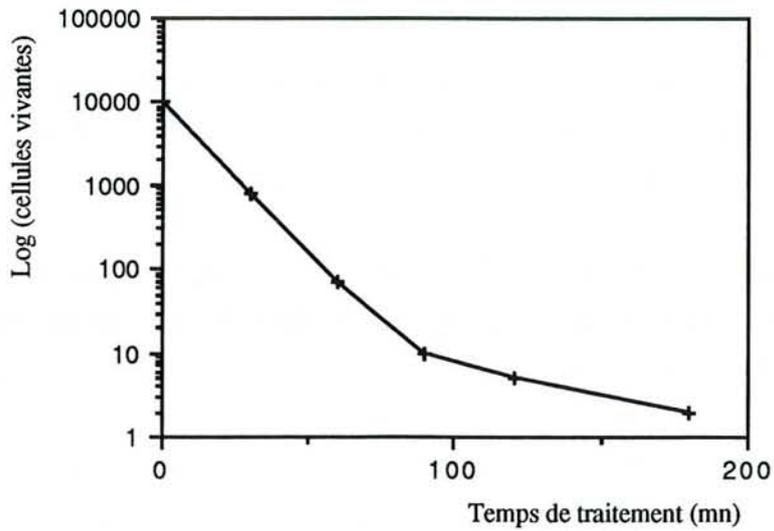
Chaque mutant est ensuite repiqué 20 fois consécutives sur milieu Tomarelli non toxique puis sur milieu toxique à fortes concentrations (4 g/l). Un des mutants de *B. longum* ATCC 15707 sur 5 FU à 4 g/l n'a pas repoussé à cette même concentration, vraisemblablement à cause d'une réversion.

**Nous avons obtenu ainsi 2 mutants de *B. longum* ATCC 15707 : l'un, appelé ATCC 15707 m.42, résistant à des concentrations de 5-fluorouracile de 4g/l, et l'autre, appelé ATCC 15707 m.45, résistant à des concentrations de 6-azauracile de 4 g/l.**

L'écart entre la concentration inhibitrice pour la souche sauvage et la concentration tolérée par le mutant est beaucoup plus important pour la souche ATCC 15707 m.42 (de 1 à 4 g/l) que pour la souche ATCC 15707 m.45 (de 2 à 4 g/l). Nous avons donc choisi de travailler avec le mutant ATCC 15707 m.42.



**Figure 33 : Survie de BB 536 à un rayonnement ultra-violet**



**Figure 34 : Survie de BB 536 à un traitement à l'EMS**

#### **- BB 536 :**

Aux concentrations inhibitrices de 6 AU (3 g/l) ou de 5 AU (1 g/l), nous n'avons obtenu aucun mutant spontané de la souche BB 536. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'agents mutagènes.

### **III.4.2.2. Mutation aux U.V. :**

Ces essais de mutation ont été réalisés uniquement sur la souche BB 536 puisque nous avons déjà obtenu spontanément des mutants de *B. longum* ATCC 15707. Ce traitement physique est la méthode la plus simple et la plus efficace pour obtenir une grande variété de mutants.

#### **III.4.2.2.1. Survie de BB 536 aux U.V. :**

La survie de BB 536 à un traitement par rayonnement U.V. de longueur d'onde 254 nm pendant 10 à 120 secondes a été étudiée et une courbe a pu être tracée (figure 33). Nous constatons qu'après 30 secondes de traitement, 8,7% des cellules sont vivantes et qu'après 120 secondes, il n'en reste plus que 0,83%. Les temps de traitement U.V. généralement reconnus comme optimaux pour l'obtention de mutants étant ceux qui correspondent à 0,1 à 1% de survie, nous travaillerons à des temps de 30 secondes, 1 minute et 2 minutes.

#### **III.4.2.2.2. Obtention de mutants sur 2 dGal :**

Des cultures de *B. longum* ATCC 15707 et de BB 536 traitées aux U.V. pendant 30 secondes, 1 ou 2 minutes ont servi à ensemercer la gélose selon la même technique qu'en mutation spontanée. Pour augmenter le taux de mutation, des essais ont été réalisés avec des temps de traitement plus longs (4 ou même 10 minutes). Nous n'avons cependant pas obtenu de mutant résistant au 2-désoxygalactose.

#### **III.4.2.2.3. Obtention de mutants sur 6 AU et 5 FU :**

Aucune colonie ne s'est développée sur milieu Tomarelli contenant l'un ou l'autre des inhibiteurs (6 AU ou 5 FU), même après traitement de la suspension d'ensemencement aux U.V pendant 30 secondes, 1, 2, 4 ou 10 minutes.

Ce manque d'efficacité du traitement U.V. peut s'expliquer par son mécanisme d'action. Cet agent mutagène produit des transitions AT, des transversions et des délétions. Les U.V. altèrent une base ou plus, si bien que l'appariement est faux ou n'est plus possible. Par ailleurs, les U.V. induisent la formation de dimères entre deux pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN qui bloquent la réplication. Pour que celle-ci ait lieu, l'intervention d'un

système de réparation pour répliquer ultérieurement la lésion est nécessaire. Du fait de l'existence de ce système de réparation, nous avons utilisé parallèlement l'E.M.S. Par ailleurs, la stabilité de la souche industrielle BB 536 est certainement un des critères de choix retenus par les professionnels laitiers.

### **III.4.2.3. Mutation à l'E.M.S. :**

#### **III.4.2.3.1. Survie de BB 536 à l'E.M.S. :**

La survie de BB 536 au traitement à l'E.M.S. a été étudiée (figure 34). 1 ml de culture de BB 536 additionné de 20 µl d'E.M.S. pendant 30 minutes permet une survie de 8% des cellules. Après 1 heure de traitement, seules 0,7% survivent.

#### **III.4.2.3.2. Obtention de mutants sur 2 dGal :**

Cet agent alkylant semble relativement spécifique de l'induction de transitions GC vers AT. Il n'est pas incorporé à l'ADN mais altère une base de façon telle qu'un appariement erroné a lieu.

Même après traitement à l'E.M.S. durant 30, 45, 60 ou même 90 minutes, aucun mutant de BB 536 n'a pu être obtenu sur gélose Tomarelli additionnée de 0,1 g/l de xylose, autour des puits renfermant du 2-déoxygalactose à 0,5 g/l.

#### **III.4.2.3.3. Obtention de mutants sur 6AU et 5FU :**

Un traitement de BB 536 avec 20 µl d'E.M.S. pendant 30, 45, 60 ou 90 minutes comme décrit au paragraphe II.8.2.3 page 100 a été effectué avant ensemencement sur milieu Tomarelli additionné de 6 AU à 2 g/l ou de 5 FU à 1 g/l. Aucune colonie ne s'est développée.

Le même traitement a été repris mais avec 30 µl d'E.M.S. Aucune croissance n'a été observée sur 6 AU. En revanche, 21 colonies très petites sont apparues sur 5 FU à 1 g/l.

Après vérification de l'appartenance de ces colonies au genre *Bifidobacterium*, elles ont été repiquées successivement sur des milieux Tomarelli renfermant chaque fois 0,5 g/l de 5 FU de plus que dans le milieu précédent. Nous avons ainsi augmenté la résistance à 4 g/l pour 6 des 21 souches.

Après 20 passages sur milieu BL agar, 5 des 6 souches ont repoussé sur 5 FU à 4 g/l. Parmi ces 5 souches, 2 forment des colonies de taille similaire à celle des souches-mères. Les 3 autres restent très petites et ne seront pas retenues pour la suite de nos études.

**Les deux mutants de BB 536 obtenus sur 5 FU sont appelés BB 536 m.15 et BB 536 m.16.**

**Nous avons choisi arbitrairement de travailler avec BB 536 m.15.**

	BB 536 nombre d'u.f.c./ml	BB 536 m.15 nombre d'u.f.c./ml	mélange volume/volume de BB 536 et BB 536 m.15 nombre d'u.f.c./ml	
			valeur théorique	valeur observée
Bl agar	$256 \pm 23 \cdot 10^5$	$183 \pm 31 \cdot 10^5$	$219 \cdot 10^5$	$239 \pm 29 \cdot 10^5$
PCA	$303 \pm 17 \cdot 10^5$	$211 \pm 20 \cdot 10^5$	$257 \cdot 10^5$	$222 \pm 11 \cdot 10^5$
GN	$240 \pm 12 \cdot 10^5$	$391 \pm 18 \cdot 10^5$	$315 \cdot 10^5$	$305 \pm 16 \cdot 10^5$
Tomarelli	$341 \pm 21 \cdot 10^5$	$374 \pm 26 \cdot 10^5$	$358 \cdot 10^5$	$371 \pm 19 \cdot 10^5$

**Tableau 30** : Numération de BB 536, BB 536 m. 15 et du mélange volume à volume de ces deux cultures pures sur différents milieux témoins.

	ATCC 15707 nombre d'u.f.c./ml	ATCC 15707 m.12 nombre d'u.f.c./ml	mélange volume/volume de ATCC 15707 et ATCC 15707 m.12 nombre d'u.f.c./ml	
			valeur théorique	valeur observée
Bl agar	$199 \pm 18 \cdot 10^5$	$246 \pm 27 \cdot 10^5$	$222 \cdot 10^5$	$250 \pm 25 \cdot 10^5$
PCA	$246 \pm 28 \cdot 10^5$	$307 \pm 32 \cdot 10^5$	$276 \cdot 10^5$	$249 \pm 18 \cdot 10^5$
GN	$203 \pm 14 \cdot 10^5$	$191 \pm 22 \cdot 10^5$	$197 \cdot 10^5$	$210 \pm 14 \cdot 10^5$
Tomarelli	$361 \pm 29 \cdot 10^5$	$254 \pm 19 \cdot 10^5$	$307 \cdot 10^5$	$287 \pm 21 \cdot 10^5$

**Tableau 30 bis** : Numération de ATCC 15707, ATCC 15707 m. 12 et du mélange volume à volume de ces deux cultures pures sur différents milieux témoins.

### **III.4.3. ETUDE DES MUTANTS ATCC 15707 m.42 ET BB 536 m.15 :**

Nous rappelons que les mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 issus respectivement de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sont tous deux résistants à 4 g/l de 5 FU.

Nous devons garder à l'esprit que la finalité de la recherche de mutants reste leur reconnaissance rapide et sûre tant en mélange avec leurs souches-mères qu'au sein d'une flore aussi complexe que la flore intestinale. En outre, plus la physiologie du mutant est proche de celle de sa souche-mère, plus nous pourrions penser que son comportement après ingestion, vis-à-vis de la muqueuse et de la flore intestinale en est similaire.

#### **III.4.3.1. Survie des mutants :**

30 repiquages sur milieu Tomarelli + 5 FU 4 g/l n'ont pas du tout altéré la morphologie ni la croissance de ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15. Nous pourrions donc utiliser ces mutants pour nos études ultérieures.

#### **III.4.3.2. Recouvrement de ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 en mélange avec les cellules-mères :**

##### - milieux témoins :

Les tableaux 30 et 30 bis rassemblent les résultats interprétables obtenus pour BB 536 m.15 et ATCC 15707 m.42 respectivement. L'observation et le comptage des colonies obtenues sur les différents milieux de culture pour les souches sauvages pures, les mutants purs ou les mélanges des deux nous permettent de constater que les souches de *B. longum* ATCC 15707 et le mutant ATCC 15707 m.42 et BB 536 et BB 536 m.15 se développent bien et de façon équivalente sur les milieux témoins BL, PCA ou GN et Tomarelli. Le nombre de colonies obtenues pour la suspension mélange n'est pas significativement différent de la valeur théorique calculée comme étant la moyenne des numérations des deux suspensions de cultures pures.

##### - milieux toxiques :

Les mêmes suspensions ayant servi à ensemercer des milieux toxiques ont fourni les résultats suivants (tableau 31) :

- sur 5 FU, dès 1 g/l, seuls les mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 se développent et ceci dans les mêmes proportions que sur milieu BL, PCA, GN ou Tomarelli sans 5 FU.

- sur milieu toxique, quelque soit la concentration de 5 FU, le nombre de bactéries se développant (mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15) reste constant.

	BB 536 nombre d'u.f.c./ml	BB 536 m.15 nombre d'u.f.c./ml	mélange volume/volume de BB 536 et BB 536 m.15	
			nombre d'u.f.c./ml	
			valeur théorique	valeur observée
Tomarelli * + 5FU 0 g/l	$341 \pm 21 \cdot 10^5$	$374 \pm 26 \cdot 10^5$	$358 \cdot 10^5$	$371 \pm 19 \cdot 10^5$
Tomarelli + 5FU 1 g/l	0	$311 \pm 31 \cdot 10^5$	$187 \cdot 10^5$	$179 \pm 18 \cdot 10^5$
Tomarelli + 5FU 2 g/l	0	$342 \pm 18 \cdot 10^5$	$171 \cdot 10^5$	$167 \pm 31 \cdot 10^5$
Tomarelli + 5FU 3 g/l	0	$370 \pm 24 \cdot 10^5$	$185 \cdot 10^5$	$202 \pm 29 \cdot 10^5$
Tomarelli + 5FU 4 g/l	0	$333 \pm 26 \cdot 10^5$	$166 \cdot 10^5$	$184 \pm 27 \cdot 10^5$

\* : ces valeurs sont celles du tableau 30 et sont rappelées pour mémoire.

**Tableau 31** : Numération de BB 536, BB 536 m. 15 et du mélange volume à volume de ces deux cultures pures sur milieu Tomarelli contenant différentes concentrations de 5-fluorouracile.

Les milieux d'isolement de ces mutants sont donc à la fois sélectifs et électifs puisque ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 peuvent être distingués de leurs cellules-mères sans difficulté et sans que leur nombre s'en trouve diminué.

### III.4.3.3. Recouvrement des mutants parmi la flore intestinale :

Nous nous sommes posé le problème du recouvrement des mutants parmi une population bactérienne complexe, de type intestinale. Il faut s'assurer qu'en culture, les bactéries intestinales n'inhibent pas la croissance de nos mutants, c'est-à-dire que si un nombre connu de mutants est mélangé à une flore intestinale, nous retrouvons bien ce même nombre de colonies se développant sur milieu Tomarelli additionné de 5 FU.

100 µl de dilutions de suspensions de mutant ATCC 15707 m.42 ou BB 536 m.15 ou de selles ont été étalés, en souches pures ou en mélange, sur milieux témoins et milieu Tomarelli + FU 1 à 4 g/l. Les résultats obtenus nous permettent de confirmer que ces mutants se développent de la même façon sur les milieux témoins et sur les milieux toxiques et que la flore intestinale est totalement inhibée par 1 g/l de 5 FU.

Lors de mélanges de dilutions de selles + mutants en différentes proportionsensemencés sur ces mêmes milieux, nous constatons que seuls les mutants se développent sur 5 FU et ce, exactement dans les proportions retrouvées pour les mêmes dilutions sur les milieux témoins.

Ces mutants peuvent donc être retrouvés de façon totale et sélective parmi une flore intestinale. Ainsi, nous avons à notre disposition une souche de *B. longum* ATCC 15707 et une souche de BB 536 qui se développent sur 5-fluorouracile à l'exclusion de tout autre microorganisme de la flore intestinale, y compris les bactéries du même genre et de la même espèce.

Nous devons cependant encore vérifier que la mutation n'a pas affecté de fonction vitale ou importante autre que l'incorporation de l'uracile. Dans ce but, nous avons effectué une étude physiologique comparée des mutants par rapport à leurs cellules-mères.

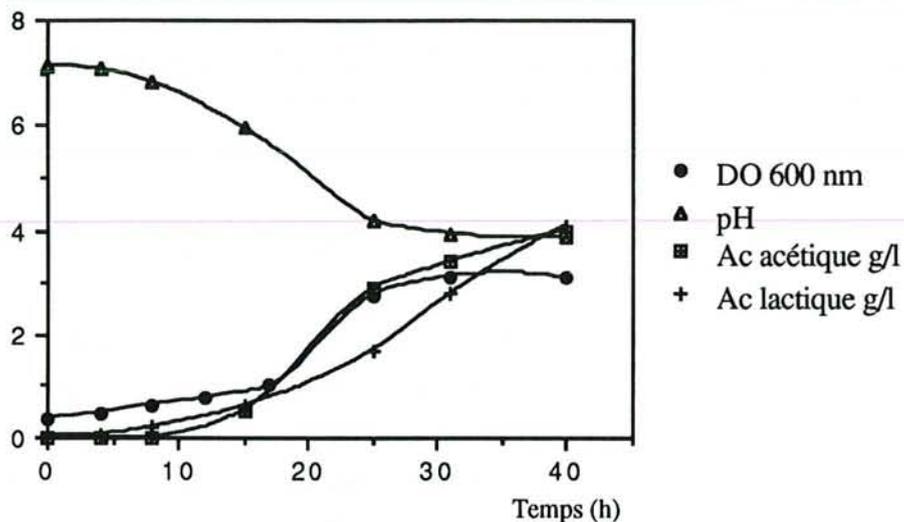


Figure 35 : Croissance de ATCC 15707 m.42 sur milieu TPY

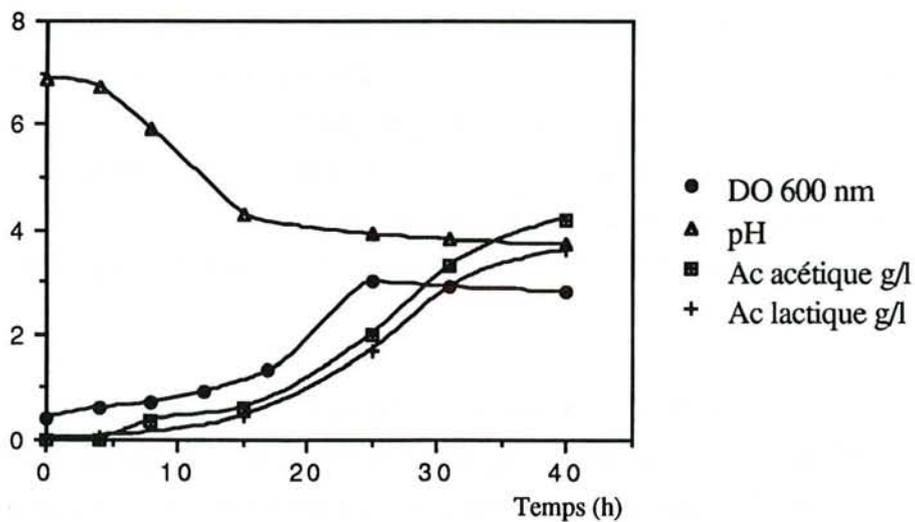


Figure 36 : Croissance de BB 536 m.15 sur milieu TPY

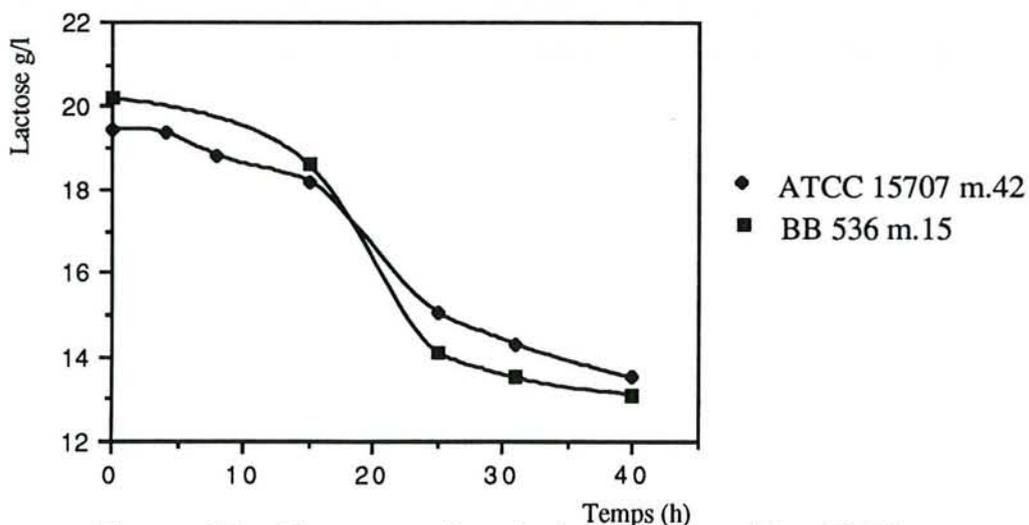


Figure 37 : Consommation du lactose sur milieu TPY par les 2 souches marquées

#### **III.4.3.4. Profils physiologiques des mutants :**

Les mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 ont été cultivés sur milieux TPY et Tomarelli. L'évaluation de la biomasse, la détermination des paramètres de croissance et les variations des substrats et des produits ont été étudiés au cours des fermentations (figures 35 à 40 et tableau 25 page 123) puis comparés aux valeurs obtenues avec *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur les mêmes milieux (figures 13, 14, 15 page 124 et figures 26, 27, 28 page 128).

Les quantités de galactose produites sont toujours inférieures à 0,01 g/l, quel que soit la souche et quel que soit le temps de fermentation.

Sur TPY comme sur Tomarelli, aucune différence notable ne peut être mise en évidence entre la souche-mère et la souche mutante au vu des courbes de croissance. Les vitesses spécifiques de croissance, de production d'acides et de consommation de lactose, sur milieu TPY ou Tomarelli, ne présentent pas de différence significative entre les souches marquées et les souches-mères. Les légers écarts s'expliquent facilement par la difficulté de répétabilité des conditions de culture, de prélèvement et de dosage.

**Les mutations ne semblent donc pas avoir affecté de fonction majeure dans le développement de ces souches.**

#### **III.4.3.5. Comparaison de la résistance de *B. longum* ATCC 15707, BB 536 et de leurs mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 aux antibiotiques :**

L'étude physiologique comparée des mutants par rapport à leurs souches-mères a été complétée par une étude de la résistance de ces souches à différents antibiotiques.

**III.4.3.5.1.** La méthode des disques antibiotiques nous a permis d'obtenir des résultats globaux pour 21 antibiotiques (tableau 32). Nous ne notons, pour cette étude, aucune différence de comportement, vis-à-vis des antibiotiques testés, entre les souches sauvages et souches mutantes.

**III.4.3.5.2.** Les résultats ont été affinés pour quelques antibiotiques par utilisation de solutions antibiotiques à différentes concentrations (tableau 33). Même avec une appréciation plus fine du seuil de résistance aux antibiotiques, nous ne pouvons déceler aucune différence de comportement entre mutants et souches d'origine.

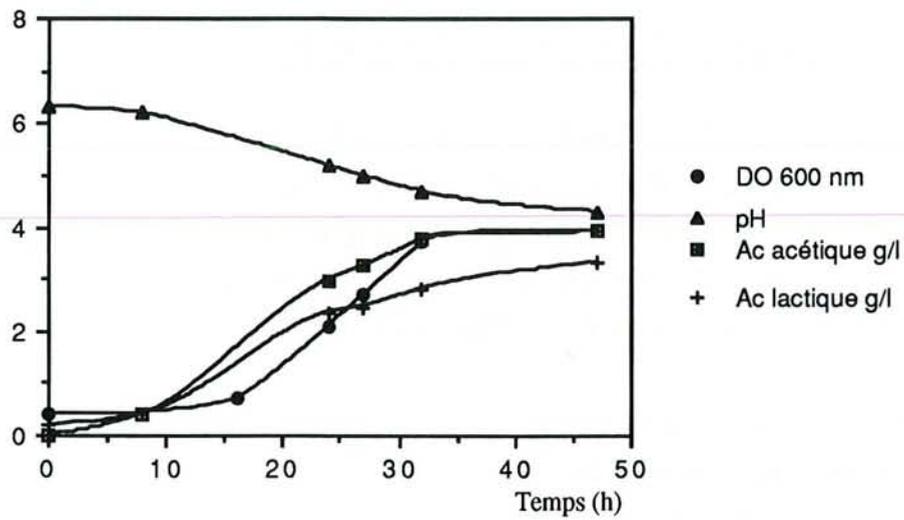


Figure 38 : Croissance de ATCC 15707 m.42 sur milieu Tomarelli

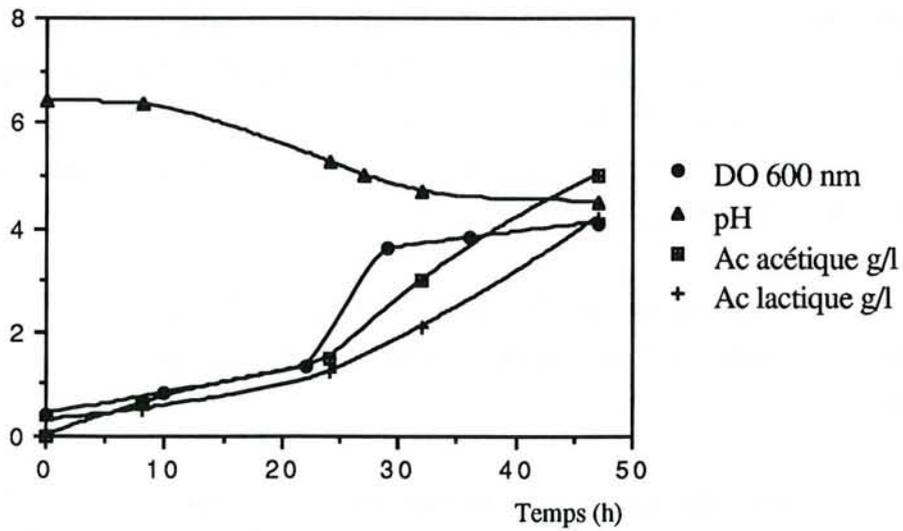


Figure 39 : Croissance de BB 536 m.15 sur milieu Tomarelli

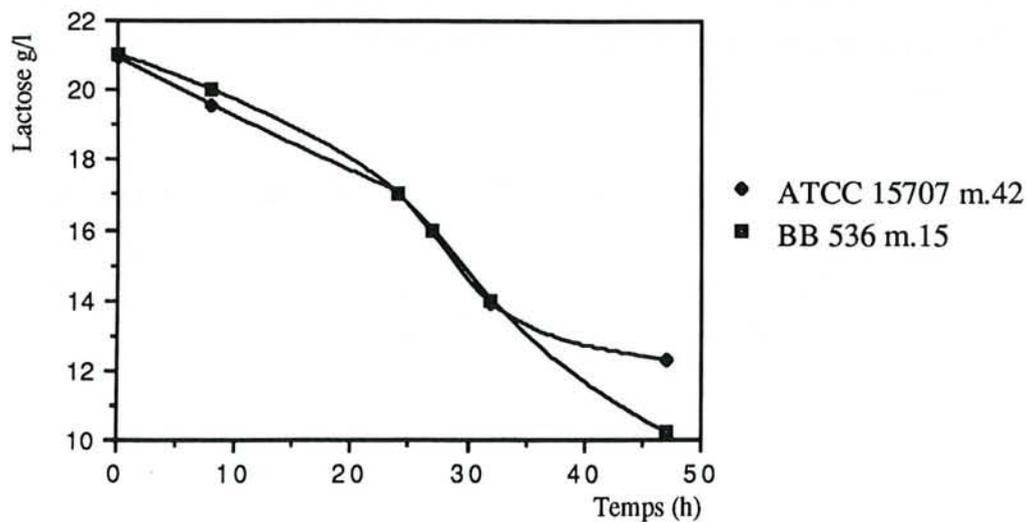


Figure 40 : Dégradation du lactose par 2 souches marquées sur milieu Tomarelli

Antibiotique	Dosage	Diamètre d'inhibition en mm				Résistant / Intermédiaire/ Sensible
		<i>B. longum</i> ATCC 15707	BB 536	ATCC 15707 m.42	BB 536 m.15	
Acide nalidixique	30 µg	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	R
Amikacine	30 µg	10	14	15	12	R
Ampicilline	10 µg	24	32	26	30	S
Bacitracine	10 UI	33	40	34	38	S
Carbénicilline	100 µg	31	42	28	39	I
Céfalotine	30 µg	22	29	19	27	I
Céfazoline	30 µg	25	30	20	28	I
Chloramphénicol	30 µg	38	45	36	46	I
Colistine	50 µg	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	R
Erythromycine	15 UI	46	49	42	45	S
Gentamycine	10 UI	12	12	9	13	I
Kanamycine	30 UI	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	R
Minocycline	30 UI	32	40	34	38	S
Néomycine	30 UI	11	15	16	14	I
Nétilmicine	30 µg	12	9	11	13	I
Pénicilline	6 µg	34	45	32	43	S
Pristinamycine	15 µg	36	46	37	42	S
Streptomycine	10 UI	14	11	12	13	I
Tétracycline	30 UI	35	40	32	38	S
Chlortétracycline	30 UI	36	40	32	38	I
Oxytétracycline	30 UI	34	28	34	30	I

**Tableau 32** : Diamètres d'inhibition en millimètres et sensibilité de deux souches de *B. longum* et leurs mutants à 21 antibiotiques.

Antibiotique	concentration en µg/ml	<i>B.longum</i> ATCC 15707	BB 536	ATCC 15707 m.42	BB 536 m.15
Ampicilline	0,1	+	+	+	+
	0,5	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
Bacitracine	0,1	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+
	1	+	(+)	+	(+)
	2	(+)	-	(+)	-
	5	-	-	-	-
Erythromycine	0,01	+	+	+	+
	0,03	+	+	+	+
	0,05	(+)	(+)	(+)	(+)
	0,1	-	-	-	-
Minocycline	0,1	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+
	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
Pristinamycine	0,005	+	+	+	+
	0,05	(+)	(+)	(+)	(+)
	0,5	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Tétracycline	0,2	+	+	+	+
	0,5	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	2,5	-	-	-	-

**Tableau 33** : Croissance de deux souches de *B. longum* et leurs mutants sur milieu BL agar additionné d'antibiotiques.

+ : colonie de diamètre supérieur à 0,5 mm

(+) : colonie en tête d'épingle

- : pas de colonie

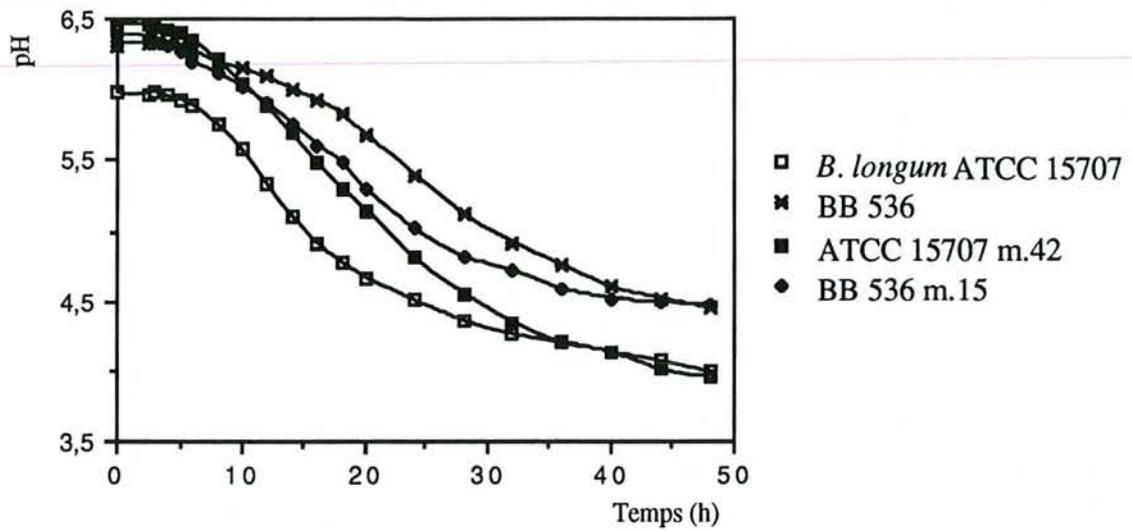


Figure 41 : Courbes d'acidification du lait en aérobiose

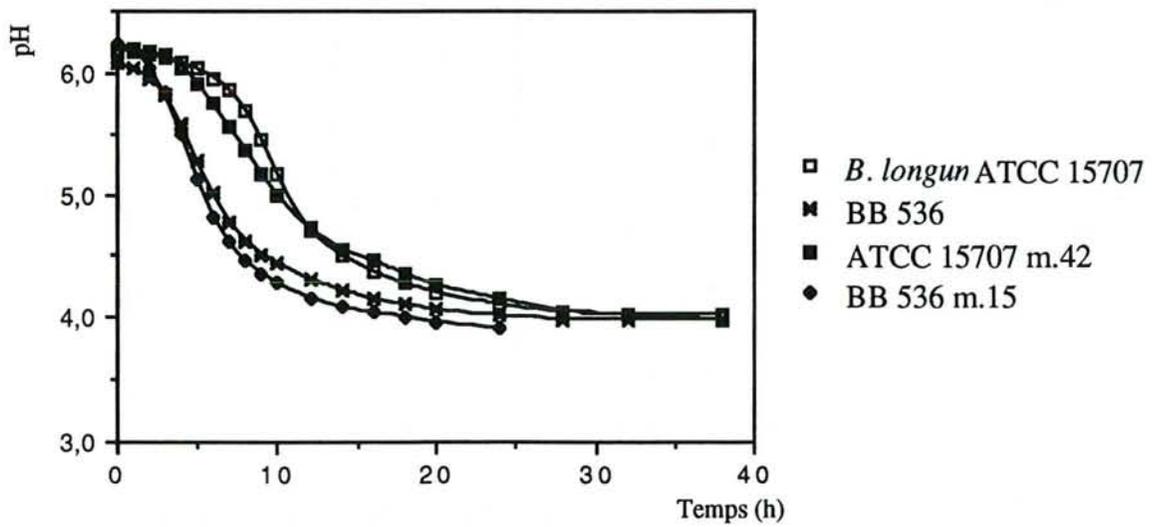


Figure 42 : Courbes d'acidification de Starlait en aérobiose

### **III.4.4. COMPORTEMENT DE *B. LONGUM* ATCC 15707, BB 536, ATCC 15707 M.42 ET BB 536 M.15 LORS DE FABRICATION DE LAIT FERMENTE :**

L'étude physiologique en milieu d'étude artificiel est nécessaire mais il ne faut pas oublier que les mutants seront intégrés dans la fabrication de laits fermentés à la place de leurs souches-mères. Leur comportement en technologie laitière est donc également important et nous allons comparer l'acidification des mutants ATCC 15707 m.42 et BB 536 m.15 par rapport à *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 sur lait ainsi que les équilibres existant avec les souches de lactobacilles et streptocoques.

#### **III.4.4.1. Etude de l'acidification du lait :**

Les figures 41 et 42 représentent respectivement la courbe d'acidification de lait ou de lait enrichi en facteurs de croissance par les quatre souches étudiées. Sur les deux milieux testés, le comportement de ATCC 15707 m.42 est très proche de celui de *B. longum* ATCC 15707 et celui de BB 536 m.15 est semblable à celui de BB 536.

L'utilisation des mutants au lieu des souches-mères ne devrait donc pas poser de difficulté en fabrication.

#### **III.4.4.2. Suivi de la population bactérienne dans des laits fermentés à ATCC 15707 m.42 ou à BB 536 m.15 :**

L'étude a été menée en parallèle sur le lait fermenté déjà existant qui contient la souche industrielle BB 536 et sur des laits fermentés fabriqués dans des conditions industrielles par la laiterie Saint-Hubert dans lesquels BB 536 a été remplacée successivement par *B. longum* ATCC 15707, le mutant ATCC 15707 m.42 et le mutant BB 536 m.15. Ces laits fermentés contiennent bien sûr également les deux souches "yaourt". Les conditions technologiques industrielles de fabrication du B'A ont été respectées.

Nous avons caractérisé ces produits en effectuant une numération des trois souches sur chacun des produits au cours du temps ainsi qu'une dégustation.

Les résultats des numérations sont présentés dans les tableaux 34 et 35. Nous observons que lors de la fabrication de lait fermenté également, ATCC 15707 m.42 se comporte tout à fait comme *B. longum* ATCC 15707 et BB 536 m.15 ne présente pas de différence avec BB 536, aussi bien en ce qui concerne les équilibres des différents genres au premier jour que pour leur évolution jusqu'à la date limite de consommation. Les streptocoques passent de  $10^8$  au jour de la fabrication à  $10^7$  à 20 jours et les lactobacilles se maintiennent à  $10^7$ . Les *Bifidobacterium*, quelque soit la souche, sont dénombrés aux alentours de  $10^8$  depuis la fabrication jusqu'à la date limite de consommation.

jour	<i>B. longum</i> ATCC 15707 *				ATCC 15707 m.42 *			
	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	pH	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	pH
1	1,9 . 10 <sup>8</sup>	2,4 . 10 <sup>7</sup>	1,2 . 10 <sup>8</sup>	4,65	2,2 . 10 <sup>8</sup>	4,3 . 10 <sup>7</sup>	2,6 . 10 <sup>8</sup>	4,75
6	1,1 . 10 <sup>8</sup>			4,63	1,7 . 10 <sup>8</sup>			4,70
13	8,2 . 10 <sup>7</sup>	6,0 . 10 <sup>7</sup>	9,1 . 10 <sup>7</sup>	4,52	8,9 . 10 <sup>7</sup>	2,1 . 10 <sup>7</sup>	1,4 . 10 <sup>8</sup>	4,56
20	9,5 . 10 <sup>7</sup>	1,3 . 10 <sup>7</sup>	9,9 . 10 <sup>7</sup>	4,46	1,2 . 10 <sup>8</sup>	1,9 . 10 <sup>7</sup>	3,2 . 10 <sup>8</sup>	4,41

**Tableau 34** : Evolution de la flore de laits fermentés à *B.longum* ATCC 15707  
ou à ATCC 15707 m.42 au cours du temps.

\* : nombre d'u.f.c. par gramme de lait fermenté

jour	BB 536 *				BB 536 m.15 *			
	<i>Sreptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	pH	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	pH
1	1,6 . 10 <sup>8</sup>	4,1 . 10 <sup>7</sup>	9,0 . 10 <sup>7</sup>	4,68	1,5 . 10 <sup>8</sup>	7,8 . 10 <sup>7</sup>	1,2 . 10 <sup>8</sup>	4,79
6	8,7 . 10 <sup>7</sup>			4,66	9,5 . 10 <sup>7</sup>			4,75
13	1,8 . 10 <sup>8</sup>	3,4 . 10 <sup>7</sup>	1,0 . 10 <sup>8</sup>	4,58	2,5 . 10 <sup>8</sup>	4,4 . 10 <sup>7</sup>	1,7 . 10 <sup>8</sup>	4,70
20	9,1 . 10 <sup>7</sup>	2,6 . 10 <sup>7</sup>	1,7 . 10 <sup>8</sup>	4,64	1,1 . 10 <sup>8</sup>	2,2 . 10 <sup>7</sup>	1,3 . 10 <sup>8</sup>	4,68

**Tableau 35** : Evolution de la flore de laits fermentés à BB 536 ou à BB 536 m.15  
au cours du temps.

\* : nombre d'u.f.c. par gramme de lait fermenté

#### **III.4.4.3. Test de dégustation :**

Un jury de dégustation constitué de quinze personnes entraînées n'a décelé aucune différence organoleptique entre les quatre produits fabriqués.

**Nous avons donc désormais à notre disposition deux mutants de *B. longum* ATCC 15707 et BB 536, parfaitement reconnaissables au sein d'une flore complexe de type intestinale et dont le comportement in vitro est tout à fait semblable à celui des souches d'origine.**

Il est légitime de penser que leur comportement in vivo sur le tractus digestif et la flore intestinale est similaire à celui des souches sauvages. Ces mutants ont été introduits dans la fabrication de laits fermentés et nous sommes prêts à les faire ingérer à des volontaires.

Groupe bactérien			Yaourt classique						Lait fermenté I <i>B.longum</i> ATCC 15707						Lait fermenté II <i>B.longum</i> BB 536					
	Etape 1		Etape 2			Etape 3			Etape 2			Etape 3			Etape 2			Etape 3		
	S 3 <sup>(a)</sup>	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
Anaérobies tot.	8,5 ± 0,6 <sup>(b)</sup>	8,6 ± 0,6	8,2	8,2	8,5	8,7	8,8	8,5	8,3	8,6	8,4	8,5	8,3	8,0	8,2	10,2	10,3	10,0	8,9	8,6
<i>Bifidobacterium</i>	6,2 ± 0,3	6,1 ± 0,3	6,0	6,2	6,1	6,3	6,2	5,9	6,0	6,8	7,3	6,9	6,4	6,1	7,4	9,6	10,1	9,9	8,6	8,2
<i>Clostridium</i>	5,6 ± 0,4	6,1 ± 0,4	5,5	5,7	5,8	5,4	5,3	5,5	5,9	5,2	4,8	4,6	5,4	5,7	5,1	4,2	3,4	3,6	4,2	5,3
<i>Bacteroides</i>	8,2 ± 0,4	8,4 ± 0,4	7,6	8,2	8,4	8,0	8,0	7,9	8,3	8,0	8,1	8,0	8,4	8,1	7,6	5,3	4,1	4,9	5,5	6,2
Coliformes	7,3 ± 0,3	7,1 ± 0,3	6,8	7,1	7,0	7,2	7,1	7,0	6,8	6,9	7,1	7,4	7,3	7,2	6,8	5,2	4,6	4,4	5,1	6,9

**Tableau 36 :** Effet de laits fermentés à *B.longum* sur la flore intestinale humaine.

a : numéro de la semaine (les analyses n'ont pas été effectuées pendant les semaines S 1 et S 2).

b : signifie  $\log_{10} \pm$  la déviation standard durant la période considérée.

## III.5. EFFETS PROBIOTIQUES

### III.5.1. EFFETS DE L'INGESTION DE DIFFERENTES SOUCHES DE *B. LONGUM* :

Nous avons déjà mis en évidence, dans le chapitre III.2, la prédominance de l'effet probiotique des souches de *Bifidobacterium* d'origine humaine sur celles d'origine animale et ce fait nous a amenés à étudier plus en détail l'espèce *longum*. Une question se pose alors : au sein de cette espèce, toutes les souches possèdent-elles le même effet sur la flore intestinale humaine? Il ne nous a pas été possible de trouver chez les producteurs de ferments d'autres souches de *B. longum*, c'est pourquoi nous avons remplacé la souche BB 536 par *B. longum* ATCC 15707 dans le lait fermenté.

Nous avons donc comparé dans un premier temps trois types de laits fermentés :

- yaourt : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
+ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;
- lait fermenté I : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
+ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
+ *B. longum* ATCC 15707;
- lait fermenté II : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
+ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
+ *B. longum* BB 536.

Les effets de l'ingestion de ces laits fermentés sur la flore intestinale humaine sont reportés dans le tableau 36.

Ce tableau confirme les résultats obtenus au début de cette étude, à savoir que :

1 - l'ingestion de yaourt ne provoque aucune modification dans la numération des genres bactériens étudiés : les bactéries anaérobies sont stables à  $10^8$  par ml de selles, les *Bifidobacterium* se maintiennent autour de  $1,2 \cdot 10^6$  / ml et les *Clostridium*, *Bacteroides* et coliformes restent de l'ordre de  $4 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^8$  et  $1,2 \cdot 10^7$  respectivement.

2 - l'apport oral de lait fermenté à *B. longum* ATCC 15707 permet une multiplication des *Bifidobacterium* de la flore intestinale par 15 et une division du nombre des clostridia par 10. Le nombre des *Bacteroides* et coliformes reste sensiblement au même niveau;

3 - l'ingestion de lait fermenté à *B. longum* BB 536 entraîne rapidement et durablement d'importantes modifications de la flore intestinale, à savoir :

- le nombre de *Bifidobacterium* est multiplié par 20 dès la première semaine d'ingestion. En semaine S 7, l'effet de l'absorption de lait fermenté à BB 536 est spectaculaire puisque nous dénombrons 8900 fois plus de *Bifidobacterium* qu'avant ingestion. 3 semaines après l'arrêt de l'ingestion, il subsiste encore 120 fois plus de *Bifidobacterium* qu'en période basale;

- nous dénombrons, après trois semaines d'apport oral, 280 fois moins de *Clostridium* et 400 fois moins de coliformes. Le nombre initial de ces deux genres bactériens n'est pas encore retrouvé trois semaines après l'arrêt de l'ingestion;

- une semaine de consommation permet une division du nombre des *Bacteroides* par 5, mais après 3 semaines, ce nombre est diminué 16000 fois. En semaine S 10, la concentration en *Bacteroides* est encore 125 fois plus faible qu'en semaine S 3.

Nous pouvons donc conclure que ce sont bien les *Bifidobacterium* et non les *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* qui sont à l'origine de ces effets probiotiques.

La comparaison des résultats des analyses bactériologiques obtenus après ingestion de lait fermenté à BB 536 ou à *B. longum* ATCC 15707 nous permet de définir un "effet souche" quant à l'action antibactérienne. En effet, l'action de *B. longum* ATCC 15707 contre les clostridies reste faible pendant l'étape 3 et disparaît rapidement en cas d'arrêt de la consommation de ce lait fermenté. Le nombre de *Bacteroides* et coliformes n'est quant à lui pas du tout influencé par cette souche. De plus, la consommation du lait fermenté à *B. longum* ATCC 15707 n'est pas caractérisée par une augmentation de 8900 fois de la flore bifide totale comme dans le cas du lait fermenté à *B. longum* BB 536 mais seulement de 15 fois.

Cette étude montre que, bien qu'absorbées dans les mêmes conditions, les deux souches de *B. longum* utilisées engendrent des effets différents. Il est donc vraisemblable que la nature de la souche ingérée joue un rôle considérable quant à l'induction d'un effet probiotique.

Groupe bactérien			Lait fermenté III <i>B.longum</i> ATCC 15707 m.42						Lait fermenté IV <i>B.longum</i> BB 536 m.15					
	Etape 1		Etape 2			Etape 3			Etape 2			Etape 3		
	(a)		S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S10	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S10
	S 3	S 4												
Anaérobies totaux	8,5 ± 0,6 <sup>(b)</sup>	8,6 ± 0,6	8,4	8,6	8,2	8,3	8,5	8,4	8,4	10,3	10,0	9,9	9,8	9,2
<i>Bifidobacterium</i> totaux	6,2 ± 0,3	6,1 ± 0,3	6,3	6,9	7,4	7,1	6,5	6,0	7,6	9,8	9,9	9,6	9,4	8,6
<i>B.longum</i> ATCC 15707 m.42	0	0	3,6	5,8	6,3	5,7	4,1	(p)	0	0	0	0	0	0
BB536 m.15	0	0	0	0	0	0	0	0	7,3	9,6	9,8	9,5	9,2	8,4
<i>Clostridium</i>	5,6 ± 0,4	6,1 ± 0,4	5,3	4,9	4,8	5,1	5,7	5,7	4,9	4,1	3,6	3,8	4,3	5,5
<i>Bacteroides</i>	8,2 ± 0,4	8,4 ± 0,4	8,3	8,1	7,9	7,8	8,1	8,0	7,9	5,4	4,3	4,3	5,6	6,1
Coliformes	7,3 ± 0,3	7,1 ± 0,3	6,7	6,9	7,3	7,3	7,1	7,1	6,4	5,0	4,2	4,3	5,0	6,8

**Tableau 37** : Effet de laits fermentés contenant des souches de *B.longum* marquées sur la flore intestinale humaine.

a : numéro de la semaine (les analyses n'ont pas été effectuées pendant les semaines S 1 et S 2).

b : signifie  $\log_{10} \pm$  la déviation standard durant la période considérée.

p : présence.

### III.5.2. ORIGINE DES *BIFIDOBACTERIUM* RETROUVES DANS LES SELLES APRES INGESTION DE LAIT FERMENTE :

Afin de compléter cette étude sur l'effet souche, nous avons étudié dans des conditions identiques, le comportement des souches mutantes que nous avons obtenues (paragraphe III.4.2). La souche ATCC 15707 est alors remplacée par la souche ATCC 15707 m. 42 et la souche BB 536 par la souche BB 536 m. 15.

Nous avons donc étudié l'action de deux nouveaux laits fermentés :

- lait fermenté III : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
+ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
+ *B. longum* ATCC 15707 m. 42;
- lait fermenté IV : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
+ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
+ *B. longum* BB 536 m. 15.

L'observation du tableau 37 permet en effet de compléter une étude comparative des souches marquées par rapport à leurs souches-mères. Le comportement de la souche BB 536 m. 15 est identique à celui de BB 536 puisque la consommation d'un lait fermenté avec cette souche marquée induit les mêmes transformations de la composition de la flore intestinale, à savoir, une multiplication des *Bifidobacterium* importante (par 5600 fois en semaine S 7) et persistante (il en subsiste encore 280 fois plus en semaine S 10) ainsi qu'une régression du genre *Clostridium* (par 180), *Bacteroides* (par 10000) et coliformes (par 1000). De même que la souche *B. longum* ATCC 15707, la souche ATCC 15707 m. 42 induit peu de modifications de l'écosystème intestinal (multiplication des *Bifidobacterium* par 18 et division des clostridies par 10).

L'intérêt de ces mutants réside dans le fait que nous sommes désormais capables de distinguer les souches exogènes des souches endogènes.

Après trois semaines d'ingestion de lait fermenté à ATCC 15707 m. 42, nous observons une multiplication du nombre des *Bifidobacterium* par 22 et parmi ces bactéries surnuméraires, 8% seulement proviennent de souches exogènes ingérées.

Nous montrons ici un fait important et nouveau dans l'étude des flores intestinales (tableau 37) : L'augmentation de la flore en *Bifidobacterium* que nous observons est due majoritairement à la souche ingérée BB 536 m. 15. Ce pourcentage passe à 63% en deuxième semaine et atteint 80% après trois semaines de consommation. Une semaine sans consommation de lait fermenté à BB 536 ne suffit pas à réduire cette proportion. Encore trois semaines après l'arrêt de l'absorption,

63% des souches surnuméraires qui persistent dans le côlon sont des souches ingérées et non des *Bifidobacterium* endogènes.

D'autre part, le comportement de la souche ATCC 15707 m.42 dans l'intestin lors de la consommation de lait fermenté III permet de confirmer les résultats obtenus précédemment (paragraphe III.5.1), c'est-à-dire que la multiplication et le maintien de l'espèce *longum* sont dépendants de la souche.

Nous avons ainsi démontré que l'augmentation du taux de *Bifidobacterium* observée lors de l'ingestion de lait fermenté est due majoritairement aux souches ingérées et non aux *Bifidobacterium* endogènes. La persistance d'un taux élevé de BB 536 dans les fécès prouve que cette souche est capable de coloniser le côlon humain, c'est-à-dire qu'il existe une adhésion de ces bactéries sur le mucus intestinal. Tous les nutriments nécessaires à la croissance des *Bifidobacterium*, et en particulier les oligoéléments, sont concentrés au niveau du mucus intestinal et permettent la multiplication des bactéries emprisonnées dans cette couche muqueuse. Par ailleurs, cette expérience met en évidence l'importance du choix de la souche, au sein même d'une espèce, pour la conception d'un lait fermenté. En effet, la souche BB 536 présente un intérêt probiotique évident tandis que la souche ATCC 15707 appartenant à la même espèce *longum* n'en montre pas.

L'effet antibactérien observé pour BB 536 peut être expliqué de différentes façons selon le genre envers lequel il s'applique : la répression des Gram - serait due, en cas de colonisation, à la production in situ d'acides lactique et acétique par les *Bifidobacterium*. A cause de son pKa plus élevé, il a été démontré que l'acide acétique présenterait un effet toxique plus fort que l'acide lactique (FERNANDES et coll., 1987).

Les causes de l'effet inhibiteur de la souche BB 536 envers le développement de certaines bactéries Gram + méritent d'être approfondies. Nous avons effectué cette étude in vitro.

### III.5.3. ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE :

Nos études sur l'activité bactériostatique de BB 536, *B. longum* ATCC 15707, des souches industrielles 2 et 3 et de *B. animalis* ATCC 25527 ont montré que la souche BB 536 inhibait in vivo le développement des coliformes, *Clostridium* et *Bacteroides* contrairement aux souches de collection *B. longum* ATCC 15707 et *B. animalis* ATCC 25527 et aux souches industrielles 2 et 3. L'inhibition envers les bactéries Gram + pourrait être expliquée par la production de bactériocines par la souche BB 536. En revanche, aucune activité bactériostatique de bactéries Gram + envers des bactéries Gram - due à des bactériocines n'ayant été démontrée,

Souches cibles	Streptocoques mésophiles	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>	<i>Clostridium</i> <i>tyrobutyricum</i>	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	<i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>
souches testées								
<i>B. longum</i> BB 536	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. longum</i> ATCC 15707	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> souche 2	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>B. animalis</i> souche 3	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	-	+	-	-	-	-	-	-

**Tableau 38** : Action bactériostatique de 3 souches industrielles et de 2 souches de collection de *Bifidobacterium* sur 23 souches appartenant à 6 genres bactériens retrouvés dans la flore intestinale.

il est fortement probable que la répression des bactéries Gram - serait due à la production d'acides par la souche BB 536.

Nous avons étudié, in vitro, la production de bactériocines par la méthode des puits (tableau 38): la croissance de *Lactobacillus acidophilus* est réprimée par les 5 souches de *Bifidobacterium* testées. La souche industrielle 2, identifiée comme appartenant à l'espèce *animalis*, inhibe le développement de *Clostridium perfringens*. Nos résultats montrent clairement que seule la souche BB 536 (parmi les cinq testées), possède une activité bactériostatique envers les streptocoques mésophiles, *Lactobacillus acidophilus* et 3 espèces de clostridia.

Cette activité peut être due à différents facteurs tels que les acides, le peroxyde d'hydrogène ou des bactériocines. Nous avons testé ces différents paramètres.

- pH :

Des surnageants de culture des souches testées ont été filtrés puis ajustés à un pH de 2, 4, 7 ou 10 sans que leur activité n'en soit altérée. L'acide lactique n'est donc pas à l'origine de l'inhibition de la croissance.

- effet de la catalase :

les différentes concentrations de catalase utilisées n'ont pas détruit l'effet inhibiteur. Le peroxyde d'hydrogène n'est donc pas le facteur inhibiteur.

- thermostabilité :

Ni le chauffage à 100°C pendant 15 à 30 minutes, ni l'autoclavage à 121°C pendant 15 minutes n'ont détruit la substance inhibitrice.

- activité enzymatique :

Le traitement aux protéases a détruit l'activité.

Au vu des résultats de ces différents tests, il est fort probable que ces composés bactériostatiques ou bactéricides soient des protéines thermostables et nous pouvons les classer parmi les bactériocines.

Cette étude réalisée in vitro devra être confirmée par une étude chez l'homme mais dès à présent, nous pouvons supposer que l'effet bactériostatique de BB 536 envers les clostridia et coliformes est retrouvé in vivo puisqu'une nette diminution de ces genres bactériens dans les selles est observée après ingestion de B'A (tableau 36 page 143).

Il est important de remarquer que cette activité anti-Gram + n'est pas retrouvée chez *B. longum* ATCC 15707 (mise à part une légère action contre les clostridies), ni chez *B. animalis*, tant in vitro (tableau 38) qu'in vivo (tableaux 24 page 117 et 36 page 143).

## *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

## CONCLUSION

Les effets cliniques de régulation du transit intestinal dus à l'ingestion de lait fermenté au *Bifidobacterium* ont largement été démontrés (MANCIAUX, 1958; MITSUOKA, 1982; YAMAZAKI, 1985; EBISSAWA, 1987).

La composition bactérienne de sept laits fermentés au *Bifidobacterium* commercialisés a été analysée. L'identification des bifidobactéries isolées, basée sur des caractères phénotypiques, ne nous a fourni qu'une orientation dans la définition des espèces rencontrées et ces résultats ont dû être affinés et confirmés par les techniques d'hybridation ADN/ADN, seules techniques véritablement fiables, en absence de sondes spécifiques des différentes espèces, pour l'identification d'espèce de *Bifidobacterium*. Nous avons adapté une telle méthode aux bifidobactéries et nous sommes désormais capables d'isoler et d'identifier toute souche de *Bifidobacterium* présente dans un produit commercial.

Nous avons ainsi reconnu, parmi les sept laits fermentés étudiés, deux souches de *B. longum* (souche BB 536), une de *B. infantis*, une de *B. bifidum*, ces trois espèces étant d'origine humaine et quatre de *B. animalis* d'origine animale. Une grande diversité d'espèces semble donc présente sur le marché français mais les produits les plus vendus sont fabriqués à l'aide de *B. animalis*. Seul B'A et sa marque distributeur contiennent *B. longum*.

La suite de nos études a porté sur les conséquences, au niveau de la flore intestinale humaine, de l'apport oral régulier de différents laits fermentés au *Bifidobacterium*. L'analyse des fécès de 93 volontaires avant, pendant et après l'absorption de ces produits nous a permis de montrer différents points :

- le yaourt n'entraîne aucune modification dans les proportions relatives des différents genres bactériens testés appartenant à la flore intestinale, à savoir les bactéries anaérobies, les *Bifidobacterium*, les *Clostridium*, les *Bacteroides* et les coliformes.

- les laits fermentés à *B. animalis*, seul ou en mélange avec *B. bifidum*, provoquent une multiplication du nombre des *Bifidobacterium* par 10 mais la numération des autres genres bactériens n'est pas modifiée.

- la consommation d'un lait fermenté à *B. longum* ATCC 15707 entraîne une multiplication du nombre des *Bifidobacterium* par 15 et une division du nombre des clostridia par 10. L'écosystème intestinal retrouve rapidement son équilibre d'origine après l'arrêt de l'ingestion.

- en revanche, 3 semaines d'ingestion de B'A, lait fermenté à *B. longum* souche BB 536, provoquent de véritables bouleversements dans l'écosystème intestinal, sans commune mesure avec ceux induits par la consommation des autres laits fermentés :

- le nombre des *Bifidobacterium* est multiplié par 2500
- celui des clostridies et coliformes est divisé par 200
- celui des *Bacteroides* est divisé par 12600.

Ces modifications des proportions relatives des différents genres bactériens intestinaux persistent encore trois semaines après arrêt de l'absorption, ce fait est remarquable et n'avait jamais été observé au préalable.

Nous avons ainsi montré que les souches d'origine animale *B. animalis* ne possèdent pas de propriétés probiotiques, que la souche *B. longum* ATCC 15707 en montre peu mais les effets de l'ingestion de la souche *B. longum* BB 536 sous forme de lait fermenté méritent d'être soulignés. L'apparition d'effets probiotiques chez l'homme dépend donc totalement du choix de l'espèce de *Bifidobacterium* utilisée pour la fabrication du lait fermenté mais également du choix de la souche au sein de cette espèce.

Ces observations nous permettent de conclure à la réalité d'un pouvoir probiotique de la souche BB 536 chez l'homme. Ce résultat est satisfaisant pour l'esprit car il semble logique qu'une souche d'origine humaine se développe mieux chez son hôte habituel qu'une souche d'origine animale habituée à des conditions de milieu différentes.

Cependant, rien ne nous permettait d'identifier l'origine des bifidobactéries surnuméraires en cas d'ingestion de B'A tant que nous ne pouvions distinguer les bactéries ingérées avec le lait fermenté des bactéries présentes naturellement dans la flore intestinale. La physiologie de deux souches de *B. longum* a été étudiée sur différents milieux et un milieu à composition définie a été mis au point pour l'obtention de souches marquées. Après plusieurs essais de mutation, nous avons obtenu un mutant spontané de *B. longum* ATCC 15707 et un mutant à l'E.M.S. de *B. longum* BB 536, tous deux résistant à 4 g/l de 5-fluorouracile. Nous avons vérifié qu'en dehors de cette croissance sur 5 FU, les caractéristiques de ces mutants, tant physiologiques que technologiques pour la fabrication de lait fermenté, sont semblables à celles des souches-mères.

Nous avons montré de plus, qu'aucun microorganisme intestinal ne peut se développer en présence d'une concentration de 5 FU de 1 g/l. Ces souches marquées, introduites dans des laits fermentés puis ingérées sont donc facilement distinguées des *Bifidobacterium* endogènes.

Grâce à cette méthodologie, nous avons confirmé que seule la souche BB 536 à l'intérieur de l'espèce *B. longum* est active au contraire de la souche ATCC 15707. Nous avons montré également que l'augmentation maximale du nombre des *Bifidobacterium* observée lors de l'ingestion de lait fermenté B'A est due pour 80% aux bactéries ingérées, ce qui implique que la souche BB 536 trouve dans l'intestin les conditions qui lui permettent de se multiplier. Le fait que le mutant soit retrouvé trois semaines après l'arrêt de la consommation de lait

fermenté prouve que cette bactérie a colonisé le tractus digestif des volontaires. Les bifidobactéries ont donc pu avoir une action dans le temps vis-à-vis des bactéries résidentes, en particulier, *E. coli*, *Clostridium* et *Bacteroides*.

Les acides produits, lactique et surtout acétique sont à l'origine de la répression de la flore Gram - (RASIC, 1983). Lors de l'étude de la production de bactériocines in vitro, nous avons montré que la souche BB 536 produit de telles molécules actives contre les bactéries Gram +, en particulier *Clostridium*. La réduction, observée in vivo, des bactéries intestinales à Gram +, peut donc s'expliquer par une production de bactériocines.

## PERSPECTIVES

Ce travail met en exergue l'importance du choix de la souche lors de la conception de lait fermenté. L'identification d'espèce, étape délicate mais néanmoins indispensable à l'industriel laitier qui veut sélectionner ses souches et pouvoir éventuellement en défendre la propriété, peut être facilitée et accélérée par l'obtention de sondes ADN spécifiques de certaines espèces de *Bifidobacterium*, comme cela a été décrit par COLMIN (1991) pour *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

L'augmentation du nombre de *Bifidobacterium* présents dans les selles après ingestion de B'A ne peut s'expliquer que si l'on admet que ces cellules survivent au passage de l'estomac et à l'acidité gastrique, ce qui fut démontré en 1989 par BERRADA et coll. Le maintien et la multiplication des bifidobactéries dans le côlon, malgré l'inhospitalité du milieu intestinal seraient-ils possibles sans une colonisation du côlon humain? Une étude de l'adhésion des *Bifidobacterium* au mucus intestinal serait intéressante pour confirmer cette hypothèse.

Dans cette étude,  $4.10^9$  bifidobactéries ont été ingérées quotidiennement, mais que se passerait-il si ce nombre passait à  $10^7$  ou  $10^5$ ? Une étude est en cours pour déterminer la dose minimale de *Bifidobacterium* devant être ingérée pour observer des modifications de l'écosystème intestinal.

Les pouvoirs probiotiques de B'A pour l'homme, déjà constatés au niveau clinique, tant en prévention qu'en thérapie (KAGEYAMA et coll., 1984, ROMOND, 1988b), sont maintenant clairement démontrés au niveau bactériologique. Afin de compléter cette étude bactériologique, il serait intéressant d'envisager un dosage dans les fécès de certaines activités enzymatiques bactériennes fécales ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -

glucuronidase, azoréductase et nitroréductase) ainsi que de certains métabolites fécaux des stéroïdes (stérols neutres et acides biliaires).

Le potentiel probiotique, à savoir, la production de bactériocines, le métabolisme des composés azotés, du cholestérol et des sels biliaires, l'effet antitumoral et l'adhésion épithéliale doivent être étudiés dans un premier temps in vitro mais l'activité probiotique réelle ne peut être déterminée que par des études in vivo chez l'homme comme dans les travaux présentés dans ce mémoire. Ces propriétés thérapeutiques laissent envisager de grandes perspectives pour la souche BB 536 qui intéresse les producteurs laitiers mais également les nutritionnistes, les médecins et les pharmaciens.

Nous regrettons que le produit actuellement commercialisé sous le nom de B'A ne contienne plus la souche sur laquelle nos études ont été entreprises, bien qu'elle ait donné entièrement satisfaction, mais une autre souche dont les propriétés probiotiques n'ont pas été démontrées.

*ANNEXES*

## Milieu BL agar

Peptone	10	g
Trypticase (BBL)	5	g
Phytone (BBL)	3	g
Levure	5	g
Foie	150	ml
Glucose	10	g
Amidon	0,5	g
Solution A	10	ml
Solution B	5	ml
Tween 80	1	g
L-cystein HCl.H <sub>2</sub> O (5% solution)	10	ml
Agar	15	g
Eau distillée	q.s.p.	1 l

pH 7,2

250 ml de solution A :	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 g

250 ml de solution B :	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	10 g
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
	NaCl	0,5 g
	MnSO <sub>4</sub>	0,337 g

## Milieu TPY

	Trypticase	10	g
	Phytone	5	g
	Glucose	5	g
	Extrait de levure	2,5	g
	Tween 80	1	ml
	Cystéine	0,5	g
(1)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g
(1)	MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,5	g
(1)	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,25	g
	CaCl <sub>2</sub>	0,15	g
(2)	FeCl <sub>3</sub>	traces	
	Agar	15	g
	Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,5

### Remarques :

- (1) : Mélanger les 3 composés dans un peu d'eau distillée.  
Il se forme un précipité que l'on dissout en ramenant le pH à 2,5.  
Mélanger ensuite cette solution aux autres composés.
- (2) : FeCl<sub>3</sub> : de 5,8 à 6 mg /l.  
Préparer 300 mg de FeCl<sub>3</sub> dans 250 ml d'eau distillée.  
Verser 5 ml de cette solution par litre de milieu.

## Milieu TPY Beerens

Ajouter au milieu TPY traditionnel 5 g/l d'acide propionique et ajuster le pH à 5,0.

### Milieu TS anaérobie

Bacto-Tryptone	1	g
NaCl	8,5	g
Chlorhydrate de cystéine	0,5	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

### Milieu de Rogosa, Mitchell et Wiseman (MRS acidifié)

Biotrycase (trypticase)	10	g
Extrait de levure	5	g
Phosphate monopotassique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	6	g
Citrate d'ammonium	2	g
Solution de sels	5	ml
Glucose	20	g
Tween 80	1	g
Acétate de sodium, 3 H <sub>2</sub> O	25	g
Acide acétique glacial	1,32	ml
Agar	15	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 5,4

#### Solution de sels :

Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	0,68	g
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	11	g
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	2,4	g

### Milieu BHI : Brain Heart Infusion

Extrait coeur-cervelle	17,5	g
Peptone pancréatique de gélatine	10	g
NaCl	5	g
Phosphate dissodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5	g
Glucose	2	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 7,4

### Milieu de Rosenow

Peptone	10	g
Extrait de viande	3	g
Glucose	2	g
Chlorure de sodium	5	g
Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5%)	10	ml
Marbre blanc	1	morceau
Cervelle	1	morceau

pH 7,2

## Préparation des solutions pour l'extraction d'ADN

### Tampon TE :

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Ajuster le pH à 8.

### Phénol saturé :

Liquéfier le phénol cristallisé au bain-marie à 68°C. Ajouter 0,5 g de 8-hydroxyquinoline (oxydant jaune qui se fixe sur le phénol). Le phénol acide est alors neutralisé comme suit : Ajouter 50 à 100 ml de Tris 1M, pH 8,0. Agiter. Laisser décanter. Aspirer le surnageant blanc (Tris) à la trompe à vide mais pas le phénol (jaune car il a fixé l'hydroxyquinoline). Cette opération est répétée deux fois avec le Tris 1M, pH 8,0 puis 3 fois avec du Tris 50 mM, pH 8,0.

### Tampon TBE :

Tris-borate	0,089 M
Acide borique	0,089 M
EDTA	0,02 M

### Gel d'agarose :

Porter à ébullition 15 ml de TBE et 0,5% d'agarose. Le couler sur le support. Après refroidissement, immerger le gel avec du TBE/2 puis charger le gel et faire migrer. La révélation a lieu par immersion 10 mn dans un bac d'eau additionnée de 50 µl de bromure d'éthidium à 10 mg/ml.

## Préparation des solutions pour les hybridations ADN / ADN

Toutes les solutions nécessaires aux hybridations seront effectuées avec de l'eau pyrodistillée puis soigneusement autoclavées.

### Tampon SSC x 10 :

NaCl	87,65	g
Citrate de sodium	44,1	g
eau pyrodistillée	q.s.p.	1 l

Ajuster le pH à 7,0.

### Solution de neutralisation :

NaCl 1M	2	volumes
HCl 1N	1	volume
Tris 1M, pH 8,0	1	volume

solutions stériles à mélanger extemporanément.

### Tampon STE :

Tris 1M, pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM
NaCl	0,1	M

### Mélange de Denhardt :

ficoll	0,2	g/l
PVP (polyvinyl pyrrolidone)	0,2	g/l
albumine de sérum de boeuf	0,2	g/l

ajuster avec du 2 \* SSC.

### Mélange réactionnel :

50% formamide

Ajuster pour obtenir du 2 \* SSC final.

La formamide doit préalablement être désionisée de la façon suivante:

Verser 4 à 5 g de résine dans 200 ml de formamide. Laisser 30 mn sous agitation avant de filtrer sur buchner.

### Milieu de HASSINEN et coll.

Lactose	35	g
Di-potassium dihydrogène orthophosphate	2,5	g
Chlorure de sodium (NaCl)	10	mg
Acétate de sodium	25	g
Acétate d' ammonium	2	g
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	10	mg
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	200	mg
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	6,74	mg
Biotine	0,004	mg
Cystine	200	mg
Pantothénate de calcium	0,4	mg
Acide ascorbique	1	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

### Milieu de PETUELY

Lactose	35	g
Di-potassium dihydrogène orthophosphate	2,5	g
Chlorure de sodium (NaCl)	6,25	mg
Acétate d' ammonium	2	g
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	6,25	mg
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	12,5	mg
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	4,25	mg
Biotine	0,004	mg
Cystine	200	mg
Pantothénate de calcium	0,4	mg
Acide ascorbique	0,01	mg
Tween 80	1,00	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,4

### Milieu de GYLLENBERG et coll.

L(+)-arabinose	10,00	g
Di-potassium hydrogène orthophosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5	g
Chlorure de sodium (NaCl)	0,010	mg
Sulphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,00	g
Sulphate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	10	mg
Sulphate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	200	mg
Sulphate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	7	mg
Biotine	5	mg
Cystéine - HCl	400	mg
Pantéthine	0,5	mg
Acide ascorbique	10	g
Tween 80	1,00	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,8 - 7,0

### Milieu de UEDA et coll.

Lactose	35	g
Acétate de sodium	25	g
Acétate d'ammonium	2	g
Dipotassium phosphate	2,5	g
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	5,55	mg
Chlorure de fer (FeCl <sub>2</sub> )	126,8	mg
Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> )	47,6	mg
Chlorure de manganèse (MnCl <sub>2</sub> )	0,063	mg
L - cystine - HCl	1	g
Biotine	50	mg
D-pantéthine	50	mg
Riboflavine	50	mg
Pyruvate de potassium	3	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,6

## Milieu de TOMARELLI et coll.

Glucose	20	g
Di-potassium hydrogène orthophosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5	g
Chlorure de sodium (NaCl)	10	mg
Acétate de sodium	25	g
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	10	mg
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	200	mg
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	6,74	mg
Adénine	10	mg
Guanine	10	mg
Uracile	10	mg
Xanthine	10	mg
Alanine	200	mg
Asparagine	100	mg
Cystine	200	mg
Tryptophane	200	mg
Hydrolysate enzymatique de caséine (N-Z-case)	5	g
Acide p-amino-benzoïque	0,01	mg
Acide ascorbique	1	g
Acide folique	0,01	mg
Biotine	0,004	mg
Calcium pantothénate	0,4	mg
Pyridoxine hydrochloride	1,2	mg
Riboflavine	0,2	mg
Thiamine hydrochloride	0,2	mg
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,8

## Tryptone USP BOKAR

Protéines non digérées	absence
Protéoses	présence
Azote total	11,5 %
Azote $\alpha$ -aminé	4,0 %
Glucides totaux	inférieurs à 0,1 %
Sucres réducteurs	absence
Indole	absence
Nitrites	absence
Chlorures (exprimés en NaCl)	0,3 %
Sodium	2,5 %
Potassium	2,4 %
Calcium	0,15 %
Fer	0,003 %

### Acides aminés totaux (en gramme pour 100 grammes de produit):

Acide aspartique	6,9
Thréonine	4,6
Sérine	5,1
Acide glutamique	15,4
Proline	9,3
Glycine	1,5
Alanine	2,4
Valine	4,4
Cystine	non dosée
Méthionine	2,1
Isoleucine	3,7
Leucine	7,8
Tyrosine	1,2
Phénylalanine	4,2
Lysine	5,7
Histidine	2,9
Arginine	2,6
Tryptophane	1,2

## Hydrolysat de caséine "Vitamin Assay Casamino Acids" (Difco)

### Acides aminés (en pourcentage):

Arginine	4,0 %
Acide aspartique	0,5 %
Acide glutamique	5,0 %
Glycine	1,0 %
Histidine	2,0 %
Isoleucine	4,5 %
Leucine	10,0 %
Lysine	7,0 %
Méthionine	2,0 %
Phénylalanine	4,0 %
Thréonine	4,0 %
Tyrosine	2,0 %
Valine	7,0 %

### Vitamines (en microgrammes par gramme) :

Pyridoxine	0,1
Biotine	0,1
Thiamine	0,1
Acide nicotinique	2,5
Riboflavine	0,05

## Gélose standard pour dénombrement (P.C.A.)

Hydrolysats tryptique de caséine	5	g
Extrait de levure	2,5	g
Glucose	1	g
Agar	9	g

pH 7

## Gélose nutritive

Peptone	5	g
Extrait de viande	1	g
Extrait de levure	2	g
Chlorure de sodium	5	g
Agar	15	g

pH 7,4

## Milieu SPS

Tryptone	15	g
Extrait de levure	10	g
Citrate de fer (III)	0,5	g
Sulfite de sodium	0,5	g
Thioglycollate de sodium	0,1	g
Sorbitan monoléate	0,05	g
Sulfadiazine	0,12	g
Sulfate de polymyxine B	0,01	g
Agar	15	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 7,0

## Milieu RCM

Tryptone	10	g
Extrait de boeuf	10	g
Extrait de levure	3	g
Dextrose	5	g
Chlorure de sodium	5	g
Amidon	1	g
Hydrochloride de cystéine	0,5	g
Acétate de sodium	3	g
Agar	15	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,8

## Milieu mFC

Tryptone	10	g
Protéose peptone	5	g
Extrait de levure	3	g
Lactose	12,5	g
Sels biliaries	1,5	g
Chlorure de sodium	5	g
Agar	15	g
Bleu aniline	0,1	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 7,4

## Milieu Elliker

Tryptone	20	g
Extrait de levure	5	g
Gélatine	2,5	g
Lactose	5	g
Saccharose	5	g
Glucose	5	g
Acétate de sodium	1,5	g
Chlorure de sodium	4	g
Acide ascorbique	0,5	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,8

## Milieu MRS

Polypeptone	10	g
Extrait de levure	5	g
Extrait de viande	10	g
Glucose	20	g
Phosphate dipotassique	2	g
Acétate de sodium	5	g
Citrate d'ammonium	2	g
Sulfate de magnésium	0,2	g
Sulfate de manganèse	0,05	g
Tween 80	1,08	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 6,4

## Milieu R2A

Protéose peptone	0,5	g
Extrait de levure	0,5	g
Casamino acides	0,5	g
Glucose	0,5	g
Amidon soluble	0,5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,05	g
Pyruvate de sodium	0,3	g
Agar	15	g
Eau distillée	q.s.p. 1	l

pH 7,2





*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

- ABRAHAM, S.N.** et **BEACHEY, E.H.** 1985. Host defences against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. In : Advances in host defence mechanisms. **GALLIN J.I., FAUCI, A.S.** (Eds). Raven Press, New York. pp. 63-88.
- ABRAHAM, S.N., GOGUEN, J.D.** et **BEACHEY, E.H.** 1988. Hyperadhesive mutant of type-1 fimbriated *E. coli* associated with formation of FIMH organelles (fimbriosomes). *Infect. Immun.*, 56 : 1023-1029.
- ABRAMS, G.D.** 1980. Morphological aspect of gastro-intestinal tract colonization. Les anaérobies, Symposium, PARIS, (Ed.) Masson, pp. 65-75.
- ALLEN, A.** 1981. The structure and function of gastrointestinal mucus. In : Basic mechanisms of gastrointestinal mucosal cell injury and protection. **Harmon J.W.** (Ed.). Baltimore, Williams and Wilkins. pp. 351-67.
- ALLEN, A.** 1984. The structure and function of gastrointestinal mucus. In : Attachement of organisms of the gut mucosa. **E.C. BOEDEKER,** CRC Press USA, 2. pp. 3-12.
- ARIES, V.C., CROWTHER, J.S., DRASAR, B.S., HILL, M.J.** and **WILLIAMS, R.E.O.** 1969. Bacteria and the aetiology of cancer of the large bowel. *Gut*, 10 : 334.
- ASSELIN, D.** 1988. Effets de l'ingestion de laits fermentés au *B. longum* sur la flore intestinale humaine. Thèse de l'Université de Caen en Sciences pharmaceutiques.
- BALLONGUE, J.** 1989. Evolution de la taxonomie des bifidobactéries. *Bifidobacterium* et facteurs bifidogènes. Rôle en santé humaine. **ARBBA** (Ed.). pp. 33-45.
- BAMBERG, H.** 1966. Über die sanierung von typhus dauerausscheidern mit Ampicillin. *Med. Welt.*, 39 : 2086.
- BEACHEY, E.H., DALE, J.B., GREBE, S., AHMED, A., SIMPSON, W.A.** et **OFEK, I.** 1979. Lymphocyte binding and T cell mitogenic properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. *J. Immunol.*, 122 : 189-195.
- BEACHEY, E.H.** 1981. Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, 143 : 325-345.
- BECK, J.** 1967. Un nouveau milieu de culture, d'isolement et d'entretien pour *B.bifidum*. *Ann. Biol. Clin.*, 25 (10-12) : 1255-1260.
- BEERENS, H., GERARD, A.** et **GUILLAUME, J.** 1957. Etude de 30 souches de *Bifidobacterium bifidum* (*Lactobacillus bifidus*). Caractérisation d'une variété buccale. Comparaison avec les souches d'origine fécale. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*, IX : 77-85.
- BEERENS, H., ROMOND, C.** et **NEUT, C.** 1980. Influence of breast-feeding of the bifid flora of the newborn intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33 : 2434-2439.
- BEERENS, H.** 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp **Beerens H.** *Letters in Applied Microbiology*, 11 (3) : 155-157.
- BENNO, Y., SAWADA** et **MITSUOKA, T.** 1984. The intestinal microflora of infants : composition of faecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immun.*, 28 : 975.
- BERGHOLM, H.** 1902. Über mikroorganismen des vaginalsekretes schwangerer. *Arch. Gynäk.*, 66 : 497.

**BERGOGNE-BEREZIN, E., CERF, M., GAUDIN, B., CAZIER, A., BIZET, J. et FELDMAN, G.** 1986. Recherche des phénomènes d'adhésion bactérienne dans le tube digestif chez l'homme. Rev. Inst. Pasteur Lyon, 19 : 93-103.

**BERNIER, J.J.** Gastroentérologie. Deuxième édition. Flammarion Médecine Sciences.

**BERRADA, N., LAROCHE, G., LEMELAND, J.F. et TONETTI, H.** 1989. Survie de bifidobactéries dans l'estomac de l'homme. Les laits fermentés. Actualité de la recherche. John Libbey Eurotext Ltd, pp. 259-260.

**BEZIRTZOGLU, E.** 1985. Contribution à l'étude de l'implantation de la flore fécale anaérobie du nouveau-né mis au monde par césarienne. Thèse Paris-Sud.

**BEZKOROVAINY, A., GROHLICH, D. et NICHOLS, J.H.** 1979. Isolation of a glycopolypeptide fraction with *L. bifidus* subspecies *penn.* growth promoting activity from whole human milk casein. Am. J. Clin. Nutr., 32 : 1428-1432.

**BEZKOROVAINY, A. et TOPOUZIAN, N.** 1981a. The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *B. bifidum* var. *penn.* Clin. Biochem., 14 (3) : 135-141.

**BEZKOROVAINY, A. et TOPOUZIAN, N.** 1981b. *B. bifidus* var. *penn.* growth promoting activity of human milk casein and its derivatives. Int. J. Biochem., 13 : 585-590.

**BEZKOROVAINY, A. et TOPOUZIAN, N.** 1983. Aspects of iron metabolism in *B. bifidum* var. *penn.* Int. J. Biochem., 15 (3) : 361-366.

**BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, N. et MILLER CATCHPOLE, R.** 1986. Mechanisms of ferric and ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. Clin. Physiol. Biochem., 4 : 150-158.

**BIANCHI-SALVADORI, B., BRUGHERA, F.** 1978. Influence du yaourt sur la flore lactique et bifide de l'intestin. XX Int. Dairy Congr., E. : 1079.

**BIANCHI-SALVADORI, B.** 1984. Passage des lactobacilles du yaourt dans le tube digestif. Symposium international sur les effets nutritionnels de la flore digestive. Mission scientifique de recherche nutritionnelle sur les aliments laitiers frais. Syndifrais (Ed.), pp. 25-29.

**BIAVATI, B., SCARDOVI, V. et MOORE, W.E.C.** 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. International Journal of Systematic Bacteriology, 32 (3) : 358-373.

**BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P., CROCIANI, F. et TROVATELLI, L.D.** 1984. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of infants. Microbiologica, 7 : 341-345.

**BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P. et TROVATELLI, L.D.** 1986. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults. Microbiologica, 9 : 39-45.

**BISHOP, R. et SUEOKA, N.** 1972. 5-bromouracil-tolerant mutants of *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 112 (2) : 870-876.

**BLAUROCK, G.** 1940. Züchtung von Bifidusbakterien aus der vaginal flora. Dtsch. Med. Wschr., 66 : 1133.

**BOEDEKER, E.C.** 1984. Attachment of organisms to the gut mucosa (Ed.) CRC Press USA, 2. pp. 157-166.

- BORRIELLO, S.P.** Carcinoma of the colon and gut bacteria. In : Microbes and infections of the gut. (Ed.) C.S. Goodwin.
- BOURRILLON, A., BOUSSOUGANT, Y., LEJEUNE, C. et PAILLERETS, F.** 1980. Etablissement et cinétique des anaérobies dans la flore fécale du nouveau-né. Les anaérobies (Symposium Paris). (Ed.). Masson. pp. 96-107.
- BOVE, J.M. et SAILLARD, C.** 1979. Cell biology of spiroplasma. In : The mycoplasma. R.F. Whitcomb and J.G. Tully. Academic Press Inc., New York., 3. pp. 83-153.
- BOVENTER, K.** 1938. Untersuchungen über das *Bacterium bifidum*. Zentralbl. Bakteriol. I. Orig., 142 : 419-430.
- BOVENTER, K.** 1949. *Bacterium bifidum* und seine Bedeutung. Ergebn. Hyg., 26 : 193-234.
- BRAUN, O.H.** 1981. Effect of consumption of human milk and other formulas on intestinal bacterial flora in infants. Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy. Lebenthal (Ed.). Raven Press, New York. pp. 247-253.
- BROWN, T.D.K., JONES-MORTIMER, M.C. et KORNBERG, H.L.** 1977. The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. Journal of general microbiology, 102 : 327-336.
- BUCHANAN, R.E. et GIBBONS, N.E.** 1974. Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> ed. Williams et Willkins co., Baltimore.
- BULLEN, C.L., TEARLE, P.V. et STEWART, M.G.** 1977. The effect of "humanised" milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants. J. Med. Microbiol., 10 : 403-413.
- CARRILLO, M., ESTRADA, E., et HAZEN, T.C.** 1985. Survival and enumeration of fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. Appl. Environ. Microbiol., 50 : 468-476.
- CHANG, J.H., KWON, I.K., et KIM, H.U.** 1983. Studies on the bifidobacteria in breast-fed Korean infant gut. Korean J. Dairy Sci., 5 : 111.
- CHENEY, C.P. et BOEDEKER, E.C.** 1984. Appearance of the host intestinal receptors for pathogenic *E. coli* with age. In : Attachment of organisms to the gut mucosa. BOEDEKER, E.C. (Ed.) CRC Press USA., 2. pp. 157-166.
- CHEVALIER, P., ROY, D. et WARD, P.** 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. Journal of Applied Bacteriology, 68 : 619-624.
- COATES, M.E. et FULLER, R.** 1977. The gnotobiotic animal in the study of gut microbiology. In : Clarke and Bauchop. pp. 311-342.
- COLMIN, C., PEBAY, M., SIMONET, J.M. et DESCARIS, B.** 1991. A species-specific DNA probe *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. FEMS Microbiol. Letters, 81 : 123-128.
- COLOMBEL, J.F., CORTOT, A., NEUT, C. et ROMOND, C.** 1987. Yogurth with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. Lancet., 2, 8459 : 43.

**CONTREPOIS, M.** 1988. Les colibacilles pathogènes : adhérence et facteurs de colonisation des colibacilles entérotoxigènes. In : L'intestin grêle. RAMBAUD J.C., MODIGLIANI, R. (Eds). Excerpta Medica, Elsevier. pp. 138-150.

**COSTERTON, J.W., IRVIN, R.T., CHENG, K.J.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35 : 299-324.

**COURTNEY, H.S., OFEK, I., SIMPSON, W.A. et BEACHEY, E.H.** 1981. Characterization of lipoteichoic acid binding to polymorphonuclear leukocytes of human blood. *Infect. Immun.*, 32 : 625-631.

**CROCIANI, F., EMALDI, O. et MATTEUZZI, D.** 1977. Increase in isoleucine accumulation by  $\alpha$ -aminobutyric acid-resistant mutants of *Bifidobacterium ruminale*. *European J. Appl. Microbiol.*, 4 : 177-179.

**CROUCHER, S.C., HOUSTON, A.P., BAYLISS, C.E. et TURNER, R.J.** 1983. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 (3) : 1025-1033.

**CUMMINS, C.S., GLENDENNING, O.M. et HARRIS, H.** 1957. Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature*, 180 : 337-338.

**DARFEUILLE-MICHAUD, A.** 1987. Contribution à la recherche et à l'identification des facteurs d'adhésion d'*E. coli* responsables de diarrhées; description de nouveaux facteurs d'adhésion. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université Clermont II.

**DECKER, S.J. et LANG, D.R.** 1977. Mutants of *Bacillus megaterium* resistant to uncouplers of oxidative phosphorylation. *The journal of biology chemistry*, 252 (17) : 5936-5938.

**DEGUCHI, Y., MORISHITA, T. et MUTAI, M.** 1985. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 49 (1) : 13-19.

**DEHNERT, J.** 1957. Untersuchungen über die gram positive Stuhlflora des Brustmilchkindes. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig.*, 169 : 66-83.

**DELLAGLIO, F.** 1989. Approches moléculaires et chimiotaxonomiques dans la classification des bactéries lactiques. In : Bif et Facteurs bifidigènes. Rôle en santé humaine. ARRBA (Ed.). pp. 55-72.

**DE MAN, J.C., ROGOSA, M. et SHARP, M.E.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. applied bacteriology*, 23 : 130-135.

**DE SIMONE, C., BIANCHI-SALVADORI, B., NEGRI, R., FERRAZZI, M., BALDINELLI, R. et VESELY, R.** 1986. The adjuvant effect of yogurth on production of gamma-interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Reports Int.*, 3 : 419-431.

**DESJARDINS, M.L. et ROY, D.** 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.*, 73 : 299-307.

**DESJARDINS, M.L., ROY, D., TOUPIN, C. et GOULET, J.** 1990. Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* ssp. *J. Dairy Sci.*, 73 (6) : 1478-1484.

**DE VOS, N., MEVISSSEN-VERHAGE, E, HARMSSEN-VAN-AMERONGEN, W. et MARCELIS, J.** 1982. A new selective medium for the culture of *Clostridium* from human feces. Eur. J. Clin. Microbiol., 1 : 267-271.

**DE VRIES, W. et STOUTHAMER, A. H.** 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria. Journal of Bacteriology, 93 (2) : 574-576.

**DE VRIES, W. et STOUTHAMER, A. H.** 1968. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria. Journal of Bacteriology, 96 (2) : 472-478.

**DE VRIES, W. et STOUTHAMER, A. H.** 1969. Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. Arch. Mikrobiol., 65 : 275-287.

**DI GIROLAMO, R., LISTON, J. et MATCHES, J.** 1977. Ionic-binding. The mechanism of viral uptake by shellfish mucus. Appl. Environ. Microbiol., 33 : 19.

**DODDS, K.L. et COLLINS-THOMPSON, D.L.** 1985. Characteristics of nitrite reductase activity in *Lactobacillus lactis* TS4. Can. J. Microbiol., 31 : 558-562.

**DRASAR, B.S., et HILL, M.J.** 1974. Human intestinal flora. Academic Press, London, New-york, San Francisco.

**DRIESSEN, F.M. et DEBOERS, R.** 1989. Fermented milks with selected intestinal bacteria : A healthy trend in new products. Neth. Milk Dairy J., 43 : 367.

**DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P.** 1979. INRA. Actualités scientifiques et agronomiques. Ecologie microbienne du tube digestif. (Ed.) Masson.

**DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P., HUDAULT, S. et NICOLAS, J.L.** 1980. Rôle des bactéries anaérobies strictes dans les effets de barrière exercés par la flore du tube digestif. Dans : Les anaérobies, Symposium Paris. (Ed.) Masson, pp. 86-95.

**EBISSAWA, E., ASSARI, T., TAKEDA, S., WATANABE, A., NIHEI, K., TAMASHITA, T., WAKIGUCHI, H. et WATANABE, S.** 1987. Utilisation de lait fermenté additionné de Bifidus Actif chez la femme enceinte. Médecine et Chirurgie digestives, premier colloque *Bifidobacterium longum* et santé, Monte Carlo, 16 (3) : 9-11.

**ELLIKER, P.R., ANDERSON, A. et HANNESEN, G.H.** 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy Sci., 39 : 1611-1612.

**ETZLER, M.E.** 1984. Lectin receptors on the intestinal cell surface. In : Attachment of organisms to the gut mucosa. BOEDEKER, E.C. (Ed.) CRC Press USA, 2. pp.: 147-156.

**EXTERKATE, F.A., OTTEN, B.J., WASSENBERG, H.W. et VEERKAMP, J.H.** 1971. Comparison of the phospholipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. Journal of Bacteriology, 106 : 824-829.

**FAURE, J.C., SCHELLENBERG, D., BEXTER, A. et WURZNER, H.P.** 1982. Barrier effect of *Bifidobacterium longum* on *Escherichia coli* in the germ-free rat. Int. J. Vit. and Nutr. Res., 52 (2) : 225-230.

**FERNANDES, C.F., SHAHANI, K.M. et AMER, M.A.** 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. FEMS Microbiol. Revs., 46 : 343-356.

**FERNANDES, C.F. et SHAHANI, K.M.** 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. J. Food Protect., 53 : 704.

- FERRARI, A., PACINI, N. et CANZI, E.** 1980. A note on bile acids transformations by strains of *Bifidobacterium*. Journal of applied bacteriology, 49 : 193-197.
- FORSTNER, G., SHERMAN, S.P. et FORSTNER, J.** 1984. Mucus : function and structure. In : attachment of organisms of the gut mucosa, by E.C. BOEDEKER, CRC Press USA, 2. pp. 13-21.
- FRISEL, E.** 1951. Studies on *Bacterium bifidum* in healthy infants. A clinical bacteriological investigation. Acta Paediat., Stockh, 40 suppl. 80 : 1-123.
- GAUHE A., GYÖRGY, P., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., ROSE, C.S., RUELIUS, H.W. et ZILLIKEN, F.** 1954. Bifidus factor IV. Preparations obtained from human milk. Arch. Biochem. Biophys., 48 : 214-224.
- GEBBERS, J.O. et LAISSUE, J.A.** 1984. Functional morphology of the mucosal barrier. Microecology and Therapy, 14 : 137-168.
- GILLILAND, S.E.** 1989. Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci., 72 : 2483.
- GLICK, M.C., SALL, T., ZILLIKEN, F. et MUDD, S.** 1960. Morphological changes of *L. bifidus* var. *penn.* produced by a cell-wall precursor. Biochim. Biophys. Acta, 37 (2) : 363-365.
- GOLDIN, B.R. et GORBACH, S.L.** 1977. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine. Cancer, 40 : 2421-2426.
- GOLDIN, B.R., SWENSON, L., DWYER, J., SEXTON, M. et GORBACH, S.L.** 1980. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human faecal bacterial enzymes. J. Natl. Cancer Inst., 64 (2) : 255-261.
- GOLDIN, B.R., GORBACH, S.L.** 1984. The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacteria activity and chemical induction of large bowel tumor. Dev. Indust. Microbiol., 25 : 139-144.
- GOLDIN, B.R.** 1986. In situ bacterial metabolism and colon mutagens. Ann. Rev. Microbiol., 40 : 367-393.
- GOLDMAN, P.** 1985. Drug metabolism by the intestinal flora and its implications. Microecology and Therapy, 15 : 257-260.
- GRIMONT, F. et GRIMONT, P.A.D.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur. Microbiol., 137B : 165-175.
- GRUNEWALD, K.K.** 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci., 47 : 2078-2079.
- GRUNEWALD, K.K. et MITCHELL, L.K.** 1983. Growth of mice fed milk fermented with *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Prot., 46 : 315.
- GUERINA, N.G. et NEUTRA, M.R.** 1984. Mechanism of bacterial adherence. Microecology and Therapy, 14 : 183-199.
- GUEST, J.R.** 1979. Anaerobic growth of *Escherichia coli* K 12 with fumarate as terminal electron acceptor. Genetic studies with menaquinone and fluoroacetate-resistant mutants. Journal of general microbiology, 115 : 259-271.

**GUFFANTI, A.A., CLEJAN, S., FALK, L.H., HICKS, D.B. et KRULWICH, T.A.** 1987. Isolation and characterization of uncoupler-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 169 (10) : 4469-4478.

**GURR, M.I., MARSHALL, V.M.E. et FULLER, R.** 1984. Laits fermentés, microflore intestinale et nutrition. *Bulletin de la Fédération Internationale de Laiterie*. pp. 54-59.

**GUSTAFSON, B.E. et CARLSTEDT-DUKE, B.** 1984. Intestinal water-soluble mucins in germfree, exgermfree and conventional animals. *Acta Pathol. Microbiol. Immun. b.*, 92 (5) : 247.

**GYLLENBERG, N. et NIEMELÄ, S.** 1959. A selective method for the demonstration of Bifid-Bacteria (*Lactobacillus bifidus*) in materials tested for faecal contamination. *J. sci. Agric. Soc. Finland*, 31 : 94-97.

**GYÖRGY, P.** 1953. Hitherto unrecognized biochemical difference between human milk and cow's milk. *Pediatrics*, 11 : 98-108.

**GYÖRGY, P., NORRIS, R.F. et ROSE, C.S.** 1954a. Bifidus factor I. Variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1) : 193-201.

**GYÖRGY, P., KUHN, R., ROSE, C.S. et ZILLIKEN, F.** 1954b. Bifidus factor II : its occurrence in milk from different species and in other natural products. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1) : 202-208.

**HAENEL, H. et MULLER-BEUTHOW, W.** 1963. Examination of german and bulgarian young men for intestinal eu biosis. *Zbl. Bakt.*, 188 : 70-80.

**HAENEL, H.** 1970. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 23 (1) : 1433-1439.

**HALLER, J. et KRÄUBIG, H.** 1960. The influence upon radiation of the intestines by the oral use of combination of living acidophilus-bifidus and colibacteria. *Strahlenther.*, 113 (2) : 272.

**HAMZE, M.** 1989. Contribution à la production de facterurs bifidigènes et à leur étude in vitro et in vivo. Thèse de l'Université de Lille.

**HARRISON, W., STAHL, R.C., MAGAVRAN, J., SANDERS, M., NORRIS, R.F. et GYÖRGY, P.** 1953. The incidence of *Lactobacillus bifidus* in vaginal excretions of pregnant and non pregnant women. *Amer. J. Obst. et Gynec.*, 65 (2) : 353-357.

**HARTLEY, C.L., NEUMANN, C.S. et RICHMOND, M.H.** 1979. Adhesion of commensal bacteria to the large intestine wall in human. *Infect. Immun.*, 23 : 128-132.

**HASHIMOTO, M.** 1985. Utilization of fructo-oligosaccharides in pig feed. *Yoton no Tomo (Nukizuri)* : 41.

**HASSINEN, J.B., DURBIN, G.T., TOMARELLI R.M. et BERNHART, F.W.** 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.*, 62 : 771-777.

**HATANAKA, M., TACHIKI, T., KUMAGAI, H. et TOCHIKURA, T.** 1987a. Distribution and some properties of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in Bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (1) : 251-252.

- HATANAKA, M., TACHIKI, T., KUMAGAI, H. et TOCHIKURA, T.** 1987b. Purification and some properties of glutamine synthetases from Bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (2) : 425-433.
- HEPNER, G., FRIED, R., JEOR, S.ST., FUSETTI, L. et MORIN, R.** 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 : 19-24.
- HERSCOVICS, A., BUGGE, B., QUARONI, A. et KIRSCH, K.** 1980. Characterization of glycopeptides labelled from D-(2-H<sup>3</sup>) mannose and L-(6-H<sup>3</sup>) fucose in intestinal epithelial cell membranes during differentiation. *Biochem. J.*, 192 : 145-151.
- HIDAKA, H., EIDA, T., TAKIZAWA, T., TOKUNAGA, T. et TASHIRO, Y.** 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, 5 : 37-41.
- HIDAKA, H., HIRAYAMA, M., et SUMI, N.** 1988. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, 52 : 1181.
- HITCHINS, A.D. et MCDONOUGH, F.E.** 1989. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 : 675-684.
- HOFFMANN, K.** 1966. Bakterielle besiedlung des menschlichen Darmes Theoretische und klinische medizinen in einzeldarstellungen. Dr. Alfred Hüthig, Heidelberg, German Federal Republic.
- HOFSTAD, T. et KALVENES, M.B.** 1985. Adhesion of anaerobic gram-negative bacteria to mucosal surfaces. *Scand. J. Infect. Dis. (suppl.)*, 46 : 33-36.
- HOLDEMAN, L.V. et MOORE, W.E.C.** 1972. Anaerobe Laboratory Manual. Blacksburg.
- HOLLAND, D.F.** 1920. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bact.*, 5 : 215-229.
- HOLMGREEN, J., SVENNERHOLM, A.M. et LINDBLAD, M.** 1983. Receptor-like glycoconjugates in human milk that inhibit classical and El Tor *V. cholerae* cell adherence (hemagglutination). *Infect. Immun.*, 39 (1) : 147-154.
- HOMMA, N., NISHIHARA, K. et ISODA, K.** 1967. Antifidus cocci, their biological properties and clinical significance. *Mschr. Kinderheilk.*, 115 (4) : 296.
- HOMMA, N.** 1988. Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria microflora*, 7 (1), 35-43.
- HOSKINS, L.C. et BOULDING, E.T.** 1976. Degradation of blood group antigens in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.*, 57 : 63-82.
- HOSKINS, L.C. et BOULDING, E.T.** 1981. Mucin degradation in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.*, 67 : 163-172.
- HOSKINS, L.C., AGUSTINES, M., MC KEE, W.B., BOULDING, E.T., KRIARIS, M. et NIEDERMEYER, G.** 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.*, 75 : 944-953.
- HOSONO, A., WARDOJO, R. et OTANI, H.** 1990. Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54 (7) : 1639.

**HOTTA, M., SATO, Y., IWATA, S., YAMASHITA, N., SUNAKAWA, K., OIKAWA, T., TANAKA, R., WATANABE, K., TAKAYAMA, H., YAJIMA, M., SEKIGUCHI, S., ARAI, S., SAKURAI, T. et MUTAI, M.** 1987. Clinical effects of *Bifidobacterium* preparations on pediatric intractable diarrhea. *Keio J. Med.*, 298-314.

**HOWARD, A.N. et MARKS, J.** 1982. The lack of evidence for a hypocholesterolemic factor in milk. *Atherosclerosis*, 45 : 243.

**HUUB, J.M., OP DEN CAMP, H.J.M., OOSTERHOF, A. et VEERKAMP, J.H.** 1985. Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 47 (1) : 332-334.

**HUSAIN, I., POUPARD, J.A. et NORRIS, R.F.** 1972. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J. Bact.*, 111 : 841-844.

**INOUE, K. et NAGAYAMA, T.** 1970. Effect of mucin upon growth of low birth-weight infants and their intestinal microflora. *Acta. Paediat. Jap. (Overseas edn.)*, 12 : 15-20.

**ISHIBASHI, N.** 1989. Absorption d'oxygène et métabolisme du *bifidobacterium*. *Bifidobacterium* et facteurs bifidogènes. Rôle en santé humaine. ARBBA (Ed.). pp. 129-138.

**ITO, M., OHNISHI, Y., ITOH, S. et NISHIMURA, M.** 1983. Carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone-resistant *Escherichia coli* mutant that exhibits a temperature-sensitive Unc phenotype. *Journal of bacteriology*, 153 (1) : 310-315.

**ITOH, K., MATSUI, T., TSUJI, K., MITSUOKA, T. et VEDA, K.** 1988. Genetic control in the susceptibility of germ free inbred mice to infection by *E. coli* 0115, a, c : K (B). *Infect Immun*, 56 : 930-935.

**IWATA, M. et MORISHITA, T.** 1989. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Letters in Applied Microbiology*, 9 : 165-168.

**JABBAL, I., KELLS, D.I.C., FORSTNER, G. et FORSTNER, J.** 1976. Human intestinal goblet cell mucin. *Can. J. Biochem.*, 54 : 707.

**JASPERS, D.A., MASSEY, L.K. et LUEDECKE, L.O.** 1984. Effect of consuming yogurts prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.*, 49 : 1178.

**JONES, G.W.** 1977. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In : *Microbial interactions*. REISSING (Ed.). Chapman and Hall, London. pp.133-176.

**KAGEYAMA, T., TANODA, T. et NAKANO, Y.** 1984. The effect of *Bifidobacterium* administration in patients with leukemia. *Bifidobacteria Microflora*, 3 (1) : 29-33.

**KALNITSKY, G. et GUZMAN BARRON, E.S.** 1974. The effect of fluoroacetate on the metabolism of yeast and bacteria. *Journal of biological chemistry*, 170 : 83-95.

**KANDLER, O.** 1970. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20 (4) : 491-507.

**KANDLER, O. et LAUER, E.** 1974. Modern concepts of the taxonomy of Bifidobacteria. *Zbl. Bakt.*, 228 : 29-45.

- KIM, Y.S., MORITA, A., MIURA, S. et SIDDIQUI, B.** 1984. Structure of glycoconjugates of intestinal mucosal membranes : role in bacterial adherence. In : Attachment of organisms to the gut mucosa. BOEDEKER, E.C. (Ed.) CRC Press USA., 2. pp. 99-109.
- KIYOSAWA, H., SUGAWARA, C., SUGARAWA, N. et MIYAKE, H.** 1984. Effect of skim milk and yogurt on serum lipids and developments of sudanophilic lesions in cholesterol-fed pigs. *Lipids*, 8 : 428-431.
- KLEINSCHMIDT, H.** 1925. Studien über die anaerobier des Säuglingsdarms. *M Schr. Kinderheilk*, 29 : 550-554.
- KLEINSCHMIDT, H.** 1949. Versuche zur anpassung der künstlichen an die natürliche nahrung des säuglings. *Osterr, Z. kinderheilk*, 3 : 55-58.
- KNOCKE, M. et HANNELORE, B.** 1984. Simulation of intestinal biocenosis in continuous flow culture. *Microecology Therapy*, 14 : 127-135.
- KNOX, M.R. et HARRIS, J.E.** 1988. Isolation and characterization of mutants of mesophilic methanogenic bacteria resistant to analogues of DNA bases and nucleosides. *Arch. microbiol.*, 149 : 557-560.
- KNUTTON, S., LLOYD, D.R. et MC NEISH A.S.** 1987. Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype 0148 : HL 28 wich adheres to human intestinal mucosa : a potentially new human ETEC colonization factor. *Infect. Immun.*, 55 : 86-92.
- KOHWI, Y., IMAI, K., TAMURA, Z., HASHIMOTO, Y.** 1978. Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann.*, 69 (5) : 613-618.
- KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S. et HAMADA, K.** 1968. Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.*, 95 (2) : 710-711.
- KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S. et HAMADA, K.** 1970a. Induction of pleomorphology and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.*, 102 : 217-220.
- KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S. et SUGANUMA, A.** 1970b. Necessity of calcium for cell division in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.*, 104 (2) : 1010-1013.
- KOZLOVA, E.P.** 1976. Intestinal microbial flora in premature infants with septicemia and its correction with *Bifidobacterium*. *Voprosy Okhr. Materin. Det.*, 21 : 50-53.
- KRIVAN, H.C., CLARK, G.F., SMITH, D.F. et WILKINS, T.D.** 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin : evidence for a glycoconjugate containing the sequence gal 1-3 Gal 1-4 glc NAc. *Infect. Immun.*, 53 (3) : 573-581.
- KUHN, R., GAUCHE, A. et BAER, H.H.** 1953. Über ein N-haltiges tetrasaccharid aus frauenmilch. *Chem. Berichte*, 86 (6) : 827-830.
- KUHN, R. et KIRSCHENLOEHR, W.** 1954. Über ein galactosido-N-acetyl-glucosamin aus den Blutgruppen Substanzen des Mekoniums. *Chem. Berichte*, 87 : 384.
- KURITZA, A.P., SHAUGHNESSY, P. et SALYERS, A.A.** 1986. Enumeration of polysaccharide degrading *Bacteroides* species in human feces using species-specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 : 385-390.

- KURMANN, J.A.** 1988. Starter for fermented milks. Section 5. Starters with selected intestinal bacteria. *Int. Dairy Fed. Bull.*, 227 : 41.
- LAMONT, J.T., WEISER, M.M. et ISSELBACHER, K.J.** 1974. Cell surface glycosyltransferase activity in normal and neoplastic intestinal epithelium of the rat. *Cancer Res.*, 34 : 3225.
- LAUER, E. et KANDLER, O.** 1976. Mechanismus der variation des verhältnisses acetat/lactat bei der vergärung von glucose durch Bifidobakterien. *Arch. Mikrobiol.*, 110 : 271-277.
- LAUTER, L.** 1921. Über das vorkommen des *B. bifidus* bei Neugeborenen. *Zentralbl. Bakteriol. L. Orig. A*, 86 : 579-581.
- LAVERGNE, E., BURDIN, J.C., SCHMITT, J. et MANCIAUX, M.** 1959. Sensibilité de *B. bifidum* à onze antibiotiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 97 (1) : 104-107.
- LECLERC, H. et MORIAMEZ, J.C.** 1980. Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathol. biol.*, 58 (4) : 217-226.
- LEE, B.H., HACHE, S. et SIMARD, R.E.** 1986. A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J. Ind. Microbiol.*, 1 : 209-212.
- LEE, L.J., KINOSHITA, S., KUMAGAI, H. et TOCHIKURA, T.** 1980. Galactokinase of *B. bifidum*. *Agric. Biol. Chem.*, 44 (12) : 2961-2966.
- LEMONNIER, D.** 1988. Le yaourt, enjeu scientifique et industrial. *Recherche*, 19 : 543-545.
- LEVESQUE, J.** 1959a. General aspects of the role of *L. bifidus* in infants. *Ann. Ped.*, 35 : 5-7.
- LEVESQUE, J., AICARDI, H. et GAUTIER, A.** 1959b. Rôle du facteur bifidus II dans l'établissement et le maintien de la flore bifide chez les nourrissons. *Sem. Hop. Paris. Ann. pédiat. Paris*, pp. 30-36.
- LEVESQUE J., GEORGES-JANET, L. et RAYNAUD, M.** 1960. Recherches sur les régimes bifidogènes. *Arch. Péd.*, 17 : 553-540.
- LIPMANN, F. et TUTTLE, C.L.** 1945. Detn. of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.*, 159 : 21-28.
- LIZKO, N.N.** 1987. Dysbacteriosis under extreme conditions. *Antibiot. Med. Biotekhnol.* 32 (3) : 184-190.
- LUCKEY, T.D.** 1965. Gnotobiologic evidence for functions of the microflora. *Ernährungsforschung*, 10 (2-3) : 192-250.
- LUNDEQUIST, B., NORD, C.E. et WINBERG, J.** 1985. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottlefed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr. Scand.*, 74 : 45-51.
- MACFARLANE, G.T., HAY, S. et GIBSON, G.R.** 1989. Influence of mucin on glycosidase, protease and arylamidase activities of human gut bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *Journal of Applied Bacteriology*, 66 : 407-417.
- MC NEISH, A.S., TURNER, P., FLEMING, J. et EVANS, N.** 1975. Mucosal adherence of human enteropathogenic *E. coli*. *Lancet*, ii : 946-948.

- MAGER, J., GOLDBLUM-SINAI, J. et BLANK, I.** 1955. Effect of fluoroacetic acid and allied fluoroanalogues on growth of *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 70 : 320-325.
- MAHIEDINNE, A., NEUT, C., ROMOND, C. et DUBREUIL, L.** 1989. Sensibilité aux antibiotiques de souches de *Bifidobacterium*. *Bifidobacterium* et facteurs bifidigènes. Rôle en santé humaine. ARBBA (Ed.). pp. 73-86.
- MANCIAUX, M.** 1958. *Bifidobacterium bifidum* : Ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson. Thèse université de Nancy.
- MANN, G.V. et SPOERRY, A.** 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. Amer. J. Clin. Nutr., 27 : 464.
- MARA, D.D. et ORAGUI, J.I.** 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. J. Appl. Bacteriol., 55 : 349-357.
- MARCUS, A. et ELLIOT, W.B.** 1959. Enzymatic reactions of fluoroacetyl phosphate. Journal of biological chemistry, 234 : 1011-1014.
- MARMUR, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol., 3 : 208-218.
- MARTEAU, P., POCHART, P., FLOURIE, B., PELLIER, P., SANTOS, L., DESJEUX, J.F. et RAMBAUD, J.C.** 1990. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. American Journal of Clinical Nutrition, 52 (4) : 658-688.
- MASSEY, L.K.** 1984. Effect of changing milk and yogurt consumption on human nutrient intake and serum lipoproteins. J. Dairy Sci., 67 : 255-262.
- MATA, L.J. et URRUTIA, J.J.** 1971. Intestinal colonization of breast-feed infants in a rural area of low socio economic level. Ann. N. Y. Acad. Sci., 176 : 93-98.
- MATTEUZI, D., CROCIANI, F., ZANI, G. et TROVATELLI, L.D.** 1971. *Bifidobacterium suis* n. sp. : a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig faeces. Z. Allg. Mikrobiol., 11 : 387-395.
- MATTEUZI, D., CROCIANI, F. et ENALDI, O.** 1978. Aminoacids produced by *bifidobacteria* and some *clostridia*. Ann. Microbiol. (Paris), 129 (2) : 175-182.
- MATTEUZI, D., CROCIANI, F. et BRIGIDI, P.** 1983. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. Ann. Microbiol., 134A : 339-349.
- MAYER, J.B. et MOSER, L.** 1950. Die typendifferenzierung des thermobakterium *Bifidum*. Z. Kinderheilk, 67 : 455-468.
- MAYER, J.B.** 1956. Das bifidum problem. Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk, 7 : 429-452.
- MAYER, J.B.** 1969. Interrelationships between diet, intestinal flora and viruses. Phys. Med. Rehabilitation, 10 (1) : 16-23.
- MEGHROUS, J., EULOGE, P., JUNELLES, A.M., BALLONGUE, J. et PETITDEMANGE, H.** 1990. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. Biotechnol.Letters, 12 (8) : 575-580.
- METCHNIKOFF, E.** 1908. The prolongation of life. G.P. Putman's son. 4, first edition.

**MEVISSSEN-VERHAGE, E.A.E., MARCELIS, J.H., DE VOS, M.N., HARMSSEN-VAN-AMERONGEN, W.C.M. et VERHOEF, J.** 1987. *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Clostridium* spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J. Clin. Microbiol.* 25 (2) : 285-289

**MILLER, L.G. et FINEGOLD, S.M.** 1967. Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium (Lactobacillus bifidus)*. *J. Bact.*, 93 (1), 125-130.

**MILLER, R.S. et HOSKINS, L.C.** 1981. Mucin degradation in human colon systems. *Gastroenterology*, 81 : 759-765.

**MIRVISH, S.S.** 1970. Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44 : 633-639.

**MITSUOKA, T., SEGA, T. et YAMAMOTO, S.** 1965. Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse des Darmflora von Menschen und Tieren. *Zbl. Bakt.* (1. Abt. Orig.), 195 : 455-465.

**MITSUOKA, T.** 1969a. Vergleichende Untersuchungen über die Laktobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenk. I. Abt. Orig.*, 210 : 32-51.

**MITSUOKA, T.** 1969b. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals, including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenk. I. Abt. Orig.*, 210 : 52-64.

**MITSUOKA, T., HAYAKAWA, K. et KIMURA, N.** 1974. Die faekal flora bei Menschen. II. Mitteilung : die Zusammensetzung der Bifidobakterien-flora der verschiedenen Altersgruppen. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenk. I. Abt. Orig. A*, 226 : 469-478.

**MITSUOKA, T. et KANEUCHI, C.** 1977. Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1799-1810.

**MITSUOKA, T.** 1982. Recent trends in Research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora.*, 1 (1) : 3-24.

**MITSUOKA, T.** 1984. Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 3 (1) : 11-28.

**MITSUOKA, T., HIDAKA, H. et EIDA, T.** 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Die Nahrung*, 31 : 427.

**MITSUOKA, T.** 1989. A profile of intestinal bacteria. Yakult Honsha Co., Ltd., Tokyo.

**MIURA, K., NAKAMURA, H., TANAKA, H. et TAMURA, Z.** 1979. Simultaneous determination of multiple enzyme activities by high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (8) : 1759-1763.

**MIZOTA, T., TAMURA, Y., TOMITA, M. et OKONOJI, S.** 1987. Lactulose as a sugar with physiological significance. *Bulletin of the I.D.F.* p. 212.

**MIZUTANI, T. et MITSUOKA, T.** 1979. Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/HE male mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63 : 1365-1370.

**MODLER, H.W., MCKELLAR, R.C., YAGUCHI, M.** 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 23 (1) : 29-41.

- MONTREUIL, J.** 1957. Les glucides du lait de femme. Bull. Soc. Chim. Biol., 39 : 395.
- MOORE, W.E.C., HASH, D.E., HOLDEMAN, L.V. et CATO, E.P.** 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. Appl. Environ. Microbiol., 39 : 900-907.
- MOREAU, M.C., THOMASSON, M., DUCLUZEAU, R. et RAIBAUD, P.** 1986. Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait. Reprod. Nutr. Develop., 26 (2B) : 745-753.
- MORITA, A., PELLEGRINI, C.A. et KIM, Y.S.** 1981. Glycoproteins in the brush border membranes of proximal and distal intestinal and the effect of small bowel resection. Gastroenterology, 80 : 1235.
- MORO, E.** 1900a. Über die nach Gram-färbbaren bacillen des säuglingsstuhles. Wien. Lin. Wschr., 13 : 114.
- MORO, E.** 1900b. Über *B. acidophilus*. Jb kinderheilk., 52 : 38.
- MUNOA, F.J., VIVES-REGO, J. et PARES, R.** 1985. Deteccion, aislamiento y caracterizacion de *Bifidobacterium* en aguas libres superficiales. Microbiol. Espan., 38 : 1-9.
- MUNOA, F.J. et PARES, R.** 1988. Selective Medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. Applied and Environmental Microbiology, 54 (7) : 1715-1718.
- MUTAI, M. et TANAKA, R.** 1987. Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora. Bifidobacteria Microflora, 6 (2) : 33-41.
- NAGLE, D.P., TEAL, R. et EISENBRAUN, A.** 1987. 5-fluorouracil-resistant strain of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of bacteriology, 169 (9) : 4119-4123.
- NAUJOKS, H.** 1921. Das vorkommen des *B. acidophilus* bei schwangeren und Gebärenden und sein zeitlicher und örtlicher Übergang auf den Neugeborenen. Zentralbl. Bakteriol. Orig. A, 86 : 582-585.
- NEIMANN, N., LAVERGNE, E., MANCIAUX, M., STERLIN, S. et PERCEBOIS, G.** 1965. Clinical and bacteriological study of a milk bifidogenic because of its lactulose content. Pédiatrie, 20 : 139-145.
- NEMETH, J.** 1975. Organisation et évolution dynamique de la villosité intestinale chez l'homme. Thèse de Doctorat en médecine, Paris VII.
- NEUMEISTER, K. et SCHMIDT, W.** 1963. Treatment of intestinal radiation reactions. Med. Klin., 58 (20) : 842-844.
- NEUT, C., ROMOND, C. et BEERENS, H.** 1980a. Influence of breast-feeding on the bifidus flora in the newborn's intestine. Microecology and Therapy, 10 : 127-137.
- NEUT, C., ROMOND, C. et BEERENS, H.** 1980b. Contribution à l'étude de la répartition des espèces de *Bifidobacterium* dans la flore fécale des nourrissons alimentés soit au sein, soit par des laits maternisés. Reprod. Nutr. Develop., 20 : 1679-1684.
- NEUT, C., ROMOND, C. et BEERENS, H.** 1981. Identification des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels. Rev Institut Pasteur Lyon, 14 : 19-26.
- NEUT, C., BEERENS, H. et ROMOND, C.** 1984. La colonisation intestinale du nouveau-né après césarienne : influence de l'environnement. Microbiol. Alim. Nutr., 2 : 337-349.

NEUT, C., LESIEUR, V., BEERENS, H. et ROMOND, C. 1985. Changes in the composition of infant fecal flora during weaning. *Microecology Therapy*, 15 : 303.

NEUTRA, M.R. et J. et FORSTNER, J. F. 1987. Physiology of the gastrointestinal tract. In : *Gastrointestinal mucus : synthesis, secretion and function*. Second edition, Leonard R. Johnson (Ed.). Raven. Press. New-York, Chap. 34.

NICHOLS, J.H., BEZKOROVAINY, A. and LANDAU, W. 1974. Human colostral whey M-1 glycoprotein and their *L. Bifidus var.penn.* growth promoting activities. *Life Sci.*, 14 : 967-976.

NORRIS, R.F., FLANDERS, T., TOMARELLI, R.M. et GYÖRGY, P. 1950. The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*. A comparison of branched and unbranched strains. *J. Bact.*, 60 : 681-696.

OCHI, Y., MITSUOKA, T. et SEGA, T. 1964. Studies on the intestinal flora of chickens. III. The development of the flora from chicks till Hens. *Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig.*, 193 : 80-95.

OKAMURA, N., NAKAYA, R., YOKOTA, H., YANAI, N. et KAWASHIMA, T. 1986. Interaction of shigella with bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 5 (1) : 51-55.

OP DEN CAMP, H.J.M., PEETER, P.A.M., OOSTERHOF, A. et VEERKAMP, J.H. 1985. Immunochemical studies on the lipoteichoic acid of *B. bifidum* subsp. *penn.* *J. Gen. Microbiol.*, 131 : 661-668.

ORLA-JENSEN, S. 1919. *The lactic Acid Bacteria*. Host, Copenhagen, Denmark, pp. 1-196.

ORLA-JENSEN, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le lait*, 4 : 468-480.

ORLA-JENSEN, S., OLSEN, E. et GEILL, T. 1945. Senility and intestinal flora. A reexamination of metchnikoffs hypothesis. *Biol. Skr. K. danske vidensk Selsk*, 3 (4) : 3-38.

OWEN, R.J. et PITCHER, D. 1985. Currents methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. *Chemical methods in bacterial systematics*.

PAYENS, W., RETHANS, E.J.M. et DE WAARD, H. 1976. Einfluss des konsums einer grossen menge von yoghurt oder milch auf den serumcholesterolgehalt. *Milchwissenschaft*, 30 : 525-529.

PERDIGON, G., DE MACIAS, M.E.N., ALVAREZ, S., OLIVIER, G. et DE RUIZ HOLGADO, A.P. 1988. Systematic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *L. casei* and *L. acidophilus*. *Immunology*, 63 (1) : 17-23.

PETSCHOW, B.W., TALBOTT, R.D. 1990. Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J. Clin. Microbiol.*, 28 : 287-292.

PETUELY, F. 1956. Ein einfacher vollsynthetischer Selektivnährboden für den *Lactobacillus bifidus*. Selektivnährboden für den *Lactobacillus bifidus*.

POCH, M. et BEZKOROVAINY, A. 1988. Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.*, 71 : 3214-3221.

- POCH, M.** et **BEZKOROVAINY, A.** 1991. Bovine milk K-casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. *J. Agric. Food Chem.*, 39 : 73-77.
- POLONOWSKI, M.** et **LESPAGNOL, A.** 1930. Sur l'existence de plusieurs glucides dans le lactosérum de femme. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 104 : 555-557.
- POUPARD, J.A., HUSAIN, I.** et **NORRIS, R.F.** 1973. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.*, 37 : 136-165.
- PREVOT, A.R.** 1940. Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Masson (Ed.) Paris France. pp. 195-199.
- PREVOT, A.R.** 1955. Concerning the distinction between *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 88 : 229-231.
- PREVOT, A.R.** 1961. Traité de systématique bactérienne. Edition Dunod, tome 2. p. 508.
- PULUSANI, S.R.** et **RAO, D.R.** 1983. Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed thermophilus, bulgaricus and acidophilus milks. *J. Food Sci.*, 48 : 280-281.
- QUARONI, A., KIRSCH, K., HERSCOVICS, A.** et **ISSELBACHER, K.J.** 1980. Surface-membrane biogenesis in rat intestinal epithelial cells at different stages of malnutrition. *Bioch. J.*, 192 : 133-139.
- RAHE, A.H.** 1915. A study of the so-called implantation of the *Bacillus bulgaricus*. *J. Infect. Dis.*, 16 : 210-220.
- RAIBAUD, P.** 1983. Destinée et effets des bactéries. Dans : Yaourt et nutrition. Mission Scientifique de recherche nutritionnelle sur les aliments laitiers frais. Syndifrais (Ed.). pp. 31-35.
- RAO, D.R., CHAWAN, C.B.** et **PULUSANI, S.R.** 1981. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterologenesis in rats. *J. Food Sci.*, 46 : 1339.
- RAO, A.V., SHIWNARAIN, N.** et **MAHARAJ, I.** 1989. Survival of microencapsuled *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 22 (4) : 345-349.
- RASIC, J. Lj.** 1983. The role of dairy foods containing Bifido- and acidophilus bacteria in nutritional and health. *North European Dairy J.*, 49 (4) : 80-88.
- RASIC, J. Lj., KURMANN, J.A.** 1983. Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag. Basel. Boston. Stuttgart.
- RAYNAUD, M.** 1959a. Le facteur bifidus 2. *Ann. Pédiatrie*, 241 : 8-23.
- RAYNAUD, M.** et **GUINTINI, J.** 1959b. Aspect microscopique du Bifidus. *Ann. de Pédiatrie*, 241 : 24-26.
- REASONER, D.J.** et **GELDREICH, E.E.** 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49 (1) : 1-7.
- RESNICK, I.G.** et **LEVIN, M.A.** 1981a. Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 : 427-432.

**RESNICK, I.G.** et **LEVIN, M.A.** 1981b. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 (3) : 433-438.

**REUTER, G.** 1963. Vergleichenden untersuchung über die Bifidus-flora im sauglings und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenk. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig.*, 191 : 486-507.

**REUTER, G.** 1971. Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *International journal of systematic bacteriology*, 21 (4) : 273-275.

**REUTER, G.** 1989. *Bifidobacterium* characteristics and classification. In : *Les laits fermentés. Actualité de la Recherche. Syndifrais (Ed.)*. p.49-58.

**ROBERTSON, A.M.** et **STANLEY, R.A.** 1982. In vitro utilization of mucin by *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 (2) : 325-330.

**ROGOSA, M., MITCHELL, J.A.** et **WISEMAN, R.F.** 1951. A selective medium for the isolation and numeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of bacteriology*, 62 : 132-133.

**ROMOND, A.F.** 1988. Apport d'un lait fermenté à *B. longum* dans le traitement des diarrhées à rotavirus du nourrisson. Doctorat en Médecine. Lille.

**ROMOND C., BEERENS, H., NEUT, C.** et **MONTREUIL, J.** 1980. Contribution à l'étude de la maternisation des laits : influence in vitro du lait maternel, du lait de vache et des laits maternisés sur la croissance de *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 131 : 309-314.

**ROMOND, M.B.** 1987 *Bifidobacterium* et facteurs bifidigènes : Etude de modèles animaux permettant l'analyse de leurs interactions. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris XI.

**ROSE, S.J.** 1984. Bacterial flora of breast-fed infants. *Pediatrics*, 74 (4) : 563.

**ROTHSTEIN, D.M.** 1986. *Clostridium thermosaccharolyticum* strain deficient in acetate production. *J. Bact.*, 165 (1) : 319-320.

**ROUFOGALIS, S.** 1941. Untersuchungen über die besiedlung des neugeborenen darmes mit *B. bifidum*. *Z. Hyg. Infektkr.*, 123 : 195-217.

**ROWLAND, J.R.** et **GRASSO, P.** 1975. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.*, 29 : 7-12.

**ROY, D., WARD, P.** et **CHEVALIER, P.** 1989. Rapid characterization of *Bifidobacterium* sp. using enzymatic and biochemical methods. *Les laits fermentés. Actualité de la recherche. Syndifrais*. pp. 281.

**SALYERS, A.A., WEST, B., VERCELLOTTI, S.E.H.** et **WILKINS, T.D.** 1977. Fermentation of mucins and plant poly-saccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 : 529-533.

**SALYERS, A.A.** et **LEEDLE, J.A.Z.** 1983. Carbohydrate utilization in the human colon. In *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges, D.J. (Ed). Academic Press, London. pp. 129-146.

**SALYERS, A.A.** 1989. Molecular and biochemical approaches to determining what bacteria are doing in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek*, 55 : 33-38.

**SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. et MANIATIS, T. 1989.** Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New-York : Cold Spring Harbor Laboratory.

**SATO, J., MOCHIZUKI, K. et HOMMA, N. 1982.** Affinity of the *Bifidobacterium* to intestinal mucosal epithelial cells. *Bifidobacteria Microflora*, 1 (1) : 51-54.

**SAVAGE, D.C. 1977.** Interaction between the host and its microbes. In Clarke and Bauchop. pp. 277-310.

**SAVAGE, D.C. 1984.** Overview of the association of microbes with epithelial surfaces. *Microecology and Therapy*, 14 : 169-182.

**SAVAINO, D.A. et LEVITT, M.D. 1985.** Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 70 : 397-403.

**SAXILD, H.H. et NYGAARD, P. 1987.** Genetic and physiological characterization of *Bacillus subtilis* mutants resistant to purine analogs. *Journal of Bacteriology*, 169 (7) : 2977-2983.

**SCARDOVI, V. et TROVATELLI, L.D. 1965.** The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.*, 15 : 19-29.

**SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., CROCIANI, F. et SGORBATI, B. 1969a.** *Bifidobacterium* : *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. *Arch. Mikrobiol*, 68 : 278-274.

**SCARDOVI, V. et TROVATELLI, L.D. 1969b.** New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig.* , 123 : 64-88.

**SCARDOVI, V., ZANI, G. et TROVATELLI, L.D. 1970.** Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch. Mikrobiol.*, 72 : 318-325.

**SCARDOVI, V., SGORBATI, B. et ZANI, G. 1971a.** Starch gel electrophoresis of fructose-6-P phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *Journal of Bacteriology*, 106 : 1036-1039.

**SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., ZANI, G., CROCIANI, F. et MATTEUZZI, D. 1971b.** Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21 (4) : 276-294.

**SCARDOVI, V. et CROCIANI, F. 1974a.** *Bifidobacterium catenulatum*, *B. dentium* et *B. angulatum*. Three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Internat. J. Syst. Bacteriol.*, 24 : 6-20.

**SCARDOVI, V. et ZANI, G. 1974b.** *Bifidobacterium magnum* sp. nov. : a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Internat. J. Syst. Bacteriol.*, 24 : 29.

**SCARDOVI, V. et SGORBATI, B. 1974c.** Electrophoretic types of transaldolase, transketolase and other enzymes in bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 40 : 427-440.

**SCARDOVI, V. et TROVATELLI, L.D. 1974d.** *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka). *Canb. nov.* and the "minimum" and "subtile" group of new bifidobacteria found in sewage. *Internat. J. Syst. Bacteriol.*, 24 : 21-28.

- SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., BIAVATI, B. et ZANI, G. 1979a.** *B. cuniculi*, *B. choerinum*, *B. boum* and *B. pseudocatenulatum* : four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Internat. J. Syst. Bacteriol.*, 29 : 291-311.
- SCARDOVI, V., CASALICCHIO, F. et VINCENZI, N. 1979b.** Multiples electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconate dehydrogenase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29 : 312-329.
- SCARDOVI, V. 1981.** The Genus *Bifidobacterium* . In : *The Prokaryotes*. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel (Eds.). pp.1951-1961.
- SCARDOVI, V. 1986.** *Bifidobacterium* . *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, IXème édition, Williams et Willkins co., Baltimore.
- SEBALD, M., GASSER, F. et WERNER, H. 1965.** DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to related genera. *Annales de l'Institut Pasteur*, 109 : 251-269.
- SEDGWICK, E.G., HOU, C. et BRAGG, P.D. 1984.** Effect of uncouplers on the bioenergetic properties of a carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone-resistant mutant *Escherichia coli* UV 6. *Biochimica et biophysica acta* : 479-492.
- SEKA ASSY, N. 1982.** Contribution à l'étude des facteurs bifidigènes présents dans le lait maternel. Thèse de 3ème cycle de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I.
- SEKI, M., IGARASHI, M., FUKUDA, Y., SIMAMURA, S., KAWASHIMA, T. et OGASA, K. 1978.** The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the "regularity" among on aged group. *J. japanese society of nutrition and food science*, 31 (4) : 379-387.
- SGORBATI, B., LENZA, G. et CASALICCHIO, F. 1976.** Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolases in *Bifidobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology*, 42 : 49-57.
- SGORBATI, B. 1979.** Preliminary quantification of immunological relationships among the transaldolase of the genus *Bifidobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45 : 557-564.
- SGORBATI, B., et SCARDOVI, V. 1979.** Immunological relationships among transaldolases in the genus *Bifidobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, 45 : 129-140.
- SGORBATI, B. et LONDON, J. 1982a.** Demonstration of phylogenetic relatedness among members of the genus *Bifidobacterium* using the enzyme transaldolase as an evolutionary marker. *International journal of Systematic bacteriology*, 32 (1) : 37-42.
- SGORBATI, B., SCARDOVI, V. et LEBLANC, J. 1982b.** Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 128 : 2121-2131.
- SGORBATI, B., SMILEY, M.B., SOZZI, T. 1983.** Plasmids and phages in *Bifidobacterium longum*. *Microbiologica*, 6 : 169-173.
- SGORBATI, B., SCARDOVI, V. et LEBLANC, J. 1986.** Related structures in the plasmid profiles of *Bifidobacterium longum*. *Microbiologica*, 9 : 415-422.
- SHIMADA, K., MADA, M., MUTAI, M., SUZZUKI, A. et KONUMA, H. 1977.** Techniques for viable cell counts of *bifidobacteria* in fermented milk. *J. Food Hyg. Soc. jap.*, 18 (6) : 537-546.

**SHIMAMURA, S.** 1989. Effet positif de la lactoferrine sur la croissance du *Bifidobacterium*. In : *Bifidobacterium* et facteurs bifidigènes. Rôle en santé humaine. ARBBA (Ed.). pp. 105-113.

**SIMHON, A., DOUGLAS, J.R., DRASAR, B.S. et SOOTHILL, J.F.** 1982. Effect of feeding on infant's faecal flora. Arch. Dis. Child., 57 : 54-88.

**SIMON, G. et GORBACH, S.** 1986. The human intestinal microflora. Dig. Dis. Sci., 31 (9) : 1475-1625.

**SIMPSON, W.A., OFEK, I., SARASOHN, C., MORRISON, J.M. et BEACHEY, E.M.** 1980. Characterization of the binding of streptococcal lipoteichoic acid to human oral epithelial cells. J. Infect. Dis., 141 : 457-462.

**SLOMIANY, B.L. et SLOMIANY, A.** 1984. Lipids of mucous secretions of the alimentary tract. In : Attachment of organisms to the gut mucosa. BOEDECKER, E.C. (Ed.). CRC Press, USA.

**SONOIKE, K., MADA, M. et MUTAI, M.** 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. J. Food Hyg. Soc. Japan, 27 : 238-244.

**STARK, P.L. et LEE, A.** 1982. The bacterial colonization of the large bowel of preterm low birth weight neonates. J. Hyg., 89 (1) : 59-67.

**STEVENSON, D.K., YANG, C., KERNER, J.A. et YEAGER, A.S.** 1985. Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. Clin. Pediatr., 24 (6) : 338-341.

**SYNDIFRAIS.** 1987. Mission scientifique de recherche nutritionnelle sur les aliments laitiers frais. Le yaourt et ses ferments vivants : qualités nutritionnelles. Cah. Nutr. Diét., 22 (5) : 5-18.

**TAGG, J.R., DAJANI, A.S. et WANNAMAKER, L.W.** 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol. Rev., 40 : 722-756.

**TANAKA, R. et MUTAI, M.** 1980. Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*. Applied Environ. Microbiol., 40 (5) : 866-869.

**TANAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROTOMI, M., KUROSHIMA, T., UEYAMA, S., MATSUMOTO, K., KURODA, A. et MUTAI, M.** 1983. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* on the human fecal flora. Bifidobacteria Microflora, 2 (1) : 17-24.

**TERAGUCHI, S., UEHARA, M., OGASA, K. et MITSUOKA, T.** 1978. Enumeration of *Bifidobacteria* in dairy products. Jap. J. Bact., 33 (6) : 753-761.

**TERAGUCHI, S., KAWASHIMA, T. et KUBOYAMA, M.** 1982. Test tube method for counting bifidobacteria in commercial dairy and pharmaceutical bacteria products. J. Food Hyg. Soc. Japan, 23 : 29-35.

**TERAGUCHI, S., ONO, J., KIYOSAWA, I., FUKUWATARI, Y., ARAKI, J., et OKONOJI, S.** 1984. Vitamin production by *Bifidobacteria* originated from human intestine. J. Japanese Society of Nutrition and Food Science, 32 (2) : 157-164.

**THAKUR, C.P. et JHA, A.N.** 1981. Influence of milk, yogurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis, 39 : 211-215.

**THOMPSON, J** et **CHASSY, B.M.** 1982. Novel phosphoenolpyruvate-dependent futile cycle in *Streptococcus lactis* : 2-deoxy-D-glucose uncouples energy production from growth. *Journal of bacteriology*, 151 (3) : 1454-1465.

**THOMPSON, L.U.**, **JENKINS, A.** et **KAMULSKY, J.** 1982. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, 36 : 1106-1111.

**TISSIER, H.** 1900. Recherche sur la flore intestinale des nourrissons. (Etat normal et pathologique). Thèse de Médecine de l'Université de Paris.

**TISSIER, H.** 1923. La putréfaction intestinale. *Bull. Inst. Pasteur*, 21 : 361, 409, 577, 625.

**TOCHIKURA, T.**, **SAKAI, K.**, **FUJIYOSHI, T.**, **TAACHIKI, T.** et **KUMAGAI, H.** 1986. p-nitrophenyl glycoside-hydrolyzing activities in Bifidobacteria and characterization of  $\beta$ -D-galactosidase of *B. longum* 401. *Agric. Biol. Chem.*, 50 (9) : 2279-2286.

**TOIDA, T.**, **SEKINE, K.**, **TATSUKI, T.**, **SAITO, M.**, **KAWASHIMA, T.**, **HASHIMOTO, Y.** et **SAKURAI, Y.** 1990. Biochemical characterization and antitumor activity of a new cell wall preparation, whole peptidoglycan (WPG) from *Bifidobacterium infantis*. *J. Can. Res. Clin. Oncol.*, 116 : 342-348.

**TOMARELLI, R.M.**, **NORRIS, R.F.** et **GYÖRGY, P.** 1949a. Inability of vitamin-B12 to replace the desoxyriboside requirement of a *Lactobacillus bifidus*. *J. biol. Chem.*, 179 (1) : 485-486.

**TOMARELLI, R.M.**, **NORRIS, R.F.**, **GYÖRGY, P.**, **HASSINEN, J.B.** et **BERNHART, F.W.** 1949b. The nutrition of variants of *Lactobacillus bifidus*. *J. biol. Chem.*, 181 (2) : 879-888.

**TOMARELLI, R.M.**, **HASSINEN, J.B.**, **ECKARDT, E.R.**, **CLARK, R.H.** et **BERNHART, F.M.** 1954. The isolation of a crystalline growth factor for a strain of *L. bifidus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 : 225-232.

**TOMASZ, A.** et **BOREK, E.** 1960. The mechanism of bacterial fragility produced by 5-fluorouracil. The accumulation of cell wall precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 46 : 324-327.

**TONER, P.G.** 1968. Cytology of intestinal epithelial cells. *Int. Rev. Cytol.*, 24 : 233-343.

**TRAMER, J.** et **FOWLER, G.G.** 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 15 : 522-528.

**TROVATELLI, L.D.**, **CROCIANI, F.**, **PEDINOTTI, M.** et **SCARDOVI, V.** 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov. : a new species isolated from chicken feces and a related group of Bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch. Microbiol.*, 98 : 187.

**TSUKAMOTO, I.** et **KOJO, S.** 1991. The effects of fluorouracil on thymidylate synthase and thymidine kinase in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochimica et biophysica acta*, 1074 : 52-55.

**UEDA, M.**, **NAKAMOTO, S.**, **NAKAI, R.** et **TAKAGI, A.** 1983. Establishment of a defined minimal medium and isolation of auxotrophic mutants for *B. bifidum* es 5. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29 : 103-114.

**USHIJIMA, T.**, **TAKAHASHI, M.** et **OZAKI, Y.** 1985. Fourteen selective media facilitate evaluation of populations of coexisting fixed bacterial strains of enteric pathogens and normal human faecal flora. *J. Microbiol. Meth.*, 4 : 189-195.

VAN TASSEL, R.L., MAC DONALD, D.K. et WILKINS, T.D. 1982. Production of a fecal mutagen by *Bacteroides* spp. *Infect. Immun.*, 37 : 975-980.

VEERKAMP, J.H., LAMBERT, R. et SAITO, Y. 1965. The composition of the cellwall of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *Archs. Biochem. Biophys.*, 112 (1) : 120-125.

VERCELLOTTI, J.R., SALYERS, A.A., BULLARD, W.S. et WILKINS, T.D. 1977. Breakdown of mucin and plant polysaccharides in the human colon. *Can. J. Biochim.*, 55 : 1190-1196.

WADOLOWSKI, E.A., LAUX, D.C., COHEN, P.S. 1988. Colonization of the streptomycin treated mouse large intestine by a human fecal *E. coli* strain : role of adhesion to mucosal receptors. *Infect. Immun.*, 56 : 1036-1043.

WALCH, E. 1956. Zur Frage der beeinflussbarkeit der darmflora des säuglings durch N-acetyl-D-glucosamin-derivate. *Dtsch. med. Wschr.*, 81 : 661-664.

WALKER, W.A. et ISSELBACHER, K.J. 1974. Uptake and transport of macromolecules by the intestine : possible role in clinical disorders. *Gastroenterology*, 67 : 531-550.

WALKER, W.A. 1985. Role of the mucosal barrier in toxin/microbial attachment to the gastrointestinal tract. Dans : *Microbial toxins and diarrhoeal disease* CIBA Foundation, Symposium, (Ed.) Pitman London, 112 : 34-56.

WEISER, M.M. 1972. Concanavalin A agglutination of intestinal cells from human foetus. *Science*, 177 : 525.

WERNER, H., GASSER, F. et SEBALD, M. 1966. DNA-basenbestimmungen an 28 *Bifidus* stämmen und an stämmen morphologisch ähnlicher gattungen. *Zbl. Bak. I. brig.*, 198 S : 504-516.

WILHELM, M.P., LEE, D.T., ROSENBLATT, J.E. 1987. Bacterial interference by anaerobic species isolated from human feces. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6 (3) : 266-270.

WILKINS, T.D., VAN TASSEL, R.L. 1983. Production of intestinal mutagens. In *Human intestinal microflora in health and disease*. Entges, D.J. (Ed.), pp. 265-288. Academic, New-York. pp. 265-288.

WILKINS, T., KRIVAN, H., STILES, B., CARMAN, R. et LYERLY, D. 1985. Clostridial toxins active locally in the gastrointestinal tract. In : *Microbial toxins and diarrhoeal disease* CIBA Fdn. Symp. Ed. Pitman London, 112. pp. 230-241.

WILLIAMS, A.G. et WITHERS, S.E. 1982. The effect of the carbohydrate growth substrate on the glycosidase activity of hemicellulose-degrading rumen bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 32 : 389-402.

WORK, E. 1971. Some applications and uses of metabolite analogues in microbiology. *Methods in microbiology*, 6A. (Ed.) Norris S.R. and Ribbons D.W.

YAMAZAKI, S., KAMIMURA, H., MOMOSE, H., KAWASHIMA, T. et UEDA, K. 1982. Protective effect of *Bifidobacterium*-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. *Bifidobacteria microflora*, 1 (1) : 55-59.

YAMAZAKI, S., MACHII, K., TSUYUCHI, S., MOMOSE, H., KAWASHIMA, T. et UEDA, K. 1985. Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunol.*, 56 : 43-50.

**YAMASAKI, H.** et **DILAWRI, N.** 1990. Measurement of growth of bifidobacteria on inulofructosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 10 : 229-232.

**YAZAWA, K.,** **IMAI, K.** et **TAMURA, Z.** 1978. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by Bifidobacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, 26 (11) : 3306-3311.

**YOSHIOKA, H.,** **FUJITA, K.** et **ISEKI, K.** 1984. Bacterial flora of breast-fed infants : reply. *Pediatrics*, 74 (4) : 563.

**YUHARA, T.,** **ISOJIMA, S.,** **TSUCHIYA, F.** et **MITSUOKA, T.** 1983. On the intestinal flora of bottle-fed infant. *Bifidobacteria Microflora*, 2 (1) : 33-39.



# UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : Madame EULOGE épouse BARATTE Pascale

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en BIOLOGIE APPLIQUEE A LA NUTRITION  
& AUX BIOINDUSTRIES

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le - 6 MAI 1992 n° 191

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



M. BOULANGE

## RESUME

La composition bactérienne de sept laits fermentés au *Bifidobacterium* commercialisés en France a été définie. Les huit souches de bifidobactéries ainsi isolées ont été identifiées phénotypiquement puis par homologie ADN/ADN, révélant la présence de quatre espèces différentes : *B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* et *B. animalis*. Des études cliniques réalisées sur 93 volontaires ont permis de montrer que l'ingestion de lait fermenté B'A à *B. longum* souche BB 536 (d'origine humaine) induit une augmentation du nombre des bifidobactéries dans les selles parallèlement à une régression du genre *Clostridium*, des coliformes et des *Bacteroides*. Ces effets probiotiques qui persistent trois semaines après l'arrêt de l'ingestion ne sont pas observés lors de l'absorption de lait fermenté avec *B. animalis*, *B. bifidum* ou *B. longum* ATCC 15707, révélant l'importance du choix de l'espèce et de la souche lors de la conception de lait fermenté.

Une étude physiologique de *B. longum* ATCC 15707 et de BB 536 ainsi que la recherche d'un milieu de culture à composition définie nous ont conduit à l'obtention de mutants de ces souches résistant à 4 g/l de 5-fluorouracile. Grâce à ces mutants séparables sur 1 g/l de FU de tous les microorganismes intestinaux y compris ceux de la même espèce, nous sommes capables de distinguer les bactéries ingérées des bactéries de la flore intestinale endogène. Nous avons ainsi pu établir que 80% des *Bifidobacterium* surnuméraires dans les selles après absorption de B'A sont issus des bactéries ingérées qui auraient colonisé le côlon humain.

**Mots-clés :** *Bifidobacterium* - Milieux d'isolement et de culture - Identification - Hybridation ADN/ADN - Mutants - Probiotiques.