



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES

Ecole Doctorale "Biologie et Santé"

THESE

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Génétique

Présentée par Melle Irène MANGIN

TYPAGE MOLECULAIRE
DE SOUCHES DU GENRE *BIFIDOBACTERIUM* :
POLYMORPHISME GENETIQUE INTRASPECIFIQUE
ET INTRAGENERIQUE.

Soutenue le 14 Septembre 1994 devant la commission d'examen :

Pr. B. DECARIS
Pr J.-C. HUBERT
Pr G. LEFEBVRE
Pr J.-M. SIMONET
Dr J. BALLONGUE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Je destine ces quelques lignes à tous ceux qui m'ont accompagnée dans ma longue marche...

J'adresse d'abord mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Bernard D'ECARIS pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et pour ses précieuses directives, sans oublier Monsieur le Professeur Jean-Marc SIMONET, toujours présent tout au long de ces trois années.

C'est vers la société YOPLAIT que vont ensuite mes pensées, car en assurant le soutien financier de notre projet, elle m'a permis d'évoluer dans des conditions matérielles et professionnelles particulièrement bonnes.

Je tiens enfin à exprimer ma reconnaissance la plus cordiale à toutes les personnes du Laboratoire de Génétique et Microbiologie, qui m'ont aidée et soutenue.

Et les amis, me direz-vous ? Je ne les oublie pas, mais peut-être préféreront-ils m'entendre les remercier de vive voix, après les mois difficiles que je leur ai fait passer ! Ils se reconnaîtront bien...

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. L'IDENTIFICATION BACTERIENNE.....	1
1.2. METHODES CLASSIQUES D'IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	4
1.2.1. Historique.....	4
1.2.2. Caractères généraux.....	5
1.2.2.1. Morphologie.....	5
1.2.2.2. Type respiratoire.....	5
1.2.2.3. Température et pH.....	5
1.2.2.4. Métabolisme des glucides.....	6
1.2.3. Identification du genre.....	6
1.2.4. Identification des espèces	7
1.2.4.1. Fermentation des sucres	7
1.2.4.2. Pourcentage d'identité ADN-ADN	9
1.2.4.3. Etude protéique	11
1.2.4.4. Antigénicité des transaldolases.....	13
1.2.4.5. Composition de la paroi.....	14
1.2.4.6. Séquence des gènes codant l'ARN 16S.....	15
1. 2. 5. Conclusion	17
1.3. LA FLORE BACTERIENNE INTESTINALE	18
1.3.1. Généralités	18
1.3.2. Techniques d'évaluation.....	18
1.3.3. Composition.....	18
1.3.4. Méthodes d'étude des interactions bactériennes dans le tube digestif.....	19
1.3.5. Etablissement de la flore intestinale	20
1.3.6. Localisation des bactéries de la flore intestinale	21
1.4. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA FLORE BACTERIENNE INTESTINALE ET PROBIOTIQUE	21
1.4.1. Rôle de la flore intestinale sur la physiologie intestinale.....	22
1.4.2. Effets métaboliques et nutritionnels.....	22
1.4.3. Rôle de la flore intestinale dans les défenses antibactériennes	23
1.4.4. Les probiotiques.....	25

2. MATERIEL ET METHODES.....	27
2.1. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.....	27
2.1.1. <i>Bifidobacterium</i>	27
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	27
2.2. EXPERIENCE CLINIQUE (Dr Y. BOUHNİK, Paris)	27
2.3. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.....	28
2.3.1. Pour la croissance des souches de <i>Bifidobacterium</i>	28
2.3.2. Pour la croissance d' <i>Escherichia coli</i>	29
2.4. PREPARATION D'ADN.....	30
2.4.1. Extraction d'ADN total des souches de <i>Bifidobacterium</i>	30
2.4.2. Extraction d'ADN plasmidique.....	30
2.4.3. Elution de fragments de restriction.....	30
2.5. DOSAGE DE L'ADN	31
2.6. CLONAGES	31
2.6.1. Réalisation de mini-banques d'ADN génomique de souches de <i>Bifidobacterium</i>	31
2.6.2. Clonage dans un plasmide	31
2.7. HYBRIDATIONS	32
2.7.1. Transferts sur membrane.....	32
2.7.2. Réalisation des tests en goutte (Dot-Blots).....	32
2.7.3. Méthodes de marquage des sondes	32
2.7.3.1. Marquages radioactifs.....	32
2.7.3.2. Marquages "froids".....	32
2.7.4. Préhybridations, hybridations, lavages et autoradiographies	33
2.7.4.1. marquage radioactif.....	33
2.7.4.2. marquage "froid"	33
2.7.5. Déshybridation des membranes	34
2.8. SEQUENÇAGE	34
3. RESULTATS	36
3.1. MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN POLYMORPHISME GENOMIQUE PAR L'ETUDE DES PROFILS DE RESTRICTION.....	36
3.1.1 Etude des souches de collection	36
3.1.2. Etude des souches d'origine industrielle	37
3.1.3. Application de la méthode à une expérience clinique.....	38
3.2. MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN POLYMORPHISME GENOMIQUE PAR L'ETUDE DES RIBOTYPES.....	40
3.2.1. Ribotypage de souches de collection.....	40

3.2.2. Ribotypage de souches industrielles	41
3.2.3. Ribotypage des souches d'origine humaine recueillies lors de l'expérience clinique	43
3.2.4. Conclusion.....	45
3.2.5. Article n°1	45
3.3. RECHERCHE DE SONDES NUCLEIQUES SPECIFIQUES.....	46
3.3.1. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	46
3.3.2. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. bifidum</i> CIP64.65	47
3.3.3. Sondes issues du clonage des ADN des souches BO et <i>B. animalis</i> ATCC25527T.....	48
3.3.4. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. longum</i> ATCC15708	50
3.3.5. Sondes issues du clonage des ADN des souches <i>B. longum</i> CIP64.62T et ATCC15707T.....	51
3.3.6. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. infantis</i> ATCC15697T.....	54
3.3.7. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. infantis</i> ATCC25962	55
3.3.8. Sondes issues du clonage de l'ADN de <i>B. breve</i> CIP64.69T	55
3.3.9. Mesure de la sensibilité de détection des sondes spécifiques	57
3.3.9.1. Méthode.....	57
3.3.9.2. Résultats	57
3.3.9.3. Conclusion	58
3.4. RECHERCHE DES FONCTIONS CODEES PAR LES FRAGMENTS L5/32 ET L6/45	59
3.4.1. Analyse du fragment L5/32 issu de l'ADN de <i>B. longum</i> ATCC15708	59
3.4.2. Analyse du fragment L6/45 issu de l'ADN de <i>B. longum</i> ATCC15707T.....	60
3.4.3. Article n°2	62
4. DISCUSSION	63
4.1. CARACTERISATION DES SOUCHES PAR TYPAGE MOLECULAIRE	63
4.2. ETUDE DE BIFIDOBACTERIES ISOLEES DE LA MICROFLORE INTESTINALE HUMAINE	68

4.3. MISE EN EVIDENCE DE L'ECHEC DE LA TENTATIVE D'IMPLANTATION DE LA SOUCHE EXOGENE BOSR DANS LA FLORE INTESTINALE.....	70
4.4. RECHERCHE DE LA FONCTION ET DE L'ORIGINE DU FRAGMENT SPECIFIQUE L6/45	71
5. PERSPECTIVES.....	76
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	77
7. ANNEXES.	

Avant-propos.

Une partie des résultats obtenus lors de ce travail a été publiée dans l'article suivant, présenté dans le chapitre 3 :

Identification of *Bifidobacterium* strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. 1994. Mangin, I., Bourget, N., Bouhnik, Y., Bisetti, N., Simonet, J.-M. & Decaris, B. *App. Environ. Microbiol.* **60** : 1451-1458.

Les résumés suivants, présentés en annexe, ont également été publiés au cours de ce travail :

Can exogenous bacteria colonize the colonic flora ? An *in vivo* study in man. 1992. Bouhnik, Y., Mangin, I., Pochart, P., Bisetti, N., Simonet, J.-M., Decaris, B. & Rambaud, J.-C. *Gastroenterology*, **102** : A598.

Long term alterations of the colonic bacterial flora induced by antibiotics. 1993. Bouhnik, Y., Flourié, B., Mangin, I., Simonet, J.-M., Bisetti, N., Marteau, P., Pochart, P., Decaris, B. & Rambaud J.-C. *Gastroenterology*, **104** : A673.

Identification of *Bifidobacterium* strains of human origin by ribosomal RNA gene restriction patterns and use of a specific nucleic probe. 1993. Mangin, I., Bourget, N., Bouhnik, Y., Simonet, J.-M. & Decaris, B. 4th Symposium on Lactic Acid Bacteria Genetics, Metabolism and Applications; Noordwijkerhout. *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : H11-P154.

L'article n°2, présenté également dans le chapitre 3, a été accepté par *Research in Microbiology* :

Selection of species-specific DNA probes which detect strain restriction polymorphism in four *Bifidobacterium* species. Mangin, I., Bourget, N., Simonet, J.-M. & Decaris, B.

Les résumés de posters ci-dessous sont présentés en annexe :

Identification de souches de *Bifidobacterium* d'origine humaine.

1992. Mangin, I., Bouhnik, Y., Simonet, J.-M. & Decaris, B. 5ème Réunion du Club des Bactéries Lactiques, Nancy, 54-P41.

Polymorphisme de restriction et taille du génome de souches de Bifidobactéries. 1992. Bourget, N., Mangin, I., Decaris, B. & Simonet, J.-M. 3^e Congrès de la Soc. Fr. de Microbiol., Lyon (Affiche 55).

Analyse phylogénétique intra et interspécifique des bactéries du genre *Bifidobacterium*. 1994. Bourget, N., Mangin, I. & Decaris, B. 6ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Lyon (Affiche B2).

Abréviations.

AMPPD : 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2 dioxetane.

ARNr : ARN ribosomique.

ARNt : ARN de transfert.

ATCC : American Type Culture Collection.

BET : bromure d'éthidium.

CE : Clinical Experiment.

CIP : Collection de l'Institut Pasteur.

(α -³²P) dCTP : désoxycytidine triphosphate marquée au ³²P sur l'atome α .

DIG : Digoxigénine.

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid.

E.O.S. : Extremely Oxygen Sensitive.

F6PPK : Fructose-6-Phosphate PhosphoKetolase.

IHF : Integration Host Factor.

IPTG : isopropyl β -D-thiogalactopyranoside.

kb : kilobase.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

ORF : phase de lecture ouverte (Open Reading Frame).

pb : paire de bases.

PCR : polymerase chain reaction.

PFGE : électrophorèse en champs pulsés (Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

6PGD : 6 phosphogluconate déshydrogénase.

RFLP : Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

SR : souche résistante à la Streptomycine et à la Rifampicine.

T : Type.

Tn : Transposon.

TPY : trypticase-phytone-yeast extract.

UV : Ultra-Violets.

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galactoside.

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. L'IDENTIFICATION BACTERIENNE

Les bactéries sont utilisées depuis très longtemps dans de nombreux domaines, notamment celui de l'agro-alimentaire. Cependant, leur utilisation reste encore aujourd'hui très largement empirique. Une identification précise de ces bactéries permettrait pourtant de rationaliser certaines méthodes de production, facilitant ainsi leur reproductibilité et amenant à une meilleure maîtrise des étapes du procédé. Au niveau industriel en particulier, une caractérisation précise des souches utilisées pourrait conduire à une protection de la propriété industrielle. D'autre part, de très nombreuses espèces bactériennes bénéfiques, commensales ou pathogènes de l'Homme (et des autres organismes vivants) existent, notamment au niveau de son tube digestif. Une étude rigoureuse de cette flore apparaît de plus en plus comme une nécessité pour une meilleure maîtrise des processus nutritionnels et de la santé humaine. Les méthodes traditionnelles de typage des bactéries, essentiellement basées sur les profils fermentaires, présentent des limites. Actuellement, les méthodes de détection, d'identification et de caractérisation des souches bactériennes sont en pleine évolution, suite à l'avènement de techniques issues de la biologie moléculaire dans le domaine de la taxonomie bactérienne.

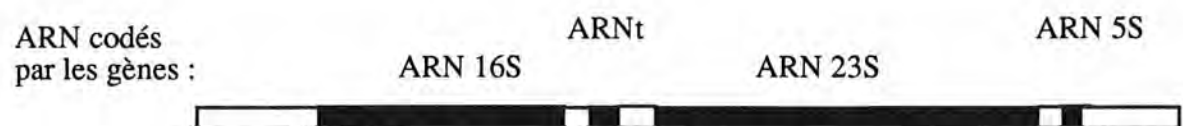
Il est maintenant possible de caractériser avec précision une bactérie en étudiant directement son génome et non plus seulement l'expression de celui-ci. Cette étude a permis de démontrer l'existence d'un polymorphisme intragénérique et intraspécifique chez de nombreuses bactéries. Il reste encore à mettre en évidence dans de nombreux cas. Ce polymorphisme génomique peut être révélé par la réalisation des profils de restriction de l'ADN total. Cela nécessite l'obtention d'un ADN de bonne qualité et de haut poids moléculaire. Lors de la comparaison des profils de restriction obtenus pour des ADN différents (empreinte (s) génomique (s) ou "fingerprints"), il est possible d'observer des fragments d'ADN spécifiques d'une souche et des fragments d'ADN communs à toutes les souches. Des souches bactériennes très différentes ont pu être caractérisées de cette manière, telles que *Agrobacterium* (Bouzar et Moore, 1987), les mycobactéries (Collins et De Lisle, 1987), *Brucella* (Allardet-Servant *et al.*, 1988), *Listeria monocytogenes* (Baloga et Harlander, 1991).

Un affinement de la méthode consiste en la réalisation du profil de restriction des gènes codant les ARN ribosomiaux (ARNr) de la bactérie à identifier (Grimont et Grimont, 1986). En effet, il existe des régions d'ARNr hautement conservées, dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants, et notamment chez toutes les bactéries, et des régions très variables. Les régions fortement conservées résultent d'une forte pression de sélection qui s'exerce sur une partie de ces séquences. La conséquence est qu'un ARN 16 ou 23S d'une bactérie pourra être

homologue du gène correspondant de n'importe quelle bactérie, même phylogénétiquement éloignée (Grimont et Grimont, 1986). Des mutations peuvent également s'accumuler au cours de l'évolution dans des séquences où elles n'influent pas les structures secondaires et tertiaires du ribosome. L'identification repose alors sur le polymorphisme de l'ADN codant les ARNr d'une espèce à l'autre, voire d'une souche à l'autre.

Chez une bactérie, les gènes qui codent les ARNr sont organisés en opérons dont la structure est schématisée sur la figure 1. Ces opérons existent en une ou plusieurs copies sur le chromosome, à des loci souvent différents. Le nombre de ces copies, la taille du génome et la vitesse de croissance des bactéries sont en général corrélés. Il n'y a par exemple qu'une copie chez les mycobactéries à croissance lente et chez certains mycoplasmes, deux copies chez les mycobactéries à croissance rapide et chez d'autres mycoplasmes, trois copies chez *Brucella*, sept copies chez les entérobactéries, et dix à onze copies chez les *Bacillus* (Grimont et Grimont, 1990). En pratique, on observe que le profil de la souche à identifier est composé d'un nombre de fragments d'ADN variable selon l'enzyme de restriction utilisée, dont la taille dépend du polymorphisme de l'ADN de la souche considérée. De nombreux microorganismes ont été identifiés de cette manière (Grimont et Grimont, 1986; Grimont *et al.*, 1989; Baloga et Harlander, 1991; De Buyser *et al.*, 1992; Pébay *et al.*, 1992; Owen *et al.*, 1988, 1993,...).

La conservation des séquences ribosomiques au cours de l'évolution rend impossible leur utilisation en tant que sonde spécifique d'un genre, ou même spécifique d'une espèce. Les techniques d'identification à l'aide de sondes moléculaires se développent beaucoup dans le domaine médical qui recherche des moyens de détection spécifique rapide des bactéries pathogènes. En effet, certaines espèces pathogènes croissent très lentement en culture *in vitro* et l'identification, et par conséquent la mise en route d'un traitement curatif, peut demander plusieurs semaines. L'obtention de sondes nucléiques espèce-spécifiques a permis l'identification de certains isolats d'intérêt médical ou industriel de façon rapide et concluante tels que *Mycobacterium avium* (Mc Fadden *et al.*, 1987), *Mycobacterium tuberculosis* (Eisenach *et al.*, 1988; Reddi *et al.*, 1988), *Campylobacter jejuni* (Korolik *et al.*, 1988), *Mycobacterium leprae* (Clark-Curtiss et Docherty, 1989), *Streptococcus thermophilus* (Colmin *et al.*, 1991)... Un autre aspect intéressant de ces sondes est qu'elles peuvent mettre en évidence des relations clonales permettant de regrouper certaines souches d'une même espèce. Ces sondes constituent par conséquent des outils précieux pour la caractérisation des microorganismes. Elles doivent aussi être sensibles, c'est-à-dire donner un résultat fiable (positif ou négatif) sur de très faibles échantillons. La mesure de la sensibilité de détection des sondes est généralement effectuée avec deux types de marquage : le marquage radioactif dit "chaud", et le marquage "froid". Il est en effet intéressant de se diriger vers l'utilisation des sondes froides de préférence aux sondes radioactives, pour faciliter leur emploi en routine dans le cadre de laboratoires industriels du domaine agro-alimentaire.



**Fig. 1 : Organisation d'un opéron d'ARNr d' *E. coli*. K12
(d'après Brosius *et al.*, 1981).**

Cette recherche d'identification a été réalisée chez les bactéries du genre *Bifidobacterium* qui représentent une part importante de l'écosystème bactérien intestinal de l'Homme et d'autres organismes vivants. Ces bactéries sont aujourd'hui utilisées à l'échelle industrielle dans de nombreux pays sous forme de produits fermentés (laits, fromages).

1.2. METHODES CLASSIQUES D'IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE *BIFIDOBACTERIUM*

Les techniques d'identification des bactéries du genre *Bifidobacterium* reposent essentiellement sur les critères morphologiques et physiologiques qui vont être étudiés dans ce chapitre, ainsi que sur certains critères génétiques comme l'hybridation ADN-ADN.

1.2.1. Historique

En 1899, à l'Institut Pasteur, Tissier observe et isole des bactéries anaérobies à Gram positif des selles de nourrissons allaités au sein, et les nomme *Bacillus bifidus communis* ou plus simplement *B. bifidus*, en se basant sur leur forme particulière en Y. Dès cette époque, ces bactéries suscitent l'intérêt des médecins et des nutritionnistes, puisque leur présence apparaît liée à l'état de bonne santé de l'enfant.

En 1924, Orla-Jensen élève les *Bifidobacterium* au rang de genre. Cependant, les difficultés rencontrées pour les distinguer des lactobacilles font que ces bactéries continueront longtemps à porter le nom de *Lactobacillus bifidus*.

Il faut attendre 1965, pour que Sébald *et al.* démontrent, grâce aux progrès de la génétique moléculaire, que le pourcentage en bases G+C de l'ADN des bifidobactéries (de 57,2 à 64,5%) diffère de celui des lactobacilles (33 à 50%).

En 1974, le genre *Bifidobacterium* apparaît dans la VIIIème édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology et est composé de 11 espèces (Buchanan et Gibbons, 1974).

Dans la IXème édition du Bergey's Manual, ce genre qui appartient à la classe des Actinomycètes, à l'ordre des *Actinomycetales* et à la famille des *Actinomycetaceae* (Stackebrandt et Woese, 1981), comprend 24 espèces (Scardovi, 1986) et a été divisé arbitrairement en deux catégories : les bifidobactéries dites d'origine animale (15 espèces, dont 2 ont en fait été isolées d'eaux usées), et les bifidobactéries d'origine humaine (9 espèces).

Une 25ème espèce a en outre été isolée chez la poule (*B. gallinarum*, Watabe *et al.*, 1983) tandis que la description d'une 26ème espèce découverte chez l'homme (*B. gallicum*) par Lauer (1990), a été soumise au *International Journal of Systematic Bacteriology*. En 1991, apparaissent également dans ce journal, deux nouvelles espèces issues de rumens bovins : *B. ruminantium* et *B. merycicum* (Biavati et Mattarelli, 1991).

Le tableau 1 recense l'ensemble des espèces décrites à ce jour ainsi que leur origine.

Tableau 1. Liste des espèces du genre *Bifidobacterium*.

Espèces d'origine humaine :

- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1. <i>B. bifidum</i> | 6. <i>B. angulatum</i> |
| 2. <i>B. longum</i> | 7. <i>B. catenulatum</i> |
| 3. <i>B. infantis</i> | 8. <i>B. pseudocatenulatum</i> |
| 4. <i>B. breve</i> | 9. <i>B. dentium</i> |
| 5. <i>B. adolescentis</i> | 26. <i>B. gallicum</i> |

Espèces d'origine animale :

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 10. <i>B. globosum</i> | 19. <i>B. suis</i> |
| 11. <i>B. pseudolongum</i> | 20. <i>B. minimum*</i> |
| 12. <i>B. cuniculi</i> | 21. <i>B. subtile*</i> |
| 13. <i>B. choerinum</i> | 22. <i>B. coryneforme</i> |
| 14. <i>B. animalis</i> | 23. <i>B. asteroïdes</i> |
| 15. <i>B. thermophilum</i> | 24. <i>B. indicum</i> |
| 16. <i>B. boum</i> | 25. <i>B. gallinarum</i> |
| 17. <i>B. magnum</i> | 27. <i>B. ruminantium</i> |
| 18. <i>B. pullorum</i> | 28. <i>B. merycicum</i> |

1-24 : d'après Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. XIXème édition.

25 : d'après Watabe *et al.*, 1983.

26 : d'après Lauer, 1990.

27-28 : d'après Biavati et Mattarelli, 1991.

* : souches isolées à partir d'eaux usées.

1.2.2. Caractères généraux

1.2.2.1. Morphologie

Le genre *Bifidobacterium* regroupe des bacilles à Gram positif, asporogènes, immobiles, se présentant sous forme de bâtonnets incurvés aux contours irréguliers et ondulés. Leurs extrémités sont effilées, bifurquées ou spatulées. Il n'est cependant pas rare de les rencontrer sous formes de bacilles courts ou longs, de largeur variable, isolés, en chaînes (*B. pullorum*), ou en étoiles (*B. asteroïdes*). Ce pléomorphisme est en relation étroite avec le taux de croissance et la composition du milieu de culture. Glick *et al.* (1960) ont démontré que l'apparition de formes ramifiées chez *B. bifidum* var. *pennsylvanius* résultait d'une déficience en N-acétylglucosamine, composé intervenant dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire. Cependant, la présence de ce composé dans le milieu de culture de nombreuses autres souches de bifidobactéries ne permet pas une transformation des formes ramifiées en simples formes bifides. Selon Kojima *et al.* (1968, 1970 a,b), la présence d'ions Ca^{2+} empêcherait le pléomorphisme et permettrait une régulation de la division cellulaire. D'un autre côté, Husain (1972) observe que la présence simultanée d'alanine, d'acide aspartique, d'acide glutamique et de sérine est essentielle pour le maintien des cellules de *B. bifidum* dans une forme non ramifiée.

1.2.2.2. Type respiratoire

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies strictes. Cependant, leur intolérance à l'oxygène n'est pas absolue : une tension de 1% d'oxygène est supportée par la plupart des souches cultivées sur milieu solide. Mais la croissance en présence d'une faible tension d'oxygène n'est possible que si le milieu contient un élément réducteur tel que la cystéine.

1.2.2.3. Température et pH

La température optimale de développement des souches d'origine humaine est comprise entre 36 et 38°C. En revanche, pour les souches d'origine animale, elle est légèrement plus élevée, aux environs de 41 à 43°C et peut atteindre 46,5°C (Rasic et Kurmann, 1983). La croissance est nulle à 20°C et en dessous.

Le pH initial optimal de croissance se situe entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance ne peut avoir lieu en dessous de 5,0 et au delà de 8,0 (Scardovi, 1986).

1.2.2.4. Métabolisme des glucides

Une enzyme spécifique, la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK; EC 4.1.2.22) définit actuellement le genre *Bifidobacterium*. Elle permet la dégradation des hexoses par la voie du fructose-6-phosphate, et aboutit à la formation de 3 molécules d'acétate et 2 molécules de lactate à partir de 2 molécules de glucose (Fig. 2). Ce rapport théorique n'est pas retrouvé en pratique. Il y a apparition d'une plus grande quantité d'acide acétique provenant de la dégradation de l'acide pyruvique, et formation de petites quantités d'acide formique en même temps que d'éthanol, issu de la réduction d'une faible partie de l'acétyl-phosphate.

Cette voie est plus simplement qualifiée de dérivation bifide ("bifid shunt") (Scardovi et Trovatelli, 1965). On constate en effet l'absence d'un grand nombre d'enzymes intervenant dans la voie d'Embden-Meyerhoff et dans celle des hexoses monophosphates utilisées par les lactobacilles.

Il est important de souligner que l'acide lactique produit par les bifidobactéries est de type L(+) (Sébald *et al.*, 1965; Rasic et Kurmann, 1983). Ce métabolite est caractéristique du genre. En effet, les lactobacilles produisent des formes D(-) ou DL qui ne sont que très lentement dégradées par le nourrisson et peuvent par conséquent entraîner des troubles tels que : acidose, formation de méthémoglobine, voire des perturbations neurologiques. Ces raisons font que le yaourt traditionnel est déconseillé chez le nouveau-né. Par contre, la forme L(+) est totalement assimilée et métabolisée. Les laits fermentés avec une souche de *Bifidobacterium* apparaissent donc mieux adaptés chez le jeune enfant (Rasic et Kurmann, 1983).

D'après Scardovi et Trovatelli, la F6PPK serait absente chez les bactéries à Gram positif susceptibles d'être confondues morphologiquement avec les bifidobactéries, telles celles appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomyces*.

Scardovi *et al.* (1971a) ont mis en évidence par électrophorèse en gel d'amidon (zymogramme), puis comparaison des mobilités électrophorétiques, trois types différents de F6PPK selon l'origine écologique de la souche dont elle est isolée : mammifère, abeille, ou homme (Tableau 8).

1.2.3. Identification du genre

Lors de la découverte, au début du 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*.

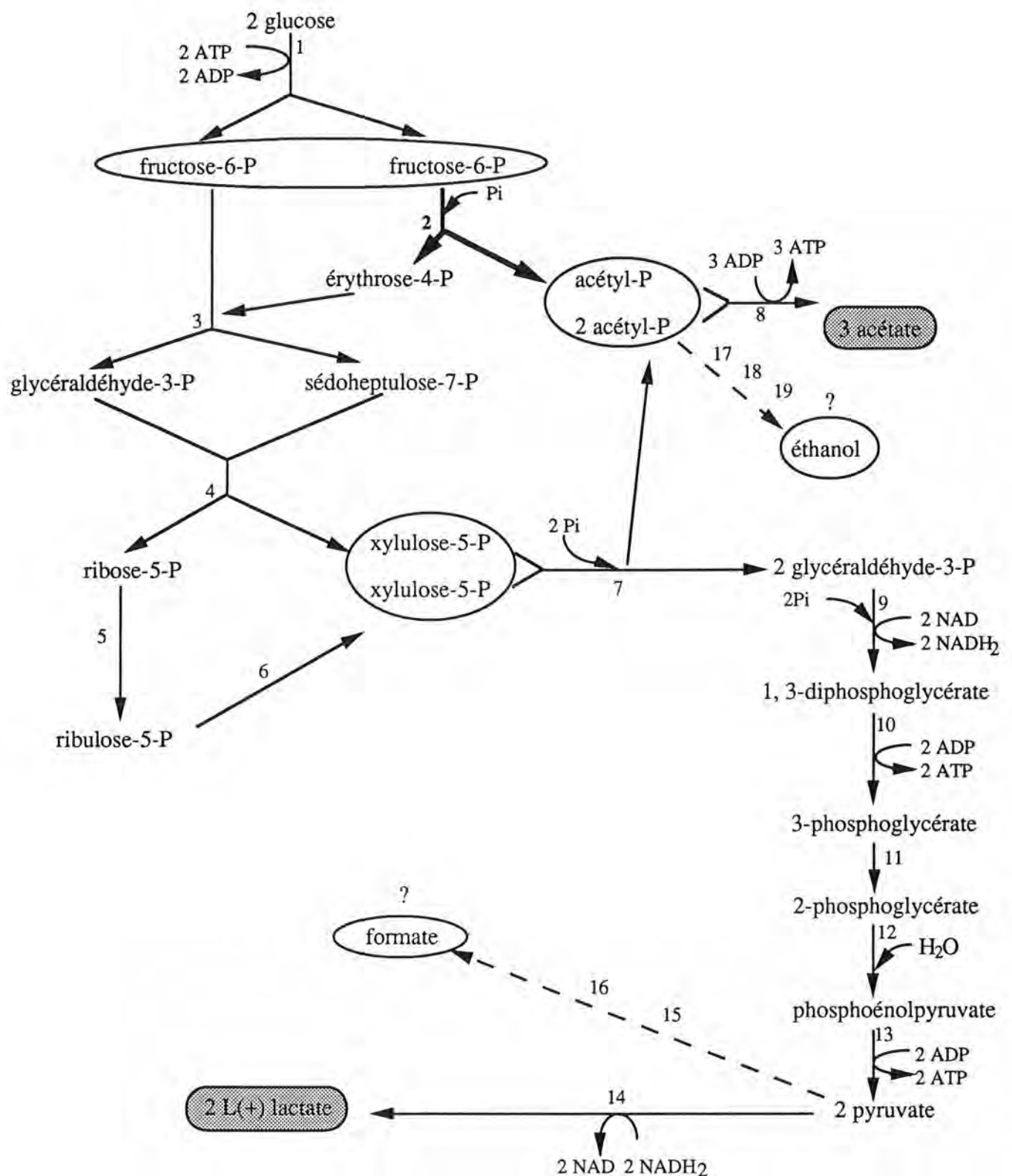


Fig. 2 : Formation d'acétate et de lactate à partir de glucose par la voie des bifidobactéries (d'après Scardovi et Trovatelli, 1965).

- 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 : glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
- 10 : phosphoglycérate kinase
- 11 : phosphoglycérate mutase
- 12 : énalase

- 13 : pyruvate kinase
- 14 : L(+) lactate déshydrogénase
- 15 : enzymes réaction phosphoroclastique
- 16 : formate déshydrogénase
- 17 : phosphotransacétylase
- 18 : aldéhyde déshydrogénase
- 19 : alcool déshydrogénase

Actuellement, une différenciation fiable des bifidobactéries des genres proches peut être obtenue par la réalisation de certains tests biochimiques : production de catalase, d'indole; réduction des nitrates, etc...(Mitsuoka, 1984).

De même, la recherche par chromatographie en phase gazeuse des acides organiques issus de la fermentation, et notamment de l'acétate et du lactate dans un rapport avoisinant 3 pour 2, constitue un excellent critère d'identification du genre *Bifidobacterium*.

En fait, la classification la plus directe et la plus fiable d'une souche bactérienne dans le genre *Bifidobacterium* est la démonstration de la présence, dans ses extraits cellulaires, de la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK), l'enzyme-clé du métabolisme glucidique des bifidobactéries.

La détection de la F6PPK peut être complétée par une recherche d' α -galactosidase. En effet, une activité α -galactosidase est détectée chez le genre *Bifidobacterium* (Chevalier *et al.*, 1990) alors que cette activité n'est pas observée chez le genre *Lactobacillus* (Lee *et al.*, 1986). Ce test, utilisant le système API ZYM (Analytab Products, Plainview, NY, USA), peut donc constituer une méthode d'identification préliminaire simple du genre.

1.2.4. Identification des espèces

La définition d'une espèce dans le genre *Bifidobacterium*, est beaucoup plus délicate, comme en témoignent les importants remaniements taxonomiques observés depuis quelques dizaines d'années.

1.2.4.1. Fermentation des sucres

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

Pendant de nombreuses années, les microbiologistes ont regroupé toutes les bifidobactéries en une seule espèce : *B. bifidum*. En 1957, Denhart met en évidence l'existence de plusieurs "biotypes" de *Bifidobacterium* et se base sur la fermentation de 24 sucres pour classer les différentes souches en 5 groupes. Quelques années plus tard, Reuter (1963/64) associe les propriétés sérologiques à la fermentation des sucres pour caractériser 7 espèces d'origine humaine, en plus de *B. bifidum*, à partir de souches isolées de selles d'enfants ou d'adultes :

- *B. bifidum* var. a et b
- *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.

Le schéma de classification suivant a été présenté en 1969 par Mitsuoka. 483 souches de bifidobactéries, isolées de selles aussi bien humaines qu'animales (porc, poulet, veau, mouton, rat, souris, cobaye et abeille), ont été étudiées et classifiées sur la base de leurs caractères physiologiques et biochimiques. Dans cette étude, Mitsuoka différencie clairement les souches d'origine humaine de celles d'origine animale par leur profil fermentaire et la capacité de ces dernières à croître à 46,5°C. Il propose la création de deux nouvelles espèces en plus de celles proposées par Reuter : *B. thermophilum* var a, b, c et d et *B. pseudolongum* var a, b, c et d, et d'un nouveau variant de l'espèce *B. longum* : *B. longum* subsp. *animalis* a et b.

La même année, Scardovi *et al.* (1969) isolent *B. ruminale* et *B. globosum* à partir de rumens bovins puis *B. asteroïdes*, *B. indicum* et *B. coryneforme* de l'intestin d'abeilles (Scardovi et Trovatelli, 1969).

Actuellement, les profils fermentaires sont encore les principaux outils utilisés pour différencier les espèces de *Bifidobacterium*. 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 2, 3 et 4). L'interprétation des résultats reste ensuite sujette à discussion et ne peut donner qu'une orientation d'identification basée sur des caractéristiques fondamentales et non remises en doute comme :

- *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 ni l'arabinose, ni le mélézitose alors que *B. longum* fermente ces deux sucres.

En 1990, Roy et Ward associent deux méthodes afin de pouvoir identifier rapidement les espèces de *Bifidobacterium*. La première est un test fermentaire basé sur la production d'acide à partir de six sucres (microméthode) : arabinose, cellobiose, mannose, mélézitose, ribose et saliciline. Une différenciation sans équivoque des espèces *B. bifidum*, *B. breve* et *B. longum* peut déjà être obtenue en 48 heures grâce à cette méthode (tableau 5). De plus, ces

Tableau 2 : Caractères fermentaires de différenciation des espèces et biovars de *Bifidobacterium* (d'après Mitsuoka, 1982)

	Mono-					Saccharide											Poly- alcool			Glucoside				
	Pentose			Hexose		Di-						Tri-		Poly-										
	Arabinose	Xylose	Ribose	Mannose	Fructose	Saccharose	Maltose	Cellobiose	Lactose	Trehalose	Melibiose	Raffinose	Melezitose	Dextrine	Amidon	Glycogène	Inuline	Mannitol	Sorbitol	Inositol	Esculine	Salicine	Amygdaline	α-méthyl -glucoside
<i>bifidum a</i>	-	-	-	-	+	+1	+1	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bifidum b</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+/-+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>infantis</i>																								
<i>ss.infantis a</i>	-	+1+	+1	+1	+1	+	+	(+)	+	-/+1	+	+	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	+	-	v
<i>ss.infantis b</i>	-	+	+	+1	+	+	+	-	+	-/+1	+	+	-	+1	+1	-	+	-	-	+	-	(+)	-	v
<i>ss.liberorum</i>	-	+1	+	+1	+	+	+	-	+	+1	+	+	-	(+)	(+)	-	-	-	-	+	+1	+1	-	+1
<i>ss.lactentis</i>	-		+1	+1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+1	-	+	+	-	(+)	-	-	-	+1
<i>breve</i>																								
<i>ss.breve a</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	v	v	v	+1/-	+	+	-	+	+	+	+
<i>ss.breve b</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+1	v	v	v	+1/-	+	+	-	+	+	+	+
<i>ss.breve c</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	v	v	+1/-	+	+	-	+	+	+	+
<i>parvulorum a</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	v	v	-	-	-	+	+	+	+
<i>parvulorum b</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	v	-	-	-	+	+	+	+
<i>thermophilum a</i>	-	-	-	-	+	+	+	v	-	v	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+1
<i>thermophilum b</i>	-	-	-	-	+	+	+	+1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	(+)	+1	(+)	+1
<i>thermophilum c</i>	-	-	-	-	+	+	+	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	(+)	+1	(+)	+1
<i>thermophilum d</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+1	+1	+1	+1
<i>adolescentis a</i>	+	+	+	+/-+1	+	+	+	+1	+	+	+	+	-/+1	+	+	+	v	+	+	-	+	+	+	+
<i>adolescentis b</i>	+	+	+	+1/+	+	+	+	+1	+	v	+	+	-/+1	+	+	+	v	+	-	-	+	+	+	+
<i>adolescentis c</i>	+/-+1	+/-+1	+	+1/+	+	+	+	+1	+	v	+	+	-/+1	v	v	v	v	-	+	-	+	+	+	+
<i>adolescentis d</i>	+/-+1	+/-+1	+	+1/+	+	+	+	+1	+	v	+	+	-/+1	+1	+1	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>longum</i>																								
<i>ss.longum a</i>	+	+	+	+1/-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1
<i>ss.longum b</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1
<i>animalis a</i>	+	+	+	-	+/-+1	+	+	-	+	-	+	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-
<i>animalis b</i>	+	+	+	+	+/-+1	+	+	-	+	-	+	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+1	+1
<i>pseudolongum a</i>	+	+	+	-	+1	+	+	-/+1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+1
<i>pseudolongum b</i>	+	+	+	+1	+1	+	+	+/+1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-/+1	+1	-/+1	+1
<i>pseudolongum c</i>	+	+	+	+1	+1	+	+	+1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+1
<i>pseudolongum d</i>	+	+	+	+1	+1	+	+	+1	-	-	+1	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+1

+ : positif

- : négatif

+1 : positif lent

(+) : positif faible

v : variable

Tableau 3 : Caractères fermentaires de différenciation des espèces et des sous-espèces du genre *Bifidobacterium* (d'après Mitsuoka, 1984)

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	-	+	+	+
<i>B.coryneforme</i>	v	+	+	+	-	+	v	+	v	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B.indicum</i>	+	-	-	+	v	+	v	+	v	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B.subtile</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	v	+	+	+	+	+	v	-	+	-	-	v	-

+ : positif

- : négatif

v : variable

w : faible

Tableau 4 : Caractères fermentaires de différenciation des espèces du genre *Bifidobacterium* (d'après Scardovi, 1986).

	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	-	+	-	-	+

+ : positif

- : négatif

v : variable

Tableau 5. Distinction des espèces de *Bifidobacterium* par leurs profils fermentaires (d'après Roy et Ward, 1990)

Substrat				Macrométhode (Biavati <i>et al.</i> , 1982)	Microméthode (Roy et Ward, 1990)
Arabinose -	Ribose -			<i>B. bifidum</i> ATCC29521	<i>B. bifidum</i> ATCC29521, 11863, 15696
	Ribose +	Mannose -		<i>B. infantis</i> ATCC15697	<i>B. infantis</i> ATCC25962 <i>B. infantis</i> ATCC15697
		Mannose +	Cellobiose -		<i>B. adolescentis</i> ATCC15703, 15704, 15706 <i>B. catenulatum</i> ATCC27539
			Cellobiose +	<i>B. breve</i> ATCC15700	<i>B. infantis</i> ATCC15702, 17930 <i>B. breve</i> ATCC15698 <i>B. breve</i> ATCC15700, 15701
Arabinose +	Saliciline -	Mélézitose -		<i>B. infantis longum</i>	<i>B. infantis</i> ATCC27920 <i>B. angulatum</i> ATCC27535
		Mélézitose +		<i>B. longum</i> ATCC15707	<i>B. longum</i> ATCC15707, 15708
	Saliciline +	Mannose -	Ribose -	<i>B. catenulatum</i> ATCC27539 <i>B. angulatum</i> ATCC27535	
			Ribose +	<i>B. adolescentis</i> ATCC15703 <i>B. pseudocatenulatum</i> ATCC27919	<i>B. adolescentis</i> ATCC15705 <i>B. pseudocatenulatum</i> ATCC27919

auteurs mettent en évidence une différence d'identification par rapport à certaines souches définies par Biavati *et al.* (1982). La seconde méthode est basée sur l'analyse par chromatographie en phase gazeuse du milieu de culture après utilisation de huit sucres mélangés (les 6 sucres précédents plus le lactose et le tagatose). La microméthode fournit des informations qualitatives sur le profil fermentaire de chaque souche alors que la méthode par chromatographie en phase gazeuse évalue l'utilisation quantitative des huit sucres, ce qui a permis la caractérisation des souches type de *Bifidobacterium* d'origine humaine en moins de 24 heures. Ces résultats, soumis à une analyse numérique, leur ont en outre permis de distinguer six grands groupes (A à F), représentés sur le dendrogramme de la figure 3. Les souches de *Bifidobacterium* montrant une similarité d'au moins 85% sont classées dans le même groupe. Ces souches ont déjà été séparées en deux groupes selon leur capacité ou non à fermenter l'arabinose. Les souches arabinose-positives ont elles-même été séparées en deux groupes, l'un fermentant le mélézitose (A) et l'autre divisé en souches saliciline-, mélézitose-négatives (sous-groupe B1), et saliciline-positives, mélézitose négative (sous-groupe B2). Les souches arabinose-négatives ont été séparées en souches ribose-positives, cellobiose-négatives (groupe C), ribose-positives, cellobiose-positives (groupe D), et ribose-négatives (groupe E). Le groupe F inclut des souches ribose-positives, saliciline-positives (sous-groupe F2) et des souches ribose-positives, saliciline-négatives (sous-groupe F1). La comparaison des profils fermentaires des souches de référence obtenus par la méthode de chromatographie en phase gazeuse avec ceux d'un isolat d'origine humaine devrait donc aboutir à une identification rapide.

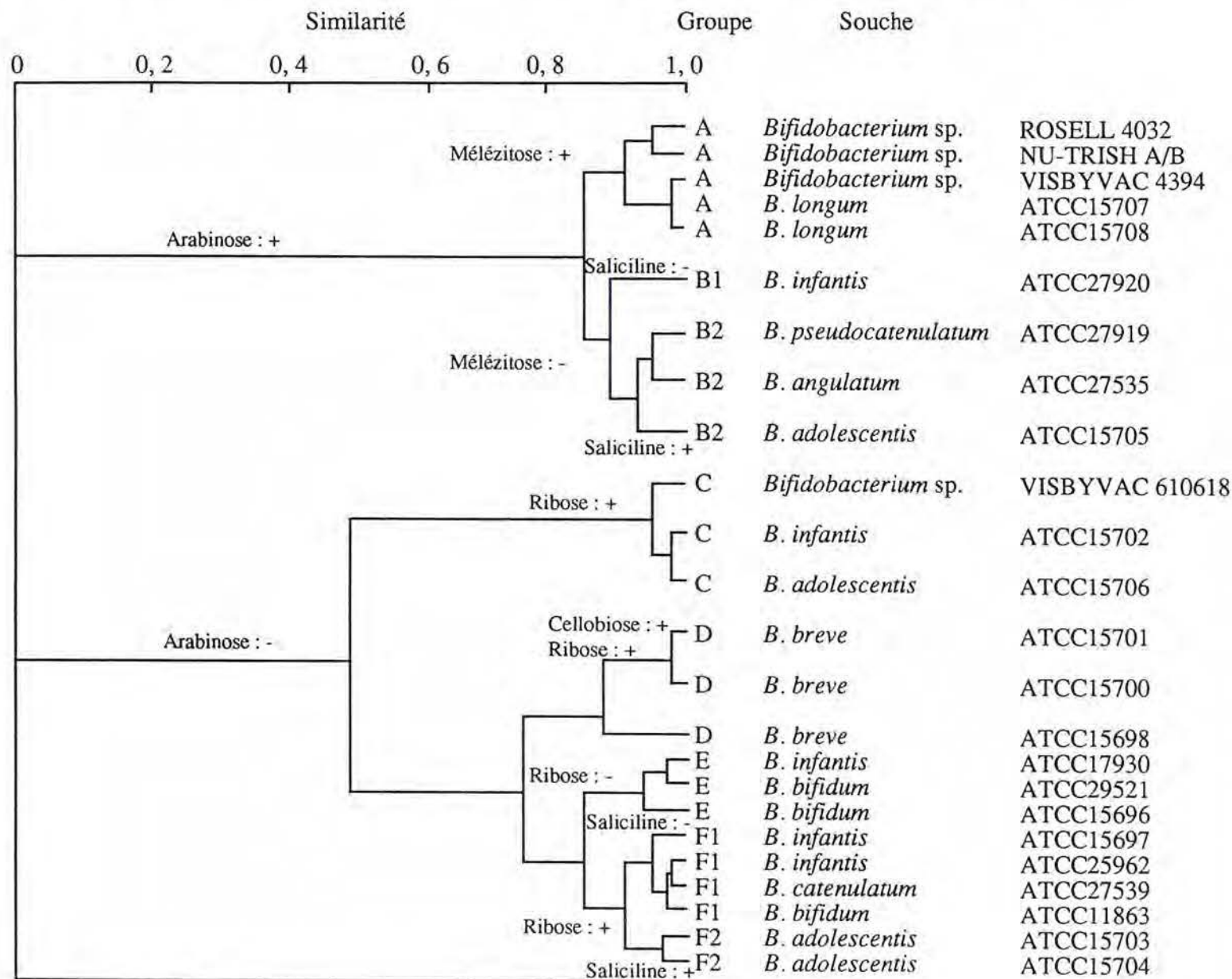
1.2.4.2. Pourcentage d'identité ADN-ADN

En 1970, Scardovi *et al.* (1970, 1971b) furent les premiers à utiliser les techniques d'hybridation ADN-ADN pour évaluer la validité du regroupement des souches dans les espèces précédemment décrites.

En s'appuyant sur les pourcentages d'identité ADN-ADN (Tableau 6), Scardovi met en évidence une forte similarité entre des souches d'origine humaine : l'ADN des souches classées dans les espèces *B. infantis* et *B. longum* présentent en effet 50 à 76 % d'identité. Et selon les critères actuels de définition d'une espèce, les taux d'homologie des souches bactériennes à l'intérieur d'une même espèce, basés sur l'hybridation ADN-ADN, doivent être supérieurs à 70%, et la variation du Tm inférieure à 5°C (Wayne *et al.*, 1987). *B. longum* et *B. infantis* formeraient donc plus un "continuum" que deux espèces distinctes. Scardovi propose également, aux vues des résultats, certaines modifications par rapport aux espèces définies par Reuter et Mitsuoka. Il réunit dans une même espèce :

- *B. liberorum*, *B. lactentis* et *B. infantis* sous le nom de *B. infantis*;
- *B. ruminale* et *B. thermophilum* sous le nom de *B. thermophilum*;

Fig. 3 : dendogramme obtenu par analyse numérique après recherche du pourcentage de sucres non fermentés dans le milieu de culture de souches de *Bifidobacterium* (méthode de chromatographie en phase gazeuse) (d'après Roy et Ward, 1990).



Pourcentage de similarité par rapport à l'ADN de référence de :																							
ADN compétiteur	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. angulatum</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. pseudocatenul.</i>	<i>B. dentium</i>	<i>B. globosum</i>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>B. choerinum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>B. boum</i>	<i>B. magnum</i>	<i>B. pullorum</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. minimum</i>	<i>B. subtile</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>B. indicum</i>
<i>B. bifidum</i>	100	2	20-28	10-20	0		25	15		0	10	27	10	5	11	5	20	0	4	4	0	0	
<i>B. longum</i>	40	75-101	50-76	12	0		20	22		0	17	16	5	0	23	0-29	9	0	7	23	0		
<i>B. infantis</i>	42	50-79	74-101	17-50			20	15		0	16-23	20-22	15	5	11	15	13	0	4	5	0		
<i>B. breve</i>	25	40	40	100			24	10		0	12	21	20	5	18	10	18	0	10	17	0		
<i>B. adolescentis</i>	14		22	5-10	70-102	20-44	20-57	30	24-49		25	20	30		25	14	21		5	13			
<i>B. angulatum</i>	24	6-13	20	12	20-30	76-100	20-35	20	8-20	20	17	16	11	18	10	5	0	20	23	8			
<i>B. catenulatum</i>	20	0-26	15	10	22-57	2-37	78-101	50-80	3-48	5	10	32	10	20	8	17	12	25	30	12			
<i>B. pseudocatenul.</i>							46-88	78-115			10	32			5								
<i>B. dentium</i>	20	0-13	20	12	15-57	5-26	16-45	18	69-110	12	17	15	6	20	0	8	0	20	5	0			
<i>B. globosum</i>	29		25	25				5		100	75	45	50	40	14	14	32	16	10	35	10	13	12
<i>B. pseudolongum</i>	35		17	7				5		65-70	100	10-15	45-50			10			9-27				
<i>B. cuniculi</i>	7		17	22				10	50-67	8-16	94-102	9-15	18-25	12-20	5		2						
<i>B. choerinum</i>	32		8	15				25	26-57	37-62	8-20	75-120	4-20	15-35	20		4						
<i>B. animalis</i>	10	8	10	20	25	10	10	10	4	30	34	26-31	19	72-100	25	21	15	0	20	5	10	5	0
<i>B. thermophilum</i>	22		29	10-22				16		5	0-23	15-25	15-20	23	79-117	27-80	11	10	5-12	4	15	0	0
<i>B. boum</i>	38		7	23				5			8	23	11	36-74	69-96		0						
<i>B. magnum</i>	10	4	25	9	6	5	26	20	21	6	10	10	23	20	12	75-106	2	9	20	7			
<i>B. pullorum</i>	27		39	33				12			25	37	35		13		94-107						
<i>B. suis</i>	28		29	22				25		23	0	21	21	5	10	7	10	10	100	10	8		
<i>B. minimum</i>	5	10	6	10	4	20	25	25	0	5	23	36	5	10	0	19	8	7	100-103	16-20	3	0	
<i>B. subtile</i>	5	20	5	14	15	11	8	10	0	8	14	34	5	18	0	0	9	11	10-31	70-100	5	4	
<i>B. coryneforme</i>				6						5	20	36	0				0		4	0	23	60	
<i>B. asteroides</i>				0				5		0	11	50		0	0		6	0	0	2	100	30	
<i>B. indicum</i>				11						0	20	44		10			17		0	0	23	100	

Tableau 6 : Pourcentage de similarité ADN-ADN entre les espèces du genre *Bifidobacterium* (d'après Scardovi, 1986).

- *B. breve* et *B. parvulorum* sous le nom de *B. breve*;
- *B. pseudolongum* et *B. globosum*.

De plus, à partir des souches définies sous le nom de *B. adolescentis*, il propose la création de quatre groupes génomiques non reliés : *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. angulatum* et *B. catenulatum*. Les profils fermentaires ne permettent pas de les différencier, et Mitsuoka lui-même (1984) a insisté sur la nécessité de réaliser de nouveaux tests phénotypiques.

L'espèce *B. suis*, isolée des selles du porc, est définie en 1971 par Matteuzzi *et al.* De même, elle ne présente aucune homologie forte avec une espèce connue de *Bifidobacterium*.

En 1974, la souche *B. longum* subsp. *animalis* définie par Mitsuoka est élevée au rang d'espèce sous le nom de *B. animalis* (Scardovi et Trovatelli, 1974b). Scardovi et Trovatelli individualisent également deux groupes génomiques : *B. minimum* (2 souches) et *B. subtile* (5 souches), dont les souches ne sont retrouvées que dans les eaux usées. La même année, *B. magnum* est isolée chez le lapin (Scardovi et Zani, 1974d), *B. pullorum* chez la poule (Trovatelli *et al.*, 1974), tandis que *B. catenulatum*, *B. dentium* et *B. angulatum* sont isolées chez l'homme (Scardovi et Crociani, 1974c).

Quelques années plus tard, quatre nouvelles espèces d'origine animale sont décrites par Scardovi *et al.* (1979a) : *B. cuniculi*, *B. choerinum*, *B. boum* et *B. pseudocatenulatum*. Ce dernier présente notamment des taux d'identité de 46 à 88 % avec *B. catenulatum* (Tableau 6), formant un autre "continuum" de souches d'origine humaine. Puis, en 1982, Biavati *et al.* confirment le caractère spécifique des groupes *B. minimum* et *B. subtile* par leurs travaux d'électrophorèse des protéines solubles.

Le tableau 7 (Mitsuoka, 1984) met en relief la précision d'identification obtenue grâce à ce type de classification. Plusieurs espèces de *Bifidobacterium* non différenciables par leurs caractères phénotypiques le sont désormais par leurs caractères génotypiques.

En 1983, Lauer et Kandler réalisent à leur tour des hybridations ADN-ADN sur les souches types de *Bifidobacterium*. D'après les forts pourcentages d'identité observés, ils suggèrent que les espèces *B. longum*, *B. suis* et *B. infantis* soient réunies en une seule et même espèce (63 à 78% d'identité ADN-ADN), nommée *B. longum*; que *B. pseudocatenulatum* et *B. catenulatum* soient reconnues comme étant deux sous-espèces et non deux espèces différentes (75% d'identité, type de muréine identique); que *B. pseudolongum* soit fusionnée avec *B. globosum* (76% d'identité) ainsi que *B. indicum* avec *B. coryneforme* (100% d'identité). Ces suggestions n'ont pas été prises en compte. En effet, le fait que ces différentes espèces soient

Classement d'après l'homologie ADN-ADN	Classement d'après les profils fermentaires
<i>B. minimum</i> <i>B. bifidum</i>  <i>B. thermophilum</i>  <i>B. boum</i>  <i>B. choerinum</i>  <i>B. subtile</i>  <i>B. pseudolongum</i>  <i>B. globosum</i>  <i>B. animalis</i>  <i>B. magnum</i>  <i>B. suis</i>  <i>B. pullorum</i>  <i>B. cuniculi</i>  <i>B. longum</i>  <i>B. infantis</i>  <i>B. breve</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. dentium</i>  <i>B. catenulatum</i>  <i>B. pseudocatenulatum</i> <i>B. angulatum</i> <i>B. asteroïdes</i>  <i>B. coryneforme</i>  <i>B. indicum</i> <i>B. gallinarum</i>	<i>B. minimum</i> <i>B. bifidum</i> a et b  <i>B. thermophilum</i>  <i>B. pseudolongum</i>  <i>B. animalis</i>  <i>B. cuniculi</i>  <i>B. longum</i> a et b  <i>B. infantis</i> ss. <i>infantis</i> a et b  <i>B. infantis</i> ss. <i>liberorum</i>  <i>B. infantis</i> ss. <i>lactentis</i>  <i>B. breve</i> ss. <i>breve</i> a et b  <i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> a et b  <i>B. adolescentis</i> a, b, c et d  <i>B. asteroïdes</i>  <i>B. indicum</i>  <i>B. gallinarum</i>

 Les espèces reliées par ce symbole présentent un taux de similarité supérieur à 50%

Tableau 7 : Comparaison des classifications génotypiques et phénotypiques des espèces de *Bifidobacterium* (d'après Mitsuoka, 1984)

très proches les unes des autres est bien établi. Cependant, lorsque toutes les données disponibles sur les souches sont considérées, la présence de certains caractères justifie la séparation actuelle (Scardovi, 1986).

Le dendrogramme de la figure 4 représente les distances taxonomiques existant entre les différentes espèces de *Bifidobacterium*. Ces distances ont été calculées d'après les résultats d'hybridation ADN-ADN de Lauer et Kandler (1983). Selon ce dendrogramme, *B. asteroïdes* et *B. indicum* (35% d'identité), qui présentent des taux d'identité inférieurs à 10% avec toutes les autres espèces testées, seraient les espèces les plus éloignées du genre. La majorité des autres souches forment 4 groupes distincts, les espèces constituant chaque groupe étant reliées génétiquement entre elles (30 à 80% d'identité). Seules 3 espèces (*B. bifidum*, *B. magnum* et *B. minimum*) montrent une faible identité (20%) avec les autres souches testées. Les résultats de Lauer et Kandler sont en accord avec ceux de l'équipe de Scardovi, à quelques exceptions près :

- *B. choerinum* présente des pourcentages d'identité de 50 et 44% avec *B. asteroïdes* et *B. indicum* respectivement selon les travaux de Scardovi (1979a) (Tableau 6), alors qu'elle n'est pas génétiquement reliée à ces espèces selon Lauer et Kandler. Néanmoins, une relation forte est observée entre *B. choerinum* et *B. pseudolongum* pour les deux groupes (50% d'identité environ).

- Deux souches de l'espèce *B. suis*, provenant de la collection ATCC, se sont avérées être très proches de *B. longum* et *B. infantis*, alors que Matteuzzi *et al.* (1971) n'ont montré aucune relation proche entre leur souche de référence de l'espèce *B. suis* et une autre espèce de *Bifidobacterium*.

1.2.4.3. Etude protéique

Deux types d'études ont été réalisées pour comparer les espèces de *Bifidobacterium* entre elles :

1. L'électrophorèse en gel d'amidon (zymogramme) des 14 isoenzymes de transaldolase et des 19 isoenzymes de 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) (cf. voie métabolique, Fig.. 2) permet de comparer les mobilités électrophorétiques de ces enzymes en fonction de la souche d'origine (tableau 8). 60 % des souches sont identifiables par cette méthode (Scardovi *et al.*, 1979b). En effet, si la distance de migration électrophorétique de la F6PPK en gel d'amidon semble liée 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).

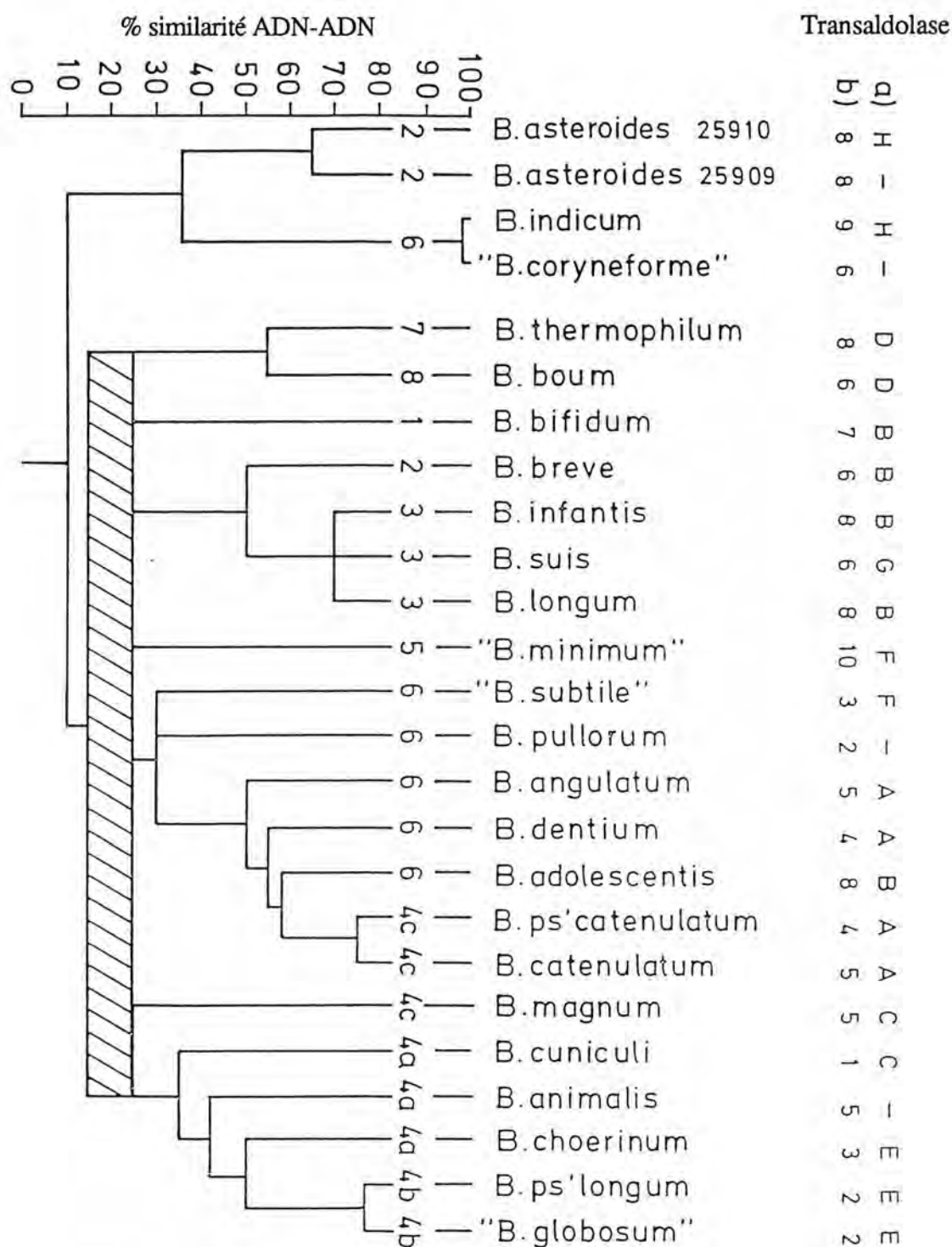


Fig. 4 : Dendrogramme basé sur le pourcentage de similarité ADN-ADN (d'après Lauer et Kandler, 1983)

1 à 8 correspondent aux différents types de muréine mis en évidence chez le genre *Bifidobacterium* (voir composition de la paroi, §1.2.4.5.). a) Groupes antigéniques antitransaldolases (selon Sgorbati et London, 1982a; §1.2.4.3.); b) Groupes électrophorétiques basés sur la migration des aldolases (selon Scardovi *et al.*, 1979b; §1.2.4.4.).

Espèces	Profils électrophorétiques		
	Transaldolase	6PGD	F6PPK
<i>B. bifidum</i>	7	7 -(8)	15
<i>B. longum</i>	(5)- 6-8	5-(6)	15
<i>B. infantis</i>	5-(6)-(8)	(3)- 4 -(5)	15
<i>B. breve</i>	6	(5)-6- 7	15
<i>B. adolescentis</i>	8	5	15
<i>B. angulatum</i>	5	5	15
<i>B. catenulatum</i>	5	6-8	15
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4 -(5)	1-3	
<i>B. dentium</i>	4	(2)	15
<i>B. globosum</i>	2	(3)-(4)-(5)- 6 -(7)	10
<i>B. pseudolongum</i>	2	7	10
<i>B. cuniculi</i>	1	4	
<i>B. choerinum</i>	3	4	
<i>B. animalis</i>	5	8-9	10
<i>B. thermophilum</i>	(7)- 8	7-8-9	10
<i>B. boum</i>	6	8-9	
<i>B. magnum</i>	5	7	10
<i>B. pullorum</i>	2	Absent	10
<i>B. suis</i>	6	5-8	10
<i>B. minimum</i>	10	6	10
<i>B. subtile</i>	3	2	10-15
<i>B. coryneforme</i>	6	6	16
<i>B. asteroides</i>	(6)-(7)- 8 -(9)	(9)- 10 -(11)-(12)-(13)	16
<i>B. indicum</i>	(6)-7-8- 9	6-(7)-8-(9)	16

Tableau 8 : Distances de migration des transaldolases, 6PGD et F6PPK 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 retrouvées chez moins de 10% des souches étudiées.

2. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide du lysat d'une souche est sans doute la méthode la plus sensible puisqu'elle permet de différencier des souches possédant un pourcentage d'identité ADN-ADN allant jusqu'à 80% (Biavati *et al.*, 1982). Au delà, les profils électrophorétiques sont quasi identiques, voire identiques entre eux. Néanmoins, l'utilisation de cette technique nécessite de posséder de nombreuses souches de référence.

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

- l'homologie entre *B. dentium* (seule espèce soupçonnée d'être pathogène) et *B. eriksonii* (anciennement *Actinomyces eriksonii*) a été établie par comparaison de leurs profils électrophorétiques qui se sont avérés être presque identiques (Biavati *et al.*, 1982). Ceci est en accord avec leur fort pourcentage d'identité ADN-ADN (80 à 100%) (Scardovi *et al.*, 1979b).

- *B. adolescentis* et *B. dentium* qui possèdent des caractères phénotypiques identiques, peuvent être différenciées par leurs zymogrammes, totalement différents (Scardovi *et al.*, 1979b). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide corrobore d'ailleurs ces résultats (Biavati *et al.*, 1982).

- La comparaison des profils électrophorétiques de protéines de *B. infantis* et *B. longum* montre que ces deux espèces possèdent les mêmes isoenzymes de transaldolase. Seules les fréquences relatives de ces isoenzymes au sein des espèces diffèrent : l'isoenzyme migrant à 5 est retrouvé plus souvent chez *B. infantis*, et celui migrant à 8 est plus fréquent chez *B. longum* (Scardovi *et al.*, 1979b). Les bandes protéiques obtenues sur les diagrammes électrophorétiques de ces deux espèces se répartissent de façon identique. Seules les concentrations de protéines diffèrent (Biavati *et al.*, 1982, 1986).

- Les transaldolase et 6PGD de *B. adolescentis*, de mobilité électrophorétique de 8 et 5 respectivement, sont retrouvées chez 50 % des souches de *B. longum* et chez de nombreux *B. infantis*, soulignant une parenté entre ces espèces. En revanche, les profils électrophorétiques des protéines cellulaires solubles sont différents, confirmant qu'il s'agit bien de trois espèces différentes (Biavati *et al.*, 1982). Il faut également noter que, sur la base des hybridations ADN-ADN, *B. adolescentis* semble assez éloignée génétiquement de ces deux espèces (Lauer et Kandler, 1983; Scardovi, 1986).

- 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 6PGD de 7 unités. Seules quelques souches de *B. thermophilum* d'origine bovine s'en approchent. Néanmoins, ces espèces peuvent être différenciées grâce à la mobilité de la 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase (Scardovi *et al.*, 1979b).

- Bien que les espèces *B. globosum* et *B. pseudolongum* possèdent un pourcentage d'identité de 70% ainsi qu'un profil fermentaire presque identique (Tableau 4), leur pourcentage moyen en bases G+C diffère de 3%. Pour cette raison, Scardovi *et al.* (1971b) ont préféré maintenir ces deux espèces séparées. Leurs profils électrophorétiques sont proches mais distincts (Biavati *et al.*, 1982) et bien qu'ils possèdent des transaldolases identiques, leurs isoenzymes de 6PGD sont différentes.

1.2.4.4. Antigénicité des transaldolases

Une approche immunologique par étude du sérotype des transaldolases permet également de différencier les espèces au sein du genre *Bifidobacterium*.

Cette méthode a consisté à préparer des immunoséras 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. asteroides* et à les tester vis-à-vis de 21 espèces différentes du genre afin de déterminer les distances immunologiques (Sgorbati et London, 1982a). Les résultats, exprimés en distances taxonomiques, sont représentés dans le dendrogramme de la figure 5 (Sgorbati, unpublished data; Scardovi, 1986). Ce schéma fait apparaître les interrelations existant au sein du genre, et permet de remarquer que les huit groupes antigéniques mis en évidence par cette méthode (A à H), peuvent être rassemblés en quatre groupes distincts étroitement liés à l'origine écologique des espèces (Baratte-Euloge, 1992). Ces quatre groupes (I, II, III et IV) coïncident avec l'arrangement des espèces de *Bifidobacterium* basé sur les mobilités électrophorétiques des enzymes (Scardovi *et al.*, 1971a, Sgorbati, 1979).

Ce dendrogramme permet en outre 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 vertébrés (II) appartiennent aux groupes C, D, E et G.

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

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

Néanmoins, pour Lauer et Kandler (1983) certains faits sont en désaccord :

- *B. adolescentis* et *B. bifidum*, qui possèdent une transaldolase du groupe B comme *B. longum*, *B. breve* et *B. infantis* ne sont pourtant pas reliées génétiquement à ce groupe ;

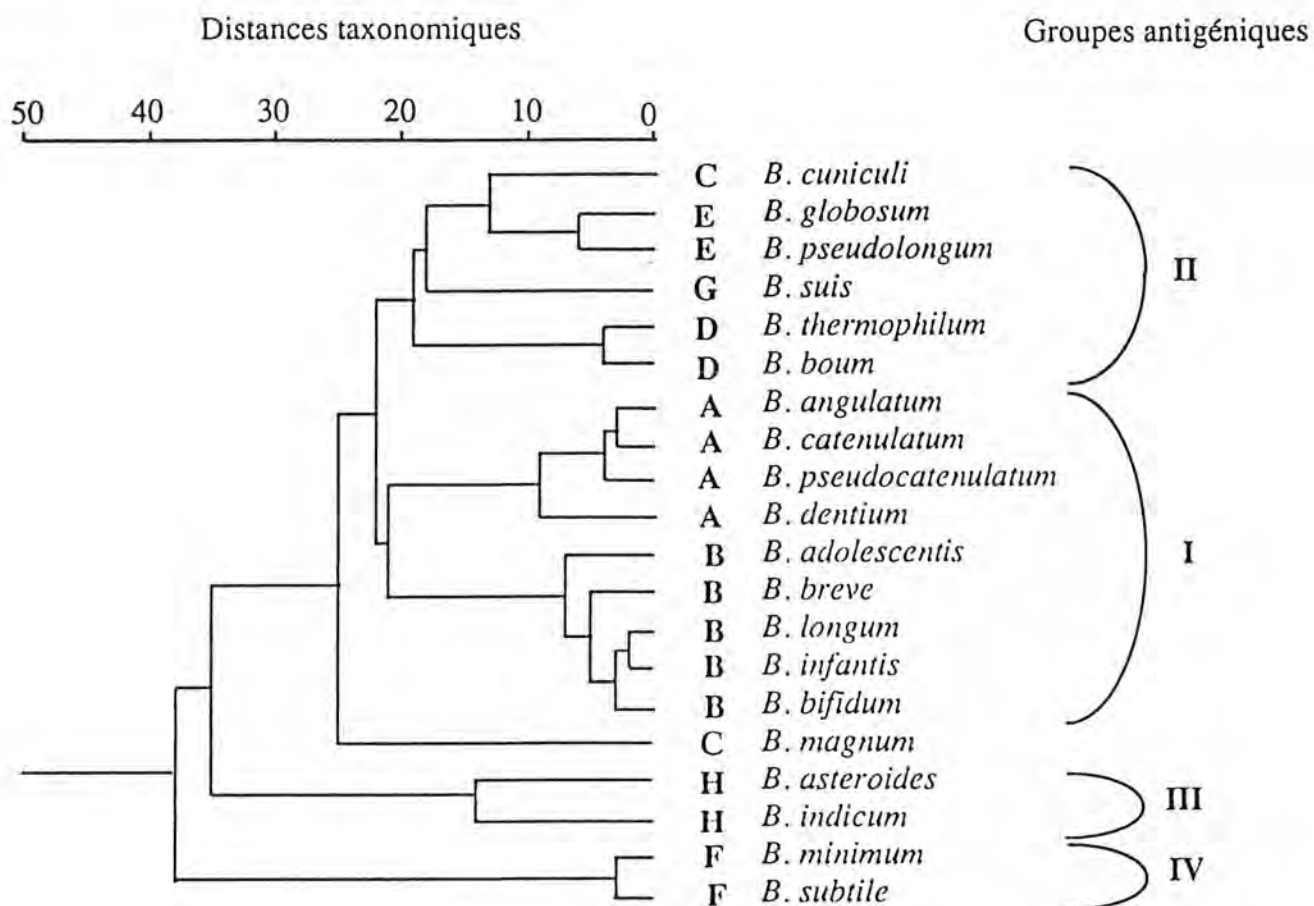


Fig. 5 : Distances taxonomiques chez le genre *Bifidobacterium*.
 (d'après Sgorbati, unpublished data; Scardovi, 1986)

Résultats obtenus avec 8 sérums antitransaldolases.

- *B. suis* s'est avéré très proche de *B. longum* (70% d'identité ADN-ADN) alors qu'il est classé seul dans le groupe G ;

- *B. minimum* et *B. subtile*, qui ne sont reliées ni génétiquement ni phénotypiquement et possèdent des transaldolases de mobilité très différentes, partagent néanmoins le même groupe immunologique F.

1.2.4.5. Composition de la paroi

Le composant principal de la paroi des bactéries du genre *Bifidobacterium* 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 des peptides. La chaîne polysaccharidique est constituée d'une alternance de N-acétylglucosamine (G) et d'acide N-acétylmuramique (M). Les tétrapeptides sont reliés aux résidus M d'une part et entre-eux d'autre part par l'intermédiaire de peptides. 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 ou thréonine (Fig. 6) (Cummins *et al.*, 1957; Veerkamp *et al.*, 1965).

Les différents types de muréine composant la paroi cellulaire des bifidobactéries ont été particulièrement étudiés par Kandler et Lauer (1974) et Lauer et Kandler (1983). Ils ont montré qu'il existait une variété considérable de types de peptidoglycane dans le genre *Bifidobacterium* et que de nombreuses espèces pouvaient être clairement distinguées sur cette base (Tableau 9).

Les différents types de muréine observés sont clairement corrélés aux groupes présentant des similarités ADN-ADN :

- *B. bifidum*, qui n'est pas génétiquement reliée à une autre espèce de *Bifidobacterium* (Tableau 6), possède un type de peptidoglycane unique.
- *B. lactentis* et *B. liberorum* possèdent le même type de muréine que *B. infantis*, confirmant la proposition de Scardovi *et al.* (1971b) de les réunir,
- *B. longum*, *B. suis* et *B. infantis* partagent le même type de muréine,
- *B. adolescentis*, *B. dentium* et *B. angulatum* possèdent le même type de muréine que la paire *B. catenulatum* - *B. pseudocatenulatum*. (40 à 60% d'identité ADN-ADN d'après Lauer et Kandler, 1983).

Cependant, on peut observer dans ce cas également, des exceptions :

- on retrouve le même type Lys-Gly dans deux groupes très distants : *B. asteroides* et *B. breve*,
- *B. breve* et *B. infantis* qui sont liées sur le plan génétique (jusqu'à 50 % d'identité ADN-ADN) et partagent le même groupe immunologique, possèdent des types de muréine différents,

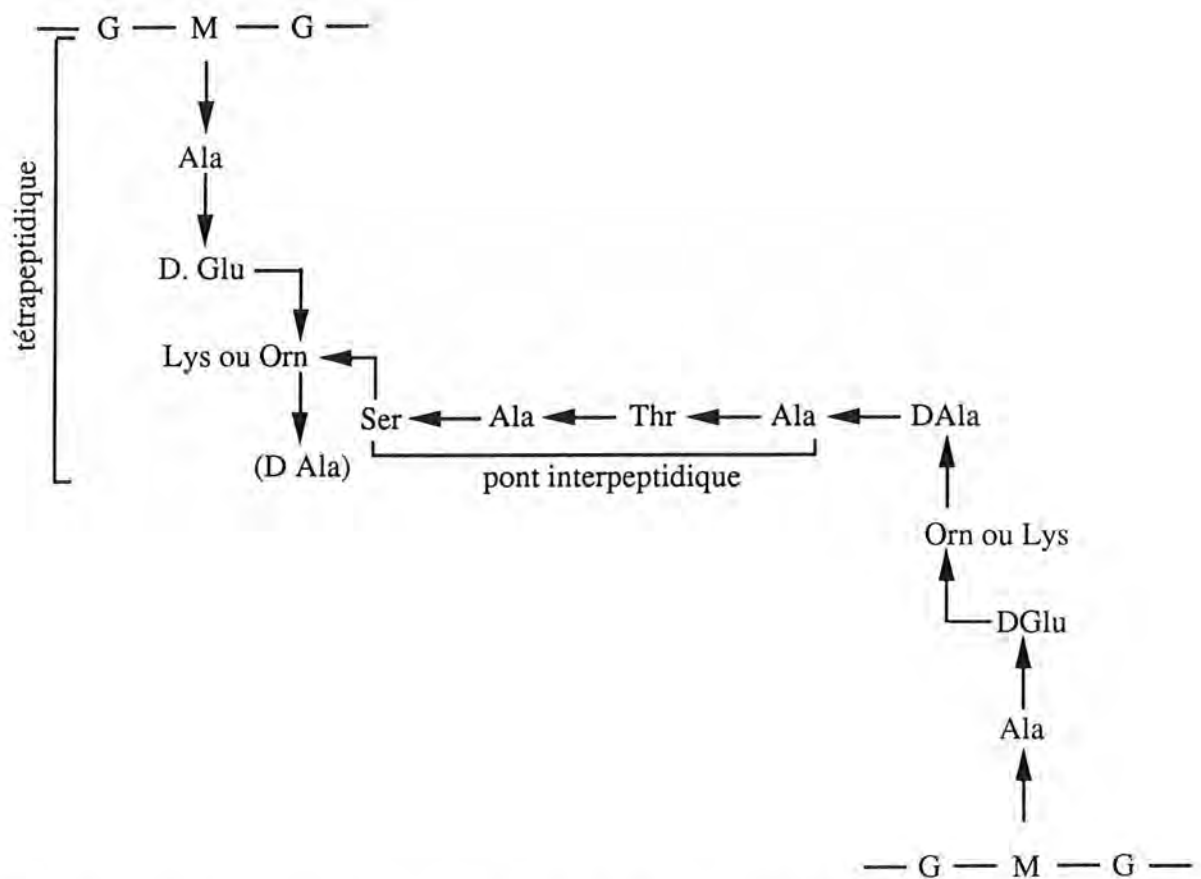


Fig 6 : Structure primaire du peptidoglycane de *B. longum*, *B. infantis* et *B. suis* (d'après Lauer et Kandler, 1983).

(Ala) n'est pas présent dans toutes les sous-unités peptidiques. M : acide N-acétyl muramique, G: N-acétylglucosamine.

n°	Type de peptidoglycane	espèce
1	Orn (Lys)- D Ser-D Asp	<i>B. bifidum</i>
2	Lys-Gly	<i>B. breve</i> , <i>B. parvulorum</i> , <i>B. asteroides</i>
3	Orn (Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	<i>B. longum</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. liberorum</i> , <i>B. lactentis</i>
4a	Orn (Lys)-Ser-(Ala)-Ala	<i>B. animalis</i> , <i>B. cuniculi</i> <i>B. choerinum</i>
4b	Orn (Lys)-Ala	<i>B. pseudolongum</i> , <i>B. globosum</i>
4c	Lys (Orn)-Ala-Ser	<i>B. magnum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
5	Lys-Ser	<i>B. minimum</i>
6	Lys (Orn)-D Asp	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. eriksonii</i> , <i>B. dentium</i> , <i>B. angulatum</i> , <i>B. subtile</i> , <i>B. coryneforme</i> , <i>B. indicum</i> , <i>B. pullorum</i>
7	Orn (Lys)-D Glu	<i>B. thermophilum</i> , <i>B. ruminale</i>
8	Lys-D Ser-D Glu	<i>B. boum</i>

Tableau 9 : Types de peptidoglycane rencontrés chez les différentes espèces de *Bifidobacterium* (d'après Lauer et Kandler, 1983).

- bien qu'ils soient très proches génétiquement (55% d'identité ADN-ADN), *B. thermophilum* et *B. boum* possèdent des types de muréine très différents.

Ces auteurs ont en outre observé que les parois cellulaires contenaient des quantités significatives de polysaccharides qui en général, consistent en glucose et galactose souvent accompagnés de rhamnose. Par exemple, les souches de *B. dentium* testées contenaient seulement du galactose alors que celles de l'espèce *B. indicum* et celles de *B. coryneforme* contenaient du galactose et du rhamnose mais aucune trace de glucose (Lauer et Kandler, 1983). La composition en sucres de la paroi cellulaire (Kandler et Lauer, 1974) peut donc aussi être un critère de différenciation des espèces de *Bifidobacterium* (Rasic et Kurmann, 1983).

D'autre part, Veerkamp *et al.* (1983) détectent la présence d'acide lipoteichoïque associé à la fraction de la paroi cellulaire insoluble au lysozyme chez *B. bifidum*. L'équipe d'Op Den Camp (1985) prépare alors des anticorps anti-acide lipoteichoïque de cette espèce par couplage avec une protéine immunogène. Des 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. Ces acides, associés aux protéines, sont responsables en agissant soit indépendamment, soit en complexes dynamiques, du caractère hydrophobe de la surface cellulaire des bifidobactéries (Op Den Camp *et al.*, 1985).

1.2.4.6. Séquence des gènes codant l'ARN 16S

Les gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S présentent plusieurs particularités :

- ils sont présents dans toutes les bactéries,
- leurs séquences contiennent des zones identiques chez toutes les bactéries et ces zones conservées sont différentes de celles codant pour l'ARN ribosomal de l'homme et de la mitochondrie.
- leurs séquences contiennent également des zones spécifiques de genre ou d'espèce bactérienne dont la connaissance aboutit à l'identification de la bactérie.

En 1993, environ 1802 séquences d'ARN 16S bactérien ont été répertoriées dans les banques de données internationales (GenBank, EMBL...). Si la séquence de la bactérie recherchée est déjà connue, elle est alors identifiée. Si elle ne l'est pas, on peut par approximation la positionner phylogénétiquement (Dauga et Grimont, 1993).

Au niveau des banques de données sont apparues les séquences d'ARNr 16S de 17 souches de *Bifidobacterium* (Yang et Woese, 1990; Woese, 1991). A l'exception de *B. dentium* ATCC15423, il s'agit des souches types :

- | | |
|---|---|
| - <i>B. adolescentis</i> ATCC15703 ^T | - <i>B. globosum</i> ATCC25865 ^T |
| - <i>B. animalis</i> ATCC25527 ^T | - <i>B. indicum</i> ATCC25911 ^T |
| - <i>B. asteroïdes</i> ATCC25910 ^T | - <i>B. infantis</i> ATCC15697 ^T |
| - <i>B. bifidum</i> M38018 | - <i>B. longum</i> ATCC15707 ^T |
| - <i>B. breve</i> ATCC15700 ^T | - <i>B. magnum</i> ATCC27540 ^T |
| - <i>B. catenulatum</i> ATCC27539 ^T | - <i>B. minimum</i> ATCC27538 ^T |
| - <i>B. coryneforme</i> ATCC25911 ^T | - <i>B. pseudolongum</i> ATCC25526 ^T |
| - <i>B. cuniculi</i> ATCC27916 ^T | - <i>B. suis</i> ATCC27533 ^T |
| - <i>B. dentium</i> ATCC15423 | |

En 1992, toujours en vue de différencier les espèces, Yamamoto *et al.* séquent des portions d'ARN 16S d'espèces du genre *Bifidobacterium* relativement proches, isolées de la microflore intestinale humaine. Leur objectif est d'obtenir des sondes oligonucléotidiques spécifiques de ces espèces à partir des régions variables de l'ARN 16S. Ils synthétisent par la suite des fragments d'ADN (16 à 19 bases) qui devraient être spécifiques des espèces *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* et *B. longum*. Ces fragments, après marquage radioactif, sont hybridés en tests en gouttes sur les ARN de haut poids moléculaire des différentes souches de ces cinq espèces, ainsi que sur les ARN d'autres espèces et d'autres genres.

Bien que les oligonucléotides synthétisés pour les espèces *B. infantis* et *B. longum* ne diffèrent que par une base, ces deux espèces peuvent néanmoins être différenciées par les conditions de stringence utilisées.

Finalement, les sondes obtenues pour les espèces *B. adolescentis*, *B. breve* et *B. longum* s'avèrent effectivement spécifiques, alors que celles synthétisées pour les espèces *B. bifidum* et *B. infantis* hybrident également avec d'autres souches que celles appartenant à ces deux espèces. La sonde PBI (*B. bifidum*) donne un signal positif sur les ARN de *B. asteroïdes* ATCC25910^T, *B. indicum* ATCC25912^T et *B. thermophilum* ATCC25525^T, tandis que la sonde PIN (*B. infantis*) hybride avec l'ARN de *B. suis* ATCC27533^T. Cependant, il s'agit dans les deux cas de souches n'appartenant pas à la flore intestinale humaine.

1. 2. 5. Conclusion

Ainsi, l'identification du genre *Bifidobacterium* et surtout des espèces au sein du genre est délicate. Les tests commerciaux apportant des informations pour l'identification phénotypique ne sont pas adaptés à ces bactéries et leur utilisation ne fournit pas de réponse suffisamment fiable. Même avec 150 caractères phénotypiques différents, l'identification reste incertaine.

La dernière étude menée par Roy et Ward (1990), démontre que les profils fermentaires des souches du genre *Bifidobacterium* sont plus "souche-dépendante" qu'"espèce-dépendante". Ainsi, l'identification précise d'un isolat inconnu dont le profil fermentaire est nouveau, reste discutable.

Par ailleurs, l'existence de bactéries pathogènes souligne l'importance d'identifier de façon stable les souches utilisées dans le domaine agro-alimentaire. En effet, une espèce, *B. dentium*, est reconnue comme étant un pathogène opportuniste (Scardovi et Crociani, 1974a). Or *B. dentium*, identifiée par l'utilisation des caractères phénotypiques décrits par Mitsuoka, est assimilée à *B. adolescentis*. Récemment, plusieurs cas de septicémies causées par *B. adolescentis* et *B. longum* ont été rapportés (Darbas *et al.*, 1989, 1991). Il est en fait probable que ces cas soient dus à *B. dentium*.

L'identification par les caractères génotypiques 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. Néanmoins, cette technique est lourde et nécessite l'utilisation de chacune des souches types du genre. De plus, elle n'amène qu'une solution partielle au problème d'identification puisqu'elle ne permet pas la distinction précise et certaine des différentes souches d'une même espèce. La présence de sous-groupes doit pourtant pouvoir être déterminée pour expliquer certaines caractéristiques particulières, spécialement si le microorganisme est d'intérêt médical ou industriel.

Plus récemment, l'utilisation d'oligonucléotides espèce-spécifiques déterminés à partir des régions hypervariables de l'ARN ribosomique 16S de cinq souches de *Bifidobacterium* a permis de différencier cinq espèces d'origine humaine (Yamamoto *et al.*, 1992). Cependant, de même qu'avec l'hybridation ADN-ADN, les souches d'une même espèce ne sont pas distinguables les unes des autres par la méthode utilisée.

1.3. LA FLORE BACTERIENNE INTESTINALE

1.3.1. Généralités

Le tube digestif de l'homme et des animaux héberge une population bactérienne caractérisée par sa densité et sa complexité. On estime qu'un organisme humain normal, composé de 10^{13} cellules, abrite dans son tube digestif 10^{14} bactéries vivantes. Avant 1960 cependant, 1 à 2 % seulement des espèces bactériennes intestinales avaient été cultivées (Moore et Holdeman, 1975). Les principaux travaux sur la flore ont en effet surtout concerné les bactéries pathogènes. Récemment, grâce au développement de certaines techniques et de la gnotoxénie, l'étude de la flore bactérienne intestinale a pu évoluer.

1.3.2. Techniques d'évaluation

L'étude du contenu du tube digestif n'est pas simple. On se limite en général à l'étude des selles qui sont en fait le processus final de tout ce qui se passe au niveau du tube digestif et qui est un reflet indirect de ce qui se passe à l'intérieur de l'intestin grêle et du côlon (Leclerc et Moriamez, 1980). Des modes de prélèvement plus élaborés tels que la biopsie de la muqueuse intestinale et le recueil de liquide d'aspiration luminale avec sonde de Camus, ou tube lesté, repéré par scopie, ont permis une exploration fine de toutes les portions du tube digestif. Une méthode plus séduisante mais encore théorique appelée pyxigraphie, consisterait à faire ingérer au sujet une capsule repérable par scopie dont l'ouverture en vue d'un recueil de liquide intestinal serait télécommandée électroniquement. Il suffirait ensuite de récupérer la capsule dans les selles pour en analyser le contenu. Malheureusement, il est encore difficile de repérer avec précision sa position le long du tractus intestinal. Une autre méthode d'étude de la flore intestinale consiste à effectuer un prélèvement pendant une intervention chirurgicale, par ponction directe de l'intestin ou du côlon. Le problème d'une telle méthode réside dans le fait que les sujets soumis à une chirurgie digestive reçoivent au préalable des antibiotiques ou d'autres substances qui modifient radicalement la flore intestinale. Les résultats obtenus ne peuvent donc absolument pas être extrapolés à l'adulte sain.

1.3.3. Composition

L'obtention d'un échantillon représentatif du contenu intestinal réel est donc extrêmement compliquée. De plus, l'étude de ces échantillons est également complexe puisque l'on dénombre plus de 400 espèces bactériennes différentes dans la flore d'un individu (Moore et Holdeman, 1975). Une analyse microbiologique détaillée d'un tel mélange hétérogène représente une tâche monumentale; la caractérisation d'un simple échantillon fécal peut demander jusqu'à un an pour être achevée (Simon et Gorbach, 1987).

Chez un hôte en bonne santé, une dizaine d'espèces, toujours les mêmes, cohabitent aux plus hauts niveaux de population (à une concentration d'au moins 10^7 cellules bactériennes par gramme de contenu colique) (Ducluzeau et Raibaud, 1989). Les autres espèces, qui constituent la flore sous-dominante, sont présentes en nombre moins élevé et fluctuent en fonction des circonstances. Néanmoins, selon les travaux de Hoskins *et al.* (1985), la flore sous-dominante jouerait un rôle non négligeable dans l'équilibre de l'écosystème intestinal. La très grande majorité des bactéries composant la flore dominante étant anaérobies strictes (E.O.S. : extremely oxygen sensitive) (Leclerc et Moriamez, 1980), leur identification pose de nombreux problèmes. Différentes techniques en vue de travailler dans une atmosphère anaérobie ont alors été développées, notamment les "roll-tubes" (Hungate, 1950) ainsi que les systèmes de jarres ou de chambres anaérobies (chambres de Freter). Ces techniques, assez lourdes, sont également coûteuses, ce qui explique pourquoi l'étude des bactéries de la flore intestinale a longtemps été négligée.

En dehors des bactéries pathogènes, les études sur la flore intestinale se sont limitées principalement aux bactéries de la flore dominante. Deux raisons expliquent ce choix :

- la complexité de la flore,
- la complexité des techniques à mettre en oeuvre.

1.3.4. Méthodes d'étude des interactions bactériennes dans le tube digestif

La complexité de l'étude des bactéries de la flore intestinale résulte également de l'existence des interactions bactériennes. En effet, ces centaines d'espèces coexistent et exercent entre elles différents mécanismes. Ces interactions microbiennes sont les responsables principales du maintien et de la régulation de l'écosystème que représente l'hôte et les microorganismes qu'il héberge dans son tube digestif (Ducluzeau et Raibaud, 1989).

Pour étudier ces interactions à l'intérieur du tractus digestif, il est indispensable de disposer d'animaux gnotoxéniques, c'est-à-dire d'animaux hébergeant uniquement des souches connues de bactéries intestinales. Ces animaux sont obtenus en ensemençant dès leur naissance des animaux totalement dépourvus de bactéries, appelés animaux axéniques. Les souches inoculées vont donc coloniser l'intestin de l'animal choisi qui sera un animal gnotoxénique à flore contrôlée. On constate, au moins pendant les premières semaines qui suivent l'ensemencement, que la flore qui s'établit chez la souris est très proche de celle du sujet donneur (souris hétéroxénique) et très différente de celle de la souris associée à sa flore habituelle (souris holoxénique) (Debure *et al.*, 1989). Par exemple, on a ainsi pu établir que l'absorption d'antibiotiques par des souris à flore humaine entraînait des effets mimant

exactement ceux que l'on observe chez les sujets humains recevant le même antibiotique (Andremont *et al.*, 1985).

1.3.5. Etablissement de la flore intestinale

Les animaux placentaires naissent stériles. Dans les premières heures qui suivent la naissance, l'intestin va être colonisé par les bactéries de l'environnement. La principale source bactérienne provient du passage vaginal qui va entraîner l'ingestion de bactéries par le nouveau-né. Ce sont ces bactéries qui vont le plus souvent coloniser l'intestin (Goldin, 1986). Cette colonisation se fait dans un ordre précis en fonction des conditions du milieu et des bactéries qui apparaissent. Chez l'homme, on estime que dans les 48 premières heures vont apparaître des bactéries aérobies tolérantes (streptocoques, *Escherichia coli*). Puis dans un deuxième temps vont apparaître les lactobacilles, suivis des bifidobactéries et des *Bacteroides* qui sont des bactéries anaérobies strictes. L'apparition de ces genres bactériens est importante puisque ce sont les premières bactéries qui vont ensuite appartenir à la flore dominante.

Ce passage d'une population dominante aérobie au niveau de l'estomac à une population anaérobie stricte dans le côlon peut s'expliquer si l'on admet que les bactéries aérobies tolérantes utilisent l'oxygène présent, créant ainsi les conditions d'oxydo-réduction nécessaires à l'implantation des anaérobies en aval (Simon et Gorbach, 1986).

Au moment du sevrage, on observe une modification profonde de la flore fécale, notamment une diminution du nombre de *Bifidobacterium* liée à une augmentation de la flore putréfiante (*Bacteroides* et entérobactéries). Progressivement, la flore se rapproche de celle des adultes pour l'atteindre, chez l'homme, entre 1 an et 4 ans. Il est communément admis qu'en dehors de certaines circonstances particulières comme le jeûne et l'administration d'antibiotiques qui entraînent un déséquilibre temporaire de la flore intestinale, celle-ci va rester relativement stable pendant une grande partie de la vie de l'individu (Fig. 7). De légers changements, essentiellement dûs à l'âge de l'individu, vont néanmoins intervenir (Mitsuoka, 1984; Havenaar et Huis in't Veld, 1992). La décroissance du nombre de *Bifidobacterium* s'accélère en effet chez le vieillard à cause d'une diminution de l'acidité gastrique (Rasic et Kurmann, 1983), et l'on observe une remontée des *Clostridium* et des bactéries aéro-anaéro facultatives.

Chaque individu possède en outre une flore particulière, différente des autres au niveau des souches bactériennes qui la composent.

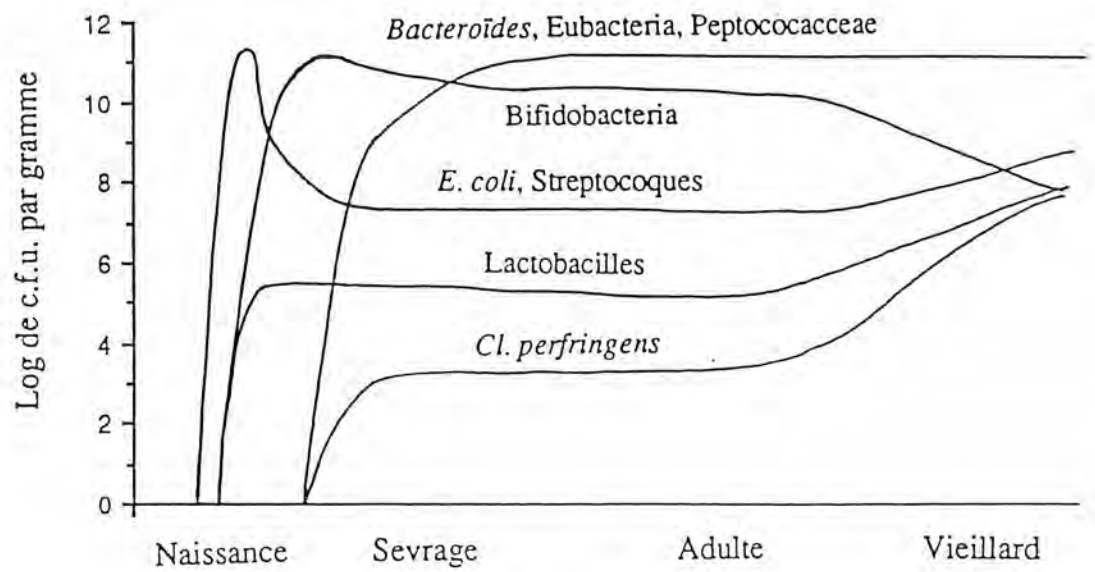


Fig. 7 : Modifications de la flore intestinale de la naissance à la vieillesse (d'après Mitsuoka, 1982).

1.3.6. Localisation des bactéries de la flore intestinale

La population bactérienne intestinale diffère en fonction de sa localisation le long du tractus intestinal (Simon et Gorbach, 1986) (Tableau 10). Au niveau de l'estomac (10^2 à 10^3 bactéries par g, le plus souvent aérobies), une sécrétion gastrique acide joue le rôle de barrière permettant de lutter efficacement contre la grande majorité des bactéries ingérées avec l'alimentation ou qui proviennent de l'environnement. Au niveau du duodénum où se jettent les sécrétions biliaires et pancréatiques, apparaissent les bactéries qui ont résisté à l'acidification gastrique (10^3 à 10^4 bactéries aérobies tolérantes par g). Tout le long de l'intestin grêle, jusqu'à la zone frontière entre l'intestin et le côlon, les concentrations bactériennes augmentent progressivement pour atteindre au niveau de l'iléon un niveau de 10^7 bactéries par g. Des bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroides*, les *Clostridium* et les bifidobactéries apparaissent à ce niveau. Enfin, à l'entrée du côlon, une modification complète de l'écosystème a lieu. Elle se traduit par une prolifération luxuriante de la flore intestinale, principalement favorisée par le fait qu'il existe une stase physiologique à ce niveau. Les populations bactériennes atteignent alors des niveaux de l'ordre de 10^{11} à 10^{12} microorganismes par g de contenu colique.

Ce gradient bactérien montre que la majorité de l'écosystème bactérien intestinal est localisé au niveau du côlon. Les bactéries qui l'atteignent ont donc résisté aux systèmes de défense que sont l'acidité gastrique, les sécrétions biliaires et pancréatiques et le péristaltisme intestinal qui correspond aux contractions de l'intestin grêle, empêchant ainsi leur colonisation.

Dans la très grande majorité des cas, les inoculi bactériens apportés par l'alimentation ou par l'ingestion occasionnelle de débris souillés, transitent à travers le tube digestif sans s'y multiplier et sans modifier l'équilibre de l'écosystème (Ducluzeau et Raibaud, 1989). Cela n'est vrai que dans le cas de bactéries non pathogènes.

1.4. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA FLORE BACTÉRIENNE INTESTINALE ET PROBIOTIQUE

La flore bactérienne naturelle exerce une influence prépondérante sur le fonctionnement de l'intestin, tant sur le plan morphologique, anatomique que physiologique (Abrams, 1980). D'autre part, cette flore interagit directement avec les substrats de la prise alimentaire et exerce ainsi des effets sur l'hôte. Enfin, elle présente un effet de "barrière", ce qui constitue une défense antibactérienne efficace (Ducluzeau et Raibaud, 1989).

	Estomac	Jejunum	Iléon	Côlon
Concentrations microbiennes totales	0 - 10 ³	0 - 10 ⁵	10 ³ - 10 ⁷	10 ¹¹ - 10 ¹²
<u>Microorganismes anaérobies stricts ou facultatifs :</u>				
Entérobactéries	0 - 10 ²	0 - 10 ³	10 ² - 10 ⁵	10 ⁴ - 10 ¹⁰
Streptocoques	0 - 10 ³	0 - 10 ⁴	10 ² - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ¹⁰
Staphylocoques	0 - 10 ²	0 - 10 ³	10 ² - 10 ⁵	10 ⁴ - 10 ⁷
Lactobacilles	0 - 10 ³	0 - 10 ⁴	10 ² - 10 ⁵	10 ⁶ - 10 ¹⁰
Champignons	0 - 10 ²	0 - 10 ²	10 ² - 10 ³	10 ² - 10 ⁶
<u>Bactéries anaérobies :</u>				
Bactéroïdes	rare	0 - 10 ²	10 ³ - 10 ⁶	10 ¹⁰ - 10 ¹²
Bifidobactéries	rare	0 - 10 ³	10 ³ - 10 ⁷	10 ⁸ - 10 ¹²
Peptocoques	rare	0 - 10 ³	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁸ - 10 ¹²
Clostridies	rare	rare	10 ² - 10 ⁴	10 ⁶ - 10 ¹¹
Fusobactéries	rare	rare	rare	10 ⁹ - 10 ¹⁰
Eubactéries	rare	rare	10 ³ - 10 ⁵	10 ⁹ - 10 ¹²
Nombre de microorganismes par millilitre de contenu intestinal				

Tableau 10 : Composition de la flore gastrointestinale humaine (d'après Simon et Gorbach, 1987).

La flore probiotique est, elle, constituée de microorganismes apportés par l'alimentation (ingérés vivants), susceptibles d'exercer un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant son écosystème intestinal (Fuller, 1989, 1991; Havenaar et Huis in't Veld, 1992).

1.4.1. Rôle de la flore intestinale sur la physiologie intestinale

Ces études ont été réalisées à partir de modèles animaux. On a comparé un animal axénique (sans flore) à un animal présentant une flore contrôlée ou une flore normale.

Chez l'animal holoxénique, l'intestin est constitué de villosités très allongées qui sont en contact avec tous les aliments du bol alimentaire, et de cryptes profondes qui sont le siège de mitoses importantes. Chez l'animal axénique, les travaux d'Abrams (1980) ont montré que ces villosités étaient beaucoup plus courtes, le nombre de cellules moins important, les cryptes moins profondes et le renouvellement cellulaire beaucoup plus lent. De plus, son système immunitaire est quasiment inexistant et les activités enzymatiques portées habituellement par les membranes au niveau des villosités sont très différentes de celles observées chez l'animal holoxénique. Cependant, lorsque l'on maintient cet animal axénique en vie pendant un certain temps, puis qu'on lui fait ingérer des souches bactériennes, l'intestin se normalise très rapidement et reprend l'aspect d'un intestin issu d'un animal holoxénique.

La flore intestinale, très précocement développée chez le nouveau-né, joue donc un rôle prépondérant dans la maturation entérocytaire. Cette action sur la morphologie et la cinétique cellulaire est fondamentale puisqu'elle conditionne l'absorption des nutriments, permet la formation de sites écologiques pour d'autres bactéries, et cette intégrité est indispensable dans la lutte contre les agents pathogènes. De plus, en agissant sur le système immunitaire par des stimulations antigéniques répétées, les bactéries intestinales assurent le bon maintien du statut immunitaire de l'hôte.

1.4.2. Effets métaboliques et nutritionnels

La flore bactérienne intestinale possède un important potentiel enzymatique qui intervient dans tous les domaines du métabolisme intestinal de l'hôte.

Les principaux exemples connus d'action de la flore microbienne colique sur les substrats endogènes naturellement déversés par les voies biliaires, ou par l'intestin jusqu'au côlon concernent :

- le cholestérol, dégradé par les enzymes bactériennes en coprostanol et coprostanone (Simon et Gorbach, 1987) ;

- les sels biliaires, transformés en acides biliaires puis en acide lithocholique et autres dérivés conjugués à des acides aminés, tels la glycine et la taurine. Cette transformation facilite leur élimination par détoxication (Rasic, 1983) ;
- la dégradation des glycoprotéines endogènes provenant du mucus, transformées en gaz et acides gras volatils.

De même, la flore microbienne colique exerce une action sur des substances exogènes comme :

- les fibres alimentaires (glucides non absorbés au niveau de l'intestin grêle), qui sont métabolisées en acides gras volatils et différents gaz ;
- certains médicaments qui, pour être actifs, doivent d'abord être déconjugués avant d'être réabsorbés par l'organisme. Sans cette action des bactéries de la flore intestinale, ils risquent de n'exercer aucun effet (Simon et Gorbach, 1987).
- certains substrats procarcinogènes fournis par l'alimentation qui, fermentés par la flore intestinale, favorisent la formation de substrats toxiques pouvant avoir un rôle important dans la cancérogénèse recto-colique (Simon et Gorbach, 1987).

Si le régime laitier n'influe pas sur la composition bactérienne de la flore, on remarque pourtant que l'activité métabolique est rapidement modifiée par des variations de régime. En effet, la plupart des enzymes bactériennes 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. Il apparaît notamment très clairement que les régimes riches en viandes et en graisses augmentent l'activité des enzymes bactériennes coliques intervenant dans la transformation de procarcinogènes en produits carcinogènes (Simon et Gorbach, 1987).

Du point de vue nutritionnel, la masse bactérienne intestinale représente par elle-même une source importante de nutriments : acides gras à chaîne courte, vitamines, acide panthoténique, acides aminés, ces derniers pouvant contribuer au mécanisme de détoxication au sein du tube digestif.

1.4.3. Rôle de la flore intestinale dans les défenses antibactériennes

La flore intestinale est très stable dans le temps malgré l'ingestion quotidienne de bactéries (Simon et Gorbach, 1986).

Lorsqu'une souche bactérienne est introduite dans le tractus gastro-intestinal d'un hôte holoxénique, il y a interactions entre les souches bactériennes déjà établies (autochtones) et celle

que l'on introduit, volontairement ou involontairement. Dans ce cas, on parle d'**effets de barrière microbiens** ou de résistance à la colonisation (Ducluzeau et Raibaud, 1989).

Pour mettre en évidence l'établissement d'une souche ou, au contraire, son transit passif, un marqueur de transit constitué par les spores d'un *Bacillus* thermophile strict est utilisé. Ces spores ne germent pas durant leur passage dans le tube digestif de l'hôte, résistent à tous les facteurs inhibiteurs qu'elles rencontrent sans perdre leur viabilité, et sont facilement dénombrables dans les selles.

Si la courbe d'élimination de la souche est parallèle à celle des spores de *Bacillus*, cette souche ne fait que transiter passivement comme le marqueur. Ainsi, la flore de barrière exerce seulement un effet bactériostatique sur la bactérie cible qui est ensuite éliminée passivement par le péristaltisme du tube digestif.

Certaines bactéries disparaissent parfois plus vite du tube digestif que le marqueur de transit, ce qui indique qu'elles sont en partie détruites durant le transit (effet bactéricide).

D'autres, au contraire, subsistent en petit nombre après la disparition du marqueur, indiquant qu'elles continuent à se multiplier à un taux faible, mais suffisant pour compenser l'évacuation : on retrouve alors des "porteurs sains" (effet permissif). Dans le cas d'une administration journalière d'une culture d'une souche qui ne s'établit pas mais qui n'est pas non plus triée par les bactéries résidentes, le niveau de population fécal de la souche se maintient à des valeurs qui dépendent du nombre de cellules viables ingérées. Dans ce cas, il s'agit d'un établissement seulement apparent.

Comment fonctionne un tel effet de barrière ?

L'une des premières hypothèses est l'absence de sites d'attachement pour les bactéries exogènes, la population endogène atteignant déjà 10^{13} à 10^{14} bactéries dans le côlon par g de contenu intestinal. Cette théorie du premier occupant a été critiquée par la suite et semble difficile à retenir. De même que l'hypothèse de l'absence de nutriments disponibles pour la bactérie exogène, les bactéries autochtones les consommant de façon préférentielle.

Une autre explication serait la production par les bactéries endogènes de substances toxiques pour les bactéries exogènes comme la libération de bactériocines ("antibiotics-like"), de facteurs agissant sur le milieu, tels que les acides gras volatils toxiques, la production d' H_2S , ou également la diminution du pH pour les germes pathogènes (Simon and Gorbach, 1986; Ducluzeau et Raibaud, 1989). Ces effets de barrières sont spécifiques en ce sens que certaines souches cibles y sont sensibles et d'autres pas. Selon la nature des souches en présence, l'effet de barrière est intraspécifique si souches cibles et inhibitrices appartiennent à la même espèce. Il est interspécifique si souches cibles et inhibitrices appartiennent à des espèces différentes. Les travaux de Duval-Iflah *et al.* (1981, 1982) illustrent les effets de barrière intraspécifiques entre souches d'*E. coli*. Chez des souris gnotoxéniques, ils montrent qu'une

souche d'*E. coli* isolée des selles et transformée pour être reconnue sur des caractères de résistance à des antibiotiques est rejetée par effet de barrière lorsqu'elle est réadministrée au même animal.

L'effet de barrière ne devrait plus être retrouvé lorsque surviennent des déséquilibres microbiens majeurs, comme la prise d'antibiotiques (Nord *et al.*, 1984; Barza *et al.*, 1987).

Il est considéré aujourd'hui, que chez un animal holoxénique, il est impossible d'implanter de façon durable dans la flore dominante (la seule qui exerce des effets) une souche dont l'intérêt pour l'hôte a été reconnu dans des modèles gnotoxéniques. La souris hétéroxénique par exemple, réacquiert une flore de type souris dès qu'elle est placée en présence de souris holoxéniques. Ceci montre que les souches de souris holoxéniques sont capables d'exercer des effets de barrière drastiques sur les souches provenant d'autres espèces animales (Ducluzeau et Raibaud, 1989). L'effet de barrière s'oppose donc à la multiplication des applications pratiques de l'ensemble des connaissances acquises sur la flore digestive. Une implantation ne serait possible qu'à la naissance, ce qui en limite l'intérêt. Un palliatif peut être trouvé dans l'ingestion continue de quantités massives de bactéries utiles (probiotiques), qui continuent à métaboliser durant leur transit et peuvent ainsi mimer l'effet d'une flore implantée.

1.4.4. Les probiotiques

Outre leur potentiel technologique, certaines bactéries possèdent des propriétés intéressantes pour l'homme. Ce sont les bactéries probiotiques.

Pour qu'un probiotique puisse exercer un effet sur l'hôte, il doit siéger au niveau du segment intestinal requis à un niveau de population suffisant, mimant celui de la flore endogène dominante (au niveau du côlon, une population d'au moins 10^7 bactéries par g est nécessaire) (Ducluzeau et Raibaud, 1989).

Ce microorganisme doit pouvoir traverser les barrières que sont l'acidité gastrique, les sécrétions biliaires et pancréatiques ainsi que résister au péristaltisme intestinal pour atteindre son site d'action, d'où l'importance parfois de l'aliment qui l'accompagne. Le yaourt a, par exemple, un effet tampon qui permet d'améliorer la résistance à l'acidité gastrique (Pochard *et al.*, 1989)

Les principaux probiotiques utilisés chez l'Homme sont d'origine fongique (levures *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*) ou bactérienne (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* species).

Un exemple de probiotique connu est le yaourt. Celui-ci est obtenu par l'action de deux espèces bactériennes thermophiles : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Décret n° 881203 du 30 XII 1988), dont l'association est appelée "Levain yaourt". Ces bactéries semblent avoir un rôle nutritionnel chez l'homme quand elles sont ingérées en très grande quantité (Rasic et Kurmann, 1983). Elles peuvent par exemple 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 qui peuvent exercer l'activité lactasique absente chez le sujet intolérant au lactose (Ducluzeau et Raibaud, 1979). Ceci a conduit les pouvoirs publics à imposer pour le yaourt un nombre minimum de 10^8 bactéries vivantes à la date limite de consommation par gramme de produit, ainsi qu'une acidité minimum de 0,7g d'acide lactique pour 100g.

L'utilisation de toute autre espèce bactérienne associée ou non à un levain yaourt entraîne pour le produit l'appellation de lait fermenté. Parmi les plus connus se trouvent les laits fermentés avec *L. acidophilus* et les laits fermentés avec une bactérie appartenant au genre *Bifidobacterium*. Quatre catégories de laits fermentés sont à considérer suivant les associations bactériennes qui les caractérisent :

- Levain yaourt + *Lactobacillus acidophilus*.
- Levain yaourt + Bifidobactérie d'origine animale. La maturation des yaourts standards se faisant à des températures compatibles avec l'origine animale des levains yaourt, soit entre 42 et 45°C, et ce type de technologie conduisant à une forte production d'acide lactique, seules des espèces de *Bifidobacterium* d'origine animale peuvent se développer.
- Levain yaourt + Bifidobactérie d'origine animale + *Lactobacillus acidophilus*;
- Levain yaourt + Bifidobactérie d'origine humaine. L'utilisation de ces espèces impose que le fabricant mette en oeuvre un levain yaourt qui respecte l'intégrité de la souche de *Bifidobacterium*. La fabrication doit donc être réalisée à une température compatible avec l'origine humaine de cette souche, c'est-à-dire voisine de 37°C. De plus, il faut que l'acidité obtenue en fin de fabrication ne soit pas trop élevée pour ne pas tuer les souches de *Bifidobacterium*, imposant leur association à des souches moins acidifiantes. En outre, les bifidobactéries étant anaérobies strictes, il est nécessaire d'employer un emballage parfaitement imperméable à l'oxygène de l'air.

Pour pouvoir suivre une modification de la flore bactérienne intestinale, il est donc nécessaire de pouvoir identifier sans ambiguïté les bactéries qui la composent, et notamment les bifidobactéries, qui font l'objet de cette étude.

2. MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

2.1.1. *Bifidobacterium*

Les souches de *Bifidobacterium* utilisées dans cette étude proviennent de la Collection de bactéries de l'Institut Pasteur (CIP), de l'American Type Culture Collection (ATCC), ou sont d'origine industrielle. Leur dénomination et leur origine sont reportées dans le tableau 11. Les autres souches de *Bifidobacterium* ont été isolées par Y. BOUHNİK et N. BISETTI à partir de selles humaines, puis envoyées au laboratoire pour une caractérisation génotypique. Elles seront par la suite réparties selon leurs profils de restriction et ribotypes dans 15 groupes distincts (CE1 à CE15).

2.1.2. *Escherichia coli*

La souche d'*E. coli* SURE a été utilisée pour les clonages dans le plasmide pBluescript KS⁺. Son génotype est :

- SURE : e14⁻(*mcrA*), D(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC*::Tn5 (*kan^r*), *uvrC*, *supE44*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1* [F' *proAB*, *lacI*^qZDM15, Tn10, (*ter^r*)].

2.2. EXPERIENCE CLINIQUE (Dr BOUHNİK, Hôpital St Lazare, Paris)

Cinq volontaires sains, sans antécédents digestifs notables et n'ayant pas consommé dans le mois précédent l'étude de substances susceptibles de modifier l'écosystème bactérien colique, ont reçu pendant 6 jours (J0 à J6) par voie orale, de la rifampicine (300 mg, 2 fois par jour) et de la streptomycine (1 g, 1 fois par jour). Ces volontaires ont également consommé de J3 à J9 un lait fermenté contenant la souche de *Bifidobacterium* sélectionnée BOSR (NBS1SR dans publication 1), résistante à ces deux antibiotiques (concentration de bactéries vivantes supérieure à 10⁹ par g).

D'autres sujets, choisis sur les mêmes critères, ont reçu ces antibiotiques ainsi qu'un produit laitier ne contenant pas la souche de *Bifidobacterium* BOSR.

Dans les deux cas, les volontaires ont ingéré des spores de *Bacillus subtilis* servant de marqueur de transit.

Des souches de *Bifidobacterium* ont été isolées tous les 3 jours.

Tableau 11 : Nom et origine des souches utilisées :

Souches utilisées	Synonyme	origine
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.58	ATCC15704	homme adulte
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.59T	ATCC15703 ^T	homme adulte
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.60	ATCC15705	homme adulte
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.61	ATCC15706	homme adulte
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC11146		homme adulte
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC25527 ^T		rat
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC27536		poulet
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP56.7T	ATCC29521 ^T	enfant
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP64.64		homme adulte
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP64.65	ATCC15696	enfant
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC15698	CIP64.66	enfant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.68	ATCC15699	enfant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.69T	ATCC15700 ^T	enfant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.70	ATCC15701	enfant
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC15697 ^T	CIP64.67T	enfant
<i>Bifidobacterium infantis</i> CIP63.78		inconnu
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC25962		enfant
<i>Bifidobacterium longum</i> CIP64.62T	ATCC15707 ^T	homme adulte
<i>Bifidobacterium longum</i> CIP64.63	ATCC15708	enfant
<i>Bifidobacterium suis</i> CIP103377T	ATCC27533 ^T	porc
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> ATCC25525 ^T		porc

ATCC = American Type Culture Collection

CIP = Collection de l'Institut Pasteur

T correspond aux souches types de chaque espèce (Reuter, 1971)

Tableau 11, suite :

Souches utilisées	Synonyme	origine
<i>Bifidobacterium angulatum</i> ATCC27535 ^T		homme adulte
<i>Bifidobacterium asteroïdes</i> ATCC25910 ^T		abeille
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ATCC27539 ^T		homme adulte
<i>Bifidobacterium coryneforme</i> ATCC25911 ^T		abeille
<i>Bifidobacterium globosum</i> ATCC25865 ^T		rumen bovin
<i>Bifidobacterium indicum</i> ATCC25912 ^T		abeille
<i>Bifidobacterium magnum</i> ATCC27540 ^T		lapin
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ATCC25526 ^T		porc
BO		industrielle
BOSR (1)		industrielle
BB11		industrielle
BB12		industrielle
BB42		industrielle
BF1		industrielle
C2		industrielle
C4		industrielle
C4A		industrielle
C4Bh		industrielle
BL2		industrielle
Bf. P		industrielle
Bf. G		industrielle
Bf. C		industrielle

(1) La souche BOSR est résistante à la streptomycine et à la rifampicine.

2.3. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

2.3.1. Pour la croissance des souches de *Bifidobacterium*

Deux milieux de cultures ont été testés :

- le **TPY** (Trypticase-phytone-yeast extract medium), d'après Scardovi *et al.* (1971b) :

Bio Trypcase (bioMérieux)	10	g
Bio Soyase (bioMérieux)	5	g
Glucose	5	g
Bacto Yeast extract (Difco)	2,5	g
Tween 80 (Aldrich)	1	g
Cysteine hydrochloride	0,5	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,5	g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25	g
CaCl ₂	0,15	g
FeCl ₃	traces	
H ₂ O	qsp 1	l

pH final : 6,5

- le **MRSD** : Lactobacilli MRS Broth (Difco)-Dicloxacilline :

Bacto Proteose Peptone	10	g
Bacto Beef Extract	10	g
Bacto Yeast Extract	5	g
Bacto Dextrose	20	g
Tween 80	1	g
Ammonium citrate	2	g
Sodium Acetate	5	g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1	g
MnSO ₄	0,005	g
K ₂ HPO ₄	2	g
H ₂ O	qsp 1	l

Ce milieu est complété par 0,5 µg/ml de dicloxacilline, un antibiotique de la famille des pénicillines.

Les milieux solides sont obtenus par addition de 15 g.l⁻¹ de Bacto-agar (Difco).
Ces milieux sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120° C.

Les souches de *Bifidobacterium* ont été cultivées dans un premier temps en jarres anaérobies avec système GasPak incorporé (BioMérieux) délivrant de l'hydrogène et du gaz carbonique à 37 °C.

Dans un deuxième temps, elles ont été cultivées à la même température dans une station anaérobie remplie d'un mélange de gaz réducteurs (H₂ : 10 %, N₂ : 90 %) qui est en permanence débarrassé des traces d'oxygène grâce à un catalyseur : l'oxyde de palladium. Dans ces conditions, les souches se développent bien et ont moins tendance à sédimenter. Pour 3 souches néanmoins, il a fallu continuer à utiliser les jarres (*B. adolescentis* CIP64.59T et CIP64.60, *B. bifidum* CIP56.7T), la croissance en station étant mauvaise. Ceci peut être dû à une exigence en CO₂, présent dans la jarre, mais pas dans la station.

Ces souches sont conservées à - 20°C en milieu de Rosenow (Diagnostics Pasteur), en TPY additionné de glycérol (concentration finale : 20 %), ou en lait reconstitué additionné d'extrait de levure (100g de poudre de lait, 5g de Bacto Yeast Extract (Difco) pour un volume final de 1l).

Milieu de **Rosenow** :

Peptone	10	g
Bacto Beef extract	3	g
Glucose	2	g
NaCl	5	g
Indicateur d'Andrade (fuchsine acide à 5 %)	10	ml
Marbre blanc	1	morceau
Cervelle	1	morceau

pH = 7,2

2.3.2. Pour la croissance d'*Escherichia coli*

La souche *E. coli* SURE est cultivée comme indiqué par Sambrook *et al.* (1989) sur milieu LB additionné des antibiotiques appropriés à la souche et au plasmide.

Milieu LB :	Bacto Tryptone (Difco)	10	g
	Bacto Yeast Extract (Difco)	5	g
	NaCl	5	g
	H ₂ O	qsp	1 l

pH = 7,5

La souche SURE, portant sur Tn10 un gène de résistance à la tétracycline, est cultivée en présence de cet antibiotique (12,5 µg.ml⁻¹). Les souches transformées par pBluescript ou ses dérivés recombinants sont cultivées avec un ajout d'ampicilline (50 µg.ml⁻¹).

L'addition de X-Gal (32 µg.ml⁻¹) et d'IPTG (38 µg.ml⁻¹) permet la mise en évidence des clones d'*E. coli* contenant les plasmides pBluescript recombinants.

2.4. PREPARATION D'ADN

2.4.1. Extraction d'ADN total des souches de *Bifidobacterium*

L'ADN total des cellules contenues dans 150 ml de culture est extrait (Demuyter *et al.*, 1988). Les bactéries sont lysées par le lysozyme (Boehringer, 25 mg.ml⁻¹) pendant 45 minutes à 37° C, puis traitées par la protéinase K (Boehringer, 5 mg.ml⁻¹) et le SDS (Sodium dodécyl sulfate : 10 %, Sigma). Après une extraction au phénol-chloroforme (phénol saturé en Tris, pH 8,0; chloroforme-alcool isoamylique (24V/1V)) et deux extractions au chloroforme, les ARN sont dégradés par l'action de la ribonucléase A (Sigma, 10 mg.ml⁻¹). L'ADN est précipité par addition d'acétate de sodium (1/10 V) et d'isopropanol froid (1V). Il est alors lavé avec de l'éthanol à 70 %, séché, puis mis en solution dans du TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8).

2.4.2. Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique des clones d'*E. coli* recombinants est extrait par lyse alcaline et purifié par centrifugation en gradient de CsCl/BET (1,05 g de CsCl par ml de solution d'ADN), selon les méthodes décrites par Hopwood *et al.* (1985). Pour les minipréparations, la technique de lyse alcaline décrite par Sambrook *et al.* (1989) a été utilisée.

2.4.3. Elution de fragments de restriction

Après migration sur gel d'agarose, la zone du gel contenant le ou les fragments désirés est découpée. L'ADN est ensuite élué par GeneClean en suivant les indications du fournisseur (Bio101, USA).

2.5. DOSAGE DE L'ADN

L'ADN, génomique ou plasmidique, est dosé au spectrophotomètre selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989).

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées sur 1 à 2 µg d'ADN natif.

2.6. CLONAGES

2.6.1. Réalisation de mini-banques d'ADN génomique de souches de *Bifidobacterium*

L'ADN est extrait à partir de cellules récoltées en fin de phase de croissance exponentielle. Il est purifié par ultracentrifugation en gradient de CsCl-BET, lavé avec de l'isopropanol saturé en CsCl, puis reprécipité. Cet ADN est ensuite digéré par l'enzyme de restriction choisie puis déposé sur un gradient de saccharose préformé (40 à 10 %) en vue de récupérer des fragments de taille comprise entre 0,5 et 3 kb. Une dialyse de la fraction choisie (après électrophorèse de contrôle en gel d'agarose) est ensuite réalisée dans une solution de TE, à 4°C, pendant une nuit (Sambrook *et al.*, 1989).

2.6.2. Clonage dans un plasmide

Le plasmide pBluescript KS⁺ (Stratagene) a été utilisé comme vecteur (Figure 8). Ce plasmide est résistant à l'ampicilline et porte une cassette multisite de clonage. L'insertion d'un fragment dans cette cassette supprime le caractère Lac⁺ conféré par ces plasmides.

L'ADN du vecteur est linéarisé par action d'une endonucléase de restriction, qui est ensuite éliminée par réalisation d'un phénol-chloroforme puis précipitation à l'éthanol (Sambrook *et al.*, 1989). L'ADN à insérer est digéré par une enzyme générant des extrémités compatibles avec celles du vecteur linéarisé, séparé sur gel et élué. Les deux ADN sont ensuite ligués par la T4 DNA ligase (Boehringer) pendant une nuit à 4° C, la proportion insert/vecteur étant de 5 afin de favoriser la religation des deux molécules.

Le mélange de ligation est alors utilisé pour transformer *E. coli* SURE par électroporation (Dower *et al.*, 1988).

L'ensemble des clones bactériens contenant des plasmides recombinants constitue la "mini-banque" d'ADN à partir de laquelle sont choisies les sondes utilisées pour les hybridations.

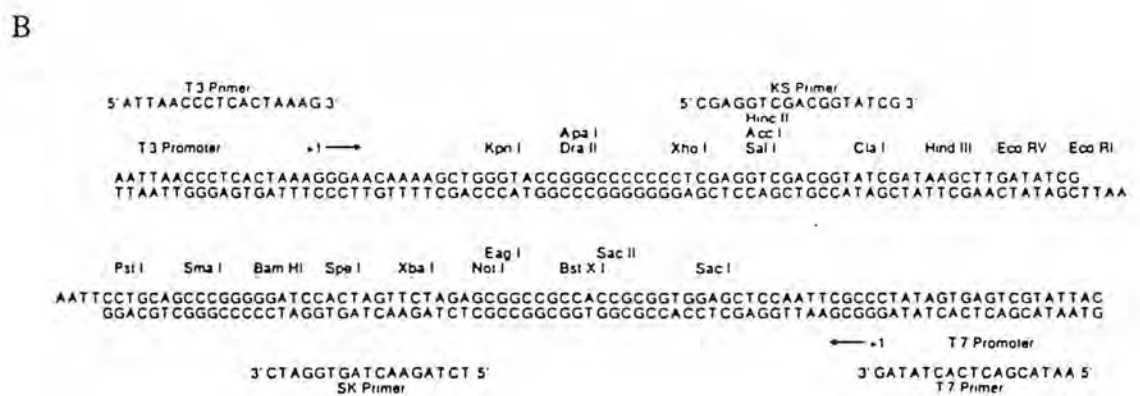
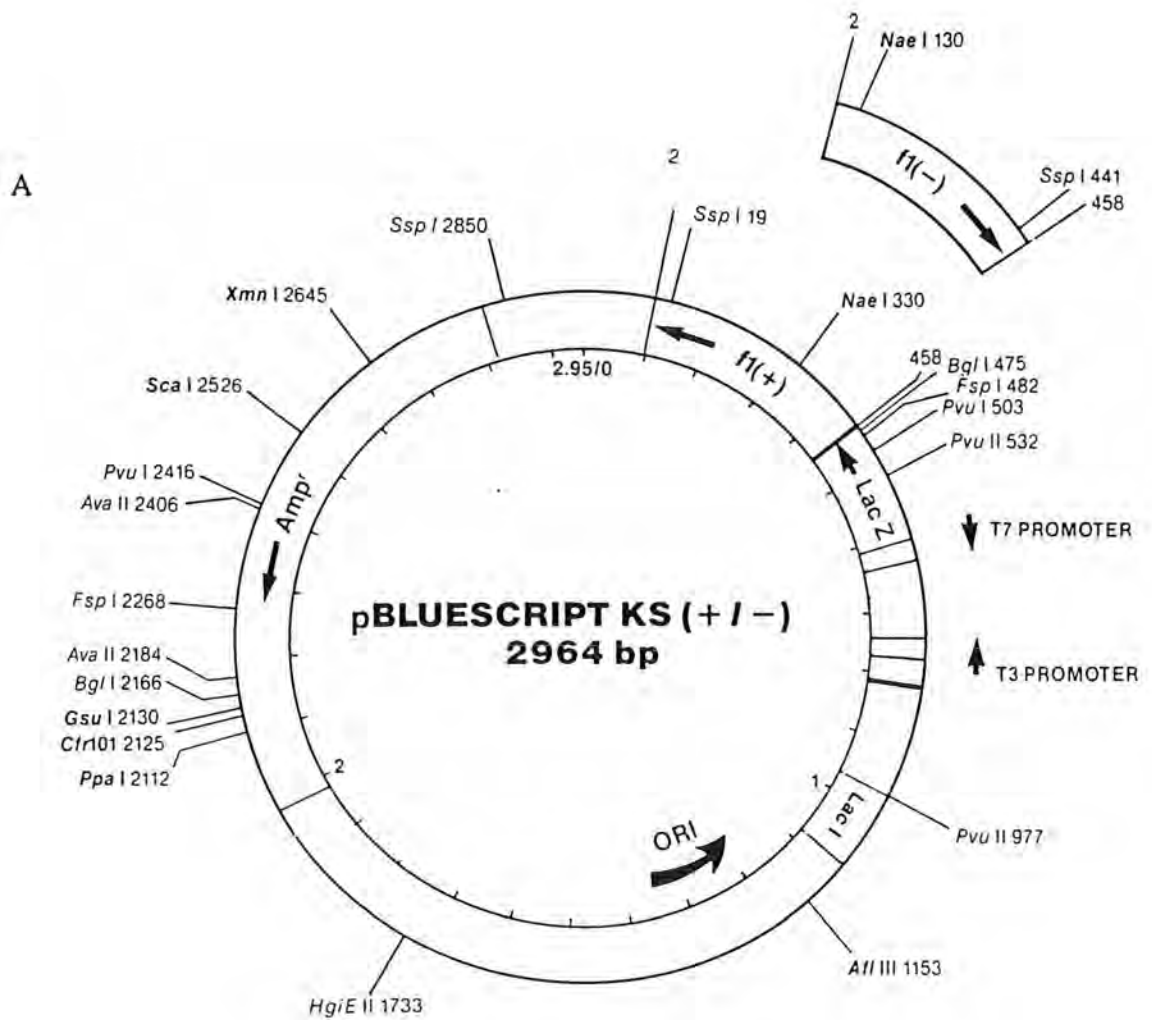


Figure 8 : A. Carte de restriction du plasmide Bluescript KS+ (Stratagene) utilisé comme vecteur de clonage. B. Séquence de la cassette multisite de clonage (MCS) et localisation des amorces et des sites de restriction uniques.

2.7. HYBRIDATIONS

2.7.1. Transferts sur membrane

Après migration sur gel d'agarose et coloration au BET, l'ADN est transféré sur membrane Hybond N (Amersham). Le transfert est réalisé sous vide sur l'appareil VacuGene (Pharmacia-LKB) selon les indications du fournisseur : 30 minutes de dépurination (HCl 0,25 M), 30 minutes de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M), 30 minutes de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH8, EDTA 1mM), puis 90 minutes de transfert proprement dit (20x SSC; 1x SSC: NaCl 0,15 M, Citrate trisodique 0,015 M.). Après rinçage de la membrane dans une solution de 2x SSC, l'ADN est fixé à la membrane par exposition aux UV pendant 5 minutes.

2.7.2. Réalisation des tests en goutte (Dot-Blots)

L'ADN natif est dénaturé 10 minutes à 100°C par 0,4 N de soude, neutralisé avec un volume égal d'acétate d'ammonium 2 M (pH 7), et déposé sur membrane Hybond N (Amersham). Le transfert est réalisé sous vide sur un appareil Bio-Dot (BioRad) selon les recommandations du constructeur: dépôt de 500 µl d'eau ultra pure, des échantillons contenant les ADN natifs, puis de 500 µl de 2x SSC.

La membrane est rincée dans une solution de 2x SSC, puis l'ADN est fixé à la membrane par exposition aux UV pendant 5 minutes.

2.7.3. Méthodes de marquage des sondes

2.7.3.1. Marquages radioactifs

A l'exception des premiers marquages, qui ont été faits par déplacement de césure (nick-translation kit, Amersham), les marquages radioactifs des sondes par le 5' [α -³²P]dCTP sont réalisés par la méthode des amorces aléatoires (kits Multiprime puis Megaprime, Amersham). En effet, cette méthode permet d'obtenir des sondes de très forte activité spécifique (de l'ordre de 10⁹ dpm.mg⁻¹), et nécessite de très faibles quantités d'ADN (5 à 25 ng selon la surface de membrane à hybrider), ce qui permet de marquer des fragments d'ADN élués de gel.

2.7.3.2. Marquages "froids"

Les sondes "froides" présentent différents avantages par rapport au marquage radioactif : la stabilité du marquage (plusieurs mois), des résultats obtenus plus rapidement (de 15 mn à quelques heures après les lavages), des conditions d'utilisation plus faciles du fait de

l'inocuité de la substance, une sonde qui peut être utilisée ultérieurement dans un laboratoire non équipé pour l'utilisation de sondes radioactives.

- principe du kit DIG DNA labeling and detection (Boehringer) :

La digoxigénine (DIG) est un haptène artificiel qui se lie aux nucléotides d'uridine (DIG-UTP) par un bras-intercalaire. Elle est incorporée par l'intermédiaire d'une enzyme dans les sondes nucléiques (marquage au hasard) (Fig. 9). L'hybridation s'effectue à 42°C. L'ajout ultérieur d'Anticorps Anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline permettra de détecter la sonde.

Deux systèmes de révélation sont possibles à ce niveau : l'enzyme peut soit catalyser une réaction colorée en utilisant comme substrats le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-Phosphate) et un sel de tétrazolium (NBT), soit déphosphoryler le substrat chimioluminescent AMPPD dont la décomposition créera un intermédiaire instable qui émettra un rayonnement.

2.7.4. Préhybridations, hybridations, lavages et autoradiographies

2.7.4.1. Marquage radioactif

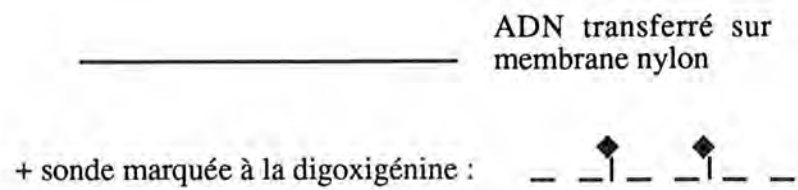
La préhybridation est réalisée à 42°C en présence d'une solution de 6x SSC, 5x Denhardt's (5g de Ficoll Type 400, 5g de polyvinylpyrrolidone, 5g de sérum albumine bovine fraction V; Sambrook *et al.*, 1989), 0,5% SDS, 50% formamide, et d'ADN de sperme de saumon (200 mg.ml⁻¹). L'hybridation est réalisée pendant une nuit dans les mêmes conditions après addition de la sonde marquée. Les étapes de lavage sont : 2 lavages de 15 minutes dans une solution de 2x SSC-0,1% SDS à température ambiante, 3 lavages de 40 minutes dans une solution de 0,1x SSC-0,1% SDS à la température désirée (50 °C pour la sonde ribosomique hétérologue, 65 °C pour des sondes homologues) et 2 rinçages dans une solution de 0,1x SSC.

L'exposition des films (Amersham, Hyperfilm MP) est réalisée à -70°C en présence d'écrans amplificateurs sans que la membrane n'ait été séchée afin de pouvoir permettre une déshybridation ultérieure.

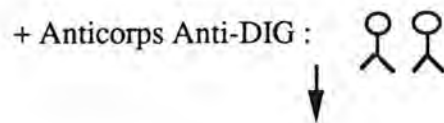
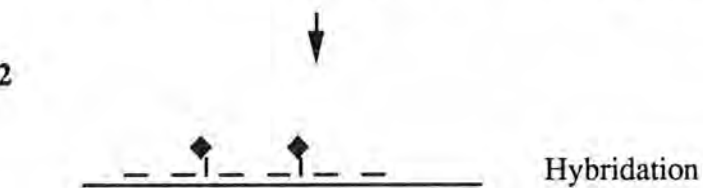
2.7.4.2. Marquage "froid"

La préhybridation est réalisée également à 42° C en présence d'une solution de formamide 50 %, 5x SSC, agent bloquant 5 %, N-lauroylsarcosine 0,1 % et SDS 0,02 %. L'hybridation est réalisée pendant une nuit dans les mêmes conditions après addition de la sonde marquée. Les étapes de lavages sont : 2 lavages de 5 minutes dans une solution de 2x

Etape 1



Etape 2



Etape 3

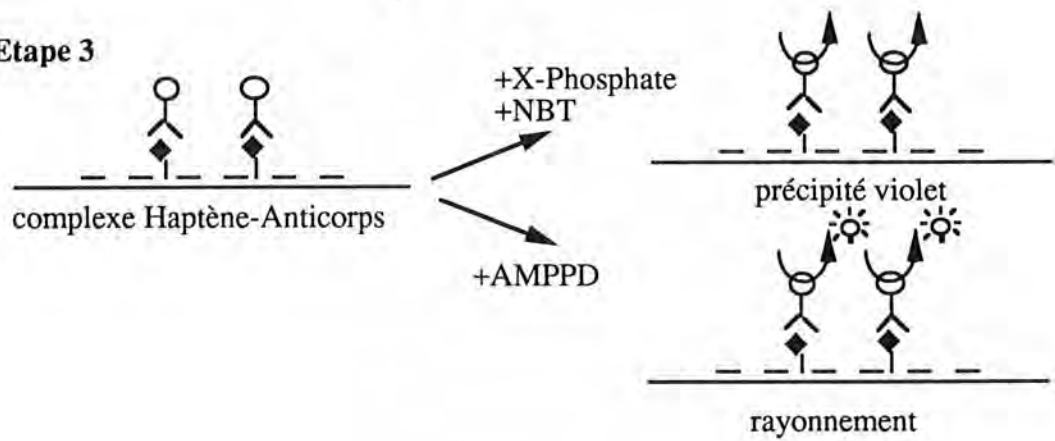


Fig. 9 : Schéma du principe de marquage du système DIG

SSC-0,1% SDS à température ambiante, suivis de 2 lavages de 15 minutes dans une solution de 0,1x SSC-0,1% SDS à 68°C.

Les étapes de révélation schématisées sur la figure 9 sont effectuées selon les indications du fournisseur.

2.7.5. Déshybridation des membranes

Le marquage radioactif est éliminé par incubation de la membrane 45 minutes à température ambiante dans une solution de NaOH 0,4M, puis 45 minutes à 45 °C dans une solution de 0,1x SSC, SDS 0,1 %, Tris-HCl 0,2 M pH 8.

Le marquage froid est éliminé par incubation de la membrane 1 heure à 75 °C, dans une solution contenant 60 % de formamide, 50 mM de Tris-HCl pH 8 et 1 % de SDS.

2.8. SEQUENÇAGE

Le kit Sequenase USB Version 2,0 a été choisi en raison d'un pourcentage de l'ADN en G+C moyen pour le genre *Bifidobacterium* (58 % pour l'espèce *B. longum*).

Les ADN plasmidiques sont préalablement dénaturés par la soude selon les indications du fournisseur. Les amorces utilisées dans les deux cas sont T3 et T7 (Stratagene). Elles s'apparient de part et d'autre des sites de clonages utilisés (*Bam*HI, *Eco*RV et *Cla*I) et par conséquent permettent de lire une séquence du plasmide pBluescript KS⁺ en amont de la séquence insérée et le début de chaque insert dans le sens 5'→3'. La lecture est donc possible sur les deux brins (Fig. 8). Ces amorces remplissent en outre les conditions qui permettent une sélection optimale du site de fixation :

- un contenu en G+C de 40 à 60%,
- une longueur généralement de 18 nucléotides.

Ceci permet d'obtenir une bonne stabilité des séquences appariées et de défavoriser les appariements sur des séquences partiellement homologues.

A partir des séquences déterminées en utilisant ces différentes amorces, quatre oligonucléotides de 17 nucléotides complémentaires d'une région de L6/45 ont été synthétisés et utilisés comme amorces dans les réactions de séquençage. Leurs séquences sont les suivantes :

- O45.1 : 5'-TAC-CGC-AAG-TCC-ATC-A-(G)-3'
- O45.2 : 5'-TTC-CGG-CAC-GGC-AGC-A-(C)-3'
- O45.3 : 5'-CCT-CAC-GTG-GCT-GGA-A-(T)-3'
- O45.4 : 5'-GGC-ACG-GTC-AAC-GGA-T-(T)-3'

Le kit tacq track (Promega, U.S.A) a été utilisé pour lire la séquence amorcée avec O45.4. En effet, la présence de nombreuses bases G-C ont rendu la lecture avec l'autre enzyme

difficile, créant de nombreuses pauses. La localisation de ces amorces sera indiquée sur les figures présentant les séquences correspondantes.

3. RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN POLYMORPHISME GENOMIQUE PAR L'ETUDE DES PROFILS DE RESTRICTION

3.1.1. Etude des souches de collection

L'ADN total de 28 souches de collection a été digéré par l'endonucléase de restriction *Bam*HI. Les figures 10 et 11A présentent les profils de restriction obtenus pour 24 de ces souches. Cette enzyme, à site de coupure hexanucléotidique (G/GATCC), génère de nombreux fragments dont la taille varie de 0,5 à 23 kb environ. L'analyse des profils montre qu'à une exception près, chacune des souches présente un profil de restriction spécifique ("fingerprint"), facilement identifiable. Chaque souche peut être notamment distinguée par ses bandes de plus haut poids moléculaire. On remarque en outre qu'il existe une certaine ressemblance au niveau des bandes de faible poids moléculaire entre profils de souches appartenant à la même espèce. Une très forte ressemblance de profils est cependant observée pour deux souches appartenant à des espèces différentes. Il s'agit des souches *B. indicum* ATCC25912^T et *B. infantis* ATCC15697^T. En fait, quel que soit le profil considéré (*Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RI, *Eco*RV ou *Hind*III), les profils de restriction se sont révélés identiques, à une bande supplémentaire près observée sur les profils *Bam*HI, *Eco*RI et *Eco*RV de la souche *B. infantis* ATCC15697^T (Fig. 12). La souche *B. indicum* ATCC25912^T a alors été réextraite à partir de la solution-mère provenant de la dilution du lyophilisat. Les profils obtenus avec ce nouvel ADN sont les mêmes que précédemment. De même, les profils de la souche *B. infantis* ATCC15697^T sont identiques à ceux de la souche *B. infantis* CIP64.67T, synonyme dans une autre collection (résultats non montrés). En conclusion, les 2 souches présentent des génotypes extrêmement proches, et ceci est en contradiction avec les données bibliographiques. Selon Lauer et Kandler (1983) notamment, l'hybridation ADN-ADN n'a révélé que 18% d'identité entre ces deux souches. De même, le type de muréine composant leur paroi est différent (Lauer et Kandler, 1983). En outre, ces deux souches appartiennent à des groupes antigéniques différents (Sgorbati et London, 1982a). Il pourrait donc s'agir d'une erreur de la collection ATCC. Ces résultats ont été confirmés par Roy et Ward (communication orale) qui ne détectent aucune différence entre leurs profils d'ADN en champs pulsés. De même, Yang et Woese (1990) observent seulement trois différences lorsqu'ils comparent la séquence des gènes codant l'ARNr 16S de ces deux souches.

L'ADN de 4 souches n'a pu être clivé par l'endonucléase de restriction *Bam*HI. Il s'agit des souches *B. adolescentis* CIP64.59T, *B. adolescentis* CIP64.61, *B. thermophilum* ATCC25525^T et *B. suis* CIP103377T. L'absence de coupure pourrait résulter de la sensibilité de l'enzyme *Bam*HI au groupement méthyl (*) situé sur l'un des résidus cytosines du site de

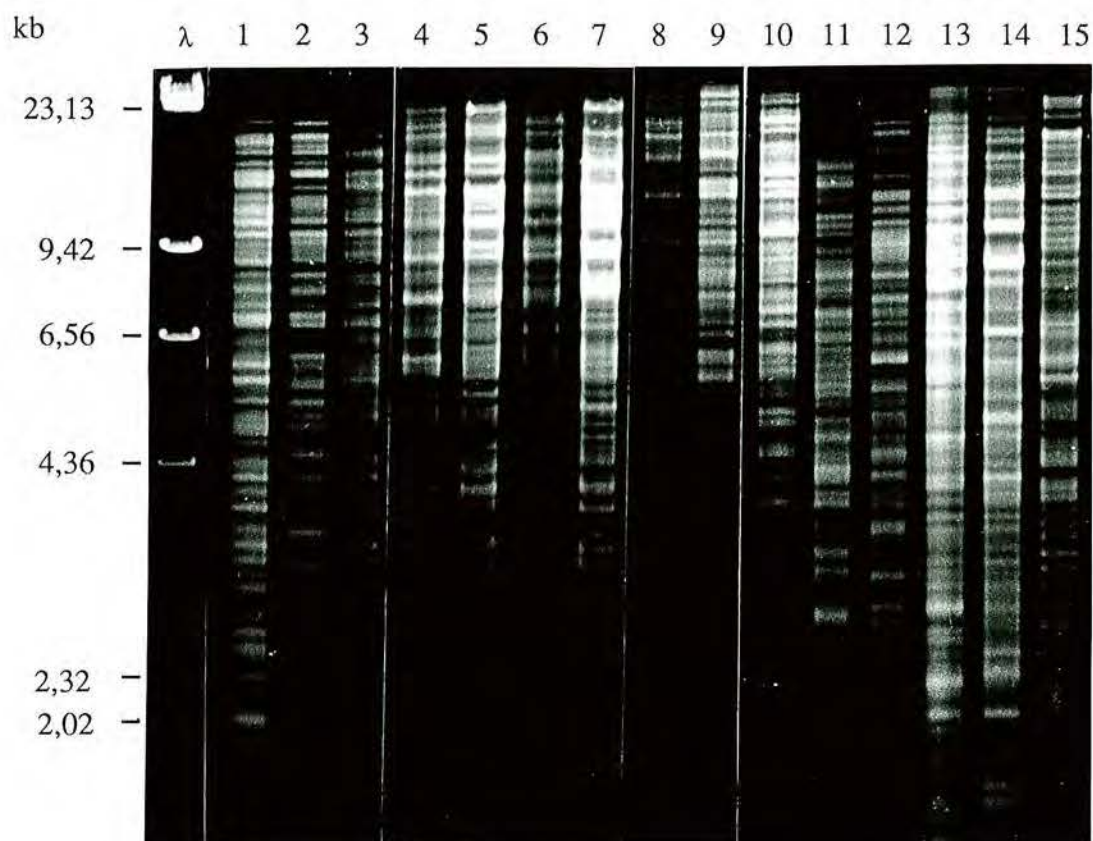


Figure 10 : profils de restriction *Bam*HI de l'ADN de souches de *Bifidobacterium*.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 1 : *B. bifidum* CIP56.7T; piste 2 : *B. bifidum* CIP64.64; piste 3 : *B. bifidum* CIP64.65; piste 4 : *B. breve* ATCC15698; piste 5 : *B. breve* CIP64.68; piste 6 : *B. breve* CIP64.69T; piste 7 : *B. breve* CIP64.70; piste 8 : *B. longum* ATCC15708; piste 9 : *B. longum* ATCC15707T; piste 10 : *B. infantis* ATCC15697T; piste 11 : *B. infantis* ATCC25962; piste 12 : *B. infantis* CIP63.78; piste 13 : *B. adolescentis* CIP64.58; piste 14 : *B. adolescentis* CIP64.60; piste 15 : *B. animalis* ATCC25527T.

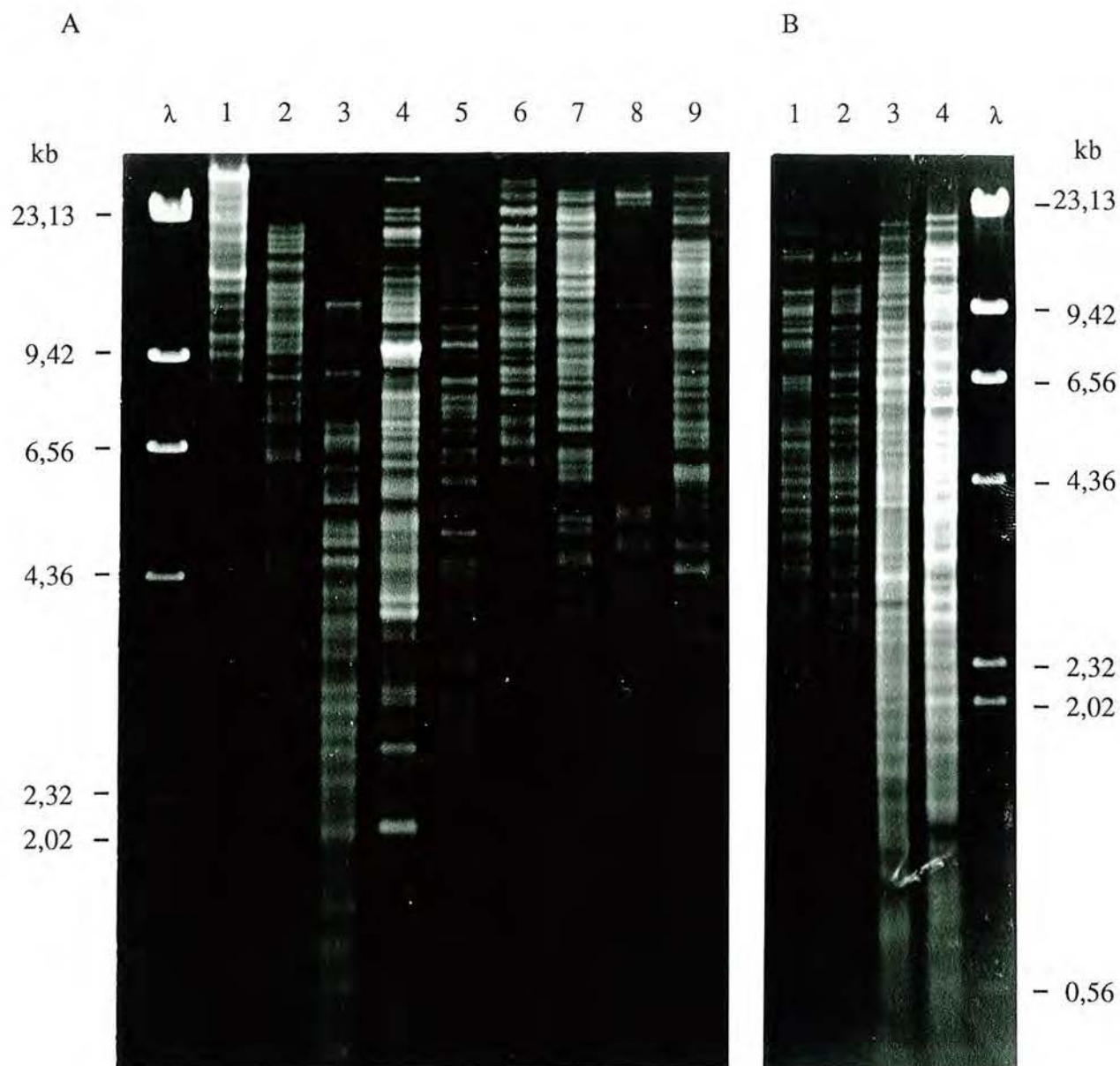


Fig. 11.

A. Profils de restriction *Bam*HI de l'ADN de souches de *Bifidobacterium*.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 1 : *B. adolescentis* ATCC11146; piste 2 : *B. angulatum* ATCC27535T; piste 3 : *B. asteroïdes* ATCC25910T; piste 4 : *B. catenulatum* ATCC27539T; piste 5 : *B. coryneforme* ATCC25911T; piste 6 : *B. globosum* ATCC25865T; piste 7 : *B. indicum* ATCC25912T; piste 8 : *B. magnum* ATCC27540T; piste 9 : *B. pseudolongum* ATCC25526T.

B. Profils de restriction *Pvu*II des 4 souches de *Bifidobacterium* dont l'ADN n'est pas clivable par *Bam*HI.

Piste 1 : *B. adolescentis* CIP64.59T; piste 2 : *B. adolescentis* CIP64.61; piste 3 : *B. thermophilum* ATCC25525T; piste 4 : *B. suis* CIP103377T; piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III.

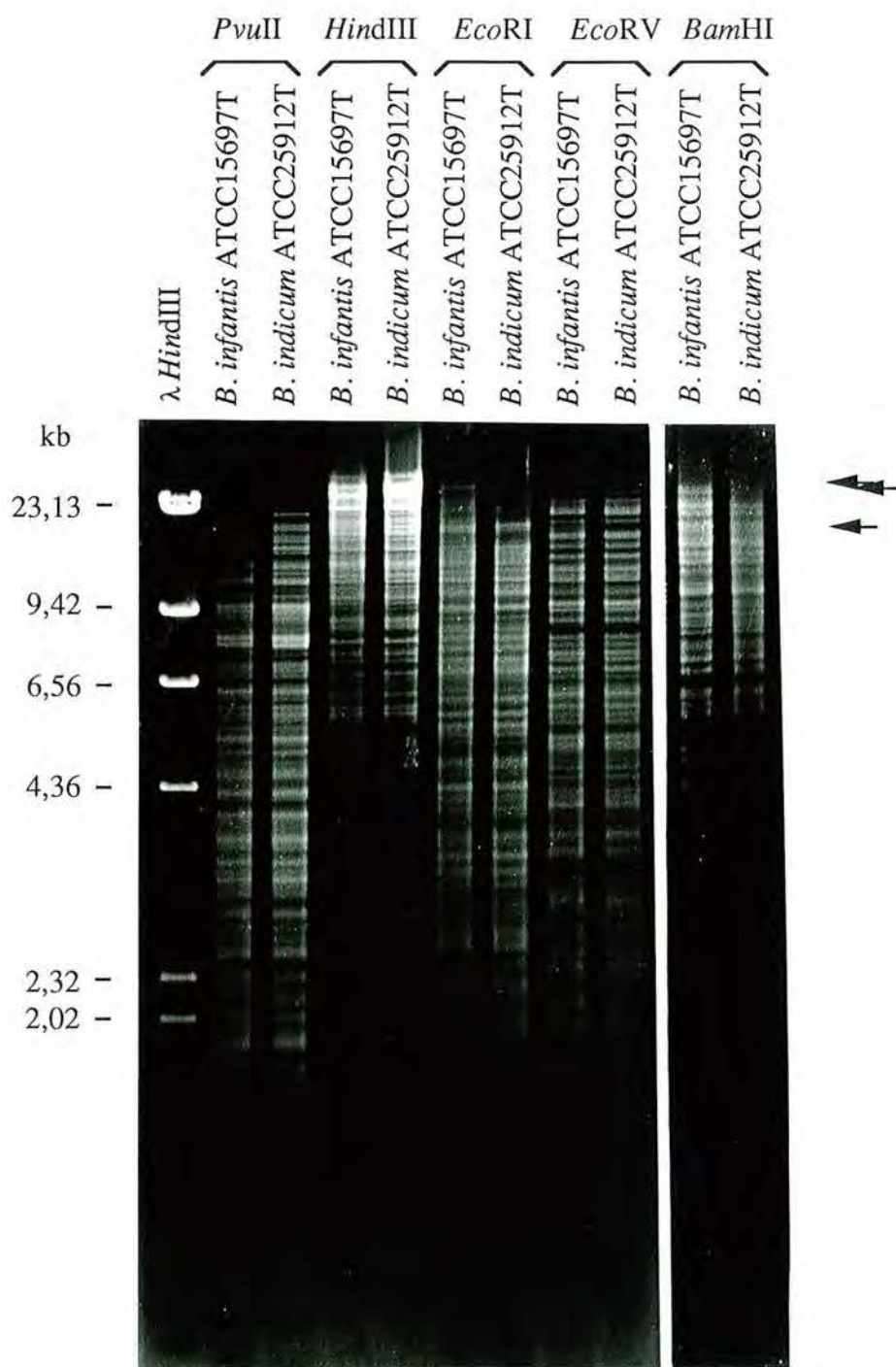


Fig. 12 : Profils de restriction *Pvu*II, *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV et *Bam*HI des souches de collection *B. infantis* ATCC15697T et *B. indicum* ATCC25912T.

▲ bandes supplémentaires observées sur les profils *Eco*RI, *Eco*RV et *Bam*HI de la souche *B. infantis* ATCC15697T.

reconnaissance GGATC*C de l'ADN de ces souches. Cette hypothèse est confirmée par le fait que ces 4 ADN n'ont pas pu être clivés par l'enzyme de restriction *Bgl*III (AGATC*T), également sensible aux méthylations, alors qu'ils le sont par *Bcl*II (TGATC*A), non sensible aux méthylations de l'ADN. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'un résidu de 5-méthylcytosine dans les sites de reconnaissance des enzymes *Bam*HI et *Bgl*III (Kessler *et al.*, 1985). L'identification de ces souches a néanmoins pu être réalisée avec d'autres profils de restriction que *Bam*HI, et notamment *Pvu*II (Fig. 11B).

3.1.2. Etude des souches d'origine industrielle

L'ADN de 14 souches industrielles a été digéré par les deux endonucléases de restriction *Bam*HI et *Pvu*II. Les résultats sont présentés sur les figures 13 à 17. La situation concernant ces souches est différente de celles de collection : nous n'observons que 4 types de profils de restriction pour 14 souches. En effet, 9 souches présentent le même profil de restriction quelle que soit l'enzyme utilisée. Il s'agit des souches BO, BOSR, BB11, BB12, BF1, C2, Bf. P, Bf. G, et Bf. C (Fig. 13 et 14). D'autres profils ont été réalisés pour les 6 premières de ces souches. Leur ADN a été notamment digéré par *Bcl*II, *Eco*RV, *Xho*I, *Sma*I, *Apa*I, *Cfo*I ou *Hpa*II (résultats non montrés). Cependant, il n'a pas été possible de discerner de différences entre elles. Or, d'après les informations fournies par les industriels, certaines de ces souches présentent des propriétés physiologiques ou technologiques distinctes. Ce polymorphisme de caractère pourrait s'expliquer par l'existence de mutations ponctuelles non décelables par RFLP, modifiant par exemple le site actif d'une enzyme, la rendant ainsi plus performante. Si cette mutation ponctuelle ne modifie pas de site de restriction connu ou utilisé, la réalisation de profils de restriction ne pourra pas la mettre en évidence. Par contre, on sait que BOSR dérive de BO et que Bf. P, Bf. G et Bf. C proviennent d'une même culture initiale. Cela explique que leurs profils de restriction se ressemblent. Pour BOSR, il faudrait trouver l'enzyme qui reconnaisse les points de mutation ponctuelle liés aux deux résistances sélectionnées. L'hypothèse de départ était que ces souches pouvaient appartenir à l'espèce *B. bifidum* (BO, BOSR, BB12) ou *B. infantis* (Bf. P, Bf. G, et Bf. C). Néanmoins, les profils de restriction de ces 9 souches ne ressemblent à aucun de ceux des souches de collection présentées dans le paragraphe 3.1.1.

Un deuxième type de profils de restriction est observé pour les deux souches industrielles BB42 et BL2 (Fig. 13 et 15). Les profils de restriction *Bam*HI de ces deux souches sont non seulement identiques entre eux, mais ils sont aussi identiques au profil de restriction *Bam*HI de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. Cependant, on distingue une bande supplémentaire sur le profil de restriction *Pvu*II de ces deux souches vers 16 kb, par rapport à celui de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T (Fig. 15). Les digestions ayant été réalisées plusieurs fois, en présence d'un excès d'enzyme, on peut en principe écarter l'idée d'une digestion incomplète. Les souches BB42 et BL2 possèdent donc

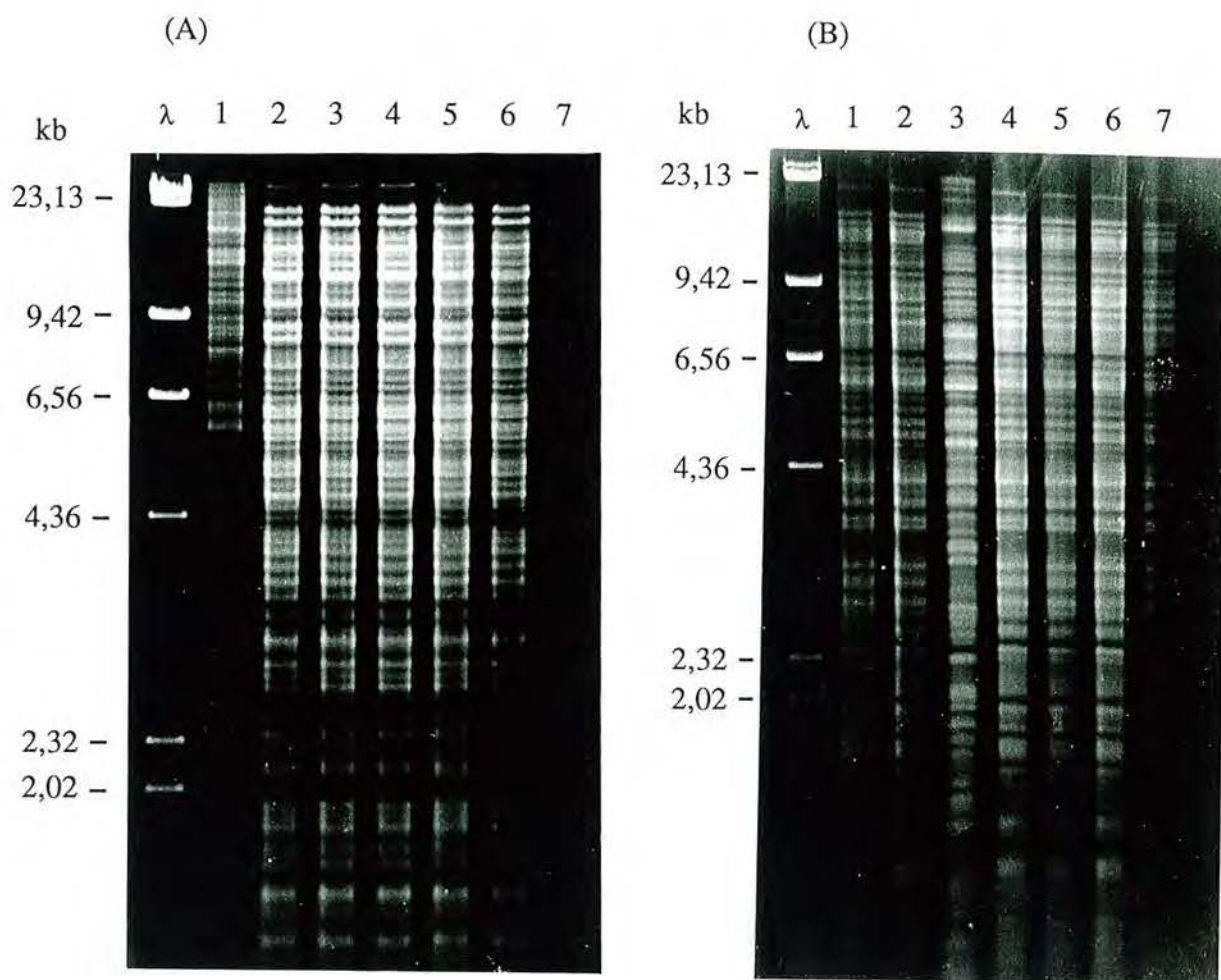


Fig. 13: Profils de restriction *Bam*HI (A) et *Pvu*II (B) de l'ADN de souches industrielles. Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; pistes 1A et 3B : BB42; pistes 2A et 1B : BO; pistes 3A et 2B : BOSR; pistes 4 (A et B) : BB11; pistes 5 (A et B) : BB12; pistes 6 (A et B) : BF1; pistes 7 (A et B) : C2.

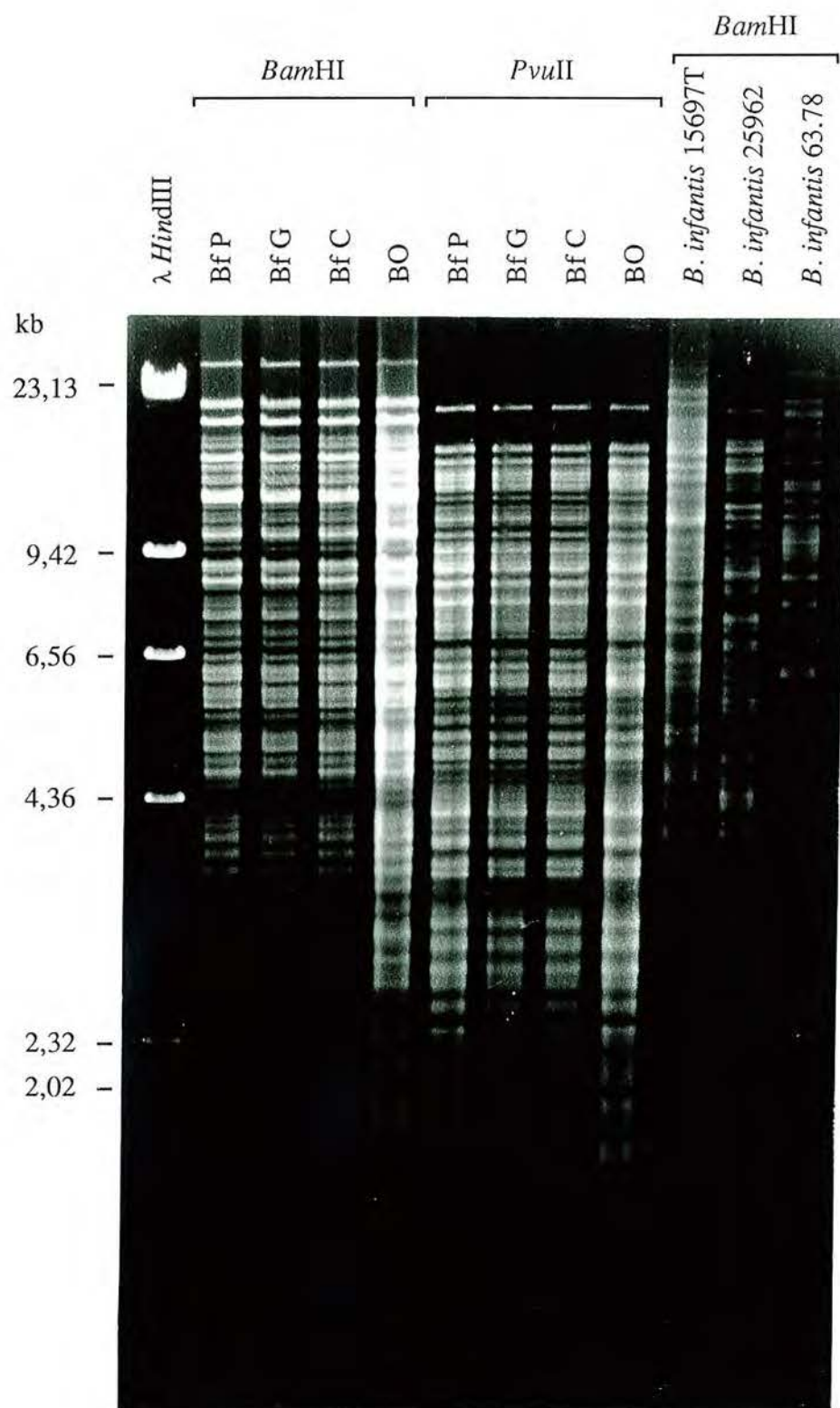


Fig. 14 : Profils de restriction *Bam*HI et *Pvu*II des souches industrielles Bf. P, Bf. G, Bf. C et BO. Profils de restriction *Bam*HI des souches de collection de l'espèce *B. infantis*.

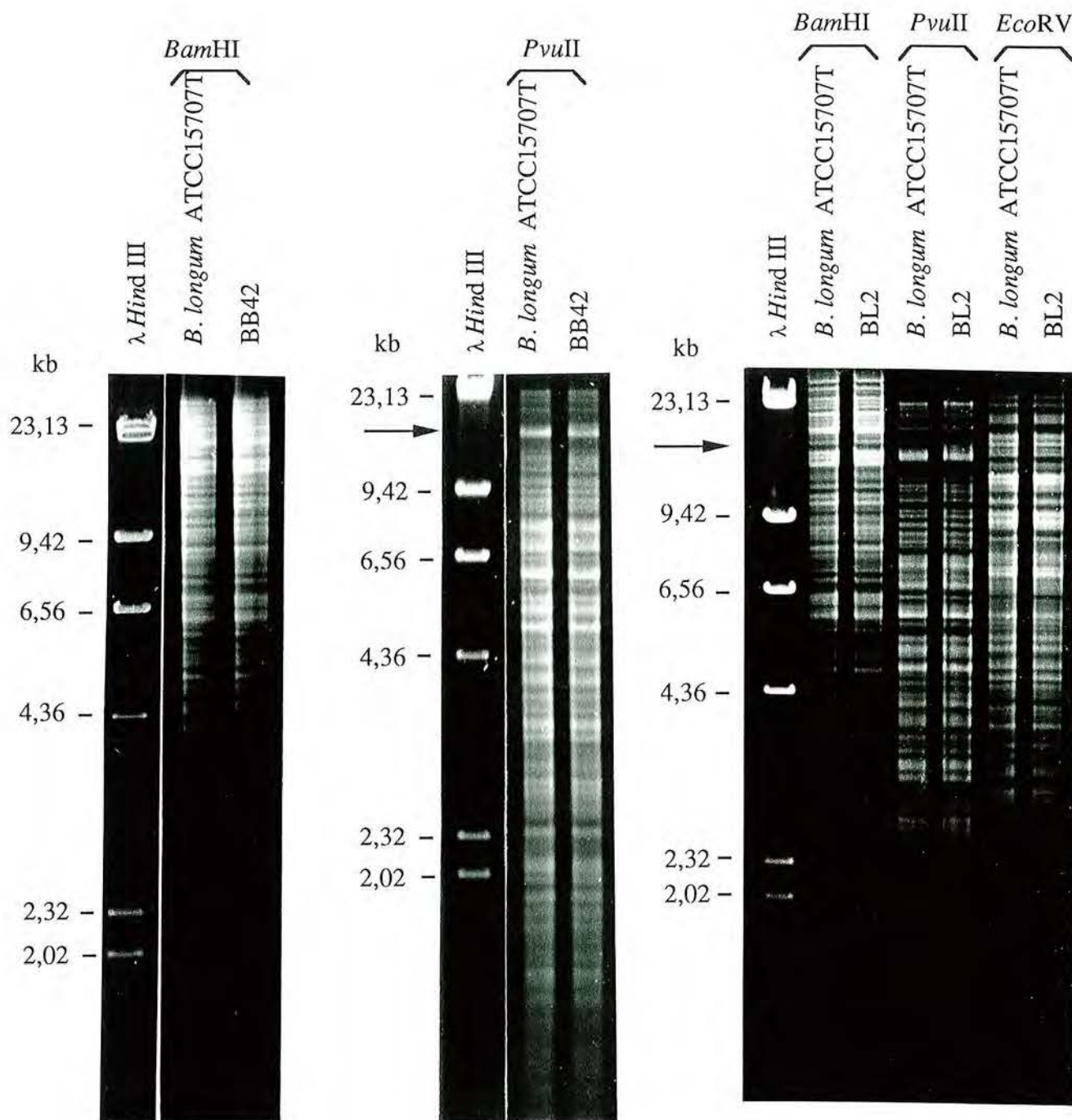


Fig. 15 : A. Profils de restriction *Bam*HI et *Pvu*II de la souche de collection *B. longum* ATCC15707T et de la souche industrielle BB42.

B. Profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV de la souche de collection *B. longum* ATCC15707T et de la souche industrielle BL2.

← bande supplémentaire sur le profil de restriction *Pvu*II des souches BB42 et BL2

un génotype extrêmement proche, voire identique. De même, leur génotype est extrêmement proche de celui de la souche *B. longum* ATCC15707^T. Les souches BB42 et BL2 peuvent donc être considérées comme des variants de cette souche de collection.

Un troisième type de profils de restriction est observé pour la souche industrielle C4 (Fig. 16). On constate que l'ensemble des profils *Bam*HI de la totalité des souches de référence diffèrent de celui de C4 à l'exception du profil de la souche *B. infantis* ATCC25962 qui lui ressemble énormément. Une co-migration des deux ADN a alors été réalisée. Aucune différence n'est décelable sur le profil *Bam*HI. Il en est de même quand on compare les profils de restriction *Eco*RV, *Hind*III et *Bgl*II des deux souches (Fig. 16). Cependant, les profils sont distinguables avec l'enzyme de restriction *Pvu*II au niveau d'une bande de 17 kb sur le profil de C4 et de 20 kb sur celui de *B. infantis* ATCC25962 (Fig. 16). La souche C4 présente donc un génotype extrêmement proche de celui de la souche *B. infantis* ATCC25962 et peut donc être considérée comme un variant de celle-ci.

Le quatrième type de profils de restriction observé correspond aux souches industrielles C4A et C4Bh (Fig. 17). Aucune différence n'est détectée entre les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV de ces deux souches (mais C4Bh dérive de C4A). De plus, ces profils ne correspondent à aucun de ceux des souches de collection ou d'origine industrielle. Néanmoins, on note une "certaine" ressemblance entre ces profils de restriction et ceux appartenant aux deux souches de collection de l'espèce *B. longum* : ATCC15708 et CIP64.62^T. Une co-migration des ADN des 2 souches de collection *B. longum* avec ceux des souches C4A et C4Bh a alors été réalisée sur les digestions citées précédemment (Fig. 17). On remarque en effet des ressemblances (groupes de bandes communes) entre les profils, surtout dans la région inférieure à 4 kb. L'appartenance de ces deux souches à l'espèce *B. longum* sera confirmée ultérieurement.

Ainsi, la réalisation de profils de restriction de l'ADN a permis de mettre en évidence l'existence d'un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) aussi bien intraspécifique, qu'interspécifique chez le genre *Bifidobacterium*. Ce RFLP permet de caractériser très finement chaque souche et parfois même de procéder à des regroupements de souches voire à des identifications non ambiguës.

3.1.3. Application de la méthode à une expérience clinique

Cette méthode, alliée à celle du ribotypage, a été utilisée dans le cadre d'une expérience sur la flore intestinale humaine. Il s'agissait de suivre les populations de Bifidobactéries au cours du temps, avant, pendant et après l'ingestion d'antibiotiques ayant pour but de déséquilibrer l'écosystème bactérien intestinal. Ainsi, l'effet de barrière provoqué par les bactéries anaérobies de la flore colique n'ayant plus lieu, l'implantation d'une souche

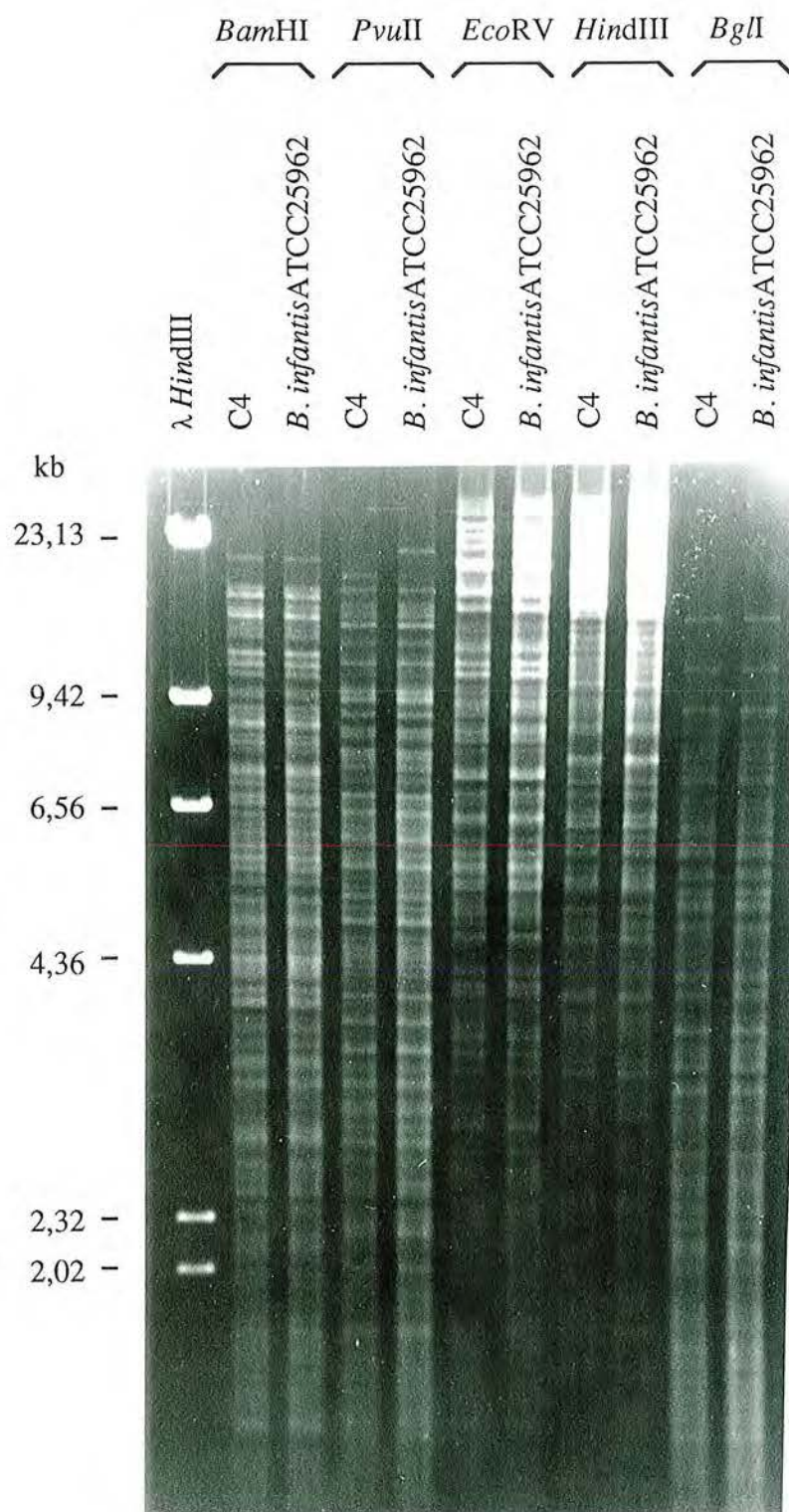


Fig. 16 : Profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RV, *Hind*III et *Bgl*I de la souche de collection *B. infantis* ATCC25962 et de la souche industrielle C4.

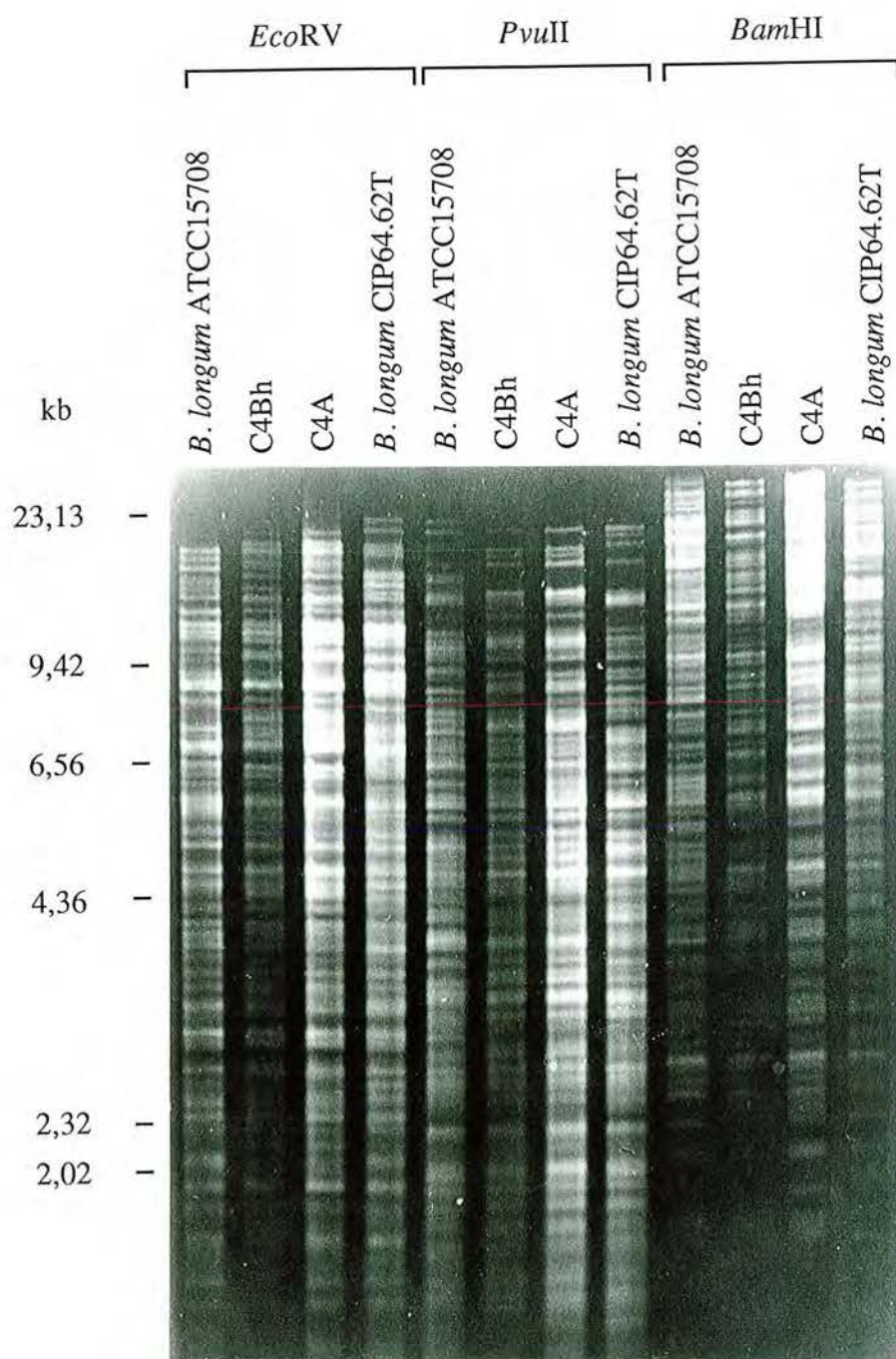


Fig. 17 : Profils de restriction *EcoRV*, *PvuII* et *BamHI* des souches de collection de l'espèce *B. longum* et des souches industrielles C4A et C4Bh.

sélectionnée de *Bifidobacterium* résistante à ces antibiotiques (BOSR) et rejetée en temps normal, devient possible. Cette expérience est décrite en détails dans la publication n°1. L'ensemble des 121 souches prélevées à partir de la microflore intestinale de cinq volontaires sains, peut se regrouper en 15 types de profils de restriction (Tableau 12). La figure 18 présente 11 des 15 profils de restriction caractéristiques retrouvés au cours de cette étude, ainsi que celui de la souche exogène ingérée BOSR. Chaque souche est désignée par son numéro de groupe, suivi d'un numéro d'apparition dans le cas où elle n'en est pas l'unique représentante. L'ADN des souches représentatives des groupes CE8 et CE11 n'étant pas hydrolysable par l'enzyme *Bam*HI, les deux profils présentés correspondent à une digestion *Pvu*II. La figure 19 montre les profils d'ADN natif de certaines de ces souches, mettant en évidence de nombreux plasmides pour les souches représentatives des groupes CE1, CE3, CE4, CE6, CE9 et CE10. La présence de ces plasmides explique que des fragments d'ADN apparaissent parfois plus intenses au niveau du profil de restriction de ces souches.

Le profil de restriction de la souche exogène BOSR se distinguant facilement de ceux des souches endogènes, il a été possible de suivre sur ce critère et de façon non ambiguë le devenir de cette souche. La totalité des résultats de l'étude sera détaillée dans le chapitre suivant.

Groupe	Nombre de souches isolées
CE1	12
CE2	1
CE3	34
CE4	4
CE5	2
CE6	2
CE7	4
CE8	30
CE9	1
CE10	1
CE11	1
CE12	1
CE13	1
CE14	5
CE15	2
BOSR	20

Tableau 12 : Regroupement des souches isolées de la flore intestinale humaine en fonction de leurs profils de restriction.

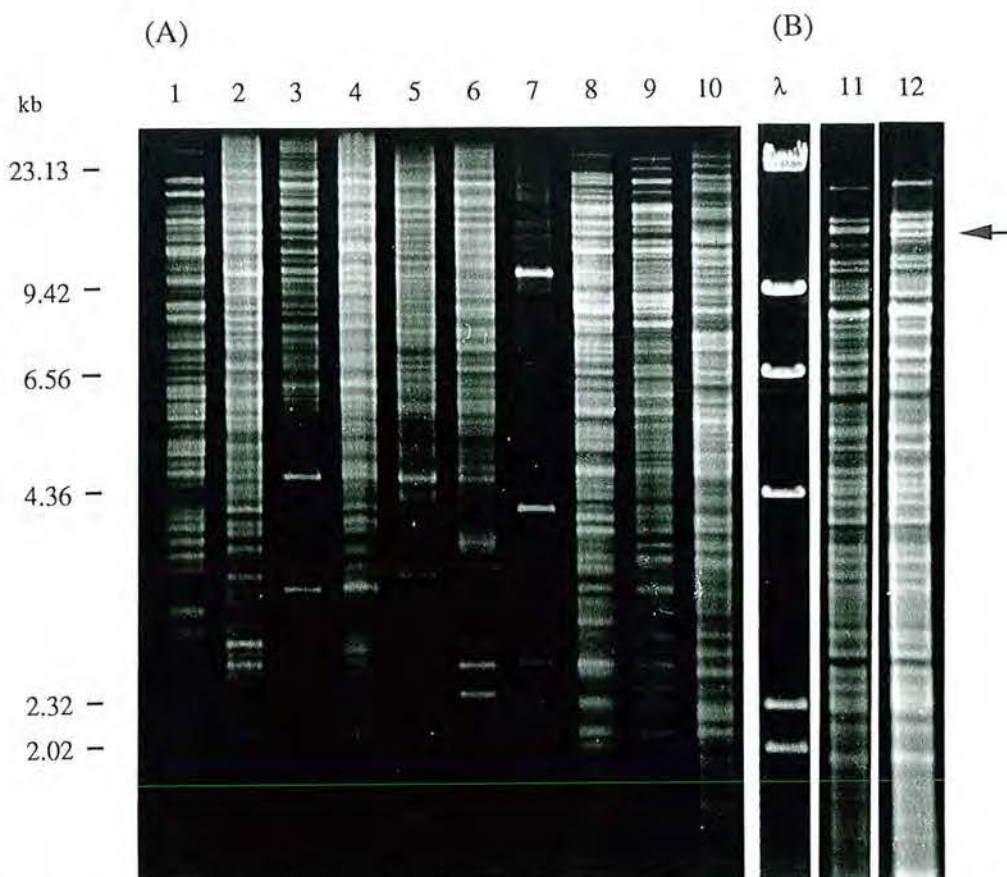


Fig. 18 : Profils de restriction *Bam*HI (A) et *Pvu*II (B) de l'ADN de 11 des souches représentatives de l'expérience clinique.
 Piste 1 : souche exogène BOSR; piste 2 : CE1-1; piste 3 : CE3-7; piste 4 : CE4-3; piste 5 : CE6-1; piste 6 : CE9; piste 7 : CE10; piste 8 : CE2; piste 9 : CE7-1; piste 10 : CE5-1; piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 11 : CE8-7; piste 12 : CE11.
 ← bande supplémentaire observée sur le profil de la souche CE11 par rapport à celui de la souche CE8-7.

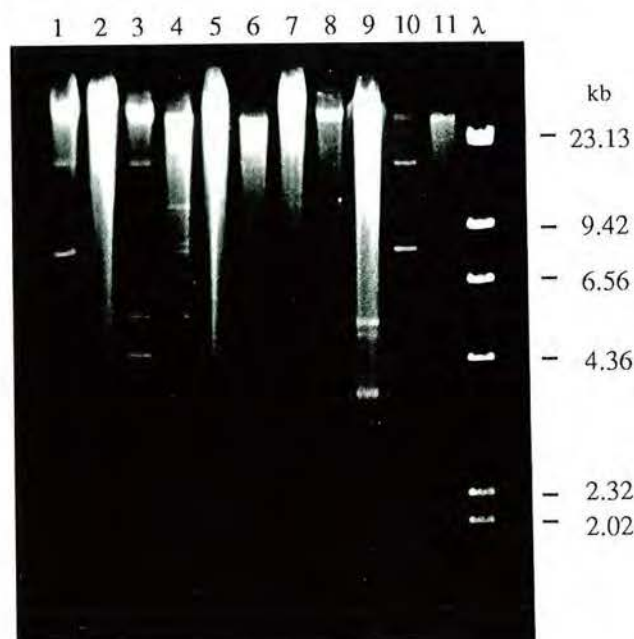


Fig. 19 : Profils des ADN natifs de 11 des 15 souches représentatives provenant de l'expérience clinique.
 Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 1 : CE1-1; piste 2 : CE2; piste 3 : CE3-7; piste 4 : CE4-3; piste 5 : CE5-1; piste 6 : CE6-1; piste 7 : CE7-1; piste 8 : CE8-7; piste 9 : CE9; piste 10 : CE10; piste 11 : CE11.

3.2. MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UN POLYMORPHISME GENOMIQUE PAR L'ETUDE DES RIBOTYPES

Une observation simplifiée du polymorphisme peut être réalisée par l'utilisation d'une sonde nucléique spécifique d'un ou plusieurs fragments génomiques. Cette sonde devrait permettre une comparaison plus rapide des souches.

Dans ce chapitre, nous étudierons la possibilité d'une caractérisation des souches du genre *Bifidobacterium* par une sonde ribosomique. Cette méthode, appelée ribotypage, consiste à hybrider l'ADN d'une souche après coupure par des enzymes de restriction et électrophorèse, avec une sonde nucléique révélant les opérons ribosomiques. Le fragment hétérologue I41 (Pébay *et al.*, 1991), partie d'un locus *rrn* de *Streptococcus thermophilus* (Fig. 20) a été utilisé comme sonde sur des profils de restriction *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III et *Pvu*II de différentes souches du laboratoire : les souches de collection, des souches industrielles ainsi que sur la plupart des isolats provenant de l'expérience clinique.

3.2.1. Ribotypage de souches de collection

L'hybridation de la sonde ribosomique I41 sur l'ADN digéré par l'enzyme *Bam*HI de 28 souches de collection, a mis en évidence 21 types de profils distincts. Ces profils sont désignés par les lettres B₁ à B₂₁ (Fig. 21; Tableau 13). En effet, les 4 ADN non clivés par *Bam*HI décrits dans le paragraphe précédent, n'ont de ce fait pu donner de profil ribosomique pour cette digestion. De plus, le ribotype *Bam*HI de la souche *B. indicum* ATCC25912^T s'est révélé identique à celui de la souche *B. infantis* ATCC15697^T, ce qui confirme les résultats obtenus avec les profils de restriction sur la très grande proximité génétique de ces deux souches (3.1.1). En outre, 3 souches de l'espèce *B. breve* possèdent le même ribotype *Bam*HI alors que leurs fingerprints sont visiblement différents.

Des similarités (bandes d'hybridation communes) entre ribotypes de souches appartenant à une même espèce sont observées. Comme avec les profils de restriction, mais de façon plus évidente, ces bandes ribosomiques communes permettent de regrouper les souches d'une même espèce. Ainsi, 2 souches de l'espèce *B. adolescentis* partagent 2 bandes ribosomiques communes sur 4; les souches de l'espèce *B. bifidum* en partagent 2 sur 2 ou 3 selon les souches; les souches de l'espèce *B. breve* en partagent 2 ou 3 sur 3; les souches de l'espèce *B. longum* en partagent 3 sur 4. La seule exception concerne les souches classées dans l'espèce *B. infantis*. En effet, ces souches ne partagent aucune bande ribosomique commune.

L'hybridation de la sonde ribosomique sur les profils de restriction *Eco*RV des 28 souches de collection a mis en évidence 23 types de profils distincts (E₁ à E₂₃, Tableau 13). Ces profils sont présentés sur les figures 22 et 23. Trois des ribotypes manquants correspondent aux souches de l'espèces *B. breve* qui possèdent toutes le même profil

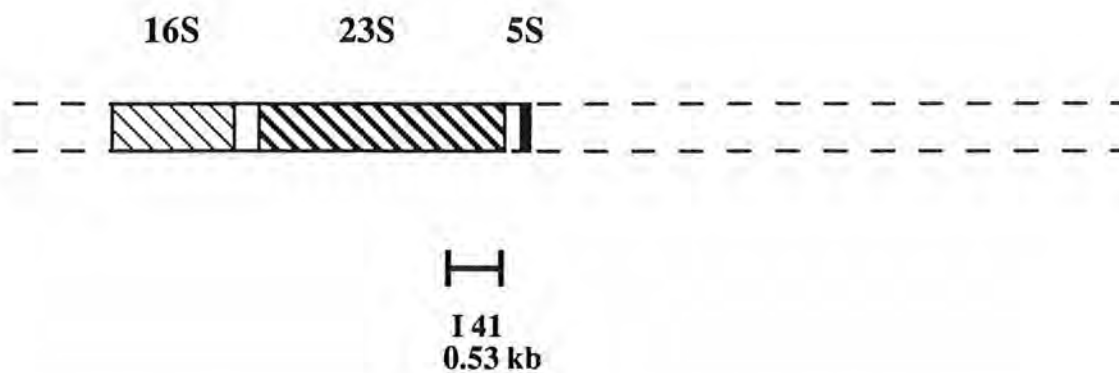


Figure 20. Carte de restriction d'un locus *rrn* de *S. thermophilus* et localisation de la sonde I41.

— : fragment d' ADN appartenant au locus *rrn*.

- - : fragment d' ADN externe au locus *rrn*.

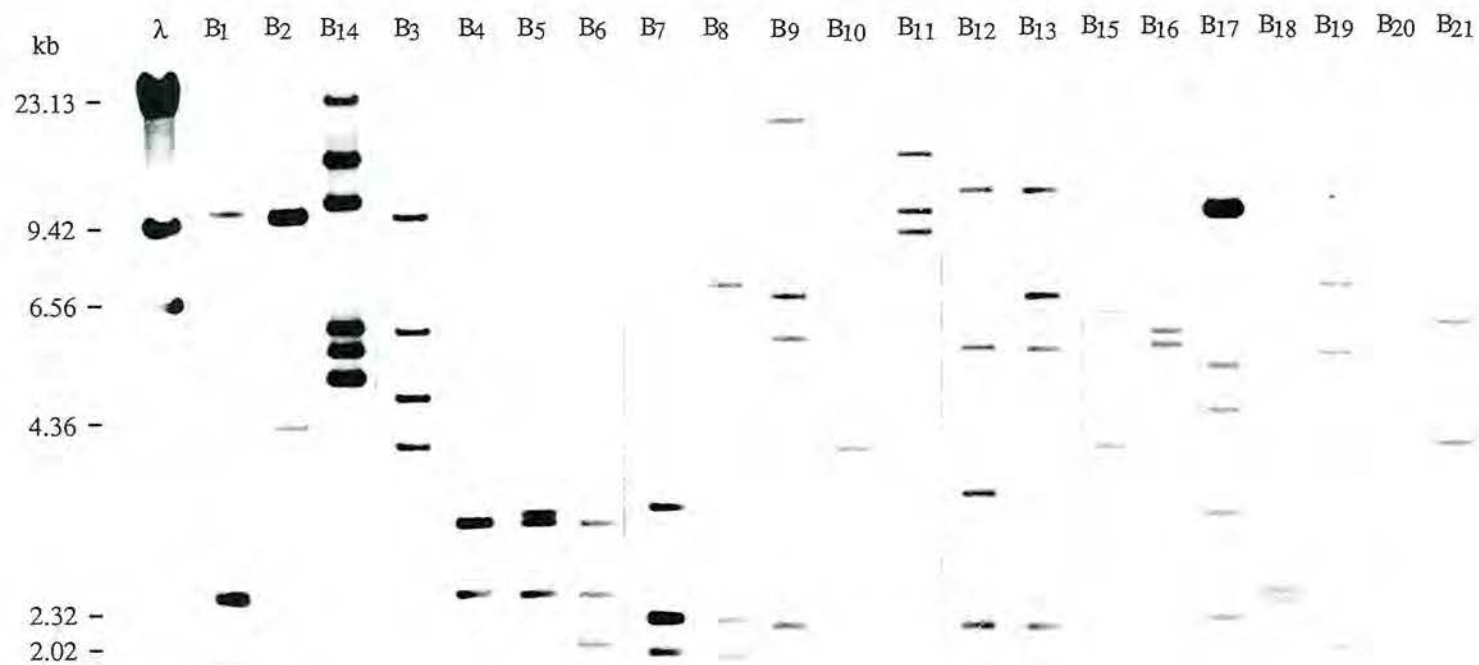


Fig. 21 : Profils ribosomiques obtenus après hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *Bam*HI de souches de collection.
 Les lettres correspondent aux profils ribosomiques rassemblés dans le Tableau 13.
 Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C.

Tableau 13: Classification des souches de collection basée sur leurs profils ribosomiques *Bam*HI, *Eco*RV et *Pvu*II.

Souches	Profils rib. <i>Bam</i> HI	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Eco</i> RV	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Pvu</i> II	Nombre de bandes ribosom.
<i>B. adolesc.</i> CIP64.58	B ₁	3*	E ₁	4	P ₁	2
<i>B. adolesc.</i> CIP64.59T	non clivé		E ₂	5	P ₂	3
<i>B. adolesc.</i> CIP64.60	B ₂	3*	E ₃	4*	P ₃	5
<i>B. adolesc.</i> CIP64.61	non clivé		E ₄	4	P ₄	4
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	B ₃	4	E ₅	4	P ₅	4
<i>B. bifidum</i> CIP56.7T	B ₄	2	E ₆	2	P ₆	2
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	B ₅	3	E ₇	3	P ₇	3
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	B ₆	3	E ₇	3	P ₈	2
<i>B. breve</i> ATCC15698	B ₇	3	E ₈	3	P ₉	2
<i>B. breve</i> CIP64.68	B ₈	3	E ₈	3	P ₁₀	2*
<i>B. breve</i> CIP64.69T	B ₈	3	E ₈	3	P ₁₁	2*
<i>B. breve</i> CIP64.70	B ₈	3	E ₈	3	P ₁₂	2*
<i>B. infantis</i> ATCC15697T <i>B. indicum</i> ATCC25912T	B ₉	4	E ₉	4	P ₁₃	3
<i>B. infantis</i> CIP63.78	B ₁₀	2	E ₁₀	3	P ₁₄	2
<i>B. infantis</i> ATCC25962	B ₁₁	3	E ₁₁	3	P ₁₅	3
<i>B. longum</i> CIP64.62T	B ₁₂	4	E ₁₂	4	P ₁₆	3
<i>B. longum</i> CIP64.63	B ₁₃	4	E ₁₃	4	P ₁₇	3
<i>B. suis</i> CIP103377T	non clivé		E ₁₄	4	P ₁₈	3*
<i>B. thermop.</i> ATCC25525T	non clivé		E ₁₅	3*	P ₁₉	4
<i>B. adolesc.</i> ATCC11146	B ₁₄	6	E ₁₆	5	non réalisé	
<i>B. angulat.</i> ATCC27535T	B ₁₅	3	E ₁₇	4	P ₂₀	4
<i>B. aster.</i> ATCC25910T	B ₁₆	2	E ₁₈	2	P ₂₁	2
<i>B. catenul.</i> ATCC27539T	B ₁₇	5*	E ₁₉	4*	P ₂₂	6*
<i>B. corynef.</i> ATCC25911T	B ₁₈	2	E ₂₀	2	P ₂₃	2
<i>B. globos.</i> ATCC25865T	B ₁₉	4	E ₂₁	4	P ₂₄	4
<i>B. magnum</i> ATCC27540T	B ₂₀	4	E ₂₂	5	P ₂₅	4
<i>B. pseudol.</i> ATCC25526T	B ₂₁	4	E ₂₃	4	P ₂₆	4

* I41 détecte un fragment dont l'intensité indique que la bande est au moins double.

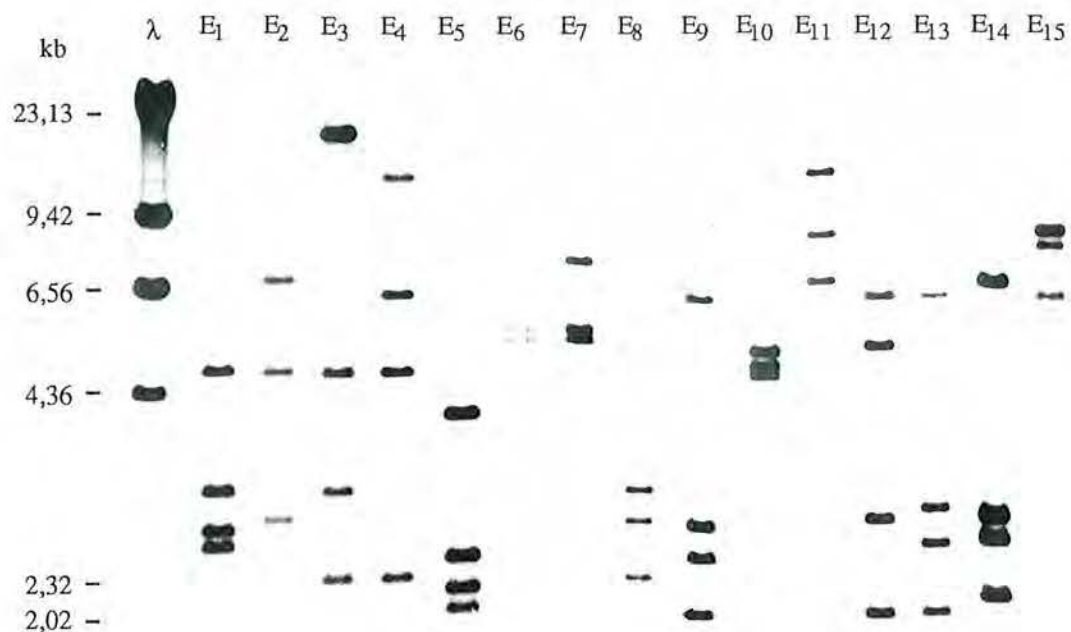


Fig. 22 : Profils ribosomiques obtenus après hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *EcoRV* de souches de *Bifidobacterium*.
Les lettres correspondent aux profils ribosomiques rassemblés dans le Tableau 13.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C.

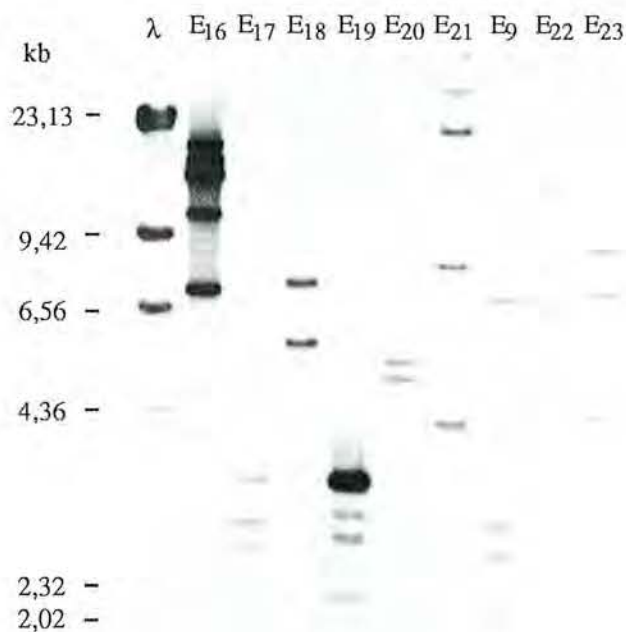


Fig. 23 : Profils ribosomiques obtenus après hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *PvuII* de souches de *Bifidobacterium*.
Les lettres correspondent aux profils ribosomiques rassemblés dans le Tableau 13.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 19h à température ambiante.

ribosomique *EcoRV* (E8) et ne sont donc pas différenciables pour cette digestion. De même, les souches *B. bifidum* CIP64.64 et CIP64.65 partagent le même profil ribosomique *EcoRV* (E7). Comme attendu, les ribotypes *EcoRV* des souches *B. indicum* ATCC25912^T et *B. infantis* ATCC15697^T sont identiques (résultats non montrés).

Les souches de l'espèce *B. breve* sont différenciées les unes des autres par hybridation de la sonde ribosomique sur leurs profils de restriction *PvuII* (Bourget *et al.*, 1993). *PvuII* est en effet l'enzyme qui permet d'obtenir un profil ribosomique unique pour chacune des souches de collection testées (Fig. 25, Tableau 13). Néanmoins, elle met moins de bandes ribosomiques communes en évidence pour les souches appartenant à la même espèce par rapport à *BamHI* ou *EcoRV*. Les bandes ribosomiques observées sont en effet de plus haut poids moléculaire et moins nombreuses en général. La taille moyenne d'un opéron ribosomique étant de 5 kb environ, une bande ribosomique de plus de 10 kb peut en effet contenir plusieurs copies de l'opéron *rrn*. Deux bandes également très proches l'une de l'autre peuvent ne pas avoir été séparées par la migration. L'intensité relative du fragment est dans ces deux cas plus forte que normal (cette plus forte intensité est symbolisée par * dans les tableaux 13 et 14). Le ribotype *PvuII* de souches du genre *Bifidobacterium* apparaît sur les figures 24 et 25. De même qu'avec l'analyse des profils ribosomiques *BamHI*, les souches classées dans l'espèce *B. infantis* ne partagent toujours aucune bande ribosomique commune. Une comparaison des profils ribosomiques de la souche *B. adolescentis* ATCC11146 avec ceux des 4 autres souches de collection de cette espèce a également été réalisée. De façon similaire, aucune bande ribosomique commune n'est observée quel que soit le profil comparé (*BamHI* ou *EcoRV*). Ces résultats suggèrent que la souche *B. adolescentis* ATCC11146 n'appartiendrait pas à la même espèce que les 4 autres souches classées dans l'espèce *B. adolescentis*. De plus, ces résultats sont conformes avec ceux de Chevalier *et al.*, (1990), qui, sur des critères fermentaires, ont constaté le fort éloignement de cette souche par rapport aux autres *Bifidobacterium*. Ils en concluaient d'ailleurs que cette souche n'appartiendrait peut-être pas au genre, et qu'une recherche du pourcentage en bases G+C permettrait de préciser sa classification.

3.2.2. Ribotypage de souches industrielles

Comme pour les profils de restriction, les ribotypes *BamHI* des souches industrielles BO, BOSR, BB11, BB12, BF1 et C2 n'ont pu être distingués les uns des autres (Fig. 26A). Il n'a pas été jugé nécessaire de réaliser les ribotypes des souches Bf. P, Bf. G, et Bf. C, obtenues plus récemment, et dont les profils de restriction étaient identiques entre eux et identiques à ceux des souches précédentes. De plus, aucune ressemblance avec le ribotype d'une souche de collection n'a encore été observée. La souche industrielle BB42 (Fig. 26A, piste 5) présente un ribotype différent de celui des souches précédentes, mais identique à celui de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. Une autre souche industrielle, BL2,

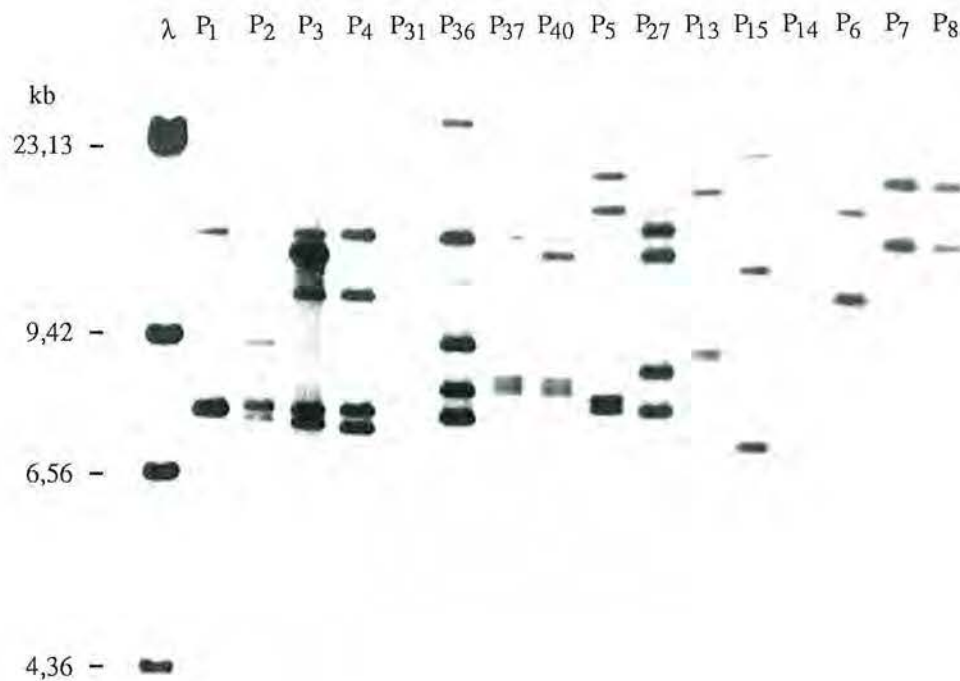


Fig. 24 : Profils ribosomiques obtenus après hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *Pvu*II de souches de *Bifidobacterium*.
Les lettres correspondent aux profils ribosomiques rassemblés dans les Tableaux 13, 14 et 15.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 20h à température ambiante.

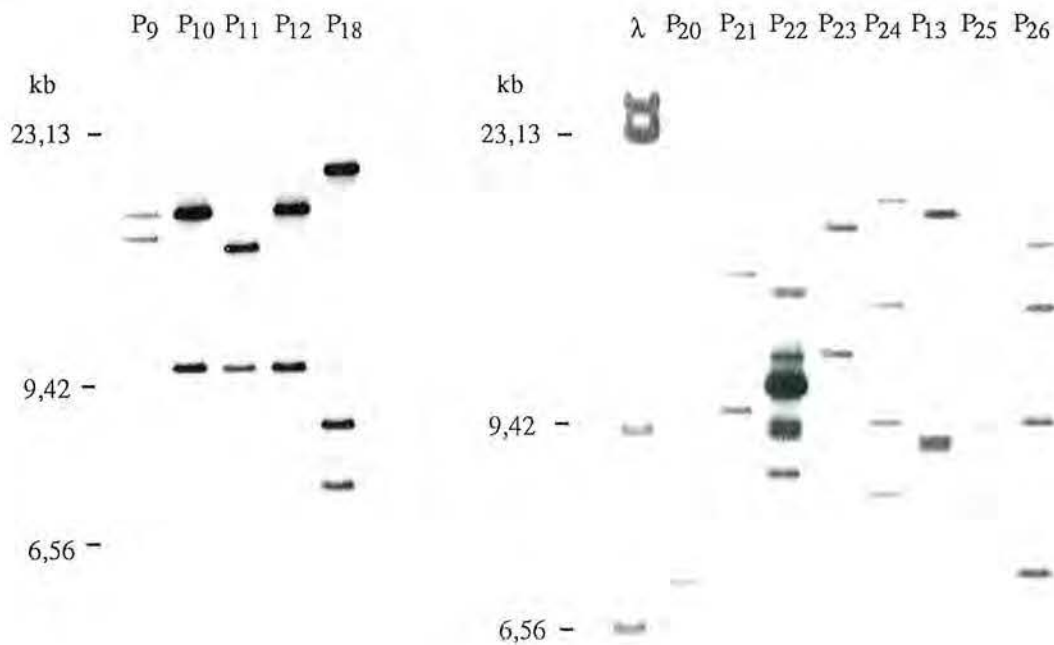


Fig. 25 : Profils ribosomiques obtenus après hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *Pvu*II de souches de *Bifidobacterium*.
Les lettres correspondent aux profils ribosomiques rassemblés dans le Tableau 13.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 24h à température ambiante.

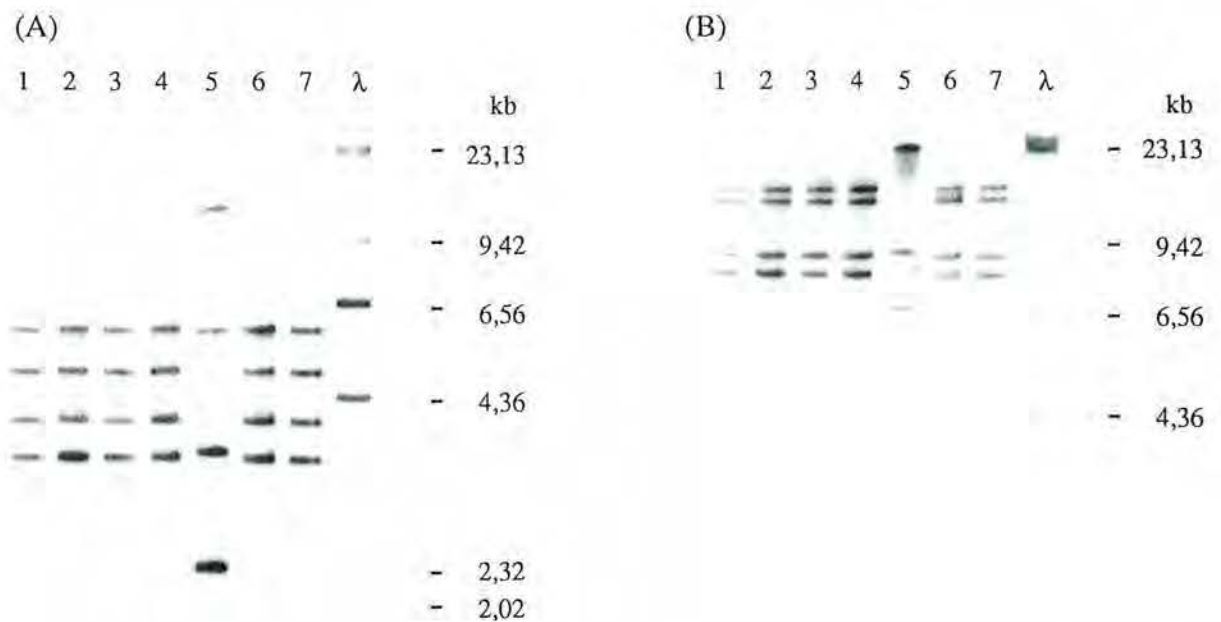


Fig. 26 : Autoradiographies obtenues après hybridation du fragment ribosomique I41 et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur les profils de restriction *Bam*HI (A) et *Pvu*II (B) de souches d'origine industrielle.
Pistes 1 : BO; pistes 2 : BOSR; pistes 3 : BB11; pistes 4 : BB12; pistes 5 : BB42; pistes 6 : BF1; pistes 7 : C2; pistes λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 72h (A), 63h (B) à -70°C avec deux écrans intensifiants.

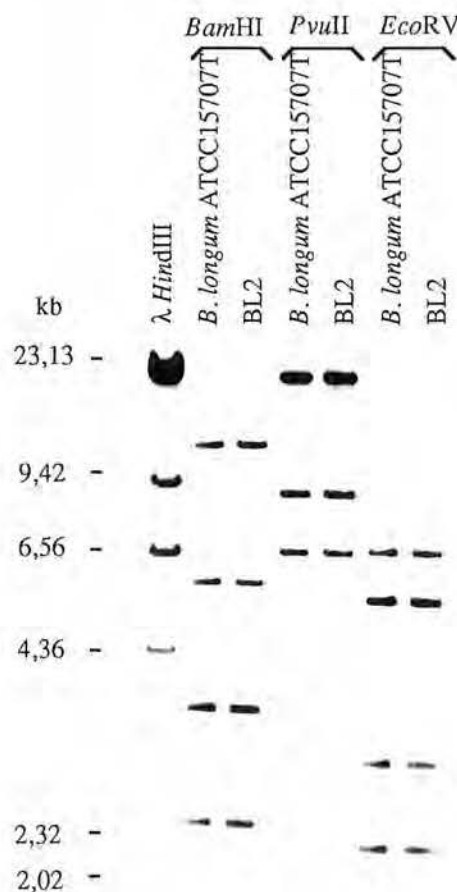


Fig. 27 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment ribosomique I41 et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV des souches de collection de l'espèce *B. longum* et de la souche d'origine industrielle BL2.
Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 20h à température ambiante.

présente le même type de profil (Fig. 27), ce qui confirme la proximité génétique de ces 2 souches avec la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T décelée dans la section précédente (3.1.2). De la même manière, la souche C4 possède un ribotype *Bam*HI identique à celui de la souche de collection *B. infantis* ATCC25962 (Fig. 28). Les ribotypes des souches C4A et C4Bh (Fig. 29) sont quasi-identiques entre eux : l'intensité relative de la bande de 7,2 kb du profil ribosomique *Bam*HI de la souche C4A semble cependant légèrement plus forte que celle lui correspondant pour la souche C4Bh. De plus, le profil ribosomique *Bam*HI de ces deux souches révèle des bandes de taille identique à celles de la souche de collection *B. longum* ATCC15708, confirmant l'identification à cette espèce faite précédemment. Seule, l'intensité des bandes diffère par rapport à celles de la souche de collection, en particulier en ce qui concerne la bande de 5,8 kb, moins intense chez *B. longum* ATCC15708. Ces résultats sont résumés dans le tableau 14.

L'hybridation de la sonde I41 sur les profils de restriction *Pvu*II des souches BO, BOSR, BB11, BB12, BF1 et C2 n'a pas permis une meilleure différenciation de ces souches (Fig. 26B). Ce résultat n'est pas inattendu puisque les profils de restriction *Pvu*II ne montraient pas de différence évidente entre ces souches. Les souches BB42 et BL2 (Fig. 26B et 27) partagent le même ribotype *Pvu*II que la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. La bande supplémentaire visible sur le profil de restriction *Pvu*II de ces souches (3.1.2) n'est donc pas une bande ribosomique. Les ribotypes des souches C4 et *B. infantis* ATCC25962, identiques pour les profils *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bgl*I et *Bgl*II, diffèrent pour la bande ribosomique de plus haut poids moléculaire sur le profil *Pvu*II (Fig. 28). Les profils ribosomiques *Pvu*II et *Eco*RV des ADN des souches C4A et C4Bh sont distincts de ceux des souches de collection (Fig. 29). Néanmoins, on retrouve 2 ou 3 bandes communes sur 4 avec les profils ribosomiques correspondants des souches de collection de l'espèce *B. longum*. Sur les profils ribosomiques *Eco*RV, on observe une bande de 6,7 kb et une de 2,15 kb communes pour les 4 souches, une bande de 3,05 kb commune pour les souches de *B. longum* ATCC15707^T, C4A et C4Bh et une bande de 2,7 kb commune pour les souches de *B. longum* ATCC15708, C4A et C4Bh. Par conséquent, sur le critère des profils de restriction et des ribotypes, aucune différence visible n'a été remarquée entre les souches C4A et C4Bh. Elles présentent donc un génotype extrêmement proche, voire identique. De plus, elles montrent de fortes ressemblances quant à ces deux critères avec les souches de collection de l'espèce *B. longum* et peuvent de ce fait être assimilées à cette espèce.

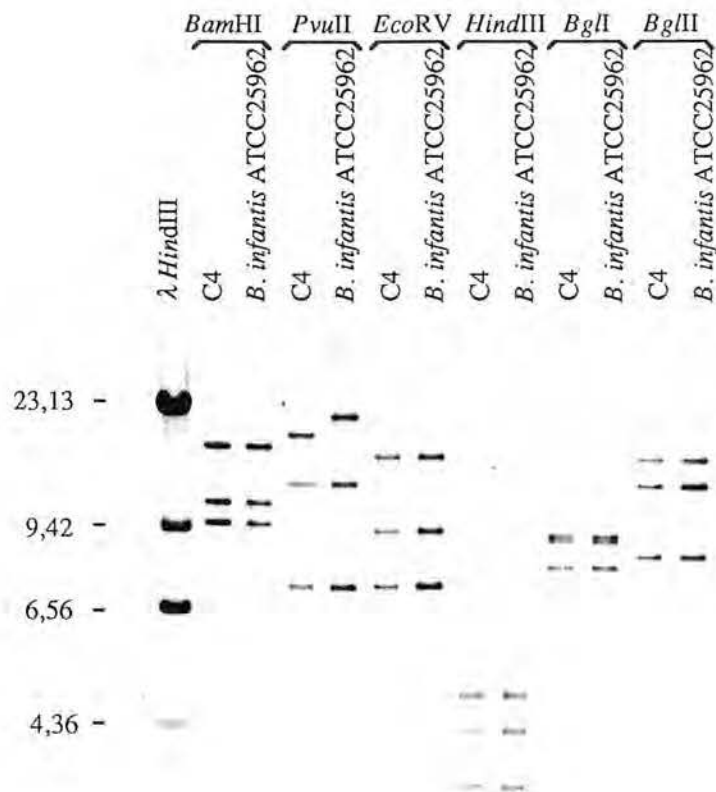


Fig. 28 : Autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde ribosomique I41 sur les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RV, *Hind*III, *Bgl*I et *Bgl*II de la souche de collection *B. infantis* ATCC25962 et de la souche industrielle C4.

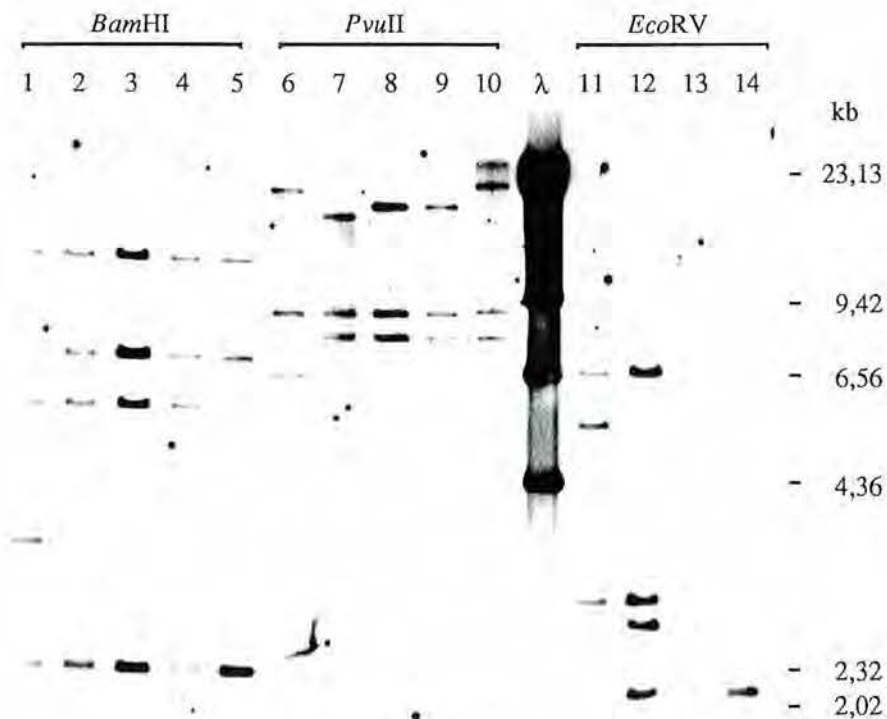


Fig. 29 : Autoradiographie obtenue après hybridation de la sonde ribosomique I41 sur les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV des souches industrielles C4A et C4Bh classées dans l'espèce *B. longum*.

Pistes 1, 6 et 11 : *B. longum* CIP64.62T; pistes 2 et 7 : souche provenant de l'expérience clinique CE6-1; pistes 3, 8 et 12: C4A; pistes 4, 9 et 13 : C4Bh; pistes 5, 10 et 14 : *B. longum* ATCC15708. Marquage avec le système DIG; lavages effectués à 68°C; exposition de 20h à température ambiante.

Tableau 14: Classification des souches industrielles basée sur leurs profils ribosomiques *Bam*HI, *Eco*RV et *Pvu*II.

Souches	Profils rib. <i>Bam</i> HI	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Eco</i> RV	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Pvu</i> II	Nombre de bandes ribosom.
BO	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
BOSR	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
BB11	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
BB12	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
BB42	B ₁₂	4	E ₁₂	4	P ₁₆	3
BF1	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
C2	B ₂₂	4	E ₂₄	4	P ₂₇	4
C4	B ₁₁	3	E ₁₁	3	P ₂₈	3
C4A	B ₁₃	4	E ₂₅	4	P ₂₉	3
C4Bh	B ₁₃	4	E ₂₅	4	P ₂₉	3
BL2	B ₁₂	4	E ₁₂	4	P ₁₆	3

3.2.3. Ribotypage des souches d'origine humaine recueillies lors de l'expérience clinique

La sonde I41 a été hybridée sur les profils de restriction des 121 isolats de *Bifidobacterium* régulièrement collectés lors de l'expérience clinique décrite au paragraphe 3.1.3. Les différents ribotypes identifiés lors de cette étude sont résumés dans le tableau 15.

Sur les 121 ADN obtenus, 91 seulement ont pu être clivés par l'endonucléase de restriction *Bam*HI. Sur ces 91 profils de restriction *Bam*HI, l'hybridation avec la sonde ribosomique I41 a révélé 20 profils ribosomiques identiques correspondant à la souche exogène ingérée BOSR. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les profils de restriction. Les ADN des 71 isolats restants ont mis en évidence 9 ribotypes *Bam*HI distincts (Fig. 3, publication n°1), alors que l'on dénombrerait 13 types de profils de restriction *Bam*HI. Certaines des souches isolées de la flore intestinale de volontaires différents présentent en effet un ribotype *Bam*HI identique, alors qu'elles possèdent des profils de restriction différents. Ces souches seront différenciées par leurs profils ribosomiques *Pvu*II, mettant en évidence 13 types de profils ribosomiques à partir de l'ADN des 71 isolats.

Dans le but d'identifier ces isolats, leurs ribotypes ont été comparés avec ceux des souches de collection, ainsi qu'avec ceux des souches industrielles. Sur les 9 profils ribosomiques *Bam*HI caractérisés, 3 n'ont montré aucune ressemblance avec ceux des souches de collection. C'est le cas des souches appartenant aux groupes CE2, CE5 et CE7. Par contre, les 6 autres profils ribosomiques *Bam*HI présentent des similarités entre eux et avec le ribotype des souches de l'espèce *B. longum* uniquement. Il s'agit des profils ribosomiques des souches classées dans les groupes CE1, CE3, CE4, CE6, CE9 et CE10 qui partagent en effet 2 à 4 bandes ribosomiques communes sur 4 avec les souches *B. longum* ATCC15707^T et *B. longum* ATCC15708 (Fig. 30 (A)). Le ribotype *Bam*HI des souches appartenant au groupes CE6, identique à celui de la souche classée dans le groupe CE12, est également identique au profil ribosomique *Bam*HI de la souche de collection *B. longum* ATCC15708 (Fig. 30 (A)). Néanmoins, leurs trois profils de restriction sont différents. De même, le ribotype *Bam*HI des souches du groupe CE3 est observé pour 4 profils de restriction différents correspondant aux souches des groupes CE3, CE13, CE14 et CE15. Ces souches peuvent cependant être distinguées par leur profil ribosomique *Pvu*II (Fig. 30 (B)), excepté celles appartenant aux groupes CE3 et CE12 qui présentent cette fois le même ribotype *Pvu*II. Néanmoins, leurs profils ribosomiques *Bam*HI diffèrent. D'autre part, les profils *Eco*RV de l'ensemble de ces souches (Fig. 31) mettent également en évidence au moins 2 bandes ribosomiques communes sur 4 ou 5 avec ceux des souches de collection de l'espèce *B. longum*.

Tableau 15: Classification des 121 souches provenant de l'expérience clinique, basée sur leurs profils ribosomiques *Bam*HI, *Eco*RV et *Pvu*II

Groupes de Souches (1)	Profils rib. <i>Bam</i> HI	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Eco</i> RV	Nombre de bandes ribosom.	Profils rib. <i>Pvu</i> II	Nombre de bandes ribosom.
CE1	B ₂₃	4	E ₂₆	4	P ₃₀	4
CE2	B ₂₄	3*	E ₂₇	4	P ₃₁	3
CE3	B ₂₅	4	E ₂₈	4	P ₃₂	3
CE4	B ₂₆	5	E ₂₉	5	P ₃₃	4
CE5	B ₂₇	4	E ₃₀	4	P ₃₄	5
CE6	B ₁₃	4	E ₃₁	4	P ₃₅	3
CE7	B ₂₈	4	E ₃₂	5	P ₃₆	6
CE8	non clivé		E ₃₃	4	P ₃₇	4
CE9	B ₂₉	4	E ₃₄	3	P ₃₈	3
CE10	B ₃₀	3	E ₃₅	2	P ₃₉	3
CE11	non clivé		E ₃₃	4	P ₄₀	5*
CE12	B ₁₃	4	E ₁₃	4	P ₃₂	3
CE13	B ₂₅	4	E ₃₄	4	P ₄₁	3
CE14	B ₂₅	4	E ₂₈	4	P ₄₂	3
CE15	B ₂₅	4	E ₂₈	4	P ₄₃	3

* I41 détecte un fragment dont l'intensité indique que la bande est au moins double.

(1) : groupes présentés dans le tableau 12.

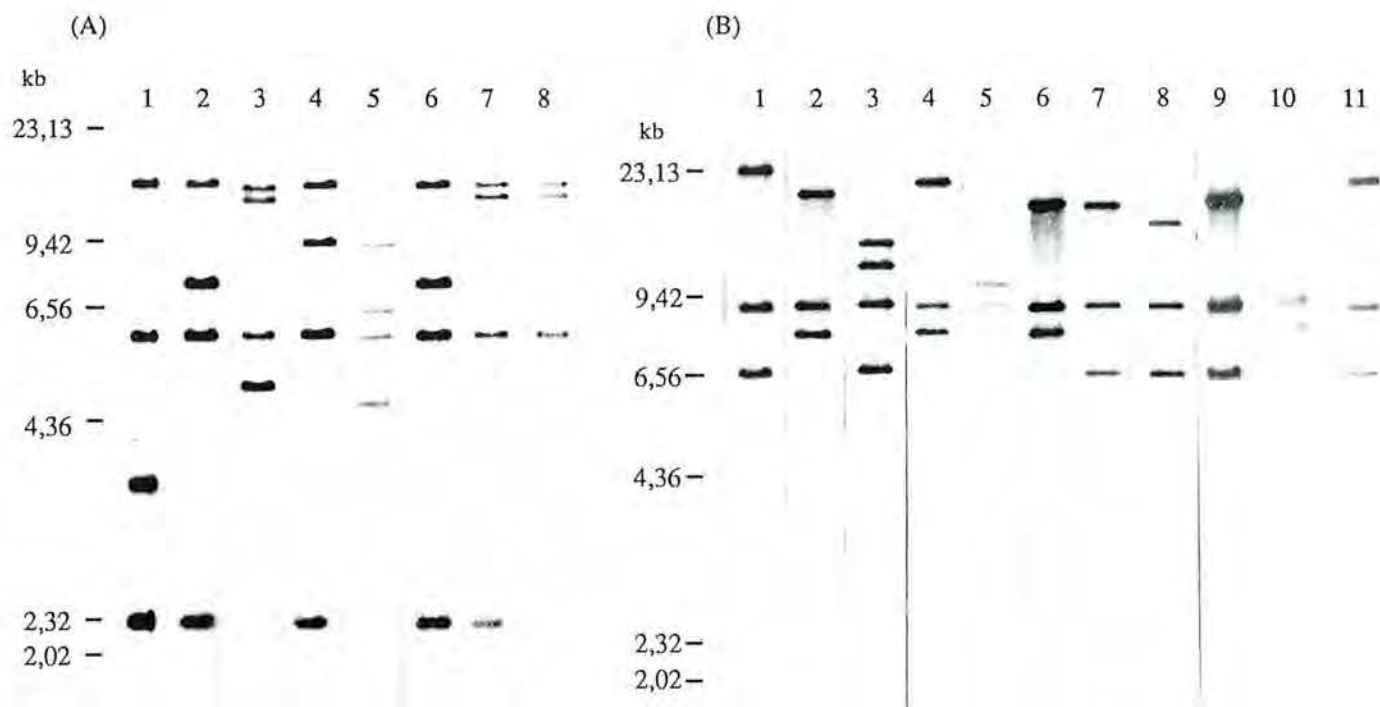


Fig. 30 : Types de profils ribosomiques obtenus après hybridation du fragment ribosomique I41 sur les profils de restriction *Bam*HI(A) et *Pvu*II (B) de souches classées dans l'espèce *B. longum* .

Souches	Type <i>Bam</i> HI	Type <i>Pvu</i> II
Pistes 1 : <i>B. longum</i> ATCC15707T	B12	P16
Pistes 2 : <i>B. longum</i> ATCC15708	B13	P17
Pistes 3 : CE1-1	B23	P30
Pistes 4 : CE3-7	B25	P32
Pistes 5 : CE4	B26	P33
Pistes 6 : CE6-1	B13	P35
Pistes 7 : CE9	B29	P38
Pistes 8 : CE10	B30	P39
Piste 9 : CE13	B25	P41
Piste 10 : CE14-2	B25	P42
Piste 11 : CE15-1	B25	P43

Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C.

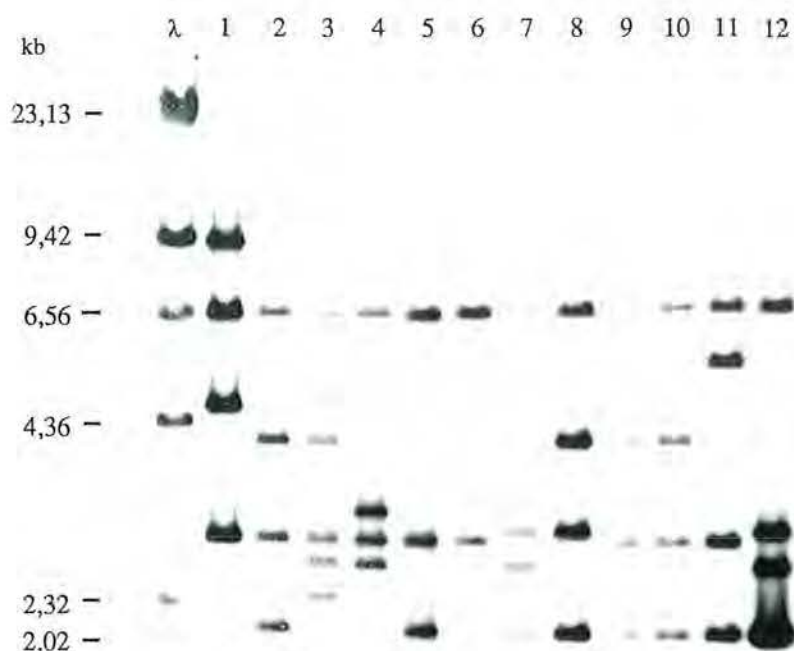


Fig. 31 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment ribosomique I41 sur les profils de restriction *EcoRV* des souches classées dans l'espèce *B. longum*.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *HindIII* utilisé comme marqueur de taille;

Souches	Type <i>EcoRV</i>
Piste 1 : CE1-1	E26
Piste 2 : CE3-7	E28
Piste 3 : CE4-3	E29
Piste 4 : CE6-1	E31
Piste 5 : CE9	E34
Piste 6 : CE10	E35
Piste 7 : CE12	E13
Piste 8 : CE13	E34
Piste 9 : CE14-2	E28
Piste 10 : CE15-1	E28
Piste 11 : <i>B. longum</i> ATCC15707T	E12
Piste 12 : <i>B. longum</i> ATCC15708	E13

Marquage radioactif; lavages à 50°C; exposition de 15h à -70°C avec deux écrans intensifiants

Ainsi, ces résultats permettent de formuler l'hypothèse que les souches classées dans les groupes CE1, CE3, CE4, CE6, CE9, CE10, CE12, CE13, CE14 et CE15 appartiendraient à l'espèce *B. longum*.

L'ADN des 30 isolats appartenant aux groupes CE8 et CE11, qui n'ont pu être clivés par l'enzyme *Bam*HI, ont été parallèlement analysés avec les profils ribosomiques *Eco*RV et *Pvu*II. Un seul type de profil est mis en évidence avec l'enzyme *Eco*RV (Fig. 32, E33). Par contre, deux types de profils apparaissent après hybridation de la sonde ribosomique sur les profils de restriction *Pvu*II (Fig. 24, pistes P37, P40). Les 29 souches appartenant au groupe CE8 présentent un profil unique (P37). Le profil de la souche CE11 (P40) est spécifique : il n'apparaît qu'une fois au cours de l'étude. La comparaison avec les profils ribosomiques des souches de collection a montré que les souches appartenant aux groupes CE8 et CE11 avaient un ribotype *Eco*RV (Fig. 32, E33) extrêmement proche de celui de la souche *B. adolescentis* CIP64.59T (Fig. 32, E2). Ces souches partagent en effet trois bandes ribosomiques communes sur 4 ou 5. De même, après une analyse par *Eco*RV, les souches des groupes CE2 et CE7 qui n'ont pu être identifiées avec *Bam*HI, s'avèrent posséder également les trois bandes ribosomiques communes aux souches précédentes (Fig. 32, E27 et E32 respectivement).

Ces résultats sont compatibles avec l'appartenance des souches classées dans les groupes CE2, CE7, CE8 et CE11 à l'espèce *B. adolescentis*.

Les profils *Bam*HI, *Eco*RV et *Pvu*II des deux souches classées dans le groupe CE5 sont présentés sur la figure 33. Aucune ressemblance de profil avec les souches de collection n'a été décelée.

Les tableaux 16 à 19 détaillent l'ordre d'apparition des souches collectées chez chaque volontaire.

Le ribotypage a donc permis de suivre les populations de *Bifidobacterium* collectées dans la microflore intestinale des cinq sujets, ainsi que le devenir de la souche exogène BOSR. On constate que cette souche est détectée dans les selles dès le premier prélèvement qui suit la première ingestion de lait fermenté et qu'elle va disparaître progressivement. Excepté pour les souches du groupe CE1 identifiées chez le volontaire n°1, les souches de *Bifidobacterium* observées avant la prise du traitement antibiotique ont toutes été éliminées par l'antibiothérapie. Par contre, les autres souches identifiées dans la flore dominante après l'ingestion des antibiotiques ont toutes été sélectionnées par l'antibiothérapie. Elles se développent en effet toutes sur milieu sélectif et proviennent probablement de la flore sous-dominante.

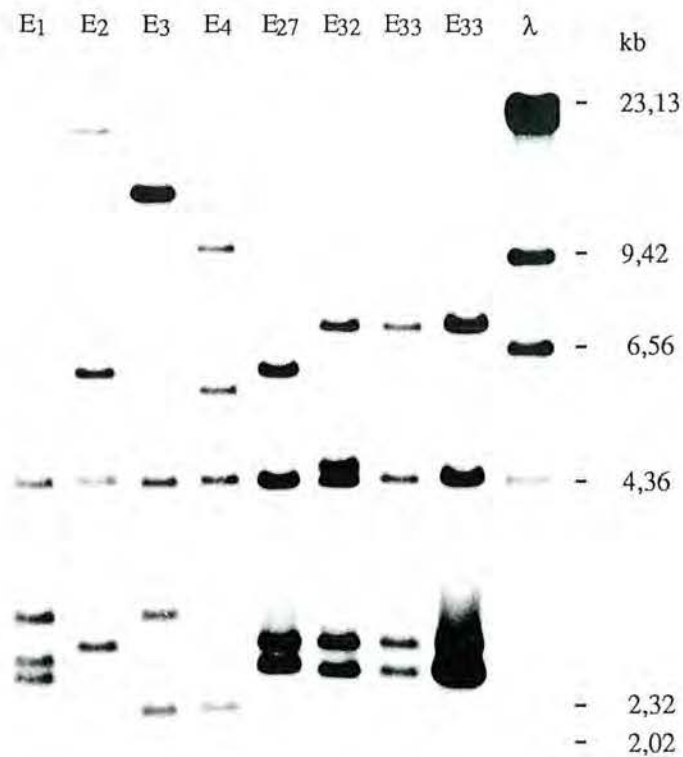


Fig. 32 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment ribosomique I41 sur les profils de restriction *EcoRV* des souches classées dans l'espèce *B. adolescentis*. Les lettres correspondent aux profils ribosomiques *EcoRV* résumés dans les tableaux 13 et 15. Les profils E33 correspondent respectivement aux souches CE8-7 et CE11. Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 19h à -70°C avec deux écrans intensifiants.

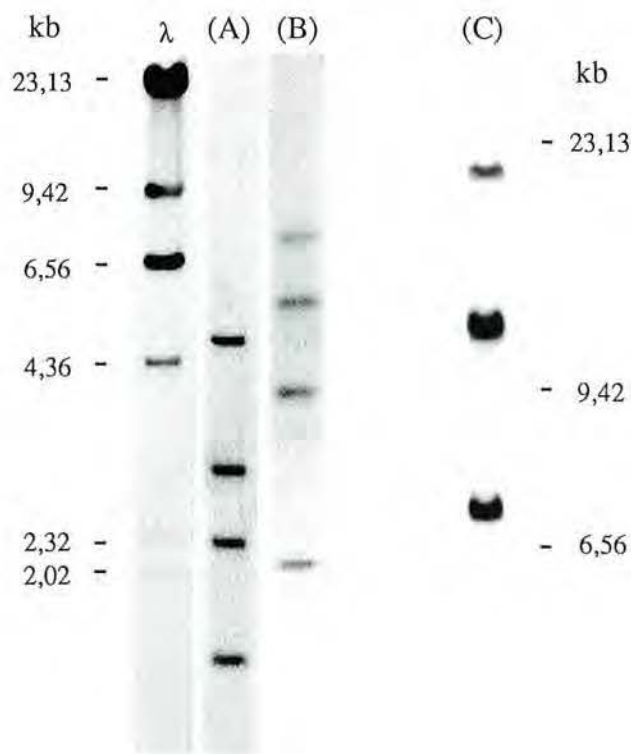


Fig. 33 : Profils ribosomiques *Bam*HI (A), *EcoRV* (B) et *Pvu*II (C) de la souche CE5-1

Tableau 16 : Souches de *Bifidobacterium* collectées dans la flore intestinale des volontaires 1 et 2, identifiées par leurs profils ribosomiques.

a) flore dominante du volontaire n°1 :

Temps (jours) Groupes	0	3	6	10	12	16	20	24	28	36	38	40	45	52	63	68
CE1	3			1					1	1	1		1	2	2	
CE2	1															
CE3		3(1)	5	2(1)	2(1)	1	1		1(2)	3		2	1	2(1)	3	1
CE4								2(1)	1							
CE5					1											
CE10							1									
NBS1SR			(1)													

b) Flore dominante du volontaire n°2.

Temps (jours) Groupes	0	3	6	10	12	16	20	24	28	32	36	40	45
CE5									1				
CE6	2												
CE7	1												
CE8		3	3(1)	2	1	(1)	2(1)	2(2)	2(1)	2(1)	3(1)	1	1
CE11													(1)
CE13	1												
NBS1SR			2(1)	(1)	(1)								

Les profils ribosomiques de ces souches sont résumés dans les tableaux 14 et 15.

Le jour 0 correspond au commencement du traitement antibiotique.

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux isolats collectés sur milieu sélectif (avec streptomycine et rifampicine).

Tableau 17 : souches de *Bifidobacterium* collectées dans la flore intestinale du sujet n°3.

DATE	MILIEU	SOUCHE	PLASMIDES
J0	non sélectif	CE7-1	-
J0	non sélectif	CE7-2	nd
J0	non sélectif	CE7-3	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	sélectif	BOSR	-
J36	sélectif	CE14-1	+
J36	non sélectif	CE14-2	+
J45	sélectif	CE14-3	+
J45	non sélectif	CE14-4	+

Tableau 18 : souches de *Bifidobacterium* collectées dans la flore intestinale du sujet n°4.

DATE	MILIEU	SOUCHE	PLASMIDES
J0	non sélectif	CE12	+
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	sélectif	BOSR	-
J16	sélectif	BOSR	-
J16	sélectif	BOSR	-
J36	sélectif	CE3-34	+

Les milieux utilisés sont les milieux de Beerens (Beerens, 1990) et BHA (Diagnostics Pasteur), non sélectifs de la souche BOSR; et le milieu BHASR, sélectif de la souche BOSR.

Tableau 19 : souches de *Bifidobacterium* collectées dans la flore intestinale du sujet n°5.

DATE	MILIEU	SOUCHE	PLASMIDES
J0	non sélectif	CE15-1	+
J0	non sélectif	CE9	+
J0	non sélectif	CE15-2	+
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	non sélectif	BOSR	-
J6	sélectif	BOSR	-
J6	sélectif	BOSR	-
J52	sélectif	CE14-5	+

Les milieux utilisés sont les milieux de Beerens (Beerens, 1990) et BHA (Diagnostics Pasteur), non sélectifs de la souche BOSR; et le milieu BHASR, sélectif de la souche BOSR.

Ainsi, étant donné que les populations prélevées reflètent les populations prédominantes du tractus gastro-intestinal, les espèces *B. longum* et *B. adolescentis* semblent faire partie de la flore dominante de l'Homme adulte. Chez le sujet n°1, la flore bifide dominante est composée de différentes souches appartenant à l'espèce *B. longum*, alors que chez le sujet n°2, elle est composée de souches appartenant à l'espèce *B. adolescentis*. Chez ces deux sujets, des souches des deux espèces coexistaient avant la prise des antibiotiques.

3.2.4. Conclusion

Le laboratoire possède actuellement 16 des 28 espèces composant le genre *Bifidobacterium*. Chacune des souches peut être identifiée sans ambiguïté, soit par la réalisation de ses profils de restriction, soit par celle de ses ribotypes. L'association de ces deux méthodes a de plus été validée par l'identification des souches prélevées dans la microflore intestinale de 5 Hommes adultes, à l'exception de 2 souches.

Ainsi, une souche nouvellement prélevée pourra être caractérisée par ces deux méthodes et comparée aux autres pour les ressemblances de profils. On a vu en effet que des souches d'une même espèce présentaient généralement des similarités de profils ou des bandes ribosomiques communes. Les figures 34 à 37 rassemblent les différents profils ribosomiques *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III et *Pvu*II obtenus pour chacune des souches du laboratoire.

Le nombre de bandes ribosomiques obtenu pour chacune des souches de collection nous a en outre permis de dénombrer les loci *rrn* de l'opéron ribosomique. On en compte au moins 5 chez la souche type de l'espèce *B. catenulatum*, 4 chez les souches des espèces *B. longum*, *B. adolescentis* et *B. animalis*, 4 également pour les souches types des espèces *B. pseudolongum*, *B. suis*, *B. thermophilum*, *B. angulatum*, *B. globosum* et *B. magnum*, 4 aussi pour une souche de l'espèce *B. infantis* (ATCC15697^T), 3 pour les souches de l'espèce *B. breve*, les autres souches de l'espèce *B. infantis*, 2 ou 3 pour les souches de l'espèce *B. bifidum* et 2 pour les souches type des espèces *B. asteroïdes* et *B. coryneforme*.

3.2.5. Article n°1

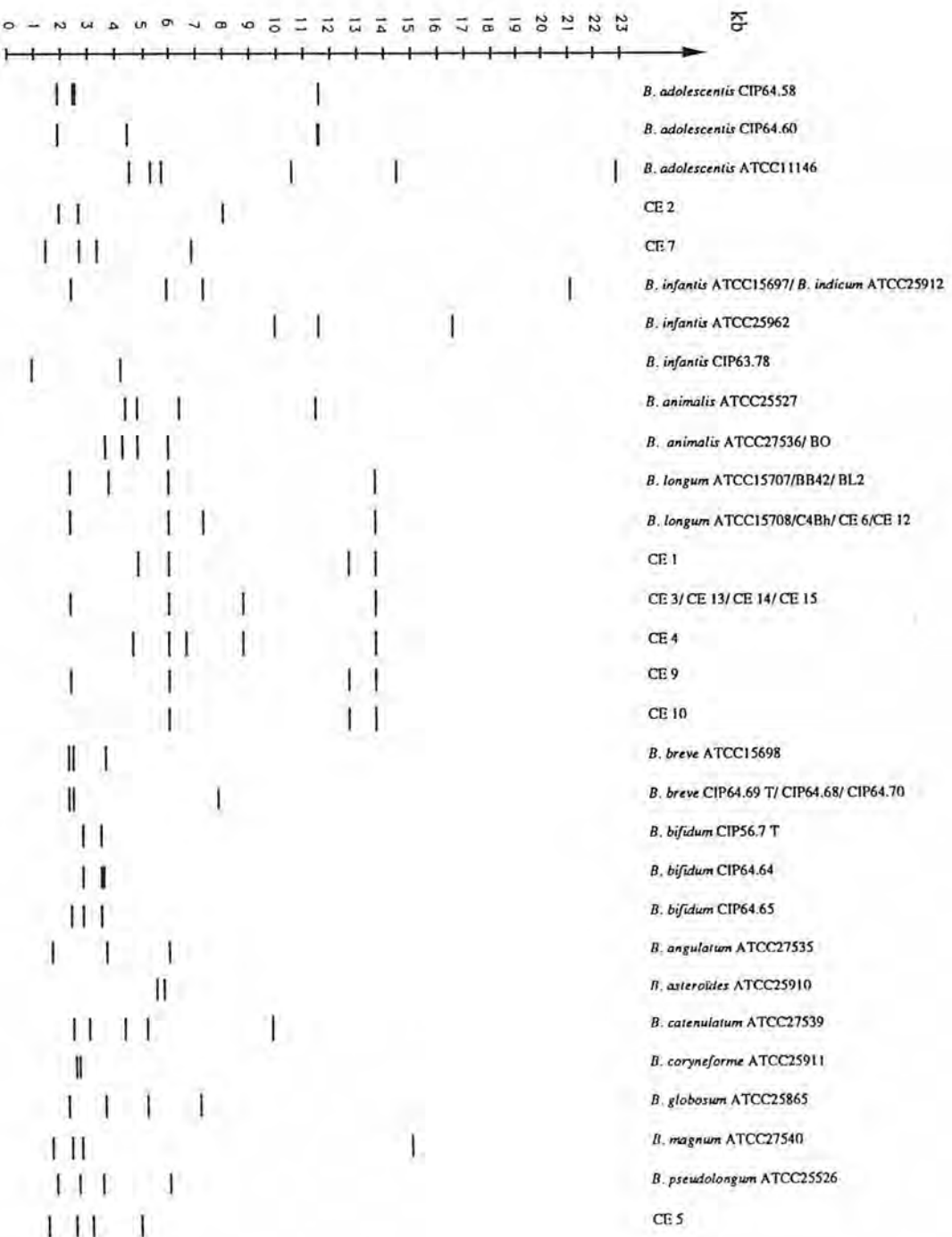


Fig. 34 : Profils ribosomiques *Bam*HI des différentes souches de *Bifidobacterium*

NB : L'ADN des souches *B. adolescentis* CIP64.59T, CIP64.61, *B. suis* CIP103377T, *B. thermophilum* ATCC25525T, CE 8 et CE 11 n'est pas digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI.

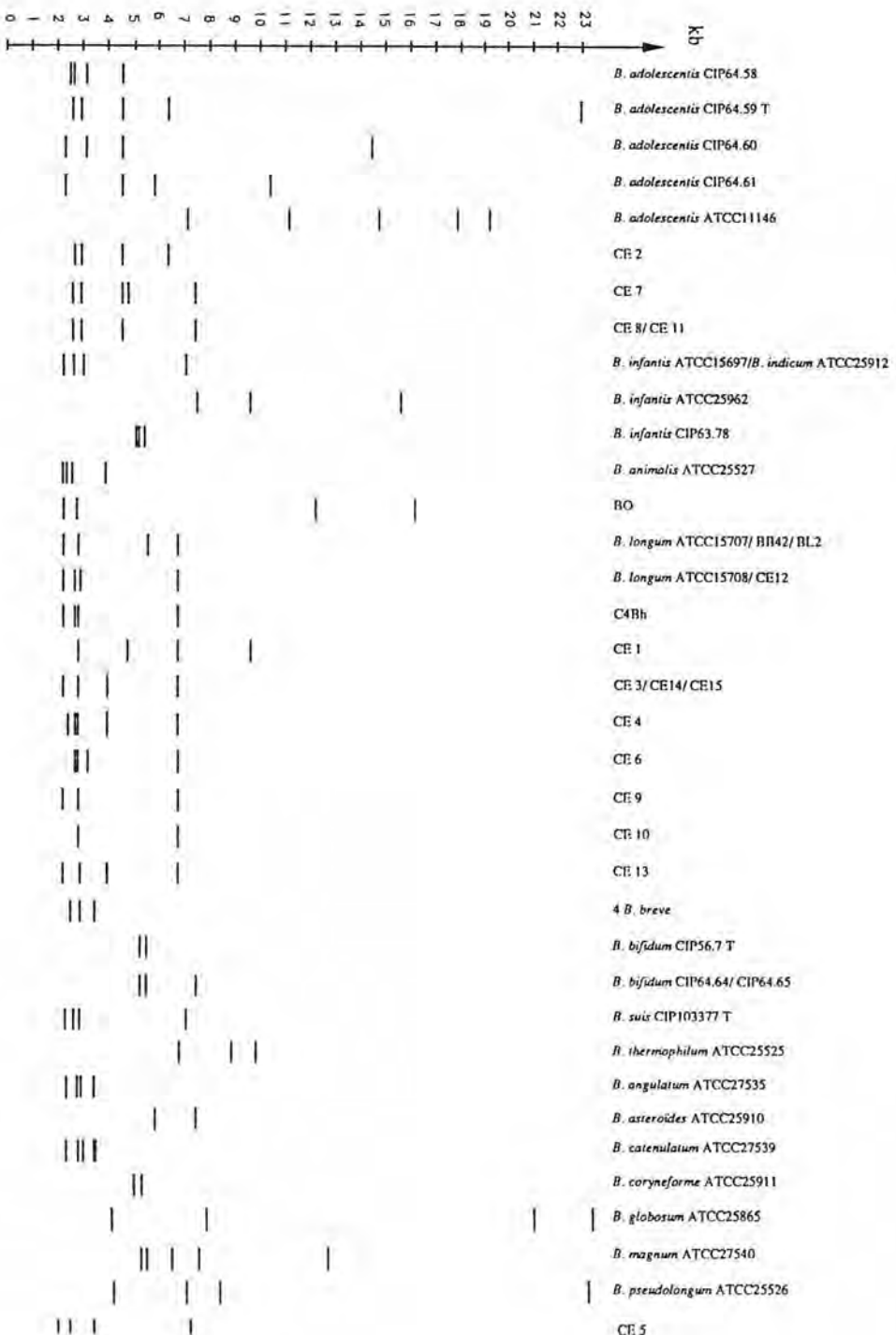


Fig. 35 : Profils ribosomiques *EcoRV* des différentes souches de *Bifidobacterium*.

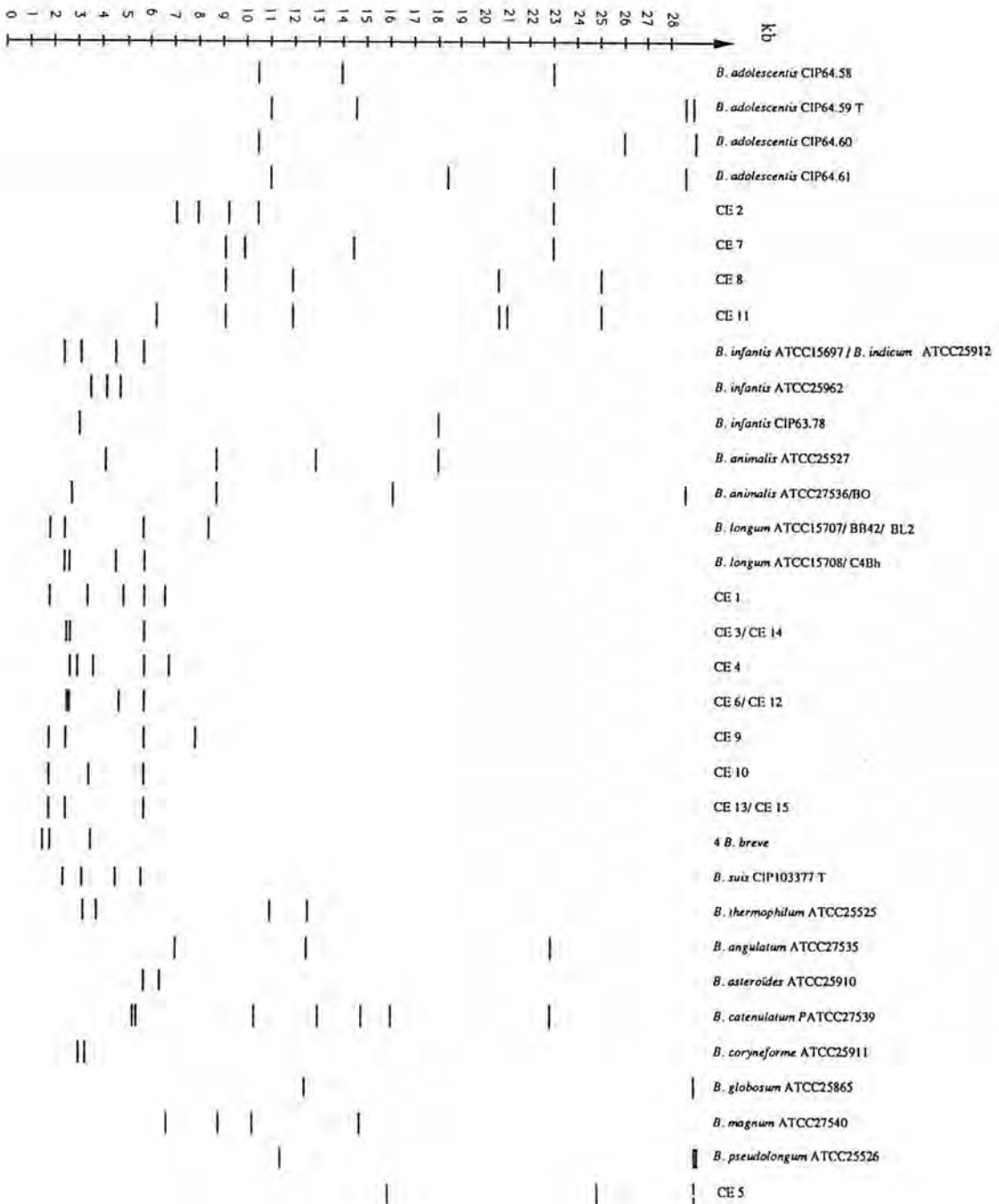


Fig. 36 : Profils ribosomiques *Hind*III des différentes souches de *Bifidobacterium*.

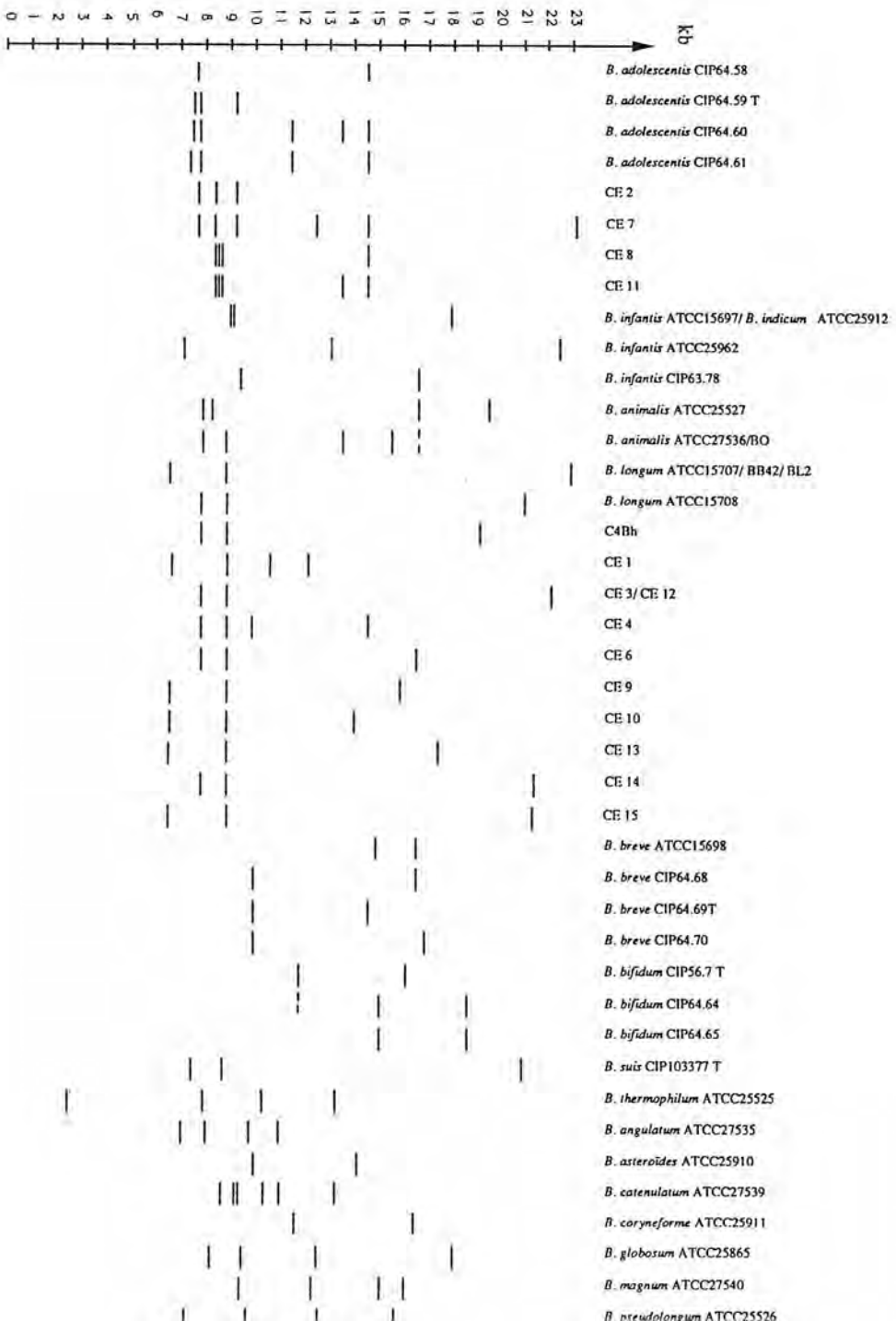


Fig. 37 : Profils ribosomiques *PvuII* des différentes souches de *Bifidobacterium*.

Identification of *Bifidobacterium* Strains by rRNA Gene Restriction Patterns

IRENE MANGIN,¹ NATHALIE BOURGET,¹ YORAM BOUHNIC,² NATHALIE BISETTI,²
JEAN-MARC SIMONET,^{1†} AND BERNARD DECARIS^{1*}

Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences, Université de Nancy I, Institut National de la Recherche Agronomique Associated Unit, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy,¹ and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité-290, Hôpital Saint-Lazare, Saint-Denis, 75010 Paris,² France

Received 5 October 1993/Accepted 14 February 1994

Total DNA from 21 collection or industrial *Bifidobacterium* strains was cleaved with various restriction endonucleases. Following electrophoresis, the fragments were subjected to Southern blot hybridization with a heterologous [α -³²P]dCTP-labeled rDNA (genes coding for rRNA) 23S gene probe. The ribosomal patterns allowed all tested strains to be differentiated and previous classifications to be confirmed. The same method was used to characterize DNA from 121 *Bifidobacterium* isolates collected from the intestinal flora of five human volunteers after the induction of colonic bacterial imbalance by antibiotics and absorption of a resistant exogenous *Bifidobacterium* strain. Hybridizations with the ribosomal probe revealed 11 different ribosomal patterns in addition to that of the exogenous strain. They permitted the *Bifidobacterium* populations belonging to the dominant colonic flora to be monitored over time. This experiment revealed significant and sustained alterations of the endogenous intestinal flora; indeed, some strains were eliminated, while others, probably belonging to subdominant flora, replaced them. Furthermore, even 2 months after the end of antibiotic treatment, the colonic flora remained different from that observed before treatment. Finally, our results showed that antibiotherapy did not allow colonic colonization by the exogenous strain.

Bifidobacteria are nonmotile, gram-positive bacteria which are natural inhabitants of warm-blooded animals and the human gut (17). These organisms play a significant role in controlling the pH of the large intestine through the liberation of lactic and acetic acids, in turn restricting the growth of many potential pathogens and putrefactive bacteria (18). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (24), 24 different *Bifidobacterium* species are described.

For a long time, *Bifidobacterium* species were mainly differentiated on the basis of fermentative characteristics (15, 17, 22). Nevertheless, this method generated many taxonomic uncertainties, particularly for *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium animalis*. DNA-DNA hybridizations (26) and, later, electrophoretic protein patterns (4) allowed a better assessment of the genetic relationship between the *Bifidobacterium* species. The aim of this study was to accurately identify and then classify *Bifidobacterium* strains by use of the restriction patterns of rRNA genes. Since rRNAs are ubiquitous and extremely conserved molecules, they can hybridize with the corresponding genes of any bacteria, even if they are phylogenetically distant (11). Since dispersed copies of the rRNA operon exist in the bacterial chromosome, several restriction fragments carrying rRNA genes should be observed. Consequently, the numbers and the sizes of these ribosomal bands will be different for every species. Furthermore, because of restriction fragment polymorphisms, some strains in the same species could also be differentiated. Therefore, this molecular method, often used for other organisms (1, 7, 12),

should allow the unambiguous differentiation of all *Bifidobacterium* strains.

In this study, we used the cloned heterologous rDNA (genes coding for rRNA) 23S probe 141 from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (19), first for restriction patterns of 21 collection or industrial *Bifidobacterium* strains and then for those of 121 *Bifidobacterium* isolates of human origin and regularly collected from the dominant intestinal flora of five healthy volunteers.

The aim of the clinical experiment was to study the fate of a streptomycin- and rifampin-resistant exogenous *Bifidobacterium* strain (NBS1SR) after the induction of colonic bacterial imbalance by these antibiotics. Indeed, the dominant anaerobic component of the endogenous intestinal microflora exerts resistance to colonization by exogenous microorganisms. A previous study (2) suggested that the alteration of this anaerobic flora with antibiotics could permit the colonization of the colon by an exogenous strain. The Beerens medium used to isolate the *Bifidobacterium* strains contains a combination of low pH and propionic acid, which makes this medium both elective and selective for all *Bifidobacterium* species (3). Moreover, populations in stools are considered to reflect the most prevalent populations in the gastrointestinal tract (28). Thus, the characterization of strains by ribotyping experiments should enable us to monitor *Bifidobacterium* populations belonging to the dominant colonic flora over a period of time.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The names and origins of the strains used in this study are listed in Table 1. They were purchased in lyophilized form from the Collection de l'Institut Pasteur (CIP), Paris, France, or from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. NBS1 and NBS2 are industrial strains. NBS2 was identified by sugar fermentations as belonging to the *Bifidobacterium longum* species, whereas

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences, Université de Nancy I, BP 239, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Phone: (0 10 33) 83 91 20 96. Fax: (0 10 33) 83 91 25 00. Electronic mail address: decaris@nancy.inra.fr.

† Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

TABLE 1. Names and origins of the strains used in this study^a

Strain	Synonym	Origin
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.58	ATCC 15704	Feces of human adult
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.59 ^T	ATCC 15703 ^T	Feces of human adult
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.60	ATCC 15705	Feces of human adult
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CIP64.61	ATCC 15706	Feces of human adult
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC 25527 ^T		Feces of rat
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP56.7 ^T	ATCC 29521 ^T	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP64.64		Feces of human adult
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIP64.65	ATCC 15696	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.66	ATCC 15698	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.68	ATCC 15699	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.69 ^T	ATCC 15700 ^T	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium breve</i> CIP64.70	ATCC 15701	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 ^T	CIP64.67 ^T	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium infantis</i> CIP63.78		Unknown
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 25962		Feces of human infant
<i>Bifidobacterium longum</i> CIP64.62 ^T	ATCC 15707 ^T	Feces of human adult
<i>Bifidobacterium longum</i> CIP64.63	ATCC 15708	Feces of human infant
<i>Bifidobacterium suis</i> CIP103377 ^T	ATCC 27533 ^T	Feces of pig
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> ATCC 25525 ^T		Feces of pig
NBS1 (industrial strain)		Unknown
NBS2 (industrial strain)		Unknown

^a See reference 21 for material on type strains.

NBS1 was only identified as belonging to the *Bifidobacterium* genus by classical methods.

A *Bifidobacterium* strain (NBS1) was isolated from commercialized fermented milk with a selective medium. This strain was replica plated (14) on brain heart infusion agar (Diagnostics Pasteur, Marne La Coquette, France) supplemented with progressively increasing concentrations of streptomycin ranging from 50 to 3,200 µg/ml (streptomycin sulfate; Rhône-Poulenc, Paris, France). A streptomycin-resistant strain was isolated and further inoculated on brain heart infusion agar containing increasing concentrations of rifampin ranging from 0 to 1,000 µg/ml (Rifadine lyophilisée; Merrell Dow France, Levallois-Perret, France), according to the gradient technique of Szybalsky and Bryson (29). Finally, a streptomycin- and rifampin-resistant strain was isolated and named NBS1SR.

The other strains were obtained from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité-290, Hôpital Saint-Lazare, Paris, France, during a clinical experiment. They were grouped into 11 distinct ribosomal patterns and consequently named CE1 to CE11.

Clinical experiment. Five human volunteers without any digestive clinical antecedent ingested the following antibiotics: rifampin at 300 mg twice a day for 6 days (from day 0 to day 6) and streptomycin at 1 g once a day for 6 days (from day 0 to day 6). They also ingested 125 g of a fermented dairy product containing exogenous *Bifidobacterium* sp. strain NBS1SR (concentration, >10⁹ cells per g) three times a day from day 3 to day 9. The experiment demonstrated that several days of ingestion of the exogenous microorganism was necessary to reach a constant high-level population in stools (5).

Stools were regularly collected for 2 months, and all *Bifidobacterium* strains were isolated on different selective media (Beerens [3] and BH-aztreonam [Azactam; Bristol Laboratory, Paris, France] media). BH-aztreonam was supplemented with the antibiotics streptomycin and rifampin to isolate resistant *Bifidobacterium* strains (see Table 4) (5). *Bifidobacterium* strains were then characterized by the enzymatic fructose 6-phosphate phosphoketolase test specific for the genus *Bifidobacterium* (25).

DNA preparation. Cells were grown at 37°C in Trypticase-

phytone-yeast extract medium (26) under anaerobic conditions (90% N₂, 10% H₂). Chromosomal DNA extraction and purification were carried out as described earlier (8). DNA was then digested, according to the supplier, with restriction enzyme *Bam*HI, *Eco*RV, or *Pvu*II (Boehringer Mannheim Biochemicals) and electrophoresed through a 0.7% agarose gel in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.002 M EDTA).

23S rDNA probe. 141, cloned from *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (19), is a part of the 23S rRNA gene located close to the 3' end.

Southern analysis. The DNA probe was [α -³²P]dCTP labeled with a multiprimer DNA labeling system kit (Amersham International, Amersham, United Kingdom). λ DNA was [α -³²P]dCTP labeled with a nick translation kit (Amersham). Southern blotting was carried out by the capillary transfer method with a Vacugene system (LKB) and Hybond-N membranes (Amersham) according to manufacturer recommendations. Prehybridization, hybridization, and low-stringency washing conditions (50°C) were as previously described (23).

RESULTS

Ribotyping identification of collection and industrial strains. Each of the *Bam*HI- or *Eco*RV-cleaved *Bifidobacterium* strain DNAs was hybridized with ribosomal probe 141. Figure 1 shows the different *Bam*HI ribosomal patterns obtained for the 19 *Bifidobacterium* collection strains, belonging to eight species, and for the 2 industrial strains. The *Bifidobacterium* strains are listed in Table 1, and the hybridization results are summarized in Table 2. With 141 as a probe, the 21 strains yielded 14 distinct *Bam*HI ribosomal patterns. DNA from the four collection strains *Bifidobacterium suis* CIP103377^T, *Bifidobacterium thermophilum* ATCC 25525^T, *B. adolescentis* CIP64.59^T, and *B. adolescentis* CIP64.61 was not cleaved with *Bam*HI (GGATCC) and consequently could not give *Bam*HI ribosomal patterns. It was also impossible to cleave DNA from these four strains with *Bgl*II (AGATCT), whereas it was cleaved with *Bcl*I (TGATCA), suggesting the existence of a 5-methylcytosine residue in their recognition site (13) (data not shown). Different patterns were obtained for

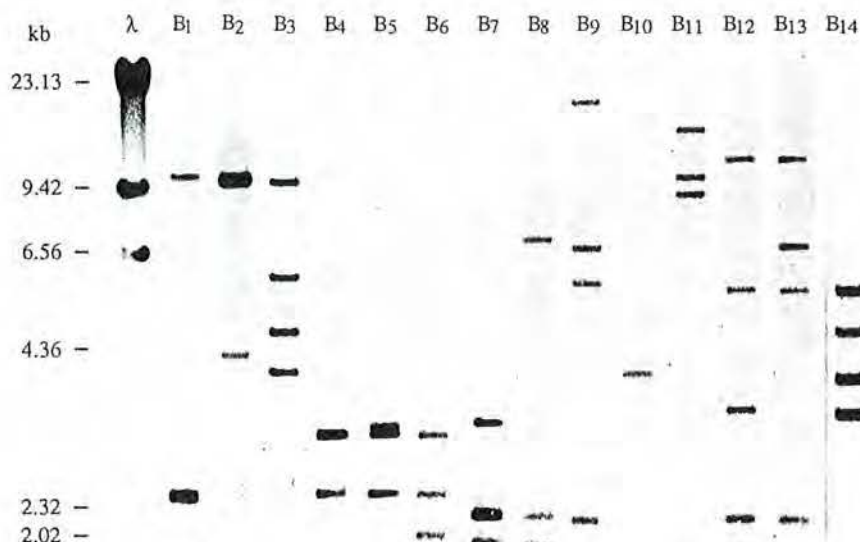


FIG. 1. Autoradiogram of *Bam*HI-digested DNA from *Bifidobacterium* strains probed with [α - 32 P]dCTP-labeled 23S ribosomal fragment I41. Lanes: λ , hybridization of [α - 32 P]dCTP-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; B₁ to B₁₄, ribosomal patterns listed in Table 2. Exposure was for 24 h at -70°C with two intensifying screens.

strains belonging to distinct species and even for different strains of the same species. Only three *Bifidobacterium breve* strains (CIP64.68, CIP64.69^T, and CIP64.70) could not be distinguished from each other by *Bam*HI ribosomal patterns. Because of their intensity, fragments of 2.4 kb (lane B₁) and 10 kb (lane B₂) were thought to be present in a molar ratio of

greater than one. These fragments could be considered doublets or, taking into account the average size of an *rm* locus (i.e., 5 kb), the 10-kb fragment could include more than one *rm* locus. Industrial strain NBS2 was identified as *B. longum* CIP64.62^T or ATCC 15707^T (synonymous strains; Table 1) because these strains shared the same fingerprints (data not

TABLE 2. Classification of collection or industrial strains based on *Bam*HI, *Eco*RV, and *Pvu*II hybridization patterns with I41 as a probe

Strain	I41 pattern with <i>Bam</i> HI	No. of ribosomal bands	I41 pattern with <i>Eco</i> RV	No. of ribosomal bands	I41 pattern with <i>Pvu</i> II	No. of ribosomal bands
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	B ₁	3 ^a	E ₁	4	P ₁	2
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59 ^T	Not cleaved		E ₂	5	P ₂	3
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	B ₂	3 ^a	E ₃	4 ^a	P ₃	5
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	Not cleaved		E ₄	4	P ₄	4
<i>B. animalis</i> ATCC 25527 ^T	B ₃	4	E ₅	4	P ₅	4
<i>B. bifidum</i> CIP56.7 ^T	B ₄	2	E ₆	2	P ₆	2
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	B ₅	3	E ₇	3	P ₇	2
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	B ₆	3	E ₇	3	P ₇	2
<i>B. breve</i> ATCC 15698	B ₇	3	E ₈	3	P ₈	2
<i>B. breve</i> CIP64.68	B ₈	3	E ₈	3	P ₉	2
<i>B. breve</i> CIP64.69 ^T	B ₈	3	E ₈	3	P ₁₀	3
<i>B. breve</i> CIP64.70	B ₈	3	E ₈	3	P ₁₁	3
<i>B. infantis</i> ATCC 15697 ^T	B ₉	4	E ₉	4	P ₁₂	2
<i>B. infantis</i> CIP63.78	B ₁₀	2	E ₁₀	3	P ₁₃	2
<i>B. infantis</i> ATCC 25962	B ₁₁	3	E ₁₁	3	P ₁₄	3
<i>B. longum</i> CIP64.62 ^T	B ₁₂	4	E ₁₂	4	P ₁₅	3
<i>B. longum</i> CIP64.63	B ₁₃	4	E ₁₃	4	P ₁₆	3
<i>B. suis</i> CIP103377 ^T	Not cleaved		E ₁₄	4	P ₁₇	3
<i>B. thermophilum</i> ATCC 25525 ^T	Not cleaved		E ₁₅	3 ^a	P ₁₈	4
NBS1	B ₁₄	4	E ₁₆	4	P ₁₉	4
NBS2	B ₁₂	4	E ₁₂	4	P ₁₅	3

^a I41 hybridized to a fragment whose intensity could indicate it to be a doublet.

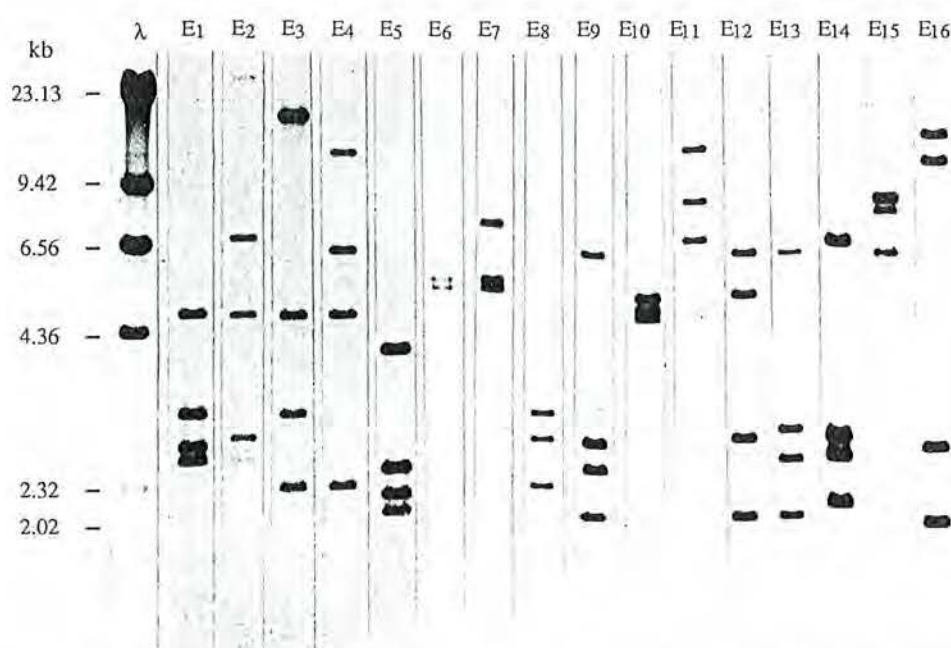


FIG. 2. Autoradiogram of *EcoRV*-digested DNA from *Bifidobacterium* strains probed with [α - 32 P]dCTP-labeled 23S ribosomal fragment 141. Lanes: λ , hybridization of [α - 32 P]dCTP-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; E₁ to E₁₆, ribosomal patterns listed in Table 2. Exposure was for 24 h at -70°C with two intensifying screens.

shown) and the same ribosomal patterns. However, industrial strain NBS1 displayed a ribosomal pattern different from those of collection strains but identical to that of strain NBS1SR.

Figure 2 shows the *EcoRV* ribosomal patterns obtained with 141 as a probe. The 21 strains tested yielded 16 different *EcoRV* ribosomal patterns. Distinct patterns were obtained for all tested strains, except for two *Bifidobacterium bifidum* strains (CIP64.64 and CIP64.65), and for the four *B. breve* strains. Industrial strain NBS2 displayed the same ribosomal pattern as *B. longum* CIP64.62^T, confirming the previous identification.

Among strains of a given species, the number of similar-molecular-size bands varied with the restriction enzyme used. With *Bam*HI, the *B. bifidum* strains shared two common ribosomal bands (2.4 and 3 kb), the *B. longum* strains shared three common bands (2.2, 5.5, and 12 kb), the *B. breve* strains shared two common bands (2 and 2.25 kb), and the *B. adolescentis* strains shared two common bands (1.85 and 10 kb).

The presence of a core of common ribosomal bands for different strains of the same species confirms the previous classifications in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (24). Moreover, pattern comparisons underline the extensive variability encountered among *Bifidobacterium* strains. Comigrations of digested DNA have been carried out to enable discrimination between bands with close molecular sizes. The number of common ribosomal bands is lower with the *EcoRV* patterns than with the *Bam*HI patterns. The two *B. longum* strains shared two common bands (2.1 and 6.5 kb), as did the *B. bifidum* strains (5.5 and 5.6 kb), but the *B. adolescentis* strains shared only one or two common bands (4.7 kb or 4.7 and 2.4 kb for two strains). The ribosomal patterns of the *B. breve* strains were identical.

Only *Bifidobacterium infantis* strains did not show common ribosomal bands, either with the *Bam*HI patterns or with the *EcoRV* patterns.

Similar work was carried out for *Pvu*II restriction patterns

(gel not shown). The results are included in Table 2. With *Pvu*II, all strains displayed a unique ribosomal pattern, except for two *B. bifidum* strains, CIP64.64 and CIP64.65, which shared the same ribosomal pattern. The *B. breve* collection strains (ATCC 15698, CIP64.68, CIP64.69^T, and CIP64.70), which could not be distinguished by *Bam*HI or *EcoRV* ribosomal patterns, displayed different *Pvu*II ribosomal patterns (6). Moreover, the 141 probe allowed two *B. breve* strains (ATCC 15698 and CIP64.66) that had been classified as synonymous to be differentiated (6). The use of *Pvu*II ribosomal patterns allowed strains to be characterized but failed to group strains of the same species. Indeed, only a few common ribosomal bands were observed among different strains of the same species.

The number of ribosomal bands detected for each strain was identical regardless of the enzyme used (*Bam*HI and *EcoRV*; *Pvu*II revealed high-molecular-size bands), except for *B. infantis* CIP63.78, in which one additional band appeared in the *EcoRV* ribosomal pattern (Table 2). This result suggests that this strain probably contains more ribosomal operon copies than previously indicated by the *Bam*HI ribosomal pattern. In consequence, hybridizations with the ribosomal probe allowed the *rrn* locus number of the ribosomal operon in *Bifidobacterium* strains to be estimated. We found at least four copies for the *B. longum* and *B. adolescentis* strains; four for the *B. animalis* ATCC 25527^T, *B. suis* CIP103377^T, and *B. thermophilum* ATCC 25525^T strains; four for a *B. infantis* strain (ATCC 15697^T); three for the *B. breve* strains and the other *B. infantis* strains; and probably two or three for the *B. bifidum* strains.

Ribotyping identification of isolates collected for the clinical experiment. 141 was used to probe DNA restriction patterns of 121 *Bifidobacterium* isolates regularly collected from the intestinal microflora of five healthy volunteers to monitor *Bifidobacterium* populations in the dominant colonic flora after antibiotic treatment. Of the 121 DNAs obtained, only 91 could be cleaved by restriction endonuclease *Bam*HI. For the 91

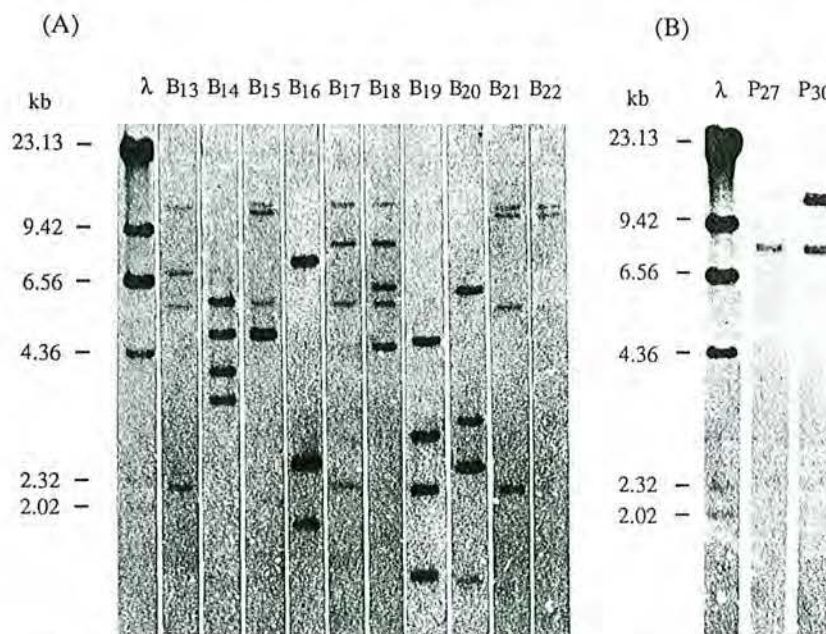


FIG. 3. Autoradiogram of *Bam*HI-digested DNA (A) or *Pvu*II-digested DNA (B) from *Bifidobacterium* isolates used in the clinical experiment and probed with [α - 32 P]dCTP-labeled 23S ribosomal fragment I41. Lane λ shows the hybridization of [α - 32 P]dCTP-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; the other lanes correspond to the ribosomal patterns listed in Table 2 (see also Table 3). Exposure was for 8 days at -70°C with two intensifying screens.

*Bam*HI restriction patterns obtained, hybridization with the I41 probe revealed 21 identical patterns corresponding to that of the selected exogenous strain, NBS1SR, used as a potential colonization vector of the intestine. The other 70 isolates were characterized by only nine distinct *Bam*HI ribosomal patterns (Fig. 3).

To identify these 70 isolates, their ribosomal patterns were

compared with those of previously described collection strains (see above). Only strain CE6 and *B. longum* ATCC 15708 shared the same banding pattern. Nevertheless, they displayed distinct fingerprints (data not shown) and could be differentiated by *Pvu*II ribosomal patterns (Fig. 4). Five of the other *Bam*HI ribosomal patterns also shared similarities with those of *B. longum* strains (two or three common ribosomal bands of

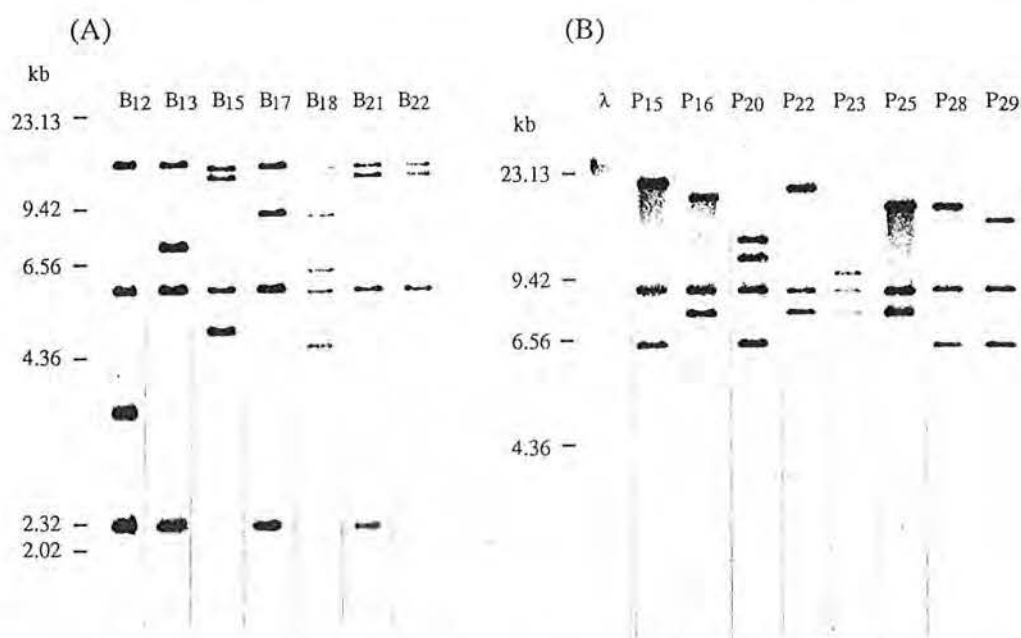


FIG. 4. Autoradiogram of *Bam*HI-digested DNA (A) or *Pvu*II-digested DNA (B) from *Bifidobacterium* strains probed with [α - 32 P]dCTP-labeled 23S ribosomal fragment I41. Lane λ shows the hybridization of [α - 32 P]dCTP-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; the other lanes correspond to the ribosomal patterns listed in Table 2 (see also Table 3). Exposure was for 24 h at -70°C with two intensifying screens.

TABLE 3. Classification of *Bifidobacterium* isolates used in the clinical experiment based on *Bam*HI, *Eco*RV, and *Pvu*II hybridization patterns with I41 as a probe

Strain ^a	I41 pattern with <i>Bam</i> HI	No. of ribosomal bands	I41 pattern with <i>Eco</i> RV	No. of ribosomal bands	I41 pattern with <i>Pvu</i> II	No. of ribosomal bands
CE1	B ₁₅	4	E ₁₇	4	P ₂₀	4
CE2	B ₁₆	3 ^b	E ₁₈	4	P ₂₁	3
CE3	B ₁₇	4	E ₁₉	4	P ₂₂	3
CE4	B ₁₈	5	E ₂₀	5	P ₂₃	4
CE5	B ₁₉	4	E ₂₁	4	P ₂₄	5
CE6	B ₁₃	4	E ₂₂	4	P ₂₅	3
CE7	B ₂₀	4	E ₂₃	5	P ₂₆	6
CE8	Not cleaved		E ₂₄	4	P ₂₇	4
CE9	B ₂₁	4	E ₂₅	3	P ₂₈	3
CE10	B ₂₂	3	E ₂₆	2	P ₂₉	3
CE11	Not cleaved		E ₂₄	4	P ₃₀	5 ^b

^a The 121 isolates used in the clinical experiment were grouped into 11 distinct ribosomal patterns and named CE1 to CE11.

^b I41 detected a fragment whose intensity could indicate it to be a doublet.

four, which were found in ribosomal patterns of the two collection strains of *B. longum* [Fig. 4]). Moreover, numerous plasmids whose presence was observed in *B. longum* strains of human origin (27) were observed in the electrophoretic patterns of their native DNAs (data not shown). Thus, these six strains (CE1, CE3, CE4, CE6, CE9, and CE10) very probably belong to the *B. longum* species. The three remaining *Bam*HI ribosomal patterns showed no striking resemblance with those of collection or industrial strains.

DNA from the 30 isolates not cleaved with *Bam*HI was analyzed for *Eco*RV and *Pvu*II patterns. Hybridization with the I41 probe revealed two distinct *Pvu*II ribosomal patterns (CE8 and CE11 differed by only one ribosomal band; Fig. 3) but only one *Eco*RV ribosomal pattern (CE8 and CE11 displayed exactly the same ribosomal pattern). The numbers of *Pvu*II-digested ribosomal bands shown in Table 3 were calculated after a long migration. As a matter of fact, the group of low-molecular-size bands can be separated into three distinct fragments (gel not shown).

To identify these 30 isolates, hybridization with I41 was used to compare their *Eco*RV restriction patterns with those of collection strains. The results showed that they shared three common ribosomal bands with *B. adolescentis* CIP64.59^T and one with the other three collection strains of *B. adolescentis* (Fig. 5).

The three remaining *Bam*HI ribosomal patterns were also analyzed after *Eco*RV digestion. Two strains (CE2 and CE7) shared three identical common ribosomal bands in the *Eco*RV ribosomal patterns with *B. adolescentis* CIP64.59^T. Common bands were the same as those found for strains CE8 and CE11 (Fig. 5). Thus, these strains (CE2, CE7, CE8, and CE11) very probably belong to the *B. adolescentis* species.

In conclusion, hybridization analysis with ribosomal probe I41 and *Bam*HI and *Eco*RV restriction patterns allowed strains belonging to the *B. longum* and *B. adolescentis* species to be tentatively identified.

Table 4 shows the change in *Bifidobacterium* populations belonging to the dominant colonic flora of two volunteers before and after antibiotic treatment. In the intestinal flora of these two volunteers, no resistant *Bifidobacterium* strains were detected before antibiotic administration. However, resistant *Bifidobacterium* strains were detected during and after antibiotic therapy. For volunteer one, one resistant strain appeared before the ingestion of exogenous resistant strain NBS1SR (day 3). The ribotyping method showed that this strain, probably originating from subdominant flora, was different

from NBS1SR. It was selected for by antibiotics. When exogenous *Bifidobacterium* sp. strain NBS1SR ingestion was stopped, this strain rapidly disappeared from the intestinal flora, while other resistant strains persisted. Moreover, some of these strains were not detectable in the dominant colonic flora before antibiotic administration. They were also selected for by antibiotic treatment. In the same way, numerous *Bifidobacterium* strains detectable before antibiotic treatment were eliminated and replaced by others. Similar results were found for the other three volunteers.

Thus, as populations in stools reflect the most predominant populations in the gastrointestinal tract, the *B. longum* and *B.*

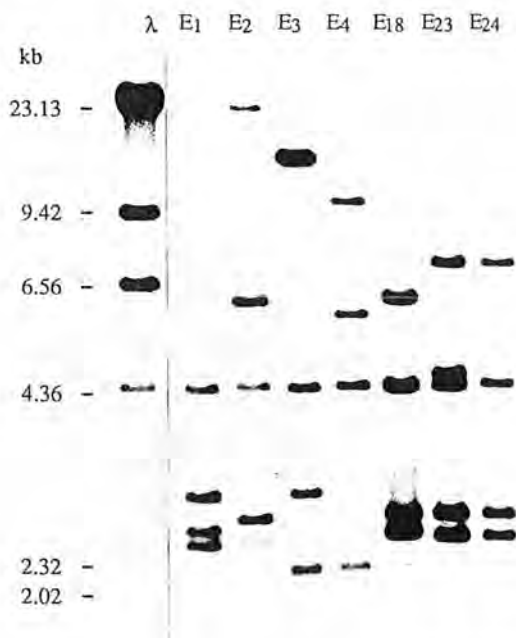


FIG. 5. Autoradiogram of *Eco*RV-digested DNA from *Bifidobacterium* strains probed with [α -³²P]dCTP-labeled 23S ribosomal fragment I41. Lane λ shows the hybridization of [α -³²P]dCTP-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; the other lanes correspond to the ribosomal patterns listed in Tables 2 and 3. Exposure was for 19 h at -70°C with two intensifying screens.

TABLE 4. Numbers of *Bifidobacterium* strains collected in the dominant colonic flora of two volunteers and identified by their ribosomal patterns^a

Volunteer	Strain	No. of isolates collected on nonselective medium and corresponding to one pattern (no. of isolates collected on selective medium ^b) on day:																	
		0 ^c	3	6	10	12	16	20	24	28	32	36	38	40	45	52	63	68	
1	CE1	3			1					1		1	1		1	2	2		
	CE2	1																	
	CE3		3 (1)	5	2 (1)	2 (1)	1	1		1 (2)		3		2	1	2 (1)	3	1	
	CE4								2 (1)	1									
	CE5					1													
	CE10							1											
	NBS1SR			(1)															
2	CE3	1																	
	CE5									1									
	CE6	2																	
	CE7	1																	
	CE8		3	3 (1)	2	1	(1)	2 (1)	2 (2)	2 (1)	2 (1)	3 (1)		1	1				
	CE11														(1)				
	NBS1SR			2 (1)	(1)	(1)													

^a The ribosomal patterns of the strains are summarized in Tables 2 and 3.^b Containing streptomycin and rifampin.^c Time zero corresponds to the start of antibiotic treatment.

adolescentis species seemed to be predominant in the genus *Bifidobacterium*. We noted that the DNA of *Bifidobacterium* strains originating from different volunteers displayed the same *Bam*HI ribosomal pattern. For example, strain CE3, identified as belonging to the *B. longum* species, was found in the intestines of the five human subjects.

DISCUSSION

Despite DNA-DNA hybridization experiments done by Scardovi et al. (26), the taxonomy of the genus *Bifidobacterium* remains problematic and often uncertain for laboratory use. A molecular method based on rRNA gene restriction fragment length polymorphisms has been proposed to resolve such problems.

In this study, we report the comparative analysis of the *Bam*HI, *Eco*RV, and *Pvu*II ribosomal patterns for 21 collection or industrial *Bifidobacterium* strains and for 121 *Bifidobacterium* isolates regularly collected from the dominant colonic flora of five human volunteers. In each of these experiments, a specific core of common bands was detected in the ribosomal patterns. This core varied with the restriction endonuclease used and regrouped different strains of the same species. The *Bam*HI ribosomal patterns revealed more common bands within the same species than the *Eco*RV or *Pvu*II ribosomal patterns. They allowed the different collection strains of *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, and *B. animalis* to be tentatively identified, along with some *B. adolescentis* strains. They also permitted *B. breve* strains to be separated from other strains but did not differentiate them from each other, except for *B. breve* ATCC 15698. For DNA not digested by *Bam*HI because of the existence of a methylcytosine residue in the recognition site (13), it was necessary to use *Eco*RV before characterization with the ribosomal probe. *Eco*RV ribosomal patterns allowed strains of the same species to be regrouped but failed to differentiate *B. breve* strains as well as two *B. bifidum* strains. However, classical electrophoretic patterns remained very different from each other. To differentiate *B. breve* strains from each other, the ribosomal probe was used with *Pvu*II, allowing each strain of this species to be characterized (6). The *Bam*HI and *Eco*RV ribosomal patterns

point out a relationship within the same species, except for *B. infantis* strains. Indeed, only the *B. infantis* strains did not possess common ribosomal bands, so we doubt the validity of this species. Every member would appear to be distant from the others. In the same way, the electrophoretic patterns of these strains were very different from each other.

In conclusion, ribosomal patterns allowed all the strains to be characterized but did not provide information enabling the classification of the different species in relation to each other.

This molecular method allowed us to monitor the intestinal *Bifidobacterium* composition of human volunteers over time after antibiotic treatment and then ingestion of fermented milk containing a resistant exogenous *Bifidobacterium* strain (NBS1SR). Manipulation of the gut microflora has been attempted as a means of introducing into the digestive tract new microorganisms which are beneficial to the host or which are able to modify in a propitious way the equilibrium and metabolic activities of the indigenous flora. Such microorganisms are called probiotics (10). By use of milk fermented with NBS1SR, it was shown that this exogenous strain reached a mean level in stools of 6×10^8 to 7×10^8 CFU/g as long as the product was consumed. Fecal recovery of the oral load was 30% (5). This high figure makes bifidobacteria a potentially privileged vector of probiotic actions. Several conditions are needed to facilitate the prolonged colonization of the intestine by an exogenous bacterium. Its belonging to the dominant flora of the host and its viability in the upper digestive tract seem to be prerequisites (20). Improving the resistance of the host to intestinal pathogens, whether by a "barrier" effect of the flora or by stimulation of the immune system, and altering the profile of the colonic flora and its enzymatic capacity are among the most widely investigated putative effects of probiotics (20).

The different ribosomal patterns obtained allowed a change in the dominant *Bifidobacterium* flora caused by the antibiotic treatment to be observed. Some strains of this dominant flora were eliminated, while others, belonging probably to subdominant flora, replaced them. This result is contradictory to literature indicating the return of a flora to its initial state after antibiotic treatment (28). Even 2 months after the end of antibiotic administration, the colonic flora remained different

from the one observed before treatment. For each unknown isolate, the sizes of hybridizing *Bam*HI bands were compared with those for collection strains. Because of the numerous common ribosomal bands, the DNA of six patterns could be identified as *B. longum* and that of four patterns could be identified as *B. adolescentis*, even though only one pattern for these isolates was identical to that of a collection strain.

Bifidobacteria constitute a numerically major part of the fecal flora of healthy humans. The most common bifidobacteria isolated from infants belong to the species *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, and *B. longum*. In contrast, *B. adolescentis* and *B. longum* are found in large numbers in the intestines of children, adults, and senile men, although the occurrence of *B. adolescentis* is significantly higher in the senile men than in the other age groups (17). The predominant species found in this study were *B. longum* and *B. adolescentis*, in agreement with previous results. Moreover, several strains of the same species can coexist in the same flora (up to four different *B. longum* strains for one subject).

We conclude that even under experimental conditions designed to impair resistance to colonization, the exogenous *Bifidobacterium* strain was unable to colonize the human colon. Indeed, a microorganism cannot affect its environment if its population does not reach a sufficient level. The minimal level is estimated to be about 10^7 to 10^8 CFU/g in the large intestine (9). Apparently, the barrier effect of the indigenous flora is the main factor in the elimination of exogenous microorganisms. The mechanisms proposed are poorly understood; these include space occupation; competition for a substrate; secretion of bacteriocins or other antagonistic proteins; production of antagonistic substrates, such as volatile fatty acids and H_2S ; and adverse physicochemical (pH and redox potential) conditions (9, 16). These numerous obstacles to colonization of the gut by nonpathogenic microorganisms may be responsible for the usual failure of attempts to implant exogenous bacteria (20).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Nadine Saulnier for help in DNA extractions.

REFERENCES

- Baloga, A. O., and S. K. Harlander. 1991. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological survey. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2324-2331.
- Barza, M., M. Giuliano, N. V. Jacobus, and S. L. Gorbach. 1987. Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on colonization resistance of intestinal microflora of humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:723-727.
- Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**:155-157.
- Biavati, B., V. Scardovi, and W. E. C. Moore. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:358-373.
- Bouhnik, Y., P. Pochart, P. Marreau, G. Arlet, I. Goderel, and J.-C. Rambaud. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology* **102**:875-878.
- Bourget, N., J.-M. Simonet, and B. Decaris. 1993. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rml* loci number. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**:11-20.
- De Buyser, M.-L., A. Morvan, S. Aubert, F. Dilasser, and N. El Solh. 1992. Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:889-899.
- Demuyter, P., P. Leblond, B. Decaris, and J.-M. Simonet. 1988. Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2001-2007.
- Ducluzeau, R., and P. Raibaud. 1989. Les interactions bactériennes dans le tube digestif. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **8**:291-311.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut* **32**:439-442.
- Grimont, F., and P. A. D. Grimont. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **137**:165-175.
- Grimont, F., M. Lefèvre, E. Ageron, and P. A. D. Grimont. 1989. rRNA gene restriction patterns of *Legionella* species: a molecular identification system. *Res. Microbiol.* **140**:615-626.
- Kessler, C., P. S. Neumaier, and W. Wolf. 1985. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases—a review. *Gene* **33**:1-102.
- Lederberg, J., and E. M. Lederberg. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63**:399-406.
- Mitsuoka, T. 1969. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungsstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* **195**:455-469.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteriol. Microflora* **1**:3-24.
- Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteriol. Microflora* **3**:11-28.
- Modler, H. W., R. C. McKellar, and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**:29-41.
- Pébay, M., C. Colmin, G. Guédon, C. De Gaspéri, B. Decaris, and J.-M. Simonet. 1992. Detection of intraspecific DNA polymorphism in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by a homologous rDNA probe. *Res. Microbiol.* **143**:37-46.
- Rambaud, J.-C., Y. Bouhnik, P. Marreau, and P. Pochart. 1993. Manipulation of the human gut microflora. *Proc. Nutr. Soc.* **52**:357-366.
- Reuter, G. 1971. Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**:273-275.
- Roy, D., and P. Ward. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:739-749.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., p. 9.31-9.57. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Scardovi, V., B. Sgorbati, and G. Zani. 1971. Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* **106**:1036-1039.
- Scardovi, V., L. D. Trovatielli, G. Zani, F. Crociani, and D. Matteuzzi. 1971. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**:276-294.
- Sgorbati, B., V. Scardovi, and D. J. Leblanc. 1982. Plasmids in genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2121-2131.
- Simon, G. L., and S. L. Gorbach. 1987. Intestinal flora and gastrointestinal function, p. 1729-1746. In L. R. Johnson (ed.), *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd ed. Raven Press, New York.
- Szybalsky, W., and V. Bryson. 1952. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.* **64**:489-499.

3.3. RECHERCHE DE SONDAS NUCLEIQUES SPECIFIQUES

La conservation des séquences ribosomiques au cours de l'évolution rend impossible leur utilisation en tant que sonde genre spécifique, ou même espèce spécifique. Actuellement, les techniques d'identification à l'aide de sondes moléculaires se développent beaucoup, notamment dans le domaine médical. Des oligonucléotides spécifiques choisis aux extrémités de ces sondes permettent une identification rapide du microorganisme étudié lorsqu'ils sont amplifiés par PCR (polymerase chain reaction). Dans ce même but, nous avons initié la construction de sondes nucléiques espèces spécifiques, réalisant des mini-banques d'ADN à partir de 10 souches de *Bifidobacterium* (Tableau 20). Les fragments clonés sont obtenus après utilisation de l'enzyme de restriction *Bam*HI, à l'exception de l'ADN de la souche *B. adolescentis* CIP64.59T qui a été clivé par *Hind*III. La valeur de ces sondes est fonction de leur spécificité. Une sonde idéale devrait donner un signal d'hybridation avec toutes les souches d'une espèce. D'autre part, elle ne devrait donner aucun signal avec les souches des autres espèces. L'hybridation de ces sondes sur les profils de restriction des souches appartenant à la même espèce peut également permettre de détecter des relations clonales. En effet, le fragment d'ADN cloné peut avoir subi des modifications de type mutations ponctuelles, insertions ou délétions qui vont modifier son poids moléculaire et donc sa position dans les profils de certaines autres souches de l'espèce. L'utilisation d'un fragment d'ADN de ce type comme sonde sur les profils des autres souches de la même espèce devrait donc révéler des signaux correspondant à un ou plusieurs fragments d'ADN selon les causes du polymorphisme.

3.3.1. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. adolescentis* CIP64.59T

Les résultats des hybridations réalisées avec les sondes A6/2 et A6/17, issues de l'ADN de la souche *B. adolescentis* CIP64.59T (Tableau 20), sont rassemblés dans le tableau 21.

La collection de souches de *Bifidobacterium* du laboratoire ne s'étant développée que progressivement, la sonde A6/2 n'a pu être testée sur toutes les souches présentes actuellement au laboratoire. Néanmoins, ces résultats d'hybridation indiquent que cette sonde A6/2 est spécifique de la souche type *B. adolescentis* CIP64.59T à partir de laquelle l'ADN a été cloné, puisqu'elle hybride uniquement sur le profil de cette souche, à la taille attendue.

Par contre, la sonde A6/17 qui avait été testée au départ sur les mêmes ADN a donné un signal d'hybridation fort non seulement sur l'ADN de la souche qui a fourni l'ADN de la banque mais aussi sur les trois autres ADN des souches de l'espèce *B. adolescentis*. De plus, l'hybridation sur les profils de restriction *Hind*III (site de restriction du clonage) de ces quatre souches a lieu sur un fragment de 1,85 kb correspondant à la taille du fragment cloné. Cette sonde révèle en outre un fragment de même taille lorsqu'elle est hybridée sur les profils de

Tableau 20 : Origine et liste des sondes testées.

origine de l'ADN cloné	nombre de sondes testées	désignation des sondes testées
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	2	A6/2 (2,45 kb), A6/17 (1,85 kb).
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	6	b4 (2,2 kb), b5 (1,5 kb), b6 (1,85 kb), bA2 (2,15 kb), bA8 (2,25 kb), bA7/2 (1,6 kb).
BO	2	BO3 (1,6 kb), BO4 (1,3 kb).
<i>B. animalis</i> ATCC25527 ^T	1	An1 (1,8 kb).
<i>B. longum</i> ATCC15708	8	L4/1 (1,5 kb), L4/5 (1,85 kb), L5/17 (1,7 kb), L5/21 (1,55 kb), L5/22 (1,75 kb), L5/23 (1,1 kb), L5/30 (1,6 kb), L5/32 (1,2 kb)
<i>B. longum</i> CIP64.62T	4	L5 (1,85 kb), L8 (2,1 kb), L10 (1,35 kb), L18 (1,7 kb).
<i>B. longum</i> ATCC15707 ^T	12	L6/4 (1,4 kb), L6/6 (1,1 kb), L6/7 (1,8 kb), L6/12 (1,9 kb), L6/14 (1,8 kb), L6/25 (2,1 kb), L6/1 (1,7 kb), L6/11 (1,9 kb), L6/32 (1,15 kb), L6/44 (1 kb), L6/45 (1,75 kb), L6/51 (1,25 kb).
<i>B. infantis</i> ATCC15697 ^T	9	inf 2 (1 kb), inf 3 (1,6 kb), inf 4 (1,95 kb), inf 10 (1,35 kb), inf 13 (0,75 kb), inf 14 (1,4 kb), inf 16 (0,5 kb), inf 17 (1,1 kb), inf 25 (1,55 kb).
<i>B. infantis</i> ATCC25962	2	ID5 (1,8 kb), IG4 (1,3 kb).
<i>B. breve</i> CIP64.69T*	7*	br6/3 (1,75 kb), brA6 (1,3 kb), brA7 (1,55 kb) brA8 (1,7 kb), brB2 (2 kb), brB5 (1,8 kb), `brE7 (1,4 kb).

* mini-banque obtenue au laboratoire (N. Bourget)

Tableau 21 : Test de sondes issues du clonage de l'ADN de *B. adolescentis* CIP64.59T

Souche-cible Souches de collection	Désignation de la sonde	
	A6/2 (2,45 kb)	A6/17 (1,85 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	++
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	++	++
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	++
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	-	++
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	-	-
<i>B. breve</i> CIP64.68	-	-
<i>B. breve</i> CIP64.69T	-	-
<i>B. breve</i> CIP 64.70	-	-
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	-	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-
<i>B. longum</i> CIP64.62T	-	-
<i>B. longum</i> CIP64.63	-	-
<i>B. suis</i> CIP103377T	nd	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	nd	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde	
		A6/2 (2,45 kb)	A6/17 (1,85 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	-	-
CE 2	<i>B. adolesc.</i>	nd	++
CE 3-7	<i>B. longum</i>	-	-
CE 4-3	<i>B. longum</i>	-	-
CE 5-1		-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	-	-
CE 7-1	<i>B. adolesc.</i>	-	++
CE 8-7	<i>B. adolesc.</i>	-	++
CE 9	<i>B. longum</i>	-	-
CE 10	<i>B. longum</i>	-	-
CE 11	<i>B. adolesc.</i>	nd	++
B0		-	-
BB42	<i>B. longum</i>	nd	-

- , pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé.

Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes.

restriction *Hind*III de 4 souches provenant de l'expérience clinique : CE2, CE7-1, CE8-7 et CE11 (Fig. 38 (A)). Ces mêmes souches étaient déjà classées sur la base des ribotypes dans l'espèce *B. adolescentis*. Par ailleurs, cette sonde n'hybride sur aucun autre ADN testé. En particulier, elle n'hybride pas sur l'ADN de la souche *B. adolescentis* ATCC11146. Dans le chapitre précédent, nous avons émis des doutes quant à l'appartenance de cette souche à cette espèce, voire au genre *Bifidobacterium*. Ce résultat confirme donc ceux des ribotypes ainsi que ceux qui se fondent sur les profils fermentaires et l'absence de F6PPK dans les extraits cellulaires de cette souche (Chevalier *et al.*, 1990).

En vue de différencier les souches de l'espèce *B. adolescentis*, la sonde A6/17 a été hybridée sur leurs profils de restriction *Eco*RV (Fig. 38 (B)). Alors qu'un signal identique apparaît pour 7 des 8 ADN testés, on observe un signal d'hybridation sur un fragment de restriction de taille légèrement supérieure pour la souche CE7. Cette souche présente donc un remaniement d'un site de restriction *Eco*RV ou une mutation d'un des deux sites *Eco*RV par rapport aux autres souches de l'espèce. La sonde A6/17 a également été hybridée sur les profils de restriction *Bam*HI des quatre souches dont l'ADN peut être clivé par cette enzyme (Fig. 38 (C)). Cette fois, seule la souche de collection *B. adolescentis* CIP64.60 peut être différenciée des autres souches par son profil d'hybridation.

En conclusion, le fragment A6/17 issu du clonage de l'ADN de la souche *B. adolescentis* CIP64.59T est spécifique de l'espèce *B. adolescentis*, si l'appartenance de la souche ATCC11146 à cette espèce est bien remise en cause.

3.3.2. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. bifidum* CIP64.65

Les différentes sondes testées, issues de l'ADN de la souche *B. bifidum* CIP64.65 (Tableau 20), ont été hybridées sur les ADN natifs de certaines souches de collection, sur ceux de souches industrielles, ainsi que sur l'ADN de souches de l'expérience clinique, rassemblés sur une même membrane par la méthode du test en gouttes (1µg d'ADN déposé par chacune des souches). Les résultats des hybridations réalisées avec les 6 sondes testées sont rassemblés dans le tableau 22.

On constate une hybridation forte des sondes b4, b5, b6, bA2 et bA8 sur les ADN des souches de l'espèce *B. bifidum*, liée à des signaux d'hybridation faibles sur d'autres ADN. Par contre, la sonde bA7/2 n'a hybridé que sur les ADN des 3 souches de l'espèce *B. bifidum*. Cette sonde a été retestée plus tard sur de nombreux autres ADN, afin de confirmer sa spécificité (Fig. 39). Aucun signal d'hybridation nouveau n'a été détecté. Hybridée sur des

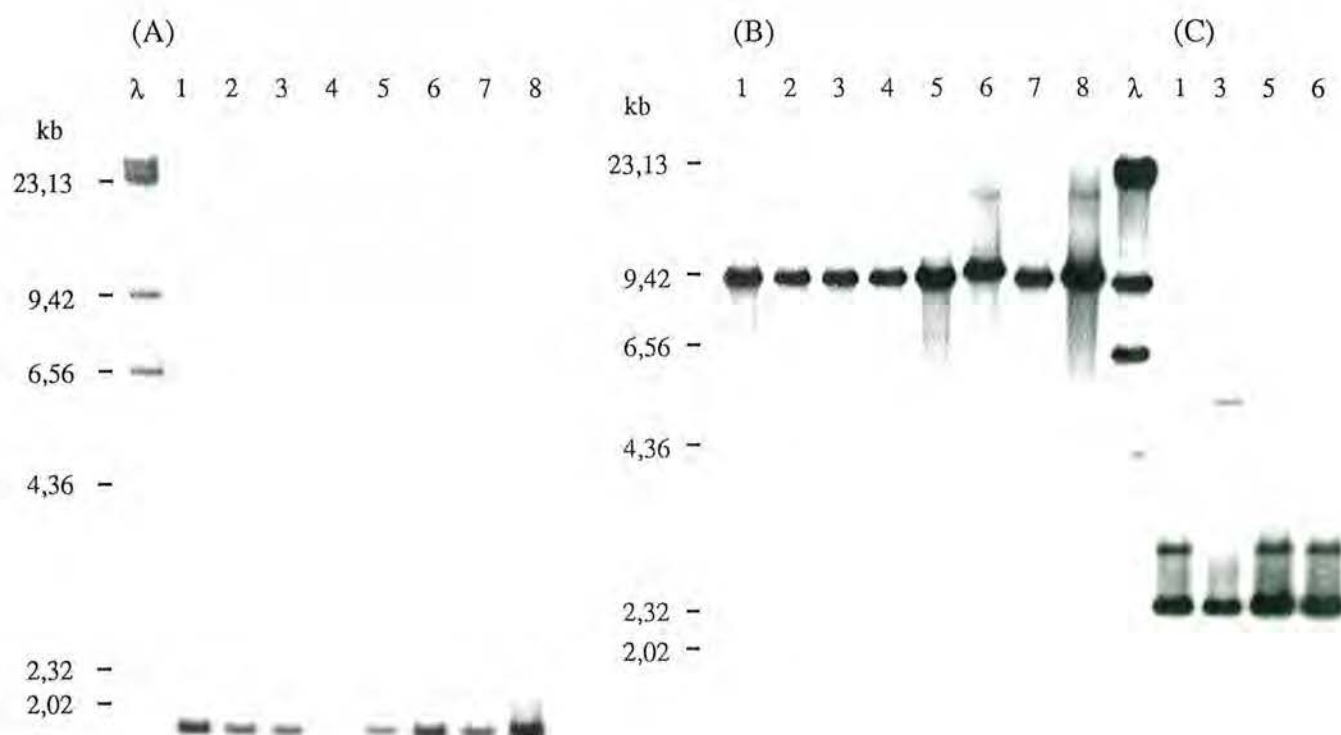


Fig. 38 : Autoradiographies obtenues après hybridation du fragment A6/17 (1,85 kb) et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur les profils de restriction *Hind*III (A), *Eco*RV (B) et *Bam*HI (C) de souches de l'espèce *B. adolescentis*.

Pistes 1 : *B. adolescentis* CIP64.58; pistes 2 : *B. adolescentis* CIP64.59T; pistes 3 : *B. adolescentis* CIP64.60; pistes 4 : *B. adolescentis* CIP64.61; pistes 5 : souche provenant de l'expérience clinique CE2; pistes 6 : CE7-1; pistes 7 : CE8-7; pistes 8 : CE11; pistes λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Marquage radioactif. Lavages effectués à 65°C. Exposition de 24h à -70°C avec deux écrans intensifiants.

Tableau 22 : Recherche d'une sonde spécifique de l'espèce *B. bifidum*.

Souche-cible	Désignation de la sonde					
	b4 (2,2 kb)	b5 (1,5 kb)	b6 (1,85 kb)	bA2 (2,15 kb)	bA8 (2,25 kb)	bA7/2 (1,6 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	±	±	+	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	±	±	nd	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	±	±	+	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	±	±	nd	-	±	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	±	±	±	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP56.7T	nd	nd	++	nd	nd	++
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	++	++	++	++	++	++
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>
<i>B. breve</i> ATCC15698	±	±	+	++	±	-
<i>B. breve</i> CIP64.68	±	±	nd	±	±	-
<i>B. breve</i> CIP64.69 T	±	±	±	-	-	-
<i>B. breve</i> CIP 64.70	±	±	nd	-	±	-
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	±	±	±	±	-	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	+	±	-	±	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> CIP64.62T	±	±	-	-	±	-
<i>B. longum</i> CIP64.63	-	±	-	±	-	-
<i>B. suis</i> CIP103377 T	±	±	±	-	±	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	±	±	±	-	-	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde					
		b4 (2,2 kb)	b5 (1,5 kb)	b6 (1,85 kb)	bA2 (2,15 kb)	bA8 (2,25 kb)	bA7/2 (1,6 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	±	±	nd	-	±	-
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	±	±	nd	-	±	-
CE 3-7	<i>B. longum</i>	-	±	nd	-	±	-
CE 4-3	<i>B. longum</i>	-	±	nd	-	±	-
CE 5-1		-	±	nd	-	-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	-	±	nd	±	±	-
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	±	±	nd	-	±	-
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	±	±	nd	-	-	-
CE 9	<i>B. longum</i>	-	±	nd	-	-	-
CE 10	<i>B. longum</i>	-	±	nd	-	-	-
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	±	±	nd	-	-	-
B0		±	±	-	-	-	-
BB42	<i>B. longum</i>	±	±	nd	-	±	-
C4	<i>B. infantis</i>	-	-	nd	-	-	-

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou / et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

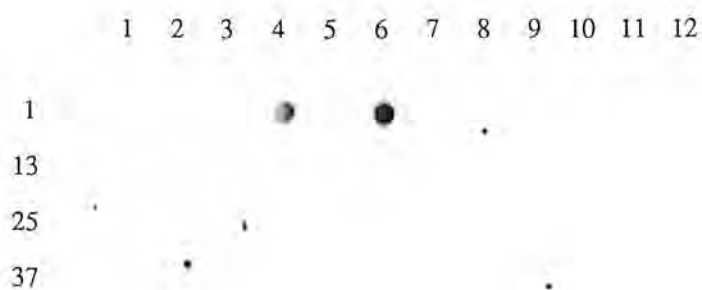


Fig. 39: Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment spécifique bA7/2 sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG. Révélation par chimioluminescence; exposition de 11h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41							

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	16.		CIP64.60
2.		ATCC15708	17.		CIP64.61
3.		C4Bh	23.		CE2
22.		CE1-1	28.		CE7-1
24.		CE3-7	29.		CE8-7
25.		CE4-3	32.		CE11
27.		CE6-1	18.	<i>Bifidobacterium species</i>	BO
30.		CE9	19.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC25527T
31.		CE10	20.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	21.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
5.		CIP64.64	26.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
6.		CIP64.65	33.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
7.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	34.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
8.		ATCC25962	35.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910T
9.		CIP63.78	36.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	37.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
11.		CIP64.68	38.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
12.		CIP64.69T	39.	<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC25912T
13.		CIP64.70	40.	<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC27540T
14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	41.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
15.		CIP64.59T			

profils *Bam*HI, cette sonde permet de distinguer un polymorphisme de restriction entre les souches de l'espèce *B. bifidum*. L'hybridation révèle en effet une bande à :

- 1,6 kb pour la souche *B. bifidum* CIP64.65 (Fig. 40 (B), piste 12),
- 1,25 kb pour la souche *B. bifidum* CIP64.64 (piste 13),
- 1,3 kb pour la souche *B. bifidum* CIP56.7 T (piste 14).

Les différences d'intensité des 3 bandes s'expliquent facilement par la quantité d'ADN déposée dans les 3 puits, notamment pour la piste 14 (Fig. 40 (A)). Entre les pistes 12 et 13 qui ont une quantité d'ADN presque similaire, l'intensité plus forte de la piste 12 semble être due à l'hybridation sonde sur sonde.

En outre, une hybridation de la sonde bA7/2 sur les profils de restriction *Eco*RV de ces souches a révélé un signal à 4,9 kb pour la souche *B. bifidum* CIP56.7 T, à 4,85 kb pour la souche *B. bifidum* CIP64.64 et un signal à 6,7 kb pour la souche *B. bifidum* CIP64.65 d'où provient l'ADN cloné (résultat non montré).

En conclusion, la sonde bA7/2 est spécifique de l'espèce *B. bifidum* et permet en outre de distinguer un RFLP entre les souches de cette espèce.

3.3.3. Sondes issues du clonage des ADN des souches BO et *B. animalis* ATCC25527^T

Rappelons que les souches industrielles BO, BOSR, BB11, BB12, BF1, C2, Bf. P, Bf. G, et Bf. C n'ont pu être distinguées les unes des autres par leurs profils de restriction ou leurs profils ribosomiques (§ 3.1.2; 3.2.2). De plus, ces souches n'ont pu être identifiées à l'une ou l'autre des espèces de la collection. Le clonage de fragments d'ADN de l'une de ces souches a été effectué en vue de déterminer à quelle (s) souche (s) de collection elles sont apparentées.

De même que précédemment, deux sondes issues du clonage de la souche industrielle BO (Tableau 20) ont été hybridées en tests en gouttes. Les résultats sont présentés dans le tableau 23.

On observe une forte hybridation des fragments BO3 et BO4 sur l'ADN des souches BO, BOSR, BB11, BB12, BF1, C2 et *B. animalis* ATCC25527^T. Pour le fragment BO3, aucun autre signal n'est détecté sur les autres ADN testés (Fig. 41).

Une hybridation avec une sonde clonée à partir de la souche *B. animalis* ATCC25527^T a alors été réalisée.

La sonde An1 (Tableau 20) a été hybridée sur les ADN natifs de souches de collection, de souches industrielles et de souches issues de l'expérience clinique. Une forte hybridation de

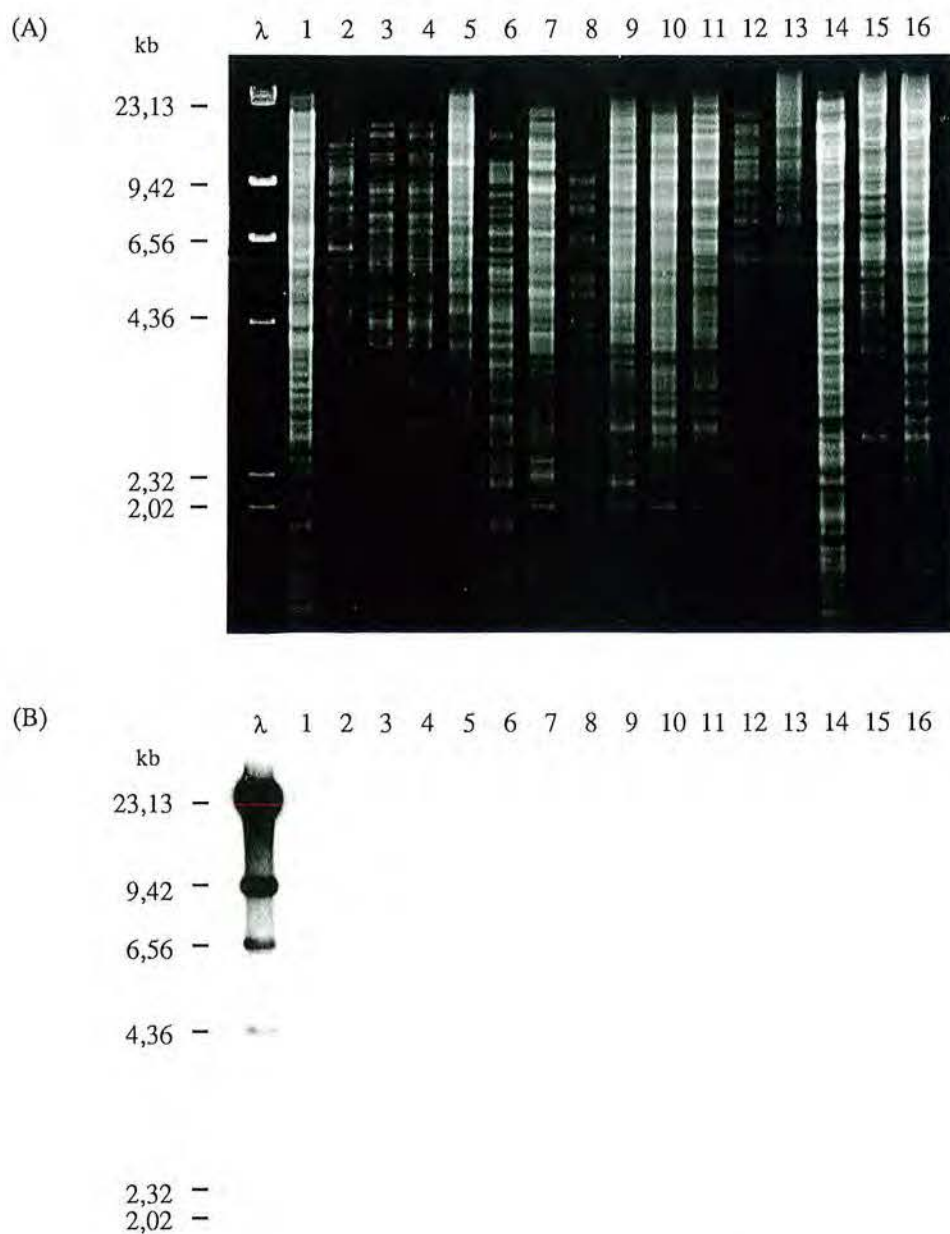


Fig. 40 : Profils de restriction *Bam*HI (A) de souches de *Bifidobacterium* de collection et autoradiographie (B) obtenue après hybridation sur ces profils du fragment ba7/2 (1,6 kb) et du bactériophage lambda utilisés comme sondes.

Pistes λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III utilisé comme marqueur de poids moléculaire; pistes 1 : *B. animalis* ATCC27527T; pistes 2 : *B. infantis* CIP63.78; pistes 3 : souche industrielle C4; pistes 4 : *B. infantis* ATCC25962; pistes 5 : *B. infantis* ATCC15697T; pistes 6 : *B. adolescentis* CIP64.61 *Pvu*II; pistes 7 : *B. adolescentis* CIP64.60; pistes 8 : *B. adolescentis* CIP64.59T *Pvu*II; pistes 9 : *B. adolescentis* CIP64.58; pistes 10 : *B. breve* CIP64.69T; pistes 11 : *B. breve* ATCC15698; pistes 12 : *B. bifidum* CIP64.65; pistes 13 : *B. bifidum* CIP64.64; pistes 14 : *B. bifidum* CIP56.7T; pistes 15 : *B. longum* CIP64.62T; pistes 16 : *B. longum* CIP64.63.

Marquage radioactif; lavages effectués à 65°C; exposition de 5 jours à - 70°C avec deux écrans intensifiants.

Tableau 23 : Recherche de l'origine de la souche industrielle B0

Souche-cible Souches de collection	Désignation de la sonde		
	B03 (1,6 kb)	B04 (1,3 kb)	An1 (1,6 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	-	±	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	++	++	++
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	±	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	±	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	-	±	-
<i>B. breve</i> CIP64.68	-	±	-
<i>B. breve</i> CIP64.69T	-	±	-
<i>B. breve</i> CIP 64.70	-	±	-
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	-	±	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	±	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	±	-
<i>B. longum</i> CIP64.62T	-	±	-
<i>B. longum</i> CIP64.63	-	±	-
<i>B. suis</i> CIP103377 T	-	±	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	-	±	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde		
		B03 (1,6 kb)	B04 (1,3 kb)	An1 (1,6 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	-	±	-
CE 3-7	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 4-3	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 5-1		-	±	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	-	±	-
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	-	±	-
CE 9	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 10	<i>B. longum</i>	-	±	-
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	nd	nd	-
B0		++	++	++
BB42	<i>B. longum</i>	-	nd	-
C4	<i>B. infantis</i>	-	nd	-
C48h	<i>B. longum</i>	nd	nd	-

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou/ et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

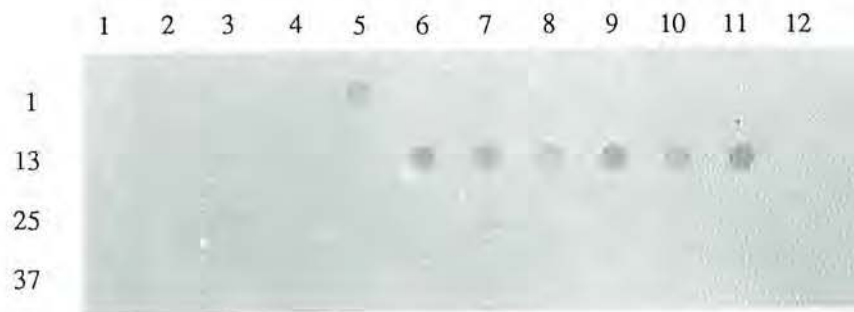


Fig. 41 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment BO3 sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par colorimétrie; exposition de 30min à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	14.	<i>Bifidobacterium longum</i>	CIP64.62T
2.		CIP64.59T	15.		CIP64.63
3.		CIP64.60	25.		BB42
4.		CIP64.61	26.		CE1-1
27.		CE2	28.		CE3-7
32.		CE7-1	29.		CE4-3
33.		CE8-7	31.		CE6-1
36.		CE11	34.		CE9
5.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC25527T	35.		CE10
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP64.64	16.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
7.		CIP64.65	17.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
8.	<i>Bifidobacterium breve</i>	CIP64.68	18.	<i>Bifidobacterium species</i>	BO
9.		ATCC15698	19.		BOSR
10.		CIP64.69T	20.		BB11
11.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	21.		BB12
12.		CIP63.78	22.		BF1
13.		ATCCC25962	23.		C2
24.		C4	30.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1

cette sonde est observée sur l'ADN de la souche *B. animalis* ATCC25527^T qui a fourni l'ADN de la banque, ainsi que sur celui de la souche BO. Aucun signal n'est visible sur les autres ADN (Fig. 42).

La sonde An1 a également été hybridée sur les profils de restriction *Bam*HI et *Pvu*II des souches BO, BOSR, BB11, BB12, BF1 et C2 ainsi que sur celui de la souche de collection *B. animalis* ATCC25527^T. Une bande de la taille attendue (1,8 kb) est observée sur le profil de la souche *B. animalis* ATCC25527^T et une bande de taille identique est observée sur le profil des 6 souches industrielles (Fig. 43 (A)). Aucun polymorphisme de restriction n'est donc détecté sur les profils *Bam*HI. Par contre, ces souches peuvent être différenciées par l'hybridation de la sonde An1 sur leurs profils de restriction *Pvu*II. En effet, un fragment de 15 kb est mis en évidence sur le profil de la souche *B. animalis* ATCC25527^T alors que celui qui est révélé sur le profil des 6 souches industrielles est de 10 kb (Fig. 43 (B)).

Les fragments An1 et BO3 sont par conséquent spécifiques de la souche de collection *B. animalis* ATCC25527^T et des souches industrielles BO, BOSR, BB11, BB12, BF1 et C2. De plus, on n'observe pas d'hybridation croisée entre ces deux fragments (résultat non montré). Les trois autres souches industrielles Bf. P, Bf. G, et Bf. C possédant le même profil de restriction que les précédentes, il n'a pas été jugé nécessaire de les hybrider avec la sonde An1. Ces résultats permettent donc d'identifier cet ensemble de souches industrielles à l'espèce *B. animalis*.

La comparaison des différents ribotypes *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III et *Pvu*II de la souche de collection *B. animalis* ATCC25527^T avec ceux de la souche BO montre qu'ils ne partagent pourtant aucune bande ribosomique commune. Une migration longue fait néanmoins apparaître une bande très légère sur le profil de la souche BO qui correspond à une bande forte sur le profil de la souche *B. animalis* ATCC25527^T (Fig. 24, P₂₇ et P₅).

L'appartenance de ces souches industrielles à l'espèce *B. animalis* a été confirmée récemment. En effet, se basant sur des études d'électrophorèse en champs pulsés, Roy et Ward (1993) démontrent que la plupart des souches du genre *Bifidobacterium* issues de produits laitiers européens correspondent à la souche *B. animalis* ATCC27536 isolée des fécès de poulet. En vue d'identifier les souches industrielles présentant le profil de restriction caractéristique de la souche BO, cette souche a été étudiée.

On ne constate en effet aucune différence visible entre les profils de restriction *Bam*HI et *Pvu*II de la souche de collection *B. animalis* ATCC27536 et ceux de la souche industrielle BO (résultats non montrés).

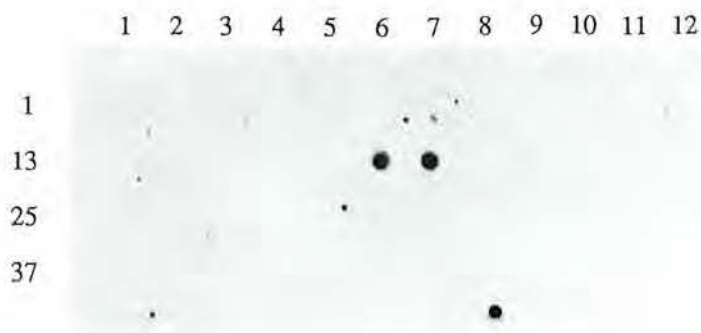


Fig. 42 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment spécifique An 1 sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 3h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41							

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	16.		CIP64.60
2.		ATCC15708	17.		CIP64.61
3.		C4Bh	23.		CE2
22.		CE1-1	28.		CE7-1
24.		CE3-7	29.		CE8-7
25.		CE4-3	32.		CE11
27.		CE6-1	18.	<i>Bifidobacterium species</i>	BO
30.		CE9	19.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC25527T
31.		CE10	20.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	21.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
5.		CIP64.64	26.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
6.		CIP64.65	33.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
7.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	34.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
8.		ATCCC25962	35.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910T
9.		CIP63.78	36.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	37.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
11.		CIP64.68	38.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
12.		CIP64.69T	39.	<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC25912T
13.		CIP64.70	40.	<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC27540T
14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	41.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
15.		CIP64.59T			

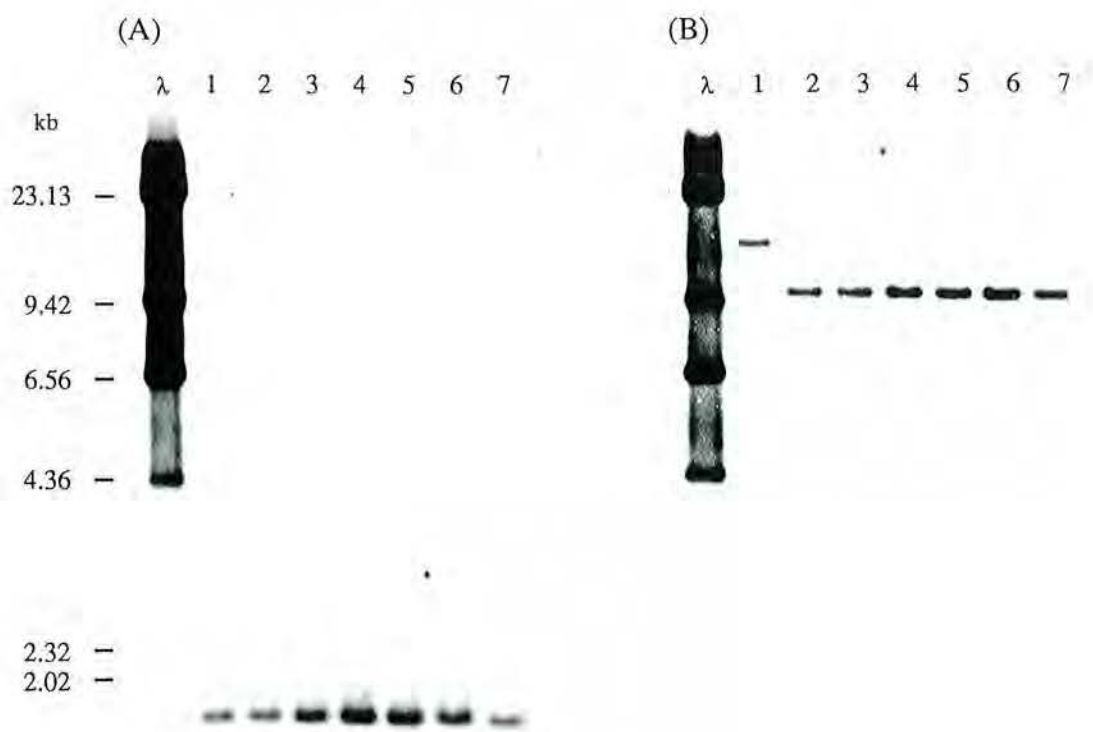


Fig. 43 : Autoradiographies obtenues après hybridation du fragment spécifique An1 (1,8 kb) et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur les profils de restriction *Bam*HI (A) et *Pvu*II (B) de *B. animalis* ATCC25527T et de 6 souches industrielles.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III utilisé comme marqueur de poids moléculaire; piste 1 : *B. animalis* ATCC25527T; piste 2 : BO; piste 3 : BOSR; piste 4 : BB11; piste 5 : BB12; piste 6 : BF1; piste 7 : C2.

Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 15h à température ambiante.

En conclusion, les souches industrielles BO, BB11, BB12, BF1, C2, Bf. P, Bf. G et Bf. C présentent un profil génomique *Bam*HI et *Pvu*II indistinguishable de celui de la souche de collection *B. animalis* ATCC27536. Ce résultat confirme donc l'hypothèse de l'appartenance de ces souches à l'espèce *B. animalis*, fondée sur l'hybridation de la sonde spécifique An1.

3.3.4. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. longum* ATCC15708

Huit fragments *Bam*HI issus de l'ADN de la souche *B. longum* ATCC15708 ont été testés (Tableau 20). Les résultats des différentes hybridations sont rassemblés dans le tableau 24.

Six sondes (L4/1, L5/17, L5/21, L5/22, L5/23 et L5/30) hybrident sur de nombreux ADN. La figure 44 (A) présente l'hybridation obtenue avec la sonde L5/23. La sonde L4/5 révèle par contre un signal fort uniquement sur l'ADN des souches de collection *B. longum* ATCC15708 et *B. suis* CIP103377T (Fig. 44 (B)). On distingue un signal extrêmement faible sur l'ADN de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. Cette sonde hybride également sur l'ADN de la souche industrielle C4Bh, ainsi que sur l'ADN de l'une des souches issues de l'expérience clinique, CE6-1. Comme pour l'ADN de la souche *B. longum* ATCC15707^T, on distingue un signal très faible sur l'ADN des souches industrielles BB42 et BL2 qui sont considérées comme des variants de cette souche de collection (§ 3.1.2). En conclusion, l'hybridation de la sonde L4/5 ne donne aucun signal révélant une homologie forte sur l'ADN de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T, alors que cette sonde hybride fortement sur l'ADN d'une souche appartenant à une autre espèce, *B. suis* CIP103377T. Ces deux souches types partagent cependant 78% d'identité ADN-ADN selon Lauer et Kandler (1983), et pourraient être réunies en une même espèce sur ce critère. La sélection d'une sonde issue de l'ADN de la deuxième souche *B. longum* de collection, qui n'hybride qu'avec l'ADN de cette souche et avec celui de la souche *B. suis* CIP103377T renforce cette hypothèse.

Pour ce qui concerne les souches de collection, la dernière sonde, L5/32, hybride uniquement sur l'ADN de la souche *B. longum* ATCC15708 qui a fourni l'ADN de la banque. Cependant, elle hybride sur la souche industrielle C4Bh ainsi que sur l'ADN de nombreuses souches issues de l'expérience clinique : CE1-1, CE2, CE3-7, CE4-3, CE6-1, CE9 (révélé plus tard) et CE10 (Fig. 44 (C)). Ces souches avaient été précédemment classées dans l'espèce *B. longum*, excepté la souche CE2, classée dans l'espèce *B. adolescentis* sur le critère des ribotypes et sur l'utilisation de la sonde spécifique A6/17 (cf. § 3.3.1). Une hybridation sur les profils de restriction *Bam*HI de ces souches (Fig. 45) a montré qu'elle hybridait sur le profil de la souche de collection *B. longum* ATCC15708 à la taille attendue (1,2 kb), sans hybrider sur celui de la deuxième souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. Le fragment L5/32 a

Tableau 24 : Test des sondes issues du clonage de l'ADN de *B. longum* ATCC15708.

Souche-cible	Désignation de la sonde							
	L4/1 * (1,5 kb)	L4/5 (1,85 kb)	L5/17 (1,7 kb)	L5/21 (1,55 kb)	L5/22 (1,75 kb)	L5/23 (1,1 kb)	L5/30 (1,6 kb)	L5/32 (1,2 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	+	-	+	±	±	-	+	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	+	-	+	±	++	±	+	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	-	+	±	+	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	-	-	++	±	++	±	+	-
<i>B. adolescentis</i> ATCC11146	-	-	+	-	-	-	++	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	-	-	+	±	+	-	±	-
<i>B. bifidum</i> CIP56.7T	++	-	+	++	++	±	+	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	-	+	++	+	±	+	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	±	-	+	±	+	±	+	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	++	-	++	++	+	+	++	-
<i>B. breve</i> CIP64.68	++	-	++	++	++	+	++	-
<i>B. breve</i> CIP64.69T	+	-	++	+	++	+	++	-
<i>B. breve</i> CIP 64.70	++	-	++	++	++	+	++	-
<i>B. infantis</i> ATCC15697	+	-	++	++	++	+	++	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	±	-	+	±	+	±	+	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. longum</i> ATCC15707T	++	±	++	++	++	++	++	-
<i>B. longum</i> ATCC15708	±	++	++	++	++	++	++	++
<i>B. suis</i> CIP103377T	±	++	++	++	++	++	++	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	+	-	+	±	+	-	+	-
<i>B. angulatum</i> ATCC27535T	-	-	+	-	±	-	+	-
<i>B. asteroides</i> ATCC25910T	-	-	+	-	-	-	++	-
<i>B. catenulatum</i> ATCC27539T	+	-	+	±	+	-	+	-
<i>B. coryneforme</i> ATCC25911T	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>B. globosum</i> ATCC25965T	-	-	+	±	±	-	+	-
<i>B. pseudolongum</i> ATCC25526T	-	-	+	±	+	-	++	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde							
		L4/1 * (1,5 kb)	L4/5 (1,85 kb)	L5/17 (1,7 kb)	L5/21 (1,55 kb)	L5/22 (1,75 kb)	L5/23 (1,1 kb)	L5/30 (1,6 kb)	L5/32 (1,2 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	±	-	++	+	++	++	++	++
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	±	-	+	+	+	-	±	++
CE 3-7	<i>B. longum</i>	+	-	++	++	++	++	++	++
CE 4-3	<i>B. longum</i>	+	-	++	++	++	++	++	++
CE 5-1		+	-	++	++	++	-	+	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	++	+	++	++	++	++	++	++
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	-	-	-	+	+	-	±	-
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	-	-	+	±	+	-	++	-
CE 9	<i>B. longum</i>	++	-	++	-	++	++	++	++
CE 10	<i>B. longum</i>	-	-	++	++	++	++	++	++
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
BO		-	-	++	-	++	±	±	-
BB42	<i>B. longum</i>	++	±	++	++	++	++	++	-
BL2	<i>B. longum</i>	++	±	++	++	++	++	++	-
C4Bh	<i>B. longum</i>	++	++	++	++	++	++	++	++

- , pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou/ et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

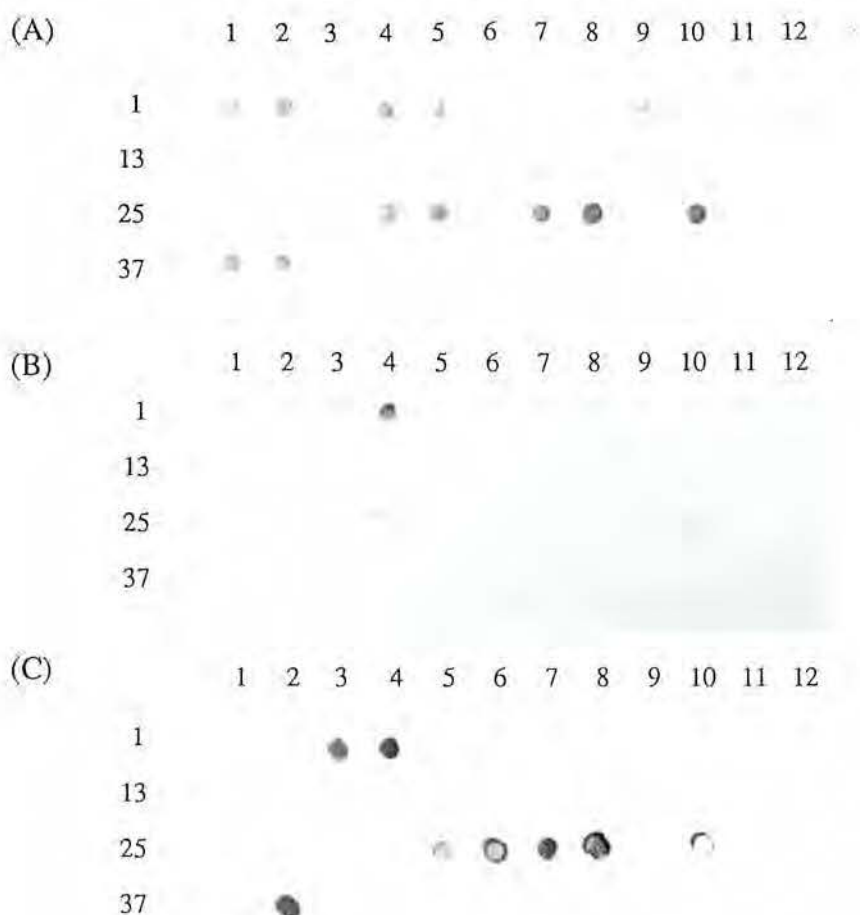


Fig. 44 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments L5/23 (A), L4/5 (B) et L5/32 (C) sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 45min (A) et 1h30 (B et C) à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45			

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	18.		CIP64.60
2.		BB42	19.		CIP64.61
3.		ATCC15708	30.		CE2
4.		C4Bh	35.		CE7-1
5.		BL2	36.		CE8-7
29.		CE1-1	20.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
31.		CE3-7	21.		BOSR
32.		CE4-3	22.		BB11
34.		CE6-1	23.		BB12
37.		CE9	24.		BF1
38.		CE10	25.		C2
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	26.		ATCC25527T
7.		CIP64.64	27.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
8.		CIP64.65	28.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
9.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	33.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
10.		ATCCC25962	39.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
11.		CIP63.78	40.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
12.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	41.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910T
13.		CIP64.68	42.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
14.		CIP64.69T	43.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
15.		CIP64.70	44.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
16.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	45.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
17.		CIP64.59T			



Fig. 45 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment L5/32 (1,2 kb) et du bactériophage lambda sur les profils de restriction *Bam*HI des souches provenant de l'expérience clinique ainsi que sur ceux de souches de l'espèce *B. longum*.

Piste 1 : CE1-1; piste 2 : CE3-7; piste 3 : CE4-3; piste 4 : CE6-1; piste 5 : CE9; piste 6 : CE10; piste 7 : CE12; piste 8 : CE13; piste 9 : CE14-2; piste 10 : CE15-1; piste 11 : *B. longum* ATCC15707T; piste 12 : *B. longum* ATCC15708; piste 13 : souche industrielle C4Bh; piste λ : bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III; piste 14 : CE2.

Marquage avec le système DIG; exposition de 30 h à température ambiante.

hybridé aussi sur les 10 ADN des souches de l'expérience clinique classées sur le critère des ribotypes dans l'espèce *B. longum* (cf. § 3.2.3). En outre, cette sonde met en évidence un grand polymorphisme de restriction chez l'espèce *B. longum*. Sur l'ADN de la souche CE2, classée dans l'espèce *B. adolescentis*, elle confirme le résultat positif du test en gouttes et révèle une bande à 12,5 kb. L'examen du profil de restriction de cette souche indique qu'il n'y a pas d'ambiguïté.

En conclusion, la sonde L5/32 est spécifique de la souche de collection *B. longum* ATCC15708. Elle confirme la classification fondée sur les ribotypes pour les 10 souches de l'expérience clinique. Par contre, l'hybridation de la sonde L5/32 sur le profil de la souche CE2 pose un problème puisque son appartenance à l'espèce *B. adolescentis* avait été proposée sur les critères des ribotypes et de l'hybridation avec la sonde spécifique A6/17. Nous sommes donc en présence d'une souche classée dans l'espèce *B. adolescentis* qui possède un fragment d'ADN trouvé uniquement chez des souches de l'espèce *B. longum*, mais pas dans le génome de la souche-type.

Dans le but de déterminer si ce fragment est d'origine chromosomique ou plasmidique, il a été hybridé sur les ADN natifs de différentes souches de l'espèce *B. longum*. Aucune hybridation n'est observée sur les différents plasmides des souches issues de l'expérience clinique (les souches de collection et industrielles de l'espèce *B. longum* ne possèdent aucun plasmide apparent). Par contre, une hybridation forte est observée sur l'ADN de haut poids moléculaire de chacune des souches ayant précédemment montré un signal positif, ce qui suggère que ce fragment d'ADN est d'origine chromosomique (résultat non montré).

Ces résultats incitent à connaître la nature du fragment L5/32 et donc à le séquencer (cf. § 3.4.1).

3.3.5. Sondes issues du clonage des ADN des souches *B. longum* CIP64.62T et ATCC15707^T

Quatre fragments *Bam*HI issus de l'ADN de la souche *B. longum* CIP64.62T et douze fragments *Bam*HI issus de l'ADN de son synonyme ATCC15707^T ont été testés (Tableau 20). Les résultats des hybridations en tests en gouttes sont rassemblés dans les tableaux 25 et 26.

Quatre sondes (L10 ; L18 ; L6/6 (Fig. 46 (A)); L6/7) hybrident fortement avec l'ADN de la souche CIP64.62T et non avec celui de l'autre souche *B. longum* de référence (Tableau 25). De plus, elles hybrident sur l'ADN de la souche *B. infantis* ATCC15697^T et donnent des signaux négatifs avec les autres ADN. L6/6 et L6/7 hybrident également avec l'ADN de la souche industrielle BB42 qui s'est avérée avoir un génotype extrêmement proche de celui des souches de collection *B. longum* ATCC15707^T ou son synonyme CIP64.62T. Contrairement aux fragments précédents, la sonde L6/12 révèle des signaux d'hybridation forts sur l'ADN des

Tableau 25 : Recherche d'une sonde spécifique de l'espèce *B. longum*.

Souche-cible	Désignation de la sonde									
	L5 * (1,05 kb)	L8 (2,1 kb)	L10 (1,35 kb)	L18 (1,7 kb)	L6/4 (1,4 kb)	L6/6 (1,1 kb)	L6/7 (1,8 kb)	L6/12 (1,9 kb)	L6/14 (1,6 kb)	L6/25 (2,1 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	nd	nd	-	nd	±	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	nd	nd	-	nd	±	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	-	-	-	-	-	-	-	++	±
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-	-	-	++	-	-	-	+	±
<i>B. breve</i> ATCC15698	++	-	-	-	+	-	-	-	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.68	nd	nd	nd	nd	nd	±	-	-	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.69T	++	-	-	-	+	-	-	-	±	±
<i>B. breve</i> CIP 64.70	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	±	±
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	++	-	++	++	+	++	++	++	±	±
<i>B. infantis</i> CIP63.78	±	-	-	-	±	-	-	-	++	±
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
<i>B. longum</i> CIP64.62T	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>
<i>B. longum</i> CIP64.63	++	-	-	-	++	-	-	++	-	+
<i>B. suis</i> CIP103377T	++	nd	nd	nd	++	-	-	-	+	++
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde								
		L5 * (1,05 kb)	L8 (2,1 kb)	L18 (1,7 kb)	L6/4 (1,4 kb)	L6/6 (1,1 kb)	L6/7 (1,8 kb)	L6/12 (1,9 kb)	L6/14 (1,6 kb)	L6/25 (2,1 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	-	-	-	+	++
CE 2	<i>B. adolesc.</i>	nd	nd	nd	+	-	-	-	-	-
CE 3-7	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	++	-	-	+	++
CE 4-3	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	++	-	-	+	++
CE 5-1		±	-	-	+	-	-	-	-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	-	-	-	+	++
CE 7-1	<i>B. adolesc.</i>	±	-	-	+	-	-	-	±	±
CE 8-7	<i>B. adolesc.</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CE 9	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	nd	-	-	+	++
CE 10	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	-	-	-	-	++
CE 11	<i>B. adolesc.</i>	-	-	-	+	nd	-	-	-	-
BO	<i>B. animalis</i>	±	-	-	±	±	-	-	-	-
BB42	<i>B. longum</i>	nd	nd	nd	nd	++	++	nd	++	++
C4	<i>B. infantis</i>	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	±	±

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes et /ou suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

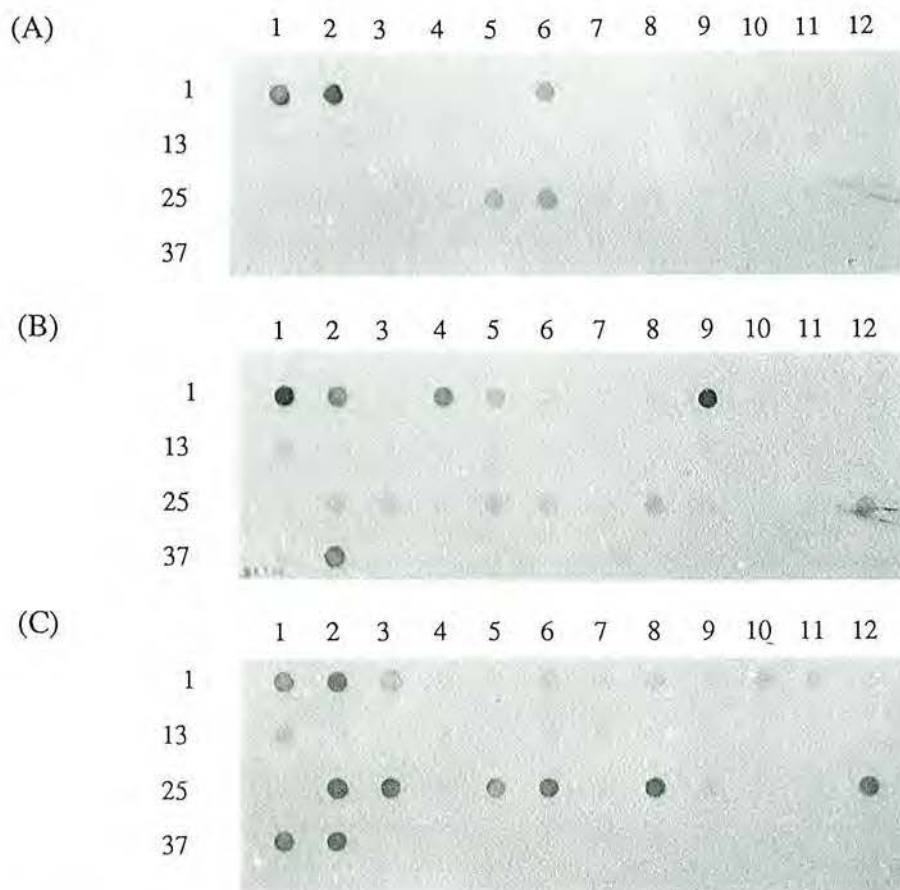


Fig. 46 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments L6/6 (A), L6/14 (B) et L6/25 (C) sur une membrane contenant les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille.

Marquage avec le système DIG; révélation par colorimétrie; exposition d' 1h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38										

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	13.		CIP64.70
2.		BB42	14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58
3.		ATCC15708	15.		CIP64.59T
27.		CE1-1	16.		CIP64.60
29.		CE3-7	17.		CIP64.61
30.		CE4-3	28.		CE2
32.		CE6-1	33.		CE7-1
36.		CE9	34.		CE8-7
37.		CE10	35.		CE11
38.		BL2	18.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP64.64	19.		BOSR
5.		CIP64.65	20.		BB11
6.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	21.		BB12
7.		ATCCC25962	22.		BF1
8.		C4	23.		C2
9.		CIP63.78	24.		ATCC25527T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	25.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
11.		CIP64.68	26.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
12.		CIP64.69T	31.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1

2 souches de collection de l'espèce *B. longum*. Elle hybride également sur l'ADN de la souche *B. infantis* ATCC15697^T et sur aucun autre ADN testé. Lauer et Kandler (1983), ont montré que *B. infantis* 15697^T et *B. longum* 15707^T présentaient 62% d'identité ADN/ADN. Ceci est à rapprocher de l'existence de sondes spécifiques de ces 2 souches.

La sonde L8 semble spécifique de la souche de collection qui a fourni l'ADN de la banque. Pour confirmer sa réelle spécificité, il faudrait la tester sur les ADN des souches plus récemment acquises. Les autres sondes testées (Tableau 25) donnent des signaux sur de nombreux autres ADN. La sonde L6/4 (1,4 kb) par exemple, a été hybridée sur les profils de restriction de souches de collection, industrielles et résultant de l'expérience clinique, à une stringence moins élevée qu'en test en gouttes (50°C au lieu de 68°C). A 68°C, de nombreux signaux - plus ou moins forts selon les ADN - étaient déjà détectés. A 50°C, on observe un signal fort sur tous les ADN testés, excepté sur ceux de *B. infantis* ATCC25962 et de la souche C4 (Fig. 47). Cette sonde hybride à la taille attendue (1,4 kb) sur le profil *Bam*HI des 2 souches *B. longum* de collection et à une taille identique sur les 6 profils *Bam*HI des souches provenant de l'expérience clinique supposées appartenir à l'espèce *B. longum* (CE1-1, CE3-7, CE4-3; CE6-1; CE9 et CE10). Elle donne un signal à 2,1 kb sur le profil *Bam*HI des 3 souches de collection de l'espèce *B. bifidum*, un signal à 4,9 kb sur le profil *Pvu*II des 2 souches de l'espèce *B. adolescentis* non clivables par *Bam*HI, un signal à 6,4 kb sur les profils *Bam*HI de la souche *B. animalis* ATCC25527^T et de la souche BO, qui s'avère appartenir à cette espèce (cf. § 3.3.3). Les autres signaux diffèrent selon les souches testées. Cette sonde L6/4 renforce donc l'hypothèse faite sur l'appartenance de six souches de l'expérience clinique à l'espèce *B. longum*. De même, elle confirme l'appartenance de la souche industrielle BO à l'espèce *B. animalis* et la classification des 3 souches *B. bifidum*. Seul l'ADN de la souche *B. thermophilum* ATCC25525^T qui donnait un résultat négatif à 68°C, n'a pas été retestée à cette température. Ce fragment pourrait être une sonde genre-spécifique si la non appartenance de la souche *B. infantis* ATCC25962 au genre *Bifidobacterium* était prouvée. Cette souche semble en effet très éloignée de la souche type *B. infantis* ATCC15697^T pour ce qui concerne les profils de restriction et les ribotypes. Une hybridation de la sonde L6/4 sur les profils de restriction des souches plus récemment acquises serait également intéressante.

On constate une hybridation forte des sondes L6/1, L6/11, L6/44, L6/45 et L6/51 sur l'ADN de la souche *B. longum* ATCC15707^T ainsi que sur celui des souches industrielles BB42 et C4Bh (Tableau 26). Aucun autre signal n'est observé sur les souches de collection (ou d'origine industrielle) pour les sondes L6/1 et L6/11 (Fig. 48 (A)). La sonde L6/44 (Fig. 48 (C)) révèle un signal sur la deuxième souche de collection, *B. longum* ATCC15708, mais également sur plusieurs souches de l'espèce *B. breve*. Par contre, la sonde L6/45 (Fig. 50) ne révèle de signal que sur l'ADN des deux souches de collection de l'espèce *B. longum* et sur celui des souches industrielles BB42 et C4Bh.

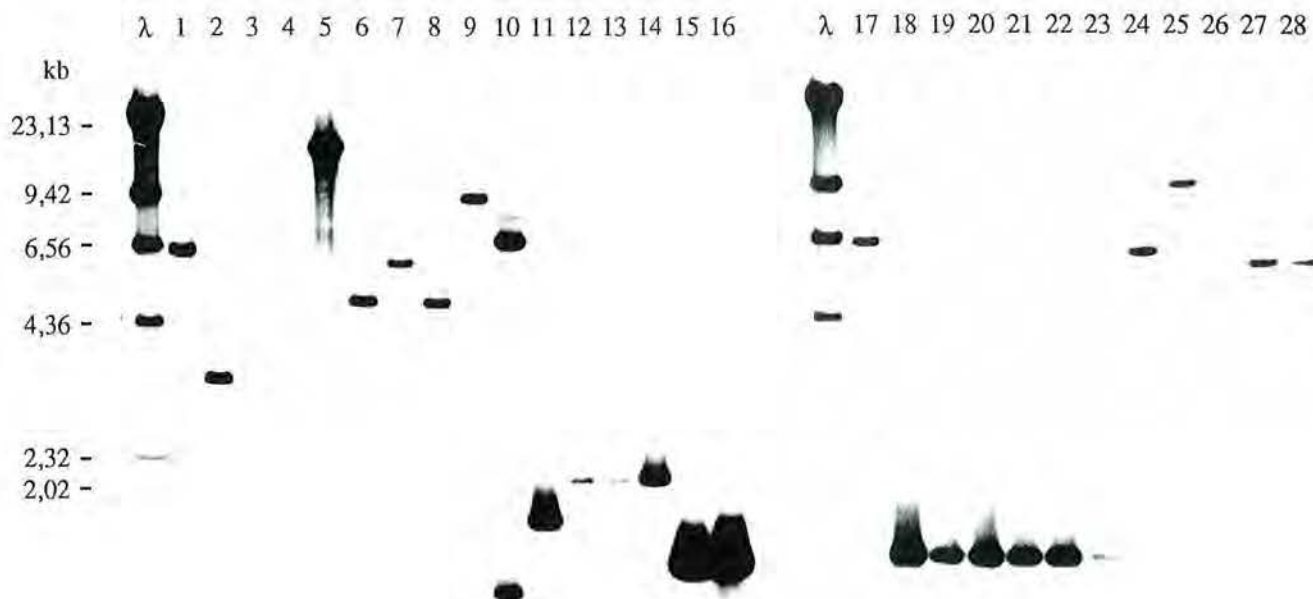


Fig. 47 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment L6/4 (1,4 kb) et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur les ADN de souches du genre *Bifidobacterium*. Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 1 : *B. animalis* ATCC25525T *Bam*HI; piste 2 : *B. infantis* CIP63.78 *Bam*HI; piste 3 : C4 *Bam*HI; piste 4 : *B. infantis* ATCC25962 *Bam*HI; piste 5 : *B. infantis* ATCC15697T *Bam*HI; piste 6 : *B. adolescentis* CIP64.61 *Pvu*II; piste 7 : *B. adolescentis* CIP64.60 *Bam*HI; piste 8 : *B. adolescentis* CIP64.59T *Pvu*II; piste 9 : *B. adolescentis* CIP64.58 *Bam*HI; piste 10 : *B. breve* CIP64.69T *Bam*HI; piste 11 : *B. breve* ATCC15698 *Bam*HI; piste 12 : *B. bifidum* CIP64.65 *Bam*HI; piste 13 : *B. bifidum* CIP64.64 *Bam*HI; piste 14 : *B. bifidum* CIP56.7T *Bam*HI; piste 15 : *B. longum* ATCC15708 *Bam*HI; piste 16 : *B. longum* CIP64.62T *Bam*HI; piste 17 : BO *Bam*HI; piste 18 : CE1-1 *Bam*HI; piste 19 : CE3-7 *Bam*HI; piste 20 : CE4-3 *Bam*HI; piste 21 : CE6-1 *Bam*HI; piste 22 : CE9 *Bam*HI; piste 23 : CE10 *Bam*HI; piste 24 : CE2 *Bam*HI; piste 25 : CE7-1 *Bam*HI; piste 26 : CE5-1 *Bam*HI; piste 27 : CE8-7 *Pvu*II; piste 28 : CE11 *Pvu*II. Marquage radioactif; lavages effectués à 50°C; exposition de 48h à -70°C avec deux écrans intensifiants.

Tableau 26 : Recherche d'une sonde spécifique de l'espèce *B. longum*.

Souche-cible	Désignation de la sonde					
	L6/1 (1,7 kb)	L6/11 (1,9 kb)	L6/32 (1,15 kb)	L6/44 (1 kb)	L6/45 (1,75 kb)	L6/51 (1,25 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	-	-	-	-	-	±
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	-	-	±	-	±
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	-	-	-	-	-	+
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP56.7T	-	-	-	-	-	±
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	-	-	-	++	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.68	-	-	-	++	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.69T	-	-	-	++	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.70	-	-	-	-	-	±
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	-	-	-	-	-	±
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	-	-	-	-	±
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> ATCC15707T	++	++	++	++	++	++
<i>B. longum</i> ATCC15708	-	-	-	+	++	±
<i>B. suis</i> CIP103377T	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	-	-	-	-	-	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde					
		L6/1 (1,7 kb)	L6/11 (1,9 kb)	L6/32 (1,15 kb)	L6/44 (1 kb)	L6/45 (1,75 kb)	L6/51 (1,25 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	-	-	-	++	++	±
CE 2	<i>B. adolesc.</i>	-	-	-	-	-	±
CE 3-7	<i>B. longum</i>	-	-	+	++	++	+
CE 4-3	<i>B. longum</i>	+	-	+	++	++	++
CE 5-1		-	-	-	-	-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	-	-	-	±	++	+
CE 7-1	<i>B. adolesc.</i>	-	-	-	±	-	-
CE 8-7	<i>B. adolesc.</i>	-	-	-	-	-	-
CE 9	<i>B. longum</i>	++	-	-	++	++	++
CE 10	<i>B. longum</i>	-	-	-	±	+	-
CE 11	<i>B. adolesc.</i>	nd	nd	nd	nd	-	nd
B0	<i>B. animalis</i>	-	-	-	-	-	-
BB42	<i>B. longum</i>	++	++	++	++	++	++
C4Bh	<i>B. longum</i>	++	++	-	++	++	++

- , pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations qui sont réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : identification proposée sur la base des ribotypes et /ou suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

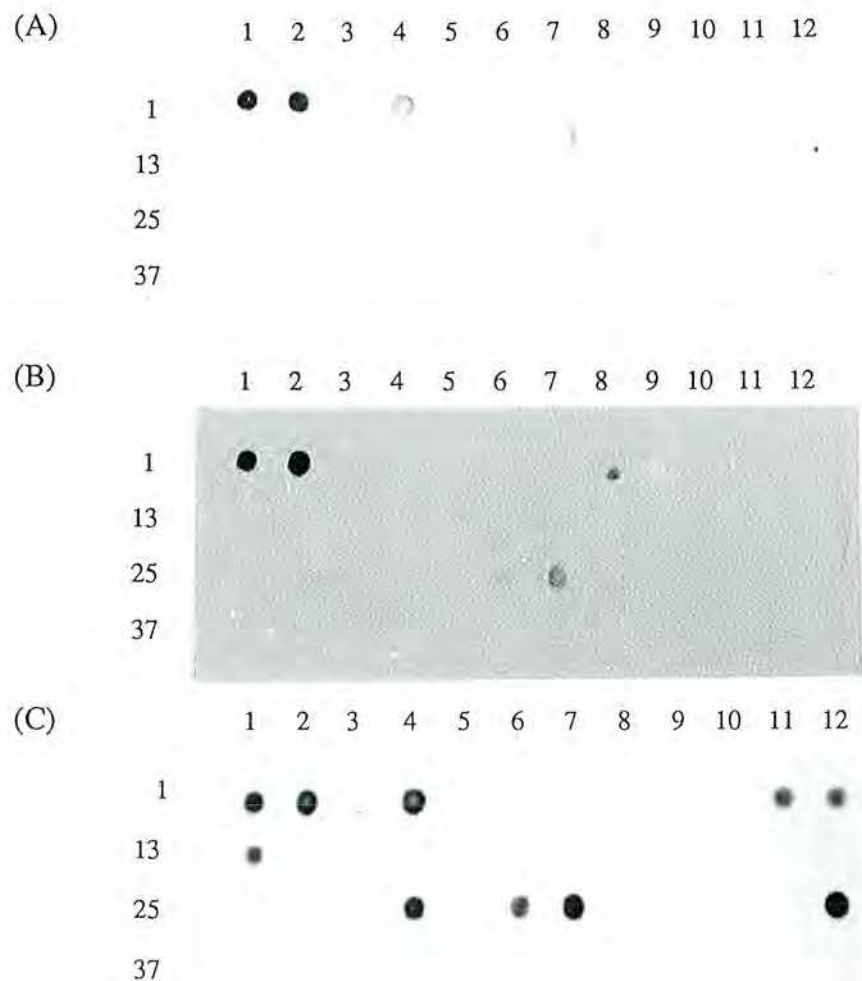


Fig. 48 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments L6/11 (A), L6/32 (B) et L6/44 (C) sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 2h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37											

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	14.		CIP64.70
2.		BB42	15.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58
3.		ATCC15708	16.		CIP64.59T
4.		C4Bh	17.		CIP64.60
28.		CE1-1	18.		CIP64.61
30.		CE3-7	29.		CE2
31.		CE4-3	34.		CE7-1
33.		CE6-1	35.		CE8-7
36.		CE9	19.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
37.		CE10	20.		BOSR
5.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	21.		BB11
6.		CIP64.64	22.		BB12
7.		CIP64.65	23.		BF1
8.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	24.		C2
9.		ATCCC25962	25.		ATCC25527T
10.		CIP63.78	26.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
11.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	27.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
12.		CIP64.68	32.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
13.		CIP64.69T			

Ces sondes ont également été testées sur les ADN de 11 souches issues de l'expérience clinique. Quatre des cinq sondes décrites précédemment, plus la sonde L6/32 (Fig. 48 (B)), hybrident exclusivement sur un ou plusieurs des ADN appartenant aux souches supposées appartenir à l'espèce *B. longum* sur les critères des profils de restriction et des ribotypes. La cinquième sonde décrite auparavant (L6/11) semble spécifique des souches *B. longum* ATCC15707^T et C4Bh (Fig. 48 (A)). Une hybridation de la sonde L6/11 a d'ailleurs été réalisée sur les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV des souches de collection *B. longum*, de C4A et C4Bh (Fig. 49). On obtient une bande de la taille attendue (1,9 kb) sur le profil *Bam*HI de la souche *B. longum* CIP64.62^T et une bande de taille identique sur le profil *Bam*HI des souches C4A et C4Bh. L'hybridation observée sur les autres profils de restriction permet de différencier, d'une part la souche de collection, et d'autre part C4A et C4Bh qui révèlent des signaux identiques entre eux mais différents de ceux de la souche de collection.

La sonde L6/45 donne un signal d'hybridation sur l'ADN des 6 souches testées classées dans l'espèce *B. longum* et sur aucun autre (Fig. 50).

En conclusion, les sondes L6/1, L6/11, L6/32 n'hybrident que sur l'ADN de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T qui a fourni la mini-banque. Elles hybrident également sur l'ADN de la souche industrielle BB42, qui est très proche génétiquement de cette souche de collection. Excepté pour la sonde L6/32, elles hybrident en outre sur l'ADN de la souche industrielle C4Bh. De plus, L6/1 et L6/11 hybrident sur l'ADN de certaines souches provenant de l'expérience clinique qui ont été associées sur le critère des ribotypes à l'espèce *B. longum*. Ces sondes sont donc spécifiques de quelques souches de l'espèce *B. longum*. Par contre, la sonde L6/45 est spécifique de toutes les souches testées de l'espèce *B. longum*. Elle n'a hybridé sur aucun autre ADN. Une vérification de la spécificité de cette sonde a été effectuée en l'hybridant sur les profils de restriction d'autres souches du laboratoire. Une hybridation sur les profils de restriction *Bam*HI et *Eco*RV de 13 des 15 souches classées dans l'espèce *B. longum* (cf. § 3.2.3) est présentée sur la figure 51. Les 2 profils manquants correspondent aux souches industrielles BB42 et BL2 qui présentent exactement le même profil d'hybridation que la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T. Au niveau du profil *Bam*HI de la souche *B. longum* ATCC15707^T, cette sonde n'hybride pas seulement sur le fragment de 1,75 kb attendu mais également sur un fragment de 1,85 kb (mieux individualisé sur la figure 2 du projet d'article). De même, elle met en évidence 2 fragments distincts pour les mêmes souches quand on l'hybride sur leur profil de restriction *Eco*RV. Au niveau des autres ADN, on observe en général un seul signal. Quatre fragments différents ont cependant été révélés pour la souche CE12, provenant de l'expérience clinique. On constate néanmoins que les souches CE13 et CE15-1, issues également de l'expérience clinique, ne révèlent aucun signal d'hybridation fort. Leur appartenance à l'espèce *B. longum* ne peut pourtant être remise en cause. Des signaux d'intensité faible sont détectés sur les différents profils de restriction en plus des signaux

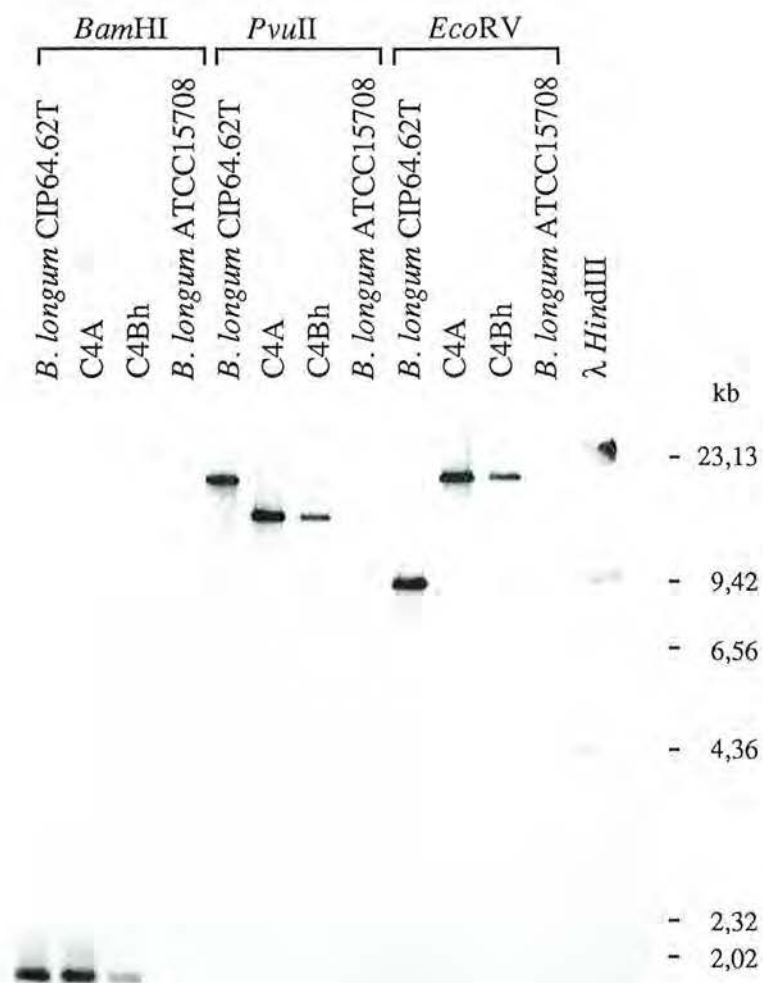


Fig. 49 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment L6/11 (1,9 kb) sur les profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II et *Eco*RV des souches de collection de l'espèce *B. longum* et des souches industrielles C4A et C4Bh.

Marquage radioactif; lavages effectués à 65°C; exposition de 24h à température ambiante.

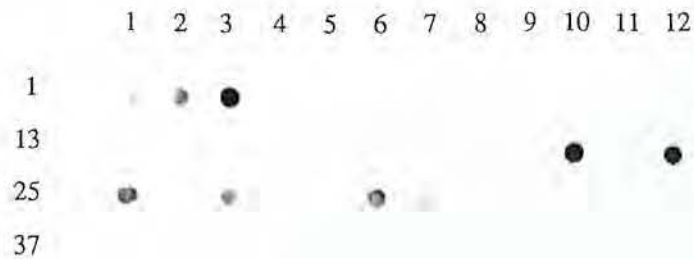


Fig. 50 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment spécifique L6/45 sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 3h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41							

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	16.		CIP64.60
2.		ATCC15708	17.		CIP64.61
3.		C4Bh	23.		CE2
22.		CE1-1	28.		CE7-1
24.		CE3-7	29.		CE8-7
25.		CE4-3	32.		CE11
27.		CE6-1	18.	<i>Bifidobacterium species</i>	BO
30.		CE9	19.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC25527T
31.		CE10	20.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	21.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
5.		CIP64.64	26.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
6.		CIP64.65	33.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
7.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	34.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
8.		ATCCC25962	35.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910T
9.		CIP63.78	36.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	37.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
11.		CIP64.68	38.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
12.		CIP64.69T	39.	<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC25912T
13.		CIP64.70	40.	<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC27540T
14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	41.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
15.		CIP64.59T			

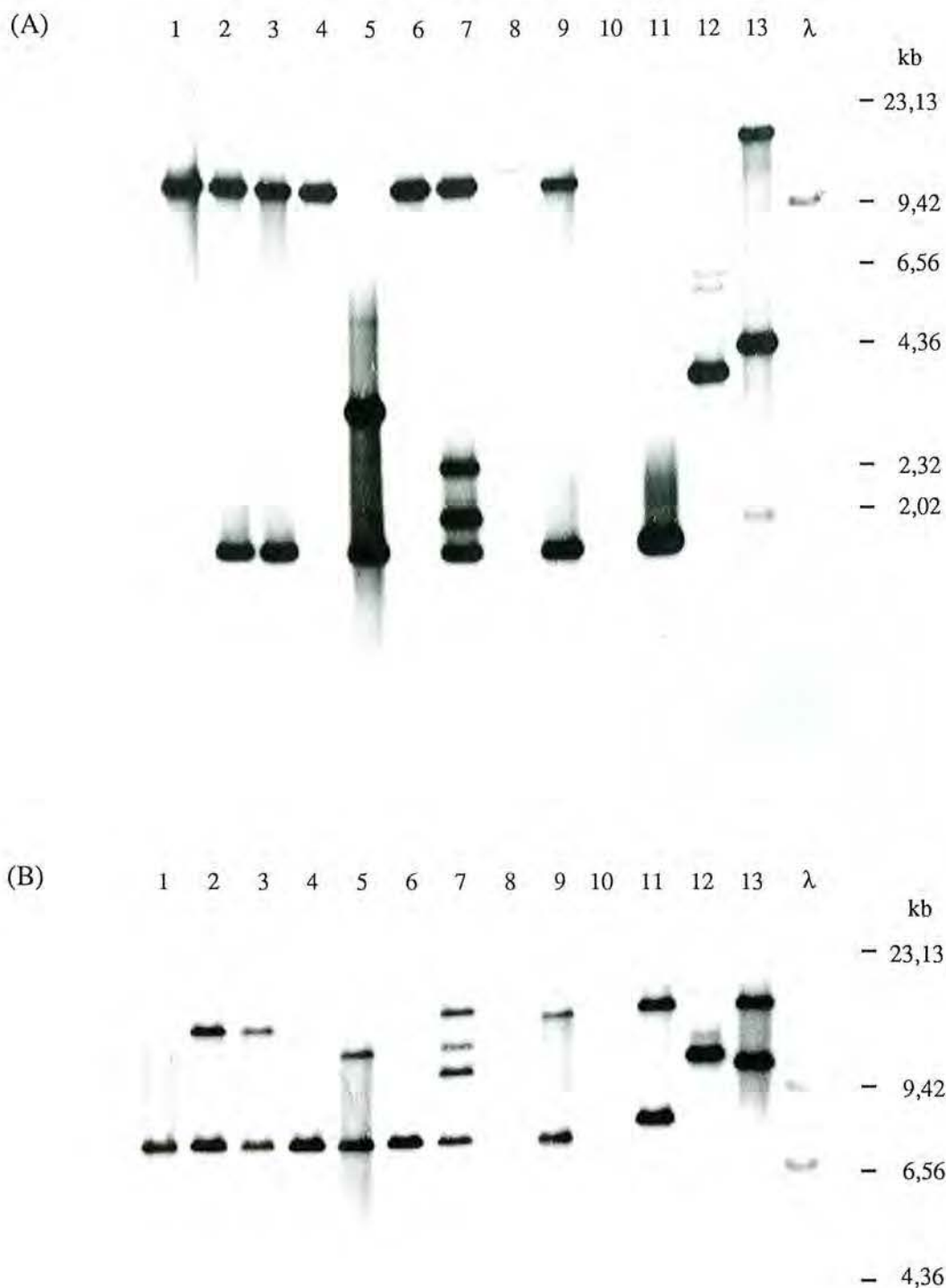


Fig. 51 : Autoradiographies obtenues après hybridation du fragment L6/45 (1,75 kb) et du bactériophage lambda utilisés comme sondes sur des profils de restriction *Bam*HI (A) et *Eco*RV (B) de souches de l'espèce *B. longum*.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda hydrolysé par *Hind*III utilisé comme marqueur de poids moléculaire; piste 1 : CE1-1; piste 2 : CE3-7; piste 3 : CE4-3; piste 4 : CE6-1; piste 5 : CE9; piste 6 : CE10; piste 7 : CE12; piste 8 : CE13; piste 9 : CE14-2; piste 10 : CE15-1; piste 11 : *B. longum* ATCC15707T; piste 12 : *B. longum* ATCC15708; piste 13 : souche industrielle C4Bh.

d'intensité forte. Ces signaux peuvent s'interpréter par le fait qu'il existe des séquences présentant une faible homologie avec la sonde ou une partie de cette sonde.

Cette sonde a été hybridée sur les ADN natifs de 6 souches différentes de l'espèce *B. longum*. De même, une hybridation forte est observée sur l'ADN de haut poids moléculaire de chacune de ces souches, alors qu'aucun signal n'est décelable sur l'ADN plasmidique, ce qui suggère que ce fragment d'ADN est d'origine chromosomique (Fig. 52).

Ces résultats nous ont également incité à connaître la nature du fragment L6/45 et donc à le séquencer (cf. § 3.4.2).

3.3.6. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. infantis* ATCC15697^T

Les résultats des hybridations réalisées avec les 9 fragments *Bam*HI testés (Tableau 20) sont rassemblés dans le tableau 27.

Six des neuf sondes testées hybrident sur certains ADN sans faire apparaître de spécificité quelconque. La sonde inf 10 (Fig. 53 (A)) hybride néanmoins sur l'ADN qui a fourni la banque, sur l'ADN des 4 souches de l'espèce *B. breve*, sur celui de la souche *B. suis* CIP103377^T ainsi que sur l'ADN de la souche *B. indicum* ATCC25912^T qui, nous l'avons vu précédemment, correspond vraisemblablement à une erreur de la collection ATCC (cf. § 3.1.1). Ces souches sont apparemment phylogénétiquement proches les unes des autres. De même, la sonde inf 14 (Fig. 53 (B)) hybride sur l'ADN qui a fourni la banque, sur l'ADN des 3 souches de l'espèce *B. bifidum*, sur celui des 4 souches de l'espèce *B. breve*, sur celui des 4 souches de l'espèce *B. adolescentis* ainsi que sur celui de la souche *B. indicum* ATCC25912^T. Par contre, la sonde inf 17 (Fig. 53 (C)) révèle un signal d'hybridation fort uniquement sur l'ADN qui a fourni la banque et sur l'ADN de *B. indicum* ATCC25912^T.

Une nouvelle interrogation quant à la classification de l'espèce *B. infantis* se pose puisqu'excepté pour deux sondes qui hybrident sur de nombreux ADN (inf 13 et inf 16), et une hybridation légère d'inf 4 sur l'ADN de *B. infantis* CIP63.78, les autres ne révèlent aucun signal sur les ADN des 2 autres souches classées dans l'espèce *B. infantis*. Le polymorphisme de restriction n'a pas été testé.

En conclusion, le fragment inf 17 est spécifique des souches *B. infantis* ATCC15697^T et *B. indicum* ATCC25912^T. Cependant, l'appartenance de cette dernière souche à une espèce autre que *B. infantis* pourrait être remise en cause.

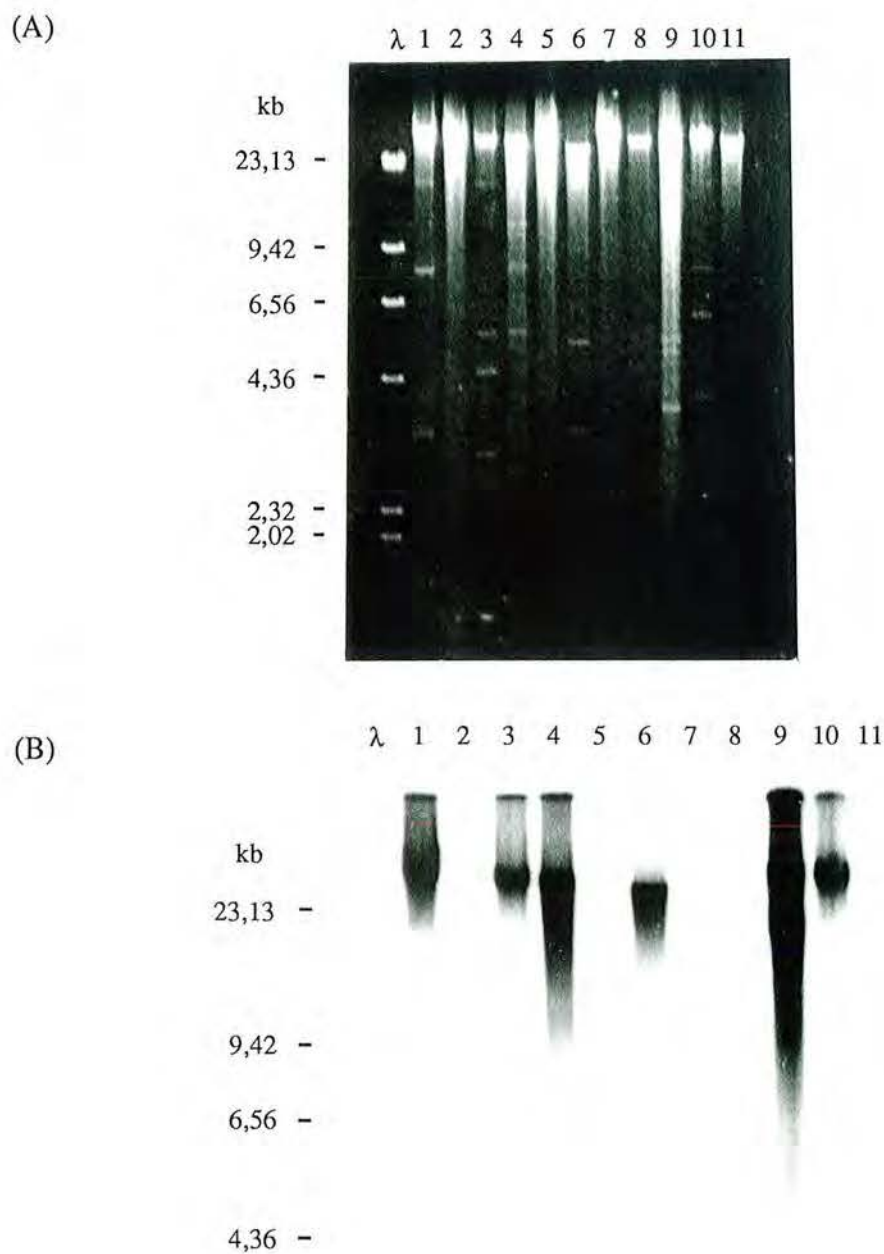


Fig. 52 : Profils d'ADN natifs de souches issues de l'expérience clinique (A) et autoradiographie (B) obtenue après hybridation du fragment L6/45 et du bactériophage lambda utilisés comme sondes.

Piste λ : ADN du bactériophage lambda digéré par *Hind*III; piste 1 : CE1-1; piste 2 : CE2; piste 3 : CE3-7; piste 4 : CE4-3; piste 5 : CE5-1; piste 6 : CE6-1; piste 7 : CE7-1; piste 8 : CE8-7; piste 9 : CE9; piste 10 : CE10; piste 11 : CE11.

Marquage radioactif; lavages effectués à 65°C; exposition de 24h à -70°C avec deux écrans intensifiants.

Tableau 27 : Test des sondes issues du clonage de l'ADN de *B. infantis* ATCC15697T

Souche-cible	Désignation de la sonde								
	inf 2 (1 kb)	inf 3 (1,6 kb)	inf 4 (1,95 kb)	inf 10 (1,35 kb)	inf 13 (0,75 kb)	inf 14 (1,4 kb)	inf 16 (0,5 kb)	inf 17 (1,1 kb)	inf 25 (1,55 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	-	+	-	++	++	-	-	++
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	-	-	+	-	++	+	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	-	+	-	++	++	-	-	±
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	+	-	++	-	++	++	-	-	±
<i>B. adolescentis</i> ATCC11146	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	-	-	-	-	++	-	++	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP56.7T	+	±	±	-	++	++	++	-	±
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	+	-	+	-	++	++	++	-	++
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-	±	-	++	++	-	-	+
<i>B. breve</i> ATCC15698	-	-	++	++	++	+	-	-	±
<i>B. breve</i> CIP64.68	++	-	++	++	++	++	++	-	++
<i>B. breve</i> CIP64.69T	++	-	++	++	++	++	++	-	++
<i>B. breve</i> CIP 64.70	++	±	++	++	++	++	++	-	++
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	±	-	++	-	++	-	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	-	-	-	++	-	++	-	-
<i>B. longum</i> ATCC15707T	-	±	++	-	++	±	++	-	-
<i>B. longum</i> ATCC15708	-	±	±	-	++	±	-	-	±
<i>B. suis</i> CIP103377T	-	++	++	++	-	-	++	-	-
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	-	±	-	-	-	-	++	-	-
<i>B. angulatum</i> ATCC27535T	-	-	-	-	-	-	++	-	-
<i>B. asteroides</i> ATCC25910T	-	-	-	-	-	-	++	-	-
<i>B. catenulatum</i> ATCC27539T	±	-	±	-	++	-	++	-	-
<i>B. coryneforme</i> ATCC25911T	-	-	-	-	++	-	++	-	-
<i>B. globosum</i> ATCC25965T	-	-	±	-	++	-	++	-	-
<i>B. indicum</i> ATCC25912T	++	++	++	++	++	++	±	++	++
<i>B. magnum</i> ATCC27540T	-	-	±	±	++	-	++	-	-
<i>B. pseudolongum</i> ATCC25526T	-	-	-	-	++	-	++	-	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde								
		inf 2 (1 kb)	inf 3 (1,6 kb)	inf 4 (1,95 kb)	inf 10 (1,35 kb)	inf 13 (0,75 kb)	inf 14 (1,4 kb)	inf 16 (0,5 kb)	inf 17 (1,1 kb)	inf 25 (1,55 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	±	±	++	-	++	-	++	-	+
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	++	±	±	-	++	++	++	-	++
CE 3-7	<i>B. longum</i>	±	±	±	-	+	±	++	-	±
CE 4-3	<i>B. longum</i>	±	±	+	-	++	±	++	-	±
CE 5-1		++	±	-	-	++	-	++	-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	±	±	+	-	++	±	++	-	±
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	-	±	+	-	++	±	++	-	±
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	-	±	+	-	++	±	++	-	±
CE 9	<i>B. longum</i>	-	±	+	-	++	±	++	-	±
CE 10	<i>B. longum</i>	-	±	±	-	++	±	++	-	±
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B0	<i>B. animalis</i>	-	-	-	-	++	-	++	-	-
C4Bh	<i>B. longum</i>	-	±	++	-	++	±	±	-	-

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou /et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

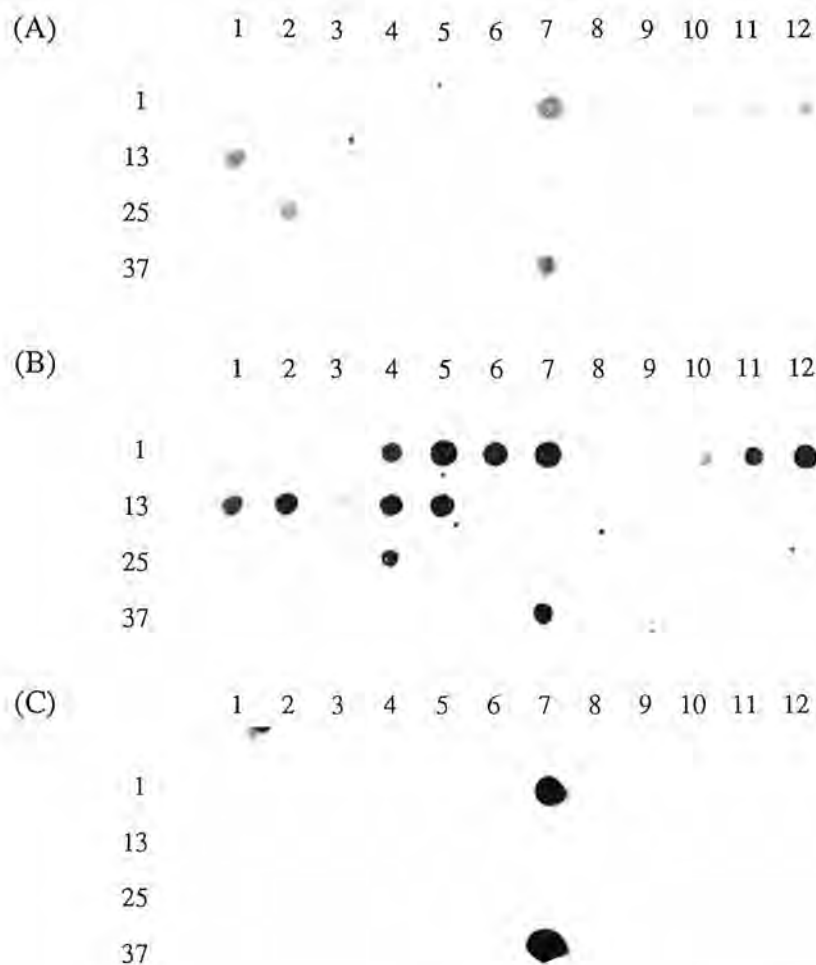


Fig. 53 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments inf 10 (A), inf 14 (B) et inf 17 (C) sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 2h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45			

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	28.		CE2
2.		ATCC15708	33.		CE7-1
3.		C4Bh	34.		CE8-7
27.		CE1-1	18.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
29.		CE3-7	19.		BOSR
30.		CE4-3	20.		BB11
32.		CE6-1	21.		BB12
35.		CE9	22.		BF1
36.		CE10	23.		C2
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	24.		ATCC25527T
5.		CIP64.64	25.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
6.		CIP64.65	26.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
7.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	31.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
8.		ATCCC25962	37.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
9.		CIP63.78	38.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	39.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910T
11.		CIP64.68	40.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
12.		CIP64.69T	41.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
13.		CIP64.70	42.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	43.	<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC25912T
15.		CIP64.59T	44.	<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC27540T
16.		CIP64.60	45.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
17.		CIP64.61			

3.3.7. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. infantis* ATCC25962

Les 2 sondes utilisées (ID5; IG4, tableau 20) ont été hybridées en tests en gouttes pour compléter un tableau d'hybridation précédent ayant eu lieu sur profils de restriction. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 28.

On détecte un signal d'hybridation fort sur les ADN des souches *B. infantis* ATCC25962 et C4. Des ADN qui répondaient négativement par hybridation sur profils de restriction, montrent un léger signal quand ils sont natifs. La quantité d'ADN de départ étant la même dans les deux cas, il pourrait s'agir d'une perte plus importante d'ADN lors du transfert des profils de restriction sur membrane par rapport au test en gouttes. Apparemment, la sonde IG4 serait plus spécifique de la souche de collection *B. infantis* ATCC25962 (Fig. 54) que la sonde ID5 qui donne des signaux plus forts sur d'autres souches testées. Aucun signal n'est cependant détecté sur les autres souches de l'espèce *B. infantis*, remettant encore en cause l'homogénéité de cette espèce. Ces 2 sondes hybrident fortement avec l'ADN de la souche C4, qui est un variant de *B. infantis* ATCC25962 (§ 3.1.2; 3.2.2). Le polymorphisme de restriction n'a pas été testé.

En conclusion, IG4 est une sonde spécifique des souches *B. infantis* ATCC25962 et C4. Les résultats obtenus confirment les conclusions précédentes concernant la souche industrielle C4 (cf. § 3.1.2; 3.2.2). Celle-ci apparaît comme étant un variant de la souche *B. infantis* ATCC25962.

3.3.8. Sondes issues du clonage de l'ADN de *B. breve* CIP64.69T

Les résultats des hybridations réalisées avec les 7 fragments issus de l'ADN de la souche *B. breve* CIP64.69T (Tableau 20) sont rassemblés dans le tableau 29.

Au niveau des souches de collection, la sonde br6/3 a hybridé uniquement sur l'ADN de deux souches de l'espèce *B. breve*, dont l'ADN qui a fourni la banque. Elle a révélé également un signal d'hybridation moyen sur l'ADN de deux souches issues de l'expérience clinique (CE2 et CE8-7) classées dans l'espèce *B. adolescentis*. Ces deux espèces semblent donc proches phylogénétiquement l'une de l'autre, confirmant le résultat d'hybridation précédent. La sonde brA6 n'hybride par contre que sur l'ADN de la souche dont elle est issue, et sur aucun autre (Fig. 55 (A)). Cette sonde est donc spécifique de la souche *B. breve* CIP64.69T. La sonde brA7 hybride par contre fortement sur 3 des 4 souches de collection de l'espèce *B. breve*, mais elle donne également des signaux d'hybridation moyens sur l'ADN de nombreuses souches de l'espèce *B. longum* et sur l'ADN de la souche *B. suis* CIP103377T (Fig. 55 (B)). Contrairement aux sondes précédentes, la sonde brE7 hybride fortement sur l'ADN des quatre

Tableau 28 : Test de sondes issues du clonage de l'ADN de *B. infantis* ATCC25962.

Souche-cible	Désignation de la sonde	
	ID5 (1,8 kb)	IG4 (1,3 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	±	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	±	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	±	(±)
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	+	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	±	(±)
<i>B. breve</i> CIP64.68	±	(±)
<i>B. breve</i> CIP64.69T	±	(±)
<i>B. breve</i> CIP 64.70	(±)	(±)
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	±	-
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	++	++
<i>B. longum</i> CIP64.62T	(±)	-
<i>B. longum</i> CIP64.63	-	-
<i>B. suis</i> CIP103377 T	(±)	(±)
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	(±)	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde	
		ID5 (1,8 kb)	IG4 (1,3 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	±	-
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	±	-
CE 3-7	<i>B. longum</i>	±	-
CE 4-3	<i>B. longum</i>	±	±
CE 5-1		±	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	±	±
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	±	±
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	±	±
CE 9	<i>B. longum</i>	-	-
CE 10	<i>B. longum</i>	-	-
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	±	±
B0	<i>B. animalis</i>	+	±
BB42	<i>B. longum</i>	-	±
C4	<i>B. infantis</i>	++	++

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou /et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

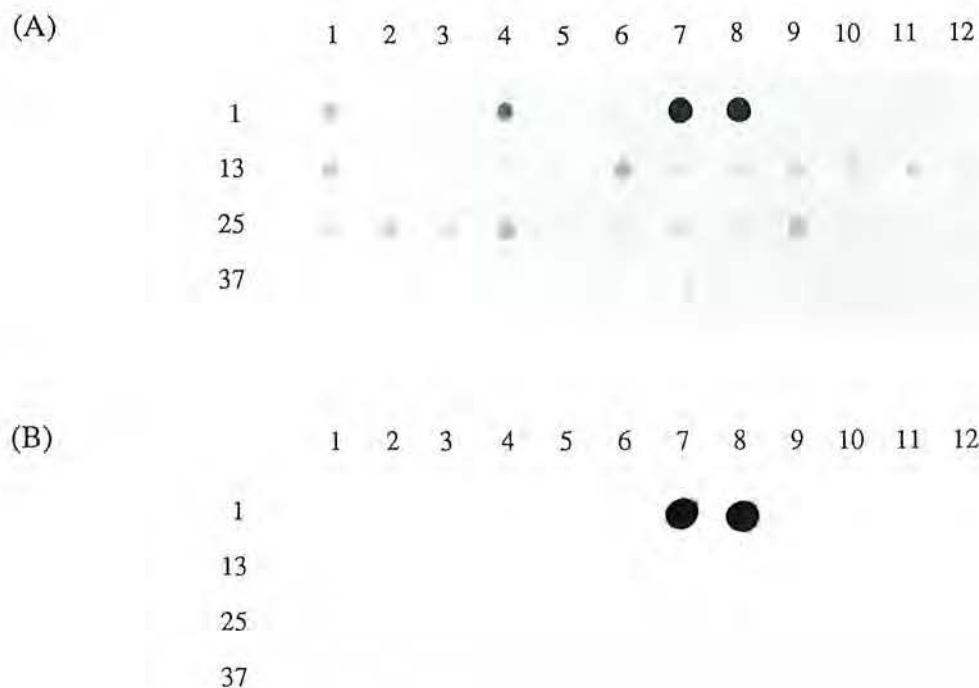


Fig. 54 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments ID5 (A) et IG4 (B) sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 3h30 à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37											

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58
2.		BB42	15.		CIP64.59T
3.		ATCC15708	16.		CIP64.60
27.		CE1-1	17.		CIP64.61
29.		CE3-7	28.		CE2
30.		CE4-3	33.		CE7-1
32.		CE6-1	34.		CE8-7
36.		CE9	35.		CE11
37.		CE10	18.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP64.64	19.		BOSR
5.		CIP64.65	20.		BB11
6.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	21.		BB12
7.		ATCCC25962	22.		BF1
8.		C4	23.		C2
9.		CIP63.78	24.		ATCC25527T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	25.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
11.		CIP64.68	26.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
12.		CIP64.69T	31.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
13.		CIP64.70			

Tableau 29 : Test des sondes issues du clonage de l'ADN de *B. breve* CIP64.69T.

Souche-cible	Désignation de la sonde						
	* br6/3 (1,75 kb)	brA6 (1,3 kb)	brA7 (1,55 kb)	brA8 (1,7 kb)	brB2 (2 kb)	brB5 (1,6 kb)	brE7 (1,4 kb)
<i>B. adolescentis</i> CIP64.58	-	-	-	+	++	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.59T	-	-	-	+	++	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.60	-	-	-	+	++	-	-
<i>B. adolescentis</i> CIP64.61	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. animalis</i> ATCC25527T	-	-	-	-	++	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.64	-	-	-	±	-	-	-
<i>B. bifidum</i> CIP64.65	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. breve</i> ATCC15698	-	-	++	+	++	±	++
<i>B. breve</i> CIP64.68	-	-	++	+	++	++	++
<i>B. breve</i> CIP64.69T	++	++	++	++	++	++	++
<i>B. breve</i> CIP 64.70	++	-	-	+	-	++	++
<i>B. infantis</i> ATCC15697T	-	-	-	±	-	-	+
<i>B. infantis</i> CIP63.78	-	-	-	-	+	±	-
<i>B. infantis</i> ATCC25962	-	-	-	-	±	-	-
<i>B. longum</i> CIP64.62T	-	-	++	±	++	±	+
<i>B. longum</i> CIP64.63	-	-	+	-	++	±	±
<i>B. suis</i> CIP103377T	-	-	+	-	-	±	+
<i>B. thermophilum</i> ATCC25525T	-	-	-	-	+	-	-

Souche-cible	Identification proposée (1)	Désignation de la sonde						
		* br6/3 (1,75 kb)	brA6 (1,3 kb)	brA7 (1,55 kb)	brA8 (1,7 kb)	brB2 (2 kb)	brB5 (1,6 kb)	brE7 (1,4 kb)
CE 1-1	<i>B. longum</i>	-	-	++	+	++	±	±
CE 2	<i>B. adolescentis</i>	+	-	-	+	+	-	-
CE 3-7	<i>B. longum</i>	-	-	++	±	-	±	±
CE 4-3	<i>B. longum</i>	-	-	++	+	++	±	±
CE 5-1		-	-	-	-	++	-	-
CE 6-1	<i>B. longum</i>	-	-	+	+	++	+	±
CE 7-1	<i>B. adolescentis</i>	-	-	-	++	-	±	-
CE 8-7	<i>B. adolescentis</i>	+	-	-	+	++	±	-
CE 9	<i>B. longum</i>	-	-	++	nd	nd	nd	±
CE 10	<i>B. longum</i>	-	nd	nd	+	++	±	±
CE 11	<i>B. adolescentis</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B0	<i>B. animalis</i>	-	-	-	-	+	-	-
BB42	<i>B. longum</i>	-	-	++	±	++	±	+
C4	<i>B. infantis</i>	-	nd	nd	-	±	±	nd
C48h	<i>B. longum</i>	nd	-	++	nd	nd	nd	+

-, pas d'hybridation décelable; ±, signal d'hybridation faible; +, signal d'hybridation d'intensité moyenne; ++, signal d'hybridation fort; nd, non déterminé. Les résultats soulignés sont ceux des hybridations réalisées avec l'ADN de la souche ayant fourni l'ADN de la banque. Les lignes en caractères gras correspondent aux souches de collection de l'espèce pour laquelle on recherche un fragment spécifique.

* : taille du fragment hybridé.

(1) : Identification proposée sur la base des ribotypes ou / et suite à l'utilisation de sondes spécifiques.

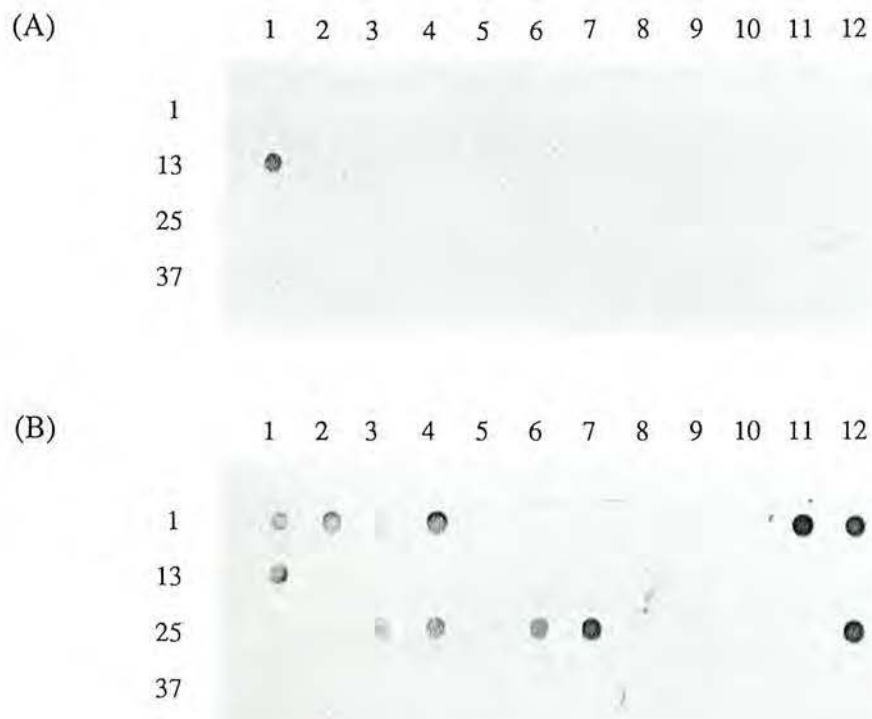


Fig. 55 : Autoradiographies obtenues après hybridation des fragments brA6 (A) et brA7 (B) sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille. Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 3h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37											

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	14.		CIP64.70
2.		BB42	15.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58
3.		ATCC15708	16.		CIP64.59T
4.		C4Bh	17.		CIP64.60
28.		CE1-1	18.		CIP64.61
30.		CE3-7	29.		CE2
31.		CE4-3	34.		CE7-1
33.		CE6-1	35.		CE8-7
36.		CE9	19.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
37.		CE10	20.		BOSR
5.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	21.		BB11
6.		CIP64.64	22.		BB12
7.		CIP64.65	23.		BF1
8.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	24.		C2
9.		ATCCC25962	25.		ATCC25527T
10.		CIP63.78	26.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
11.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	27.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
12.		CIP64.68	32.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
13.		CIP64.69T			

souches *B. breve*. On observe cependant des signaux sur les ADN des souches *B. longum*, sur celui de la souche *B. infantis* ATCC15697^T ainsi que sur celui de *B. suis* CIP103377^T (Fig. 56).

En conclusion, une sonde spécifique de la souche *B. breve* CIP64.69^T a été isolée. Elle devrait permettre d'identifier cette souche ainsi que ses variants.

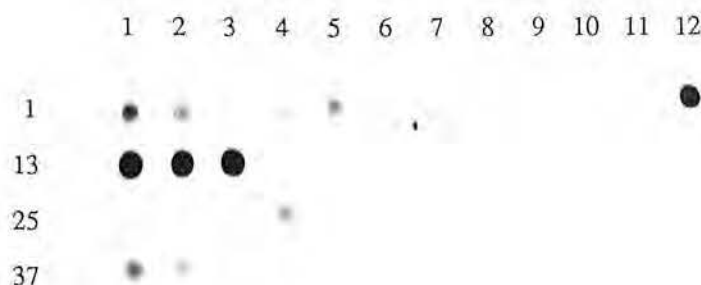


Fig. 56 : Autoradiographie obtenue après hybridation du fragment brE7 sur les ADN natifs des souches de *Bifidobacterium* du tableau ci-dessous selon l'ordre de la grille.
Marquage DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 1h à température ambiante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45			

No	Espèce	Souche	No	Espèce	Souche
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707T	18.		CIP64.60
2.		BB42	19.		CIP64.61
3.		ATCC15708	30.		CE2
4.		C4Bh	35.		CE7-1
5.		BL2	36.		CE8-7
29.		CE1-1	20.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BO
31.		CE3-7	21.		BOSR
32.		CE4-3	22.		BB11
34.		CE6-1	23.		BB12
37.		CE9	24.		BF1
38.		CE10	25.		C2
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7T	26.		ATCC25527T
7.		CIP64.64	27.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525T
8.		CIP64.65	28.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377T
9.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697T	33.	<i>Bifidobacterium species</i>	CE5-1
10.		ATCCC25962	39.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539T
11.		CIP63.78	40.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535T
12.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	41.	<i>Bifidobacterium asteroïdes</i>	ATCC25910T
13.		CIP64.68	42.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865T
14.		CIP64.69T	43.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911T
15.		CIP64.70	44.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC11146
16.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	45.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526T
17.		CIP64.59T			

3.3.9. Mesure de la sensibilité de détection des sondes spécifiques

3.3.9.1. Méthode

Dans le but d'évaluer la sensibilité de détection d'un fragment d'ADN par les sondes spécifiques obtenues pour les espèces *B. bifidum* (bA7/2) et *B. adolescentis* (A6/17), des hybridations en tests en gouttes ont été réalisées sur des quantités variables d'ADN. Pour chacune des souches d'une même espèce, différentes quantités d'ADN allant de 0,05 ng à 2 µg ont été déposées dans les puits (0,05 ng; 0,5 ng; 1 ng; 10 ng; 100 ng; 1 µg; 2 µg). Ces quantités ont été calculées d'après la concentration de l'ADN mesurée par spectroscopie à 260 et 280 nm.

La taille du génome des Bifidobactéries étant de l'ordre de 2000 kb (Bourget *et al.*; 1993), et les sondes utilisées d'environ 2 kb, on estime que l'homologie entre la sonde et l'ADN testé se fera sur une quantité 1000 fois inférieure par rapport à la quantité d'ADN déposée. Par exemple, pour 2 µg d'ADN-cible, la sonde devrait s'hybrider sur les 2 ng d'ADN homologue existant. Par cette méthode, on souhaite déterminer le seuil de détection de la sonde.

3.3.9.2. Résultats

Espèce *B. bifidum* :

Pour les trois souches de l'espèce *B. bifidum*, la sonde bA7/2 (1,6 kb), marquée par le système digoxigénine (DIG; Boehringer, Mannheim), a révélé des signaux d'intensité croissante, selon la quantité d'ADN déposée (Fig. 57).

Le seuil de détection dans les conditions de marquage et d'exposition réalisées, est déterminé pour une quantité de 10ng d'ADN total déposé, ce qui correspond à une homologie sur environ 10 pg d'ADN (le signal est tout à fait visible sur l'original). Une exposition plus longue de la membrane permet de distinguer un signal pour la quantité inférieure qui est d'1 ng, ce qui correspond à une quantité d'ADN homologue à la sonde d'1 pg. Néanmoins, le bruit de fond, à ce niveau, devient très important.

Espèce *B. adolescentis* :

La sonde A6/17 (1,85 kb), marquée au [α -³²P]dCTP, a été hybridée sur l'ADN des 4 souches de collection de l'espèce *B. adolescentis*. Les signaux révélés par cette sonde ont une intensité croissante selon la quantité d'ADN déposée (Fig. 58).

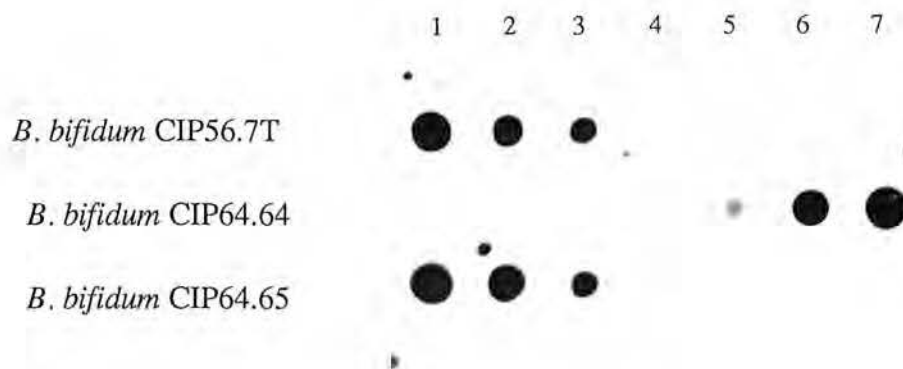


Fig. 57 : Recherche du seuil de détection de la sonde bA7/2 hybridée sur différentes quantités d'ADN des souches de collection de l' espèce *B. bifidum*.
Marquage avec le système DIG; révélation par chimioluminescence; exposition de 5h à température ambiante.

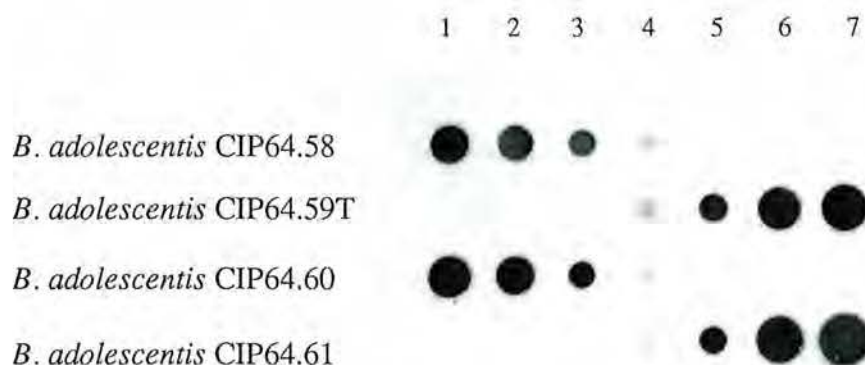


Fig. 58 : Recherche du seuil de détection de la sonde A6/17 hybridée sur différentes quantités d'ADN des souches de collection de l' espèce *B. adolescentis*.
Marquage radioactif; lavages effectués à 65°C; exposition de 20h à température ambiante.

0,05 ng; 0,5 ng; 1 ng; 10 ng; 100 ng; 1µg et 2µg d'ADN (pistes 1 à 7) sont déposés dans un ordre croissant pour les souches *B. bifidum* CIP64.64, *B. adolescentis* CIP64.59T et CIP64.61, et dans un ordre décroissant pour les souches *B. bifidum* CIP56.7T, CIP64.65 et *B. adolescentis* CIP64.58, CIP64.60.

Le seuil de détection de la sonde, après 20H00 d'exposition à température ambiante, correspond à 1 ng d'ADN total, ce qui indique une homologie sur environ 1pg (de même, le signal est visible sur l'original). Cette fois, le bruit de fond est quasiment inexistant.

3.3.9.3. Conclusion

Quel que soit le type de marquage utilisé (DIG ou [α - ^{32}P]dCTP), ces sondes peuvent détecter jusqu'à 1pg d'ADN homologue (ce qui correspond à un dépôt d'1 ng d'ADN total). L'hybridation sur dot-blots est donc réalisée dans de bonnes conditions puisque la quantité d'ADN cible varie de 1 à 1,5 μg par dépôt.

3.4. RECHERCHE DES FONCTIONS CODEES PAR LES FRAGMENTS L5/32 ET L6/45

3.4.1. Analyse du fragment L5/32 issu de l'ADN de *B. longum* ATCC15708

Rappelons que la sonde L5/32 est spécifique de la souche de collection *B. longum* ATCC15708, qu'elle hybride en plus sur l'ADN de la souche industrielle C4Bh, sur celui des souches issues de l'expérience clinique classées dans l'espèce *B. longum*, ainsi que sur l'ADN de la souche CE2 classée dans l'espèce *B. adolescentis* (cf. § 3.3.4). Afin de caractériser l'ADN contenu dans cet insert, celui-ci a été séquencé.

La stratégie de séquençage est présentée en figure 59 et la séquence en figure 60A. Les nucléotides 1 à 1215 correspondent au fragment estimé à 1,2 kb issu de l'ADN de *B. longum* ATCC15708 (Fig. 60A). Le pourcentage en bases G+C de ce fragment est de 55%, ce qui correspond au pourcentage moyen en G+C du génome des *Bifidobacterium* de l'espèce *longum* (58%, Scardovi, 1986).

Une recherche de cadres de lecture ouverte (ORF) a alors été effectuée en utilisant les codons ATG et GTG comme codons d'initiation. Elle révèle l'existence d'une extrémité d'ORF potentielle (ORF1) d'au moins 894 nucléotides en phase -3 (Fig. 60B). Cette ORF1 présente un usage de codons dont le pourcentage en G+C pour les trois nucléotides des codons est de 58,3% pour la première base, 49,1% pour la seconde et 65,7% pour la troisième. Le pourcentage en bases G+C de cette ORF1 est de 57,6%. L'utilisation des codons est donnée dans le tableau 30. Ces chiffres ont été comparés à ceux du graphe de Muto et Osawa (1987) (Fig. 61) qui prédisent que pour 58% en G+C, le pourcentage moyen pour la première base est de 64%, celui de la seconde, 43% et celui de la troisième 68,5%. Le pourcentage en G+C de la première base est toujours plus élevé que celui de la seconde, celui de la troisième base étant variable. Il est en effet plus élevé que celui de la première base dans le cas d'un génome ayant un pourcentage en G+C égal ou supérieur à 55%. Ces résultats sont donc compatibles avec le fait que l'ORF1 puisse correspondre à une séquence réellement codante. Néanmoins, il manque la partie N-terminale de ce gène potentiel. La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique de l'ORF1 a alors été comparée avec celles disponibles dans la banque de données NCBI du réseau blast. Elle n'a révélé d'homologie significative avec aucune séquence connue.

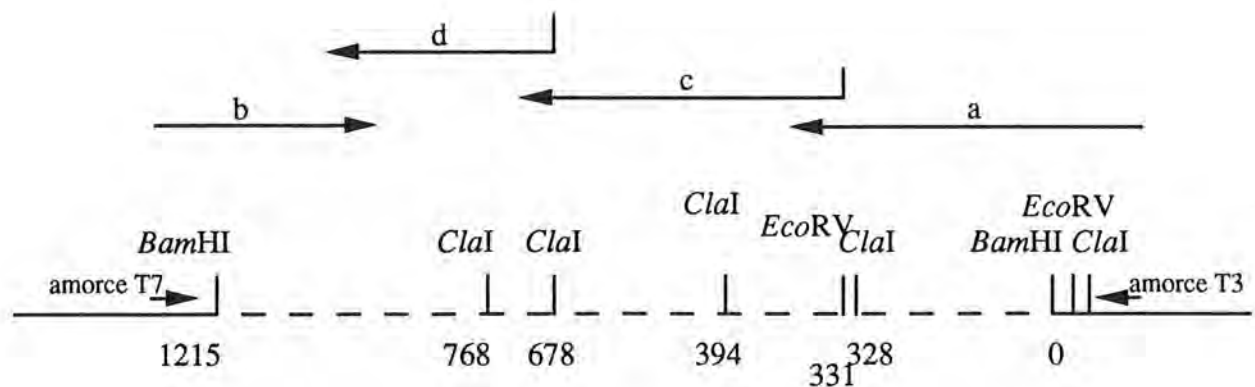


Fig. 59 : Stratégie de séquençage du fragment *Bam*HI de 1,2 kb de pL5/32.

La ligne en pointillés représente l'insert L5/32 cloné dans le vecteur pBluescript KS+ (trait simple). Les amorces T3 et T7 ont été utilisées pour séquencer les extrémités de l'insert (flèches a et b). Les flèches c et d représentent les séquences initiées à partir des sous-clones pL5/32-1 et pL5/32-2. pL5/32 a été digéré par *EcoRV*, présent en unique exemplaire dans l'insert ainsi que dans la cassette de clonage du plasmide. Le grand fragment a ensuite été reliqué. Cela a permis le séquençage à partir de l'amorce T3, de l'insert délété de 331pb du clone pL5/32-1. De même pL5/32 a été digéré partiellement par *ClaI* qui existe en plusieurs exemplaires dans l'insert et en site unique dans la cassette de clonage du plasmide. Le grand fragment a alors été reliqué. Le clone pL5/32-2, possédant un insert d'environ 500 pb (ce qui correspond à au moins deux fragments *ClaI* délétés) a été sélectionné et séquencé à partir de l'amorce T3. Le plasmide pL5/32-1 a permis de continuer la lecture de l'insert initiée avec l'amorce T3. Le plasmide pL5/32-2 a permis la lecture de 251 bases, reliées à la séquence obtenue avec pL5/32-1. De plus, la fin de cette séquence correspond à la séquence complémentaire lue à l'extrémité du fragment L5/32 séquencée avec l'amorce T7.

A

		10		20		30		40		50		60	
1	CCACGTT	CGG	AGTGT	AGAAC	ACATG	GCATG	AGTCG	AGTTT	CAATG	CAACG	TCGTC	CAGCAA	60
61	AGTAGG	AACAG	CACCCT	TTTTC	TGTCT	GTGTA	CGGCAT	CAGT	ACAAT	GTTTC	TAATG	AACAG	120
121	TTGTT	CGCGC	AAGGA	AATGC	CGGCAT	ATATG	TGCGTC	CATGT	TCAA	AGCATA	GAGAT	TTCATT	180
181	ATCCGG	CCTC	AACGA	GAATG	ATTTG	GTTCT	AGCGCA	AATAC	ATGCT	TTCAC	GACAC	ATGCC	240
241	TTCGT	GATAC	ATACG	TTGGT	CAGA	AAGAT	TGCGCT	AGAA	CTCAG	CAGTC	ACCGC	ACGTG	300
301	GTCCAC	GATG	TCGTT	GACCT	TGGT	CAATATC	GATAT	CGCGC	TCGCC	GAATG	CCTGC	CGCTC	360
361	GTAGGC	CAGG	TCGAT	GTGGT	GTTCG	TGTGC	GTAAT	CGATG	ATACG	GCGAG	CCAA	ATCGGC	420
421	AATGT	CGCCG	GACTT	GTTGA	AGGA	ACGACC	ACGCAG	CAGC	ACGCG	TGCA	TAAG	AGGGCG	480
481	CATCG	CTTGA	CCAACT	TGTA	CCGGT	CTGAC	TTCAC	CTTCA	CCATC	CAACC	GTCGG	CAAAA	540
541	TATAG	CACCA	CGCCT	TCACG	CGGGC	TTGCC	TTGGC	TTTCG	CGATT	GCCTG	GGCGA	CTTCT	600
601	TCCGG	CGAAT	GGCAG	ATCGC	CACCG	TTTCC	GGCCG	CACGA	AGCCG	CCGGC	AAGAG	TGAAC	660
661	GTTTC	CTCGT	GAGCG	GCATC	GATGG	AGAAC	GATTG	CGCAT	TACGA	ATCAG	ATGC	AGCAAG	720
721	CGCAC	GCCGG	ATGAT	TCGTA	TCCA	ACGATG	TGCCG	GTCGG	ACTCG	CGATC	GATGA	CTTCA	780
781	AACGC	CGCCG	TGACA	TTCCA	CTCAT	GCAAC	ATACG	CCACA	ATTCG	GCACG	TACCG	CTGAA	840
841	TCTCG	AAGGA	AACGG	GCGCT	CGATA	AAGCCG	GAATA	AATCCG	TTTGC	CCCCG	CTTCG	ACCAG	900
901	AAGCG	GAACA	ATCC	AGGAGT	TCCCG	CCCGC	CCCAC	GAGCC	CGAGA	AAATCC	GTTCT	CCTTG	960
961	CGCTC	AACGC	GCACG	GGCAA	CGACT	CTGGA	TGTTCT	TGAG	CGTGAT	TGAC	GACTT	GGGCG	1020
1021	AACGA	TGTCC	CCTCC	GTCTC	GTCC	ACAGCA	AAGA	ACTTCT	CGA	ACCGCG	TTGC	ACCACC	1080
1081	TGACC	GTTGC	CGCCG	ATAAA	AAGCC	CTCGC	GCATT	GATGG	TGCG	ATCCGT	CCACC	GATGT	1140
1141	TCACG	AAATG	CCTCT	GCACT	GAAAT	TGCAC	GCATA	CACGT	CTGTT	TCGCC	GCGC	ACCGGA	1200
1201	ATAAC	CCGAA	CGTAA										1215
		10		20		30		40		50		60	

B

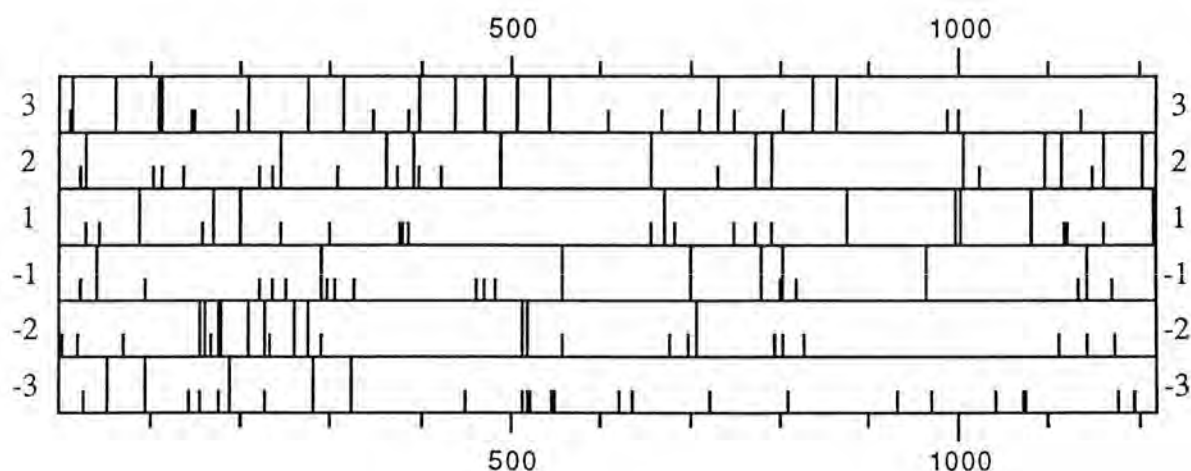


Fig. 60 :

A : Séquence nucléotidique du fragment L5/32.

B : Représentation des ORF potentielles du fragment L5/32. Les petites barres verticales représentent les codons ATG ou GTG; les grandes barres verticales représentent les codons "stop". L' échelle supérieure donne la position des nucléotides dans le fragment L5/32.

MW : 32675 Dalton CAI(S.c.) : 0.062 CAI(E.c.) : 0.212

TTT phe F	6	TCT ser S	-	TAT tyr Y	3	TGT cys C	-
TTC phe F	10	TCC ser S	4	TAC tyr Y	3	TGC cys C	7
TTA leu L	2	TCA ser S	5	TAA OCH Z	-	TGA OPA Z	1
TTG leu L	7	TCG ser S	11	TAG AMB Z	-	TGG trp W	7
CTT leu L	3	CCT pro P	3	CAT his H	6	CGT arg R	6
CTC leu L	4	CCC pro P	1	CAC his H	4	CGC arg R	8
CTA leu L	1	CCA pro P	1	CAA gln Q	4	CGA arg R	3
CTG leu L	2	CCG pro P	6	CAG gln Q	2	CGG arg R	5
ATT ile I	4	ACT thr T	3	AAT asn N	5	AGT ser S	1
ATC ile I	7	ACC thr T	3	AAC asn N	4	AGC ser S	4
ATA ile I	2	ACA thr T	5	AAA lys K	-	AGA arg R	-
ATG met M	2	ACG thr T	9	AAG lys K	8	AGG arg R	1
GTT val V	5	GCT ala A	3	GAT asp D	5	GGT gly G	2
GTC val V	7	GCC ala A	11	GAC asp D	5	GGC gly G	11
GTA val V	2	GCA ala A	4	GAA glu E	13	GGA gly G	4
GTG val V	15	GCG ala A	12	GAG glu E	10	GGG gly G	5

Tableau 30 : Usage des codons de l' ORF1 de L5/32 (programme DNA strider).

Les codes à trois lettres et à une lettre sont donnés pour les acides aminés.

L' ORF1 présente 58.3, 49.1 et 65.7 % en G+C pour les premières, secondes et troisièmes positions des codons.

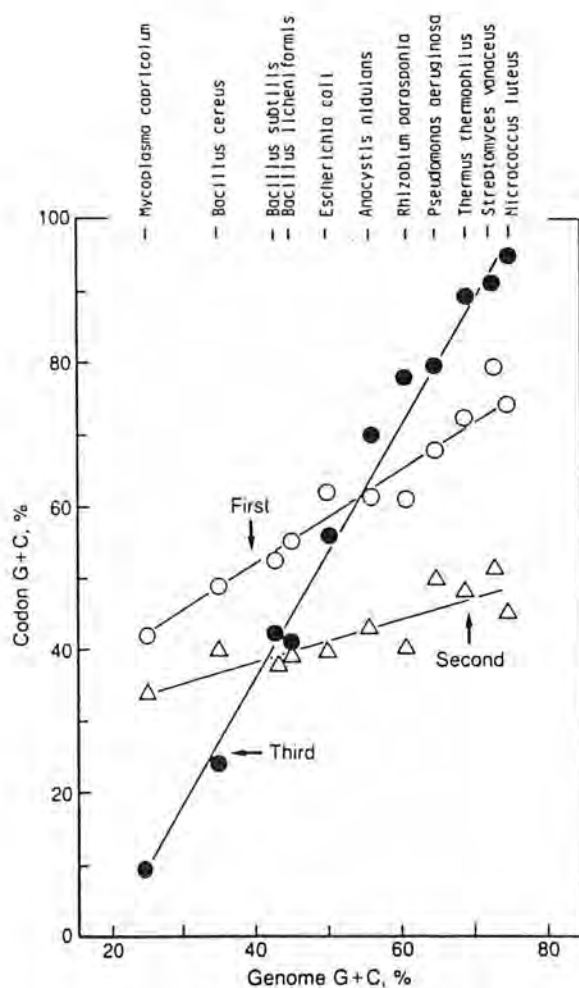


Fig. 61 : Corrélation entre le contenu en G+C de l'ADN génomique total et les premières, secondes et troisièmes positions des codons des gènes séquencés (Muto and Osawa, 1987).

3.4.2. Analyse du fragment L6/45 issu de l'ADN de *B. longum* ATCC15707^T

Rappelons que la sonde L6/45 hybride sur l'ADN de 13 des 15 souches classées dans l'espèce *B. longum* et sur aucun autre ADN testé (cf. § 3.3.5). De plus, elle révèle 1 à 4 bandes différentes selon la souche *B. longum* testée, et notamment 2 pour la souche *B. longum* ATCC15707^T qui avait fourni l'ADN de la banque.

La stratégie de séquençage est présentée en figure 62 et la séquence en figure 63A. Les nucléotides 1 à 1755 correspondent au fragment estimé à 1,75 kb issu de l'ADN de *B. longum* ATCC15707^T (Fig. 63A). Le pourcentage en bases G+C de ce fragment est de 66,5%, donc supérieur au pourcentage moyen en G+C du génome des *Bifidobacterium* de l'espèce *longum* (58%, Scardovi, 1986).

Une recherche des phases de lecture ouverte a été effectuée en utilisant les codons ATG et GTG comme codons d'initiation (Fig. 63B). Un cadre de lecture ouverte potentiel (ORF2-1) a été mis en évidence en phase +1, fondé sur la composition en bases à chacune des trois positions des codons (Fig. 63B). Cette ORF2-1 présente respectivement 71, 57 et 74% en G+C pour les premières, secondes et troisièmes positions des codons (Tableau 31A). Elle débiterait par un codon d'initiation de traduction GTG situé aux positions 466 à 468. Une comparaison de la séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique avec les séquences disponibles dans la banque de données NCBI du réseau blastp a montré que cette ORF2-1 présentait des similarités faibles avec des intégrases et recombinaises trouvées chez *E. coli*. Ces similarités deviennent significatives, notamment avec les intégrases XerC (3×10^{-5}) et FimB (3×10^{-4}) d'*E. coli*, quand on interroge la banque en utilisant un autre codon d'initiation de traduction GTG situé aux positions 679 à 681. L'utilisation des codons à partir de cet autre codon d'initiation est donnée dans le tableau 31B. Cette séquence (ORF2-2), coderait pour une protéine d'au moins 359 acides aminés. La séquence protéique située entre ces deux codons GTG est extrêmement riche en résidus glycine et les séquences protéiques alignées par la banque à ce niveau ne sont absolument pas significatives. Une recherche de site (s) de fixation des ribosomes, ainsi qu'une recherche de séquence (s) promotrice (s) consensus a alors été effectuée afin de résoudre ce problème, mais elle est restée vaine. Le meilleur site de fixation des ribosomes concernant le premier codon d'initiation potentiel est "AGCAGG", situé à 6 nucléotides du codon GTG. En amont du second site d'initiation de traduction potentiel, on observe les nucléotides "TGGCGG" à 14 nucléotides du codon GTG. Ils pourraient également correspondre à un site de fixation pour les ribosomes.

Les enzymes alignées avec la séquence protéique de l'ORF2-2 font partie de la famille des recombinaises site-spécifiques catalysant la coupure et la religation des deux molécules d'ADN intervenant dans ce type de recombinaison (Fig. 64). La séquence protéique de l'ORF2-2 (Fig. 65) contient en particulier deux régions qui sont homologues à deux domaines

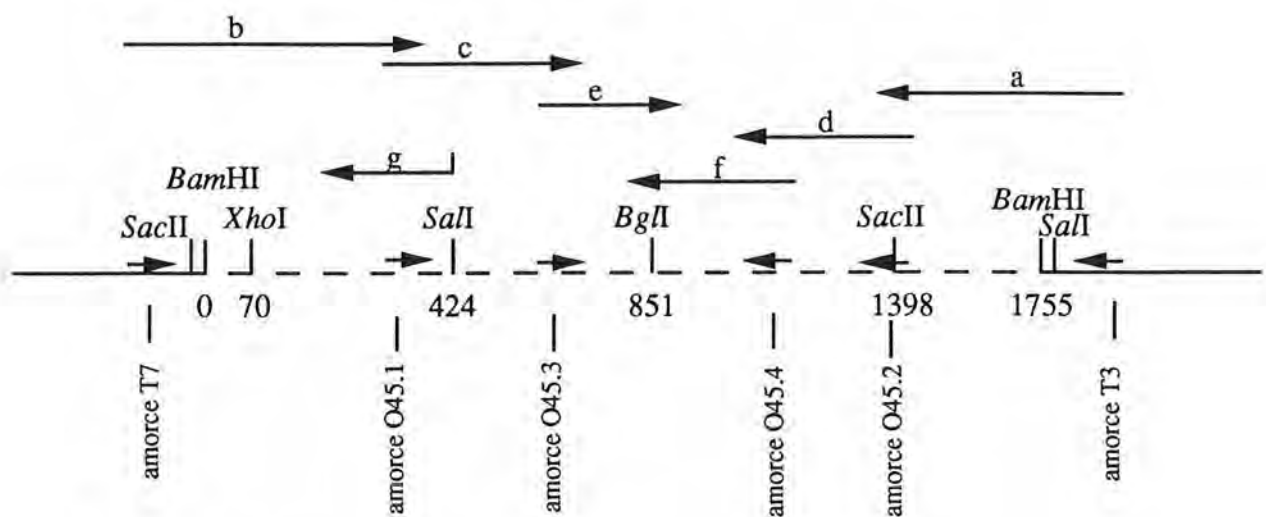


Fig. 62 : Stratégie de séquençage du fragment *Bam*HI de 1,75 kb de pL6/45.

La ligne en pointillés représente l'insert L6/45 cloné dans le vecteur pBluescript KS+ (trait simple). Les amorces T3 et T7 ont été utilisées pour séquencer les extrémités de l'insert (flèches a et b). Les flèches c à f représentent les séquences obtenues avec les amorces O45.1 à O45.4. Ces amorces ont été progressivement choisies à la fin des séquences lues, pour pouvoir continuer la lecture de l'insert (cf. § 2.8).

La flèche g représente la séquence initiée à partir du sous-clone pL6/45-1. pL6/45 a en effet été digéré par *Sal*I, présent en unique exemplaire dans l'insert ainsi que dans la cassette de clonage du plasmide. Le grand fragment a ensuite été religué. Cela a permis le séquençage à partir de l'amorce T3, d'une partie de l'insert délété de 1331pb du sous-clone pL6/45-1 et de confirmer une partie de la séquence obtenue avec l'amorce O45.1.

A

	10	20	30	40	50	60	
1	AAGGAGATCG	TGGCCTGGGA	CGTCAGCCGG	CATCCCGACA	TGGCCCAGCA	GCGGCGCCTG	60
61	CTCGCCATGC	TCGAGGAGAA	GCTGCCCCGAA	GACGCCGACC	CGATCCCCGCA	CTCCGAT	120
121	GCCGGGTTTG	TTGTTAAGCC	GGGGAACGGT	TCGGGGTCTT	GGTGGCTGGC	CGTGTCCCAT	180
181	GTGGTTTCCC	GGCTTAACGT	TCCGGGTAT	GTTCGTCTTG	TCCCATTGA	TTCGAACGAA	240
241	GGAGTTTGCC	ATGGGTGAGA	CGACGGTTGG	CCATGTCGCG	GGCGAGGTGG	TCCGCGCGCT	300
301	TTACGGGGCC	GGTTATATGG	AATCCACCAT	AGGCCAGTAC	CGCAAGTCCA	TCAGGGCGTT	360
361	GGAACGGTAC	GCCGGAGGCC	CGGATGCGGT	GTACACGCGT	GGGTGGGCG	CGGGGTTGCG	420
421	CGCGTCGACC	TTCAGTGAGC	GGACGGGCGG	TTTCAGCAGG	CAGCG	TCGATTACGG	480
481	CAGGCTGGCG	CGTTTGTGCG	ACTCGTATCT	GCGGTCCGGT	TCGGTGGACC	TGGGCAAGTG	540
541	GCGCAGGAGC	AGGCTTGCGG	AGCCGGTGGT	TCCGGGTTTG	GCCGTGGTCA	TGGAGCGTTG	600
601	GGAGGCGTAT	CTCGCCGGTT	CGGGACTGGC	TTGCGCGACG	GTGGGGCATT	ACCGTCGGA	660
661	GGCGGGCTTG	TTCTCTCACT	GGCTGGAATC	TCATGGGGTC	GTGTCGTTGG	ACGGTTCGGA	720
721	TGGCTCGCAT	GTGCTGGGGT	TCCTGGCCGG	GCTGCGTTCA	CGCTGGTCGG	AGTCGTGAGT	780
781	GCGGCACGCG	CGTCGGACCT	GCGCCCGTTG	TTCAGATGGC	TCGGGCGGGA	TGACCTGGCG	840
841	GACGCGATCG	GCCTGGCCGG	CATACGCAGG	ACCCACGCGA	TCGCGGGAAC	GTTGCCCGAC	900
901	GACGAGCACC	GCCGCTTGCT	GGAGGCGTGC	GCCTCGCGGT	CGGTGCCGTC	GAGGGACGCG	960
961	GCGATCACCC	TGCTGTCGCT	GACGTGCGGG	CTGAGGGCAT	GCGATGTGAT	CGGTCTGAGG	1020
1021	ATCGCCGACG	TGGATTGGGA	TTCCATGAGC	ATAGGTCTGG	TGCAGCGAAA	GACGGGCAAT	1080
1081	CCGTTGACCG	TGCCGATGAC	GGGACCGCTG	GCCGCGAGGC	TGGCGTCCTG	GCTGTTGGAC	1140
1141	GAAAGGCCCG	CCACCGACGA	CGACCGTGTG	TTGCTGCGGT	ACAAGGCGCC	CCATGTGCGG	1200
1201	CTTCGGGGTC	ATTATCGGT	GTACGAGGCG	ATCAGCCGTG	TCATGCGGCA	CGCCGGGCTC	1260
1261	GGACGCCGGG	GCGGTTCAG	GCTGTTGCGG	CGCAACGCGG	CGACGAGGAT	GCTGGAGGCG	1320
1321	GCCACGCCGT	TGCCGACGAT	CAGCGCGGTG	CTTGCCACG	CCGACCCCGA	TTCACACGCG	1380
1381	GTCTACATGG	CCACGCACCG	CGGGGGAATG	CTCGCGTGCG	TGCTGCCGTG	CCGGAAGGCG	1440
1441	GATCGTCATG	AGACCCACGG	AACACGGATT	CGTCGGCCCC	CTCGCCGCGG	AATTGGAGGA	1500
1501	GTACATCCGT	TTCAAGGCGT	CCATGGGACG	GATGGCGGCC	ACCCGCGTCC	AGGTCCTGCG	1560
1561	CTCGTTCGAC	GGCATTGCTT	CGAACACGGG	GCCGTGCGTC	TGGAGCGGGG	CGTCGTGGAG	1620
1621	CGATGGATCG	CCCATAGGAT	CGACGCGAAT	CCCGGGGGTT	GCCGCTCGTG	GTTCTCGTAC	1680
1681	ATCAGGGACT	TCGGCAGGTG	GATGCGACTG	GCCCACGATC	CCGACGCGTA	CGTGCTCTCC	1740
1741	GACCACTGGA	AGGCC					1755

B

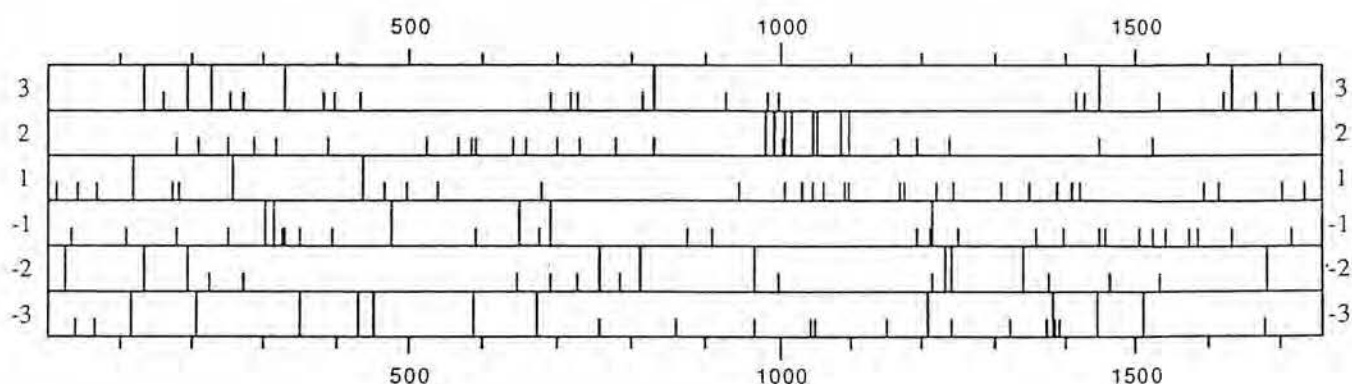


Fig. 63 :

A : Séquence nucléotidique du fragment L6/45.

B : Représentation des ORF potentielles du fragment L6/45. Les petites barres verticales représentent les codons ATG ou GTG; les grandes barres verticales représentent les codons "stop". L'échelle supérieure donne la position des nucléotides dans le fragment L6/45.

A

430 codons

MW : 46437 Dalton CAI(S.c.) : 0.034 CAI(E.c.) : 0.176

TTT phe F	3	TCT ser S	2	TAT tyr Y	-	TGT cys C	1
TTC phe F	9	TCC ser S	6	TAC tyr Y	5	TGC cys C	8
TTA leu L	2	TCA ser S	2	TAA OCH Z	-	TGA OPA Z	-
TTG leu L	8	TCG ser S	9	TAG AMB Z	-	TGG trp W	10
CTT leu L	3	CCT pro P	4	CAT his H	8	CGT arg R	8
CTC leu L	8	CCC pro P	7	CAC his H	10	CGC arg R	13
CTA leu L	-	CCA pro P	1	CAA gln Q	2	CGA arg R	7
CTG leu L	19	CCG pro P	11	CAG gln Q	6	CGG arg R	18
ATT ile I	2	ACT thr T	1	AAT asn N	2	AGT ser S	-
ATC ile I	11	ACC thr T	5	AAC asn N	1	AGC ser S	3
ATA ile I	2	ACA thr T	2	AAA lys K	-	AGA arg R	1
ATG met M	7	ACG thr T	9	AAG lys K	4	AGG arg R	11
GTT val V	5	GCT ala A	6	GAT asp D	9	GGT gly G	12
GTC val V	10	GCC ala A	14	GAC asp D	17	GGC gly G	15
GTA val V	3	GCA ala A	5	GAA glu E	2	GGA gly G	15
GTG val V	17	GCG ala A	28	GAG glu E	8	GGG gly G	13

B

359 codons

MW : 39553 Dalton CAI(S.c.) : 0.034 CAI(E.c.) : 0.174

TTT phe F	1	TCT ser S	-	TAT tyr Y	-	TGT cys C	1
TTC phe F	6	TCC ser S	5	TAC tyr Y	5	TGC cys C	7
TTA leu L	-	TCA ser S	2	TAA OCH Z	-	TGA OPA Z	-
TTG leu L	7	TCG ser S	8	TAG AMB Z	-	TGG trp W	10
CTT leu L	2	CCT pro P	2	CAT his H	7	CGT arg R	7
CTC leu L	7	CCC pro P	7	CAC his H	9	CGC arg R	12
CTA leu L	-	CCA pro P	1	CAA gln Q	1	CGA arg R	5
CTG leu L	19	CCG pro P	10	CAG gln Q	3	CGG arg R	15
ATT ile I	2	ACT thr T	-	AAT asn N	2	AGT ser S	-
ATC ile I	11	ACC thr T	5	AAC asn N	1	AGC ser S	3
ATA ile I	2	ACA thr T	2	AAA lys K	-	AGA arg R	1
ATG met M	7	ACG thr T	9	AAG lys K	4	AGG arg R	11
GTT val V	3	GCT ala A	4	GAT asp D	8	GGT gly G	7
GTC val V	9	GCC ala A	13	GAC asp D	16	GGC gly G	9
GTA val V	1	GCA ala A	4	GAA glu E	2	GGA gly G	11
GTG val V	14	GCG ala A	24	GAG glu E	7	GGG gly G	8

Tableau 31 :

A. Usage des codons de l'ORF2-1 de L6/45 (programme DNA strider).

Cette phase de lecture ouverte présente 71, 57 et 74 % en G+C pour les premières, secondes et troisièmes positions des codons.

B. Usage des codons de l'ORF2-2 de L6/45.

Cette phase de lecture ouverte présente 69, 56 et 78% en G+C pour les premières, secondes et troisièmes positions des codons.

<i>ORF2-2</i>	-----LPDDE	HRRLLEACAS	RSVPSRDAAT	TLLSLTCGLR	ACDVIGLRIA
<i>XerC</i>	-----IDVDD	MNELLDIDIN	DPLAVDPRAM	LEVMYGAGLP	LSELVGLDIK
<i>FimB</i>	-----LTHSE	IESLLKAANT	GEHAARNYCL	TLLCFIHGFR	ASEICRLRIS
<i>FimE</i>	-----LTGKE	VQAMMQAVCY	GATGARDYCL	ILLAYRHGMR	ISELLDLHYQ
<i>E2</i>	RLPVVLPDE	VVRILGF---	--KEGEHRLF	AQLLYGTGMR	ISEGLQLRVK
<i>TnpA</i>	QIRT-LRSKE	VKQIIDACHT	K----EDKLI	LMIMYEGGLR	LGEVLSLRLE
<i>ORF2-2</i>	DVDWDSMSG	LVQRKTGNEL	TVPMTGELA-	-----ARLA	SWL-----
<i>XerC</i>	HLDESSEVW	VM-GKGSKER	RL-----P	IGRNAVAWIR	HWLDLRDLFG
<i>FimB</i>	DIDLKAKCIY	IRHLK-----K	GFSTTHPLLN	KDVOAL---K	NWLSIRTSYP
<i>FimE</i>	DLDLNEGRIN	IRHLK-----N	GFSTVHPLRF	DEREAV---P	RWTQERANWK
<i>E2</i>	DLDFDHGTII	VREGKGSKDR	ALMLPESLAP	SLREQLSKAR	AWW-LKDQAE
<i>TnpA</i>	DIVTWDNQIH	LT-----EP	DVNVNEAYIK	LRRERTIHVS	K--EIMSLYT
<i>ORF2-2</i>	-----	EDERPATDDD	-----RVEVR	YK---APHVA	LRGHSSVYE-
<i>XerC</i>	SEDDALFLSK	LGKRIS----	-----	-----	-----AR
<i>FimB</i>	HAE-SE----	-----	-----MVFLS	R-----KGN	PLSRQQFY--
<i>FimE</i>	GADRTD----	-----	-----AIFIS	R-----RGS	RLSRQQAY--
<i>E2</i>	GRSGVALPDA	LERKYPRAGH	SWPWFVVEAQ	HTHSTDERSG	VVRRHHMYDQ
<i>TnpA</i>	DYLIYEYSEE	LEHDX-----	-----VFIS	LKE-----G	YFGKPLKYQS
<i>ORF2-2</i>	AISRVMR---	-HAGLGRRGG	SRLLRNAAT	RMLEAATPLP	TISAVLGHAD
<i>XerC</i>	NVQKRAEWG	IKQGLNNHVV	PHKLRRHSFAT	HMLESSGDLR	GVQELLGHAN
<i>FimB</i>	---HIISTSG	GNAGLSLEIH	PHMLRHSCGF	ALANMGIDTR	LIDQYLGHRN
<i>FimE</i>	---RIIRDAG	TEAGTVTQTH	PHMLRHACGY	EIAERGADTR	LIDQYLGHRN
<i>E2</i>	TFQRAEKRAV	EQAGITKPAT	PHTLRHSFAT	ALLRSGYDIR	TVQDLLGHSD
<i>TnpA</i>	VLD-LVRRIV	KRTGI--EFT	SHMLRHTHAT	QLIREGWDVA	FVQKRLGHAH
<i>ORF2-2</i>	PDSTR-VYMA	TH			
<i>XerC</i>	LSITQ-LYTH	LD			
<i>FimB</i>	IRHTV-WYTA	SN			
<i>FimE</i>	IRHTV-RYTA	SN			
<i>E2</i>	VSTTM-LYTH	VL			
<i>TnpA</i>	VQTTLNTYVH	LS			

Fig. 64 : Alignements de la séquence protéique d'un fragment de l'ORF2-2 de L6/45 (acides aminés 72 à 240) avec les séquences correspondantes des intégrases XerC (Colloms *et al.*, 1990), FimB et FimE (Dorman et Higgins, 1987), E2 (Sundström *et al.*, 1988) et TnpA (Murphy *et al.*, 1985).

Clustal package of mutiple alignments Program (Higgins and Sharp, 1988-1989).

L 6/45-T7 [679 to 1755] -> 1-phase Translation

DNA sequence 1755 b.p. AAGGAGATCGTG ... CAGTGAAGGCC linear

679/1	709/11
GTG GCT GGA ATC TCA TGG GGT CGT GTC GTT	GGA CGG TTC GGA TGG CTC GCA TGT GCT GGG
V A G I S W G R V V	G R F G W L A C A G
739/21	769/31
GTT CCT GGC CGG GCT GCG TTC ACG CTG GTC	GGA GTC GTC GAT GCG GCA CGC GCG TCG GAC
V P G R A A F T L V	G V V D A A R A S D
799/41	829/51
CTG CGC CCG TTG TTC AGA TGG CTC GGG CGG	GAT GAC CTG GCG GAC GCG ATC GGC CTG GCC
L R P L F R W L G R	D D L A D A I G L A
859/61	889/71
GGC ATA CGC AGG ACC CAC GCG ATC GCG GGA	ACG TTG CCC GAC GAC GAG CAC CGC CGC TTG
G I R R T H A I A G	T L P D D E H R R L
919/81	949/91
CTG GAG GCG TGC GCC TCG CGG TCG GTG CCG	TCG AGG GAC GCG GCG ATC ACC CTG CTG TCG
L E A C A S R S V P	<u>S R D A A I T L L S</u>
979/101	1009/111
CTG ACG TGC GGG CTG AGG GCA TGC GAT GTG	ATC GGT CTG AGG ATC GCC GAC GTG GAT TGG
<u>L T C G L R A C D V</u>	<u>I G L R I A D V D W</u>
1039/121	1069/131
GAT TCC ATG AGC ATA GGT CTG GTG CAG CGA	AAG ACG GGC AAT CCG TTG ACC GTG CCG ATG
<u>D S M S I G L V Q R</u>	<u>K T G N P L T V P M</u>
1099/141	1129/151
ACG GGA CCG CTG GCC GCG AGG CTG GCG TCC	TGG CTG TTG GAC GAA AGG CCC GCC ACC GAC
T G P L A A R L A S	W L L D E R P A T D
1159/161	1189/171
GAC GAC CGT GTG TTC GTG CGG TAC AAG GCG	CCC CAT GTC GCG CTT CGG GGT CAT TCA TCG
D D R V F V R Y K A	P H V A L R G H S S
1219/181	1249/191
GTG TAC GAG GCG ATC AGC CGT GTC ATG CGG	CAC GCC GGG CTC GGA CGC CGG GGC GGT TCC
V Y E A I S R V M R	H A G L G R R G G S
1279/201	1309/211
AGG CTG TTG CGG CGC AAC GCG GCG ACG AGG	ATG CTG GAG GCG GCC ACG CCG TTG CCG ACG
<u>R L L R R N A A T R</u>	<u>M L E A A T P L P T</u>
1339/221	1369/231
ATC AGC GCG GTG CTT GGC CAC GCC GAC CCC	GAT TCC ACA CGC GTC TAC ATG GCC ACG CAC
<u>I S A V L G H A D P</u>	<u>D S T R V Y M A T H</u>
1399/241	1429/251
CGC GGG GGA ATG CTC GCG TGC GTG CTG CCG	TGC CGG AAG GCG GAT CGT CAT GAG ACC CAC
R G G M L A C V L P	C R K A D R H E T H
1459/261	1489/271
GGA ACA CGG ATT CGT CGG CCC GCT CGC CGG	CGA ATT GGA GGA GTA CAT CCG TTT CAA GGC
G T R I R R P A R R	R I G G V H P F Q G
1519/281	1549/291
GTC CAT GGG CAG GCA TGG CGC CAC CCG CGT	CCA GGT CCT GCG CTC GTT CGA CGG CAT TGC
V H G Q A W R H P R	P G P A L V R R H C
1579/301	1609/311
CTC GAA CAC GGG GCC GTG CGT CTG GAG CGG	GGC GTC GTG GAG CGA TGG ATC GCC CAT AGG
L E H G A V R L E R	G V V E R W I A H R
1639/321	1669/331
ATC GAC GCG AAT CCC GGG GGT TGC CGC TCG	TGG TTC TCG TAC ATC AGG GAC TTC GGC AGG
I D A N P G G C R S	W F S Y I R D F G R
1699/341	1729/351
TGG ATG CGA CTG GCC CAC GAT CCC GAC GCG	TAC GTG CTC TCC GAC CAG TGG AAG GCC
W M R L A H D P D A	Y V L S D Q W K A

Fig. 65 : Séquence protéique de l' ORF2-2 du fragment L6/45 (Programme DNA Strider). Les séquences soulignées correspondent aux domaines 1 et 2 rencontrés chez les recombinaisons de la famille de l'intégrases de lambda.

conservés chez les recombinases site-spécifiques de la famille de l'intégrase de lambda (Fig. 66). Le fragment L6/45 pourrait donc contenir un gène codant une intégrase.

Les recombinases site-spécifiques interviennent dans l'intégration et l'excision du chromosome des bactériophages dans le chromosome bactérien (intégrase Int pour λ , Campbell, 1962; Weisberg et Landy, 1983), la résolution des co-intégrats générés au cours des "sauts" de transposons (résolvase de Tn3 (Reed et Grindley, 1981); intégrase TnpI de Tn4430 (Mahillon et Lereclus, 1988)), l'inversion de fragments d'ADN permettant la sélection d'antigènes flagellaires particuliers chez *Salmonella typhimurium* (invertase Hin, Simon *et al.*, 1980) ou le contrôle de la liste d'hôtes possibles pour des phages tels que Mu (invertase Gin, van de Putte, 1980), dans le maintien d'une ségrégation fidèle du phage P1 au cours des divisions (protéine Cre, Austin *et al.*, 1981), le maintien de la stabilité du plasmide ColE1 d'*Escherichia coli* (intégrase XerC, Stirling *et al.*, 1988; Colloms *et al.*, 1990), l'expression de gènes de fixation pour l'azote au cours de la différenciation des hétérocystes chez les cyanobactéries (Golden *et al.*, 1985), l'expression de gènes d'adhésion aux cellules eucaryotes chez *Escherichia coli* (intégrases FimB et FimE, Dorman et Higgins, 1987), le maintien d'un nombre de copies élevé du plasmide 2 μ m de *Saccharomyces cerevisiae* (protéine FLP, McLeod *et al.*, 1984) et la génération de nombreux anticorps (Early *et al.*, 1980) et récepteurs pour les cellules T au niveau du système immunitaire (Gascoigne *et al.*, 1984).

En fait, toutes les recombinases site-spécifiques décrites ci-dessus se classent, soit dans la famille représentée par la protéine Hin de *S. typhimurium* (résolvases, invertases), soit dans celle représentée par la protéine Int du phage lambda (intégrases) pour laquelle des alignements avec la séquence protéique de l'ORF2-2 ont été observés.

L'interrogation du réseau blastn de la banque NCBI concernant la séquence nucléotidique de l'ORF2-2 n'a révélé aucune homologie significative avec une séquence connue.

De plus, le fragment L6/45 est répété dans sa totalité dans certaines souches de l'espèce *B. longum*, puisque l'hybridation des 424 premières bases de ce fragment (*Bam*HI-*Sal*I, cf. Fig. 62), ne comprenant pas le gène de la recombinase, donne des signaux identiques à l'hybridation du fragment entier et à celle du fragment délété des 851 premières bases (*Bgl*II-*Bam*HI) (résultats non montrés).

Domaine 1

<i>L6/45</i>	AAITLLSLTC	GLRACDVIGL	RIADVWD
<i>XerC</i>	RAMLEVYGA	GLRLSELVGL	DIKHLDLE
<i>FimB</i>	YCLTLLCFIH	GFRASEICRL	RISDIDIK
<i>FimE</i>	YCLILLAYRH	GMPISELADL	HYQDLIDN
<i>E2-pLMO20</i>	RLFAQLLYGT	GMRISEGLQL	KVKDLDFD
<i>Tn4430-TnpI</i>	LAATLLAYT	GVRISEALSI	KMNDFNQ
<i>Tn554-TnpA</i>	KLLEMLMYEG	GLRIGEVLSL	RLEDIVTW
<i>Tn554-TnpB</i>	ATMTMIVOEC	GMPISELCTL	KKGCLLED
<i>Tn1545-int</i>	YDEILILEKT	GLRISEFGGL	TLPDLDFE
<i>F:D-Prot</i>	KMLLATLWNT	GARINEALAL	TRGDFSLA
<i>P1-Cre</i>	TAGVEKALSL	GVTKLVERWI	SVSGVADD
<i>P22-Int</i>	KSVVEFALST	GLRISNIINL	EWQOIQMQ
<i>Lambda-Int</i>	RLAMELAVVT	GQSVGDLCEM	KWSDIVDG

Domaine 2

<i>L6/45</i>	RLLRNAATR	MLEAA-TPLP	TISAVLGHAD	-PDST-RVYM	A
<i>XerC</i>	HKLRHSEATH	MLESS-GDLR	GVQELLGHAN	-LSTT-QIYT	H
<i>FimB</i>	HMLRHSCGFA	LANMG-IDTR	LIQDYLGHNR	-IRHT-VWYT	A
<i>FimE</i>	HMLRHACGYE	LAERG-ADTP	LIQDYLGHNR	-IRHT-VRIT	A
<i>E2-PLMO20</i>	HTLRHSEATA	LLRSG-YDIR	TVQDLLGHSD	-VSTT-MIYT	H
<i>Tn4430-TnpI</i>	HQLRHFECTN	AIEKG-FSIH	EVANQAGHSN	-IHTT-LLYT	N
<i>Tn554-TnpA</i>	HMLRHTHATQ	LIREG-WQVA	FVQKRLGHAH	VQTTL-NTYV	H
<i>Tn554-TnpB</i>	HAFRHTVGTR	MINNG-MPQH	IVQKFLGHES	-PEMT-SRYA	H
<i>Tn1545-Int</i>	HSLRHTFCTN	YANAG-MNPK	ALQYIMGHAN	-IATLNYIA	H
<i>F:D-Prot</i>	HTFRHSYAMH	MLYAG-TPLK	VLQSLMGHKS	-ISST-EVYT	K
<i>P1-Cre</i>	HSAPVGAARD	MARAG-VSIP	EIMQAGGWTN	-VNIV-MNYI	R
<i>P22-Int</i>	HDLRHTWASW	LVOAG-VPIS	VLQEMGGWES	-TEMV-RRYA	H
<i>Lambda-Int</i>	HELRLSLA-R	LYEKO-TSDK	FAQHLLGHKS	-DTMA-SQY-	R
<i>Flp</i>	HIGRHLMTSF	LSMKGLTELT	NVVGNWSDKR	ASAVARTTYT	H

Fig. 66 : Alignements de la séquence protéique de l'ORF2-2 de L6/45 avec d'autres recombinaisons spécifiques de la famille de l'intégrase de lambda. Seuls les domaines conservés sont comparés bien que L6/45, XerC, E2, FimE et FimB puissent être alignées entre les domaines 1 et 2. Les régions de L6/45 qui sont comparées (acides aminés 94 à 121 et 201 à 238) sont celles qui sont soulignées sur la figure 65. Des trous ont été introduits pour optimiser l'homologie (d'après Colloms *et al.*, 1990).

3.4.3. Article n°2

**Selection of Species-Specific DNA Probes
Which Detect Strain Restriction Polymorphism
In Four *Bifidobacterium* Species**

I. MANGIN, N. BOURGET, J.-M. SIMONET[†] and B. DECARIS*.

*Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences, Université de
Nancy I, Institut National de la Recherche Agronomique Associated Unit,
BP 239, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.*

Telephone number : (33) 83 91 20 96 ; Fax number : (33) 83 91 25 00

*†Present address : Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS URA1354,
Université de Paris-Sud, Bât 400, 91405 Orsay, France.*

** corresponding author*

SUMMARY

Randomly cloned fragments (in a size range 1 to 2.5 kb) of DNA from *Bifidobacterium longum* ATCC15707, *B. adolescentis* CIP64.59T, *B. bifidum* CIP64.65 and *B. animalis* ATCC25527 were used as hybridization probes to characterize strains of these species and distinguish them from closely related *Bifidobacterium* species. The fragments were screened for hybridization with native DNA from 41 different *Bifidobacterium* strains. For each species, a fragment hybridizing specifically with DNA from strains of the same species was isolated. Each fragment was then hybridized with restriction digests in order to study the genome polymorphism. In some of the tested *B. longum* strains including strain ATCC15707, the species-specific fragment L6/45 hybridized with 2 fragments instead of one as expected. Sequence of the fragment revealed the presence of an ORF which had an amino acid sequence similar to the site-specific recombinases of lambda integrase family. Moreover, Southern analysis demonstrated that at least 3 copies of this fragment are present in the chromosome of *B. longum* ATCC15707 and in some other *B. longum* strains. The species-specific fragment A6/17 of *B. adolescentis* hybridized with the same restriction fragment of the eight strains of this species tested. The *B. bifidum* specific fragment hybridized with different DNA restriction fragments according to the strain. The restriction

fragment *an1* from *B. animalis* ATCC25527 hybridized with the same restriction fragment from strain *B. animalis* ATCC27536. However these two strains could be differentiated by another restriction pattern. Thus, hybridization results highlight the genetic polymorphism which exists among *Bifidobacterium* strains of the same species.

Key-words: *Bifidobacterium*, species-specific DNA probes, Restriction Fragment Length Polymorphism, site-specific recombinase.

INTRODUCTION

Bifidobacteria are major constituents of the intestinal microflora of humans and other living organisms. Moreover many fermented dairy foods are now produced on an industrial scale in various countries, using cultures containing bifidobacteria (eg. fermented milks and cheeses). Thus, rapid strain characterization has become important for studying the relationship between the intestinal microflora and the host's health as well as for dairy manufacturers. For a long time, the classification of *Bifidobacterium* species relied upon testing a selected panel of biochemical reactions (Mitsuoka, 1984). However, results could be variable depending on the isolate tested and thus identification often remained uncertain. Recently, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium longum* have been reported to have caused two separate cases of bloodstream infections (Darbas *et al.* 1989; 1991). According to Scardovi and Crociani (1974), only one *Bifidobacterium* species (*Bifidobacterium dentium*) might be pathogenic.

However in these two cases, the identification of strains was only based on morphological and sugar fermentation characteristics. Furthermore Roy and Ward (1990) demonstrated that fermentation patterns of *Bifidobacterium* strains tend to be strain-specific rather than species-specific. Thus, using this method to accurately identify isolates is doubtful. A partial solution to this problem has been to use DNA-DNA homology, to test the relatedness of unknown isolates with the type strains (Lauer and Kandler, 1983; Scardovi *et al.*, 1971). However, DNA-DNA homology requires special skills and the inclusion of all type cultures in the assays. Moreover, DNA-DNA homology generally does not detect subgroups or strain specific characteristics which are important when microorganisms are of medical or industrial interest. More recently, species-specific oligonucleotide probes based on highly variable rRNA regions have been used for the identification of several *Bifidobacterium* species (Yamamoto *et al.*, 1992). However, these probes could not distinguish between the different strains of the same species. More recently, identification of *Bifidobacterium* strains using rRNA gene restriction patterns revealed that in most cases there are ribosomal bands which are common to all strains of the same species. Thus, hybridization of a ribosomal probe with restriction digests of unknown isolates enabled most of them to be unambiguously identified (Mangin *et al.*, 1994). Strain identification of various bacteria has been carried out in this way previously (Baloga and Harlander, 1991; De Buyser *et al.*, 1992; Grimont *et al.*, 1989). The development of species-specific DNA probes has enabled researchers to identify particular isolates of interest quickly and conclusively (Clark-Curtiss and Docherty, 1989; Colmin *et al.*,

1991; Eisenach *et al.*, 1988; Korolik *et al.*, 1988; Wickes *et al.*, 1992). These probes are valuable tools for the characterization of bacteria.

In this study, we report the identification of four *Bifidobacterium* species using species-specific DNA probes isolated from recombinant DNA libraries of strains *B. longum* ATCC15707, *B. adolescentis* CIP64.59T, *B. bifidum* CIP64.65 and *B. animalis* ATCC25527. Three of these strains are of human origin and present industrial interest. The sequencing results of the *B. longum* specific probe L6/45 have also been presented.

Abbreviations

ATCC = American Type Culture Collection

CIP = Collection de l'Institut Pasteur

NCBI = National Center for Biotechnology Information

ORF = Open Reading Frame

PCR = Polymerase Chain Reaction

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Bifidobacterium* strains are listed in Table 1. They were obtained in a lyophilized form from either the Collection de l'Institut Pasteur (CIP, Paris, France), or the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md). The strains designated CE1 to CE11 were obtained from INSERM U-290 (Hôpital Saint Lazare, Paris), during a clinical experiment on the human microflora. Assignment of these strains to the *Bifidobacterium* genus was based on cell morphology and the presence of fructose-6-phosphate phosphoketolase, the key enzyme of *Bifidobacterium* metabolism (Scardovi, 1986). Strains CE1, CE3, CE4, CE6, CE9 and CE10 have been previously identified by rRNA gene restriction patterns as *B. longum* (Mangin *et al.*, 1994). Indeed, we found that 2-4 of the bands (out of a total of 4) were in common with collection strains of *B. longum*. Moreover, their fingerprints showed similarities with those of *B. longum* strains (data not reported). NBS3 (Nancy *Bifidobacterium* Strain) was identified in the same manner as *B. longum* (data not reported). Strains CE2, CE7, CE8 and CE11 were identified in the same way as *B. adolescentis* (Mangin *et al.*, 1994). CE5 was characterized by rRNA restriction patterns but failed to be identified to a known *Bifidobacterium* species. Cells were grown at 37°C in Trypticase-phytone-yeast extract medium (Scardovi *et al.*, 1971) under anaerobic conditions (90% N₂, 10% H₂).

DNA Preparation. Extraction and purification of chromosomal DNA were carried out as described by Demuyter *et al.* (1988). DNA was then digested with restriction enzymes *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pvu*II or *Xho*I according to the supplier

(Boehringer Mannheim, FRG), and electrophoresed through a 0.7% agarose gel using Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.002 M EDTA). Cloned DNA fragments were isolated and purified in an agarose gel using the "GeneClean" procedure (Bio 101, La Jolla, CA).

Construction of genomic libraries from *B. longum* ATCC15707, *B. bifidum* CIP64.65 and *B. animalis* ATCC25527. Total chromosomal DNA was isolated and completely digested with restriction endonuclease *Bam*HI. Fragments obtained were size-fractionated in a sucrose gradient (40% to 10%). DNA fragments in a size range 1 to 2.5 kb were then cloned into the single *Bam*HI site of plasmid "pBluescript KS+" (Stratagene, La Jolla, CA). The ligation mixture was used to transform *E. coli* SURE™ (Stratagene) by electroporation according to Dower *et al.* (1988). Cells were then spread onto LB solid medium supplemented with IPTG (38 µg/ml), X-Gal (32 µg/ml), ampicillin (50 µg/ml) and tetracyclin (12.5 µg/ml). The plasmidic DNA content of the white colonies was extracted by a miniprep procedure (Sambrook *et al.*, 1989) and restriction analysed.

Construction of a genomic library from *B. adolescentis* CIP64.59T. Since it was impossible to cleave the DNA of *B. adolescentis* CIP64.59T with *Bam*HI, it was digested with *Hind*III and cloned into the same site of plasmid Bluescript KS+.

Dot-blot preparation. DNA (1 µg/ sample) was denatured in 0.4 N NaOH at 100°C for 10 min, neutralized at 0°C with an equal volume of 2 M ammonium acetate (pH 7) and then loaded on a Bio-Dot apparatus (BioRad) containing a

nylon membrane (Hybond-N, Amersham International, Amersham, UK). Before reprobing, membranes were incubated at 75 °C for 1 hour in a solution of 60% formamide, 50 mM Tris-HCl pH 8 and 1% SDS.

Southern analysis. Southern blots were carried out using the vacuum transfer method with the Vacugene system (Pharmacia, LKB) and Hybond-N membranes (Amersham), according to the manufacturer recommendations. The DNA probes were either [α - 32 P]dCTP-labeled using the Megaprime DNA labeling system kit (Amersham) or DIG-labeled using the DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer). Prehybridization, hybridization and high stringency washing conditions (65°C for radiolabeled probes or 68°C for DIG-labeled probes) were performed as previously described (Sambrook *et al.*, 1989). After autoradiography, the tested probe was removed and the blot was reprobbed with another DIG-labeled DNA fragment.

DNA sequencing. The dideoxy-chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) was performed with the "Sequenase 2.0" sequencing kit (USB, Cleveland, Ohio) and α - 35 S-dATP (Amersham). For each set of four reactions, 6 pmol of alkali-denaturated plasmid were annealed to 2 pmol of primer T3 or T7 (Stratagene). The absence of any unique interesting site for subcloning, except for *Sal*I, led to four additional primers being selected. The labeling and chain-termination steps were carried out in the presence of either dGTP or dTTP. The hyperfilm-MP were left exposed for 2 or 3 days.

RESULTS

Species-specificity of the L6/45 DNA probe cloned from *B. longum* ATCC15707.

Out of the 55 recombinant clones, 17 DNA fragments were selected according to their size (1 to 2.5 kb). The L6/45 fragment (1.75 kb) from *B. longum* ATCC15707 only hybridized with DNA from *B. longum* strains (Fig.1). Hybridization of the probe L6/45 with *Bam*HI restriction digests of different *B. longum* strains was then performed under high stringency conditions in order to study restriction polymorphism (Fig. 2A). This probe not only hybridized with the predicted *Bam*HI fragment of 1.75 kb from *B. longum* ATCC15707 but also with another fragment of 1.85 kb. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was observed that clearly differentiated some of the *B. longum* strains, but not all. For example, *B. longum* strains ATCC15707, *B. longum* ATCC15708, NBS3, CE1 and CE9 had characteristic RFLP patterns with the specific probe whereas strains CE6 and CE10, CE3 and CE4 gave an identical banding pattern. However, the latter four strains displayed distinct fingerprints and ribosomal patterns (Mangin *et al.*, 1994). In order to distinguish strains with similar *Bam*HI hybridization patterns, hybridization of L6/45 with their *Xho*I restriction digests were carried out, since there is only one *Xho*I site in the L6/45 probe (Fig. 2B). Nevertheless, the strains which could not be differentiated with *Bam*HI hybridization patterns could neither be differentiated with *Xho*I hybridization patterns. These results suggest that some of the restriction sites around the L6/45 fragment are not conserved in all of the strains of *B. longum*. Despite only being able to accurately identify five

strains, our results demonstrate that this probe can be used to fingerprint strains of *B. longum*. Moreover this probe positively confirmed the identification of six strains of *B. longum* which originated from the intestinal flora of five human volunteers (Mangin *et al.*, 1994). Weak hybridizing signals were also observed on the autoradiographies, these were reproducibly obtained even after digestion with an excess of restriction endonucleases. These weak signals could be due either to the presence of sequences having a slight similarity to the *L6/45* probe or to a short sequence of the insert being repeated in the genome. The nucleotide sequence of this 1,755 bp *Bam*HI cloned fragment was determined. A part of an ORF of at least 1077 nucleotides was observed. Its G+C composition was 67.9 % (68.8; 56.5 and 78.3 % G+C for the first, second and third positions of the codons respectively) which is higher than the average G+C content of *B. longum* : 58% (Scardovi, 1986). Since a Shine-Dalgarno sequence could not be found, the location of the translation initiation site is unclear. The deduced amino acid sequence was then compared with sequences of the NCBI data bank (blast network). The translated protein sequence contains two regions which are homologous with the two conserved domains of lambda integrase family of site-specific recombinases (Fig. 3) (Argos *et al.*, 1986; Sadowsky, 1986). The second domain of *L6/45* ORF has only two of the three amino acids totally conserved: arginine and tyrosine, but not histidine. Histidine was replaced by arginine, which is another basic amino acid. This sequence has a 31% amino acid identity to the *E. coli* integrase XerC in an alignment covering about 105 amino acids. XerC mediates site-specific recombination at the *cer* site of plasmid ColE1, maintaining

it in a monomeric state and thus allowing stable inheritance (Colloms *et al.*, 1990). The L6/45 ORF sequence also displays similarities with the recombinases FimB and FimE, two regulatory proteins which control the phase variation of type 1 fimbriae in *E. coli*. These proteins mediate the periodic inversion of a 300 bp DNA segment that harbors the promoter for the fimbrial structural gene *fimA* (Dorman and Higgins, 1987). The L6/45 ORF sequence also displays similarities with plasmid pLMO20 integrase E2 which allowed trimethoprim resistance gene *dhfrV* to be inserted by a recombinational event into a structure containing the sulfonamide resistance gene *sulI* (Sundström *et al.*, 1988). Similarity was also found with TnpA, one of the three proteins encoded by transposon Tn554, which is required for its transposition (Murphy *et al.*, 1985).

Species-specificity of the A6/17 DNA probe cloned from *B. adolescentis* CIP64.59T.

The first fragment tested (A6/2, 2.45 kb) was strain-specific since hybridization only occurred with the DNA of *B. adolescentis* CIP64.59T. A6/17 insert (1.85 kb) was the second fragment of *B. adolescentis* HindIII library tested for specificity. It was directly probed onto restriction patterns of the *Bifidobacterium* strains. This probe revealed strong signals with only the *B. adolescentis* strains including both the CIP strains and the four strains of human origin identified as *B. adolescentis* strains on the basis of ribosomal patterns (Mangin *et al.* 1994). However, the A6/17 probe did not show specificity with *B. adolescentis* ATCC11146 which is thought to belong to another genus (Chevalier *et al.*, 1990). On the HindIII restriction patterns, the A6/17 probe hybridized with

the predicted fragment of 1.85 kb from *B. adolescentis* CIP64.59T. Furthermore, this probe hybridized with a fragment of the same size on the other *B. adolescentis* patterns (Fig. 4A). Weak hybridizing signals were also observed in lane 4 and 5 but these resulted from partial digestion. In search of polymorphism, hybridization was carried out on *EcoRV* and *Bam*HI patterns (Fig. 4B, 4C). All strains of *B. adolescentis* had an identical pattern with *EcoRV* apart from strain CE7 (which displayed a pattern characteristic of this strain). In addition, *B. adolescentis* CIP64.60 was the only strain which could be differentiated from the other strains by *Bam*HI patterns. Contrary to L6/45 probe of *B. longum*, the restriction sites around A6/17 seem to be relatively conserved among all *B. adolescentis* strains tested. This probe also confirmed that the four tested strains of human origin could be assigned to the species *B. adolescentis*.

Species-specificity of the bA7/2 DNA probe cloned from *B. bifidum* CIP64.65.

Autoradiograph showed that the bA7/2 (1.6 kb) insert of DNA hybridized specifically with *B. bifidum* chromosomal DNA (Fig. 5A). The probe was then hybridized onto *Bam*HI restriction patterns of *B. bifidum* strains (Fig. 5B). As expected, this probe revealed a signal at 1.6 kb on the *B. bifidum* CIP64.65 *Bam*HI pattern. In contrast, hybridization occurred with different fragments in the two other *B. bifidum* strains (Fig. 5B). The autoradiograph showed a stronger signal for *B. bifidum* CIP56.7T DNA compared to the other two strains but this was due to a larger amount of DNA in this lane. The bA7/2 cloned fragment proved to

be useful in revealing RFLP among strains of the *B. bifidum* species, which allowed accurate strain characterization.

Species-specificity of the *an1* DNA probe cloned from *B. animalis* ATCC25527.

Hybridization with probe *an1* (1.8 kb) occurred only with *B. animalis* ATCC25527 and ATCC27536 DNAs (Fig. 6A). Since Southern blot hybridizations yield more specific information, the *an1* probe was hybridized with membranes containing *Bam*HI digests of DNA from these two strains. A fragment of 1.8 kb was revealed on their *Bam*HI restriction patterns (Fig. 6B, lanes 1 and 2) but hybridization occurred with two different fragments on their *Pvu*II restriction patterns (Fig. 6B, lanes 3 and 4). Thus, this probe which revealed RFLP is able to distinguish between two different strains of *B. animalis*.

DISCUSSION

We have isolated DNA fragments which appear to be useful probes for detecting strains of *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* and *B. animalis*. Moreover, hybridization results highlight the genetic polymorphism which exists among *Bifidobacterium* strains of the same species. These specific probes can in most cases characterize particular strains unambiguously. Hybridization pattern differences could result either from point mutations altering restriction sites or from chromosomal rearrangements. In fact, one rearrangement could change the length of more restriction fragments than one point mutation. RFLP is therefore more likely to have resulted from genomic plasticity than from nucleotide

sequence variability. An interesting feature of the *B. longum* probe L6/45 is that it hybridized with two chromosomal fragments in some of the *B. longum* strains. Moreover, hybridization results with *Xho*I restriction digests demonstrated that at least three copies of this fragment are present in *B. longum* ATCC15707 and in some other *B. longum* strains. Indeed, there are double number hybridizing bands on the *Xho*I hybridization patterns compared to *Bam*HI. However in the L6/45 fragment there is just one *Xho*I site which is located at 70 bp from one extremity. The 70 bp homology cannot be detected with high stringency conditions since it is too small. The amino acid sequence of the L6/45 fragment has substantial sequence similarity to the lambda integrase family of site-specific recombinases, especially at the two most conserved domains. The second domain notably contains the absolutely conserved tyrosine residue which is known to link with the recombination site DNA in lambda integrase (Pargellis *et al.*, 1988). The other part of the second domain contains only one of the two other absolutely conserved residues (arginine) which might also be involved in the recombinase active site (Argos *et al.*, 1986). Although the conserved histidine residue has been replaced by an arginine residue, the residue change is conserved. Given this similarity to the lambda integrase family, it seems likely that this protein catalyses one site-specific recombination. In the region between the two conserved domains, the L6/45 sequence is most similar to the sequence of the *E. coli* chromosomally encoded XerC protein (Colloms *et al.*, 1990) which resolves plasmid ColE1 dimers into monomers. As the L6/45 fragment is repeated in some strains, it could be involved in a larger genetic region, potentially of

extrachromosomal origin. Indeed, co-integrate resolution of transposon Tn4430 is mediated by a site-specific recombinase of the integrase family (Mahillon and Lereclus, 1988). Furthermore, Tn554 TnpA and TnpB proteins also share similarities with the conserved region of lambda integrase (Murphy *et al.*, 1985) like Tn1545 and Tn916 which can be inserted at multiple sites (Wooley *et al.*, 1989). Cloning and sequencing of fragments overlapping L6/45 should be carried out in order to answer some of these questions.

RESUME

Obtention de sondes nucléiques spécifiques détectant le polymorphisme de restriction de souches appartenant à quatre espèces de *Bifidobacterium*

Des fragments de 1 à 2,5 kb clonés à partir de l'ADN des souches *B. longum* ATCC15707, *B. adolescentis* CIP64.59T, *B. bifidum* CIP64.65 et *B. animalis* ATCC25527 ont été hybridés avec l'ADN de 41 souches de *Bifidobacterium* en vue d'obtenir une sonde spécifique à chacune des quatre espèces. Un fragment spécifique n'hybridant qu'avec l'ADN des souches de la même espèce a en effet été isolé. Ces fragments ont ensuite été hybridés sur l'ADN des profils de restriction des souches appartenant à la même espèce afin d'étudier le polymorphisme de restriction. Chez certaines souches identifiées à l'espèce *B. longum* et chez *B. longum* ATCC15707T, le fragment spécifique L6/45 a hybridé avec 2 fragments différents. Son séquençage a permis de mettre en évidence une partie de phase de lecture ouverte dont la séquence protéique déduite montre des homologies significatives avec les recombinases site-spécifiques de

la famille des intégrases de lambda. De plus, les résultats d'hybridation avec *Xho*I montrent qu'il existe au moins 3 copies de ce fragment chez *B. longum* ATCC15707T. Le fragment spécifique de l'espèce *B. adolescentis* hybride sur le même fragment de restriction pour les 8 souches classées dans cette espèce. Par contre, celui de l'espèce *B. bifidum* permet de différencier chacune des souches de cette espèce. Le fragment spécifique de l'espèce *B. animalis* permet de différencier les deux souches de cette espèce mais sur un autre profil de restriction. Ces résultats d'hybridation soulignent le grand polymorphisme génétique rencontré chez les souches du genre *Bifidobacterium*.

Mots-clés : *Bifidobacterium*, sondes nucléiques espèces-spécifiques, Polymorphisme de la taille des fragments de restriction, recombinaison site-spécifique.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Lois Silk for her help in revising the manuscript.

REFERENCES

1. Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., Kahn, M. L., Kalionis, B., Narayana, S. V. L., Pierson III, L. S., Sternberg, N. & Leong J. M. (1986), The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* 5, 433-440.
2. Baloga, A. O. & Harlander, S. K. (1991), Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological survey. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2324-2331.

3. Chevalier, P., Roy, D. & Ward P. (1990), Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 619-624.
4. Clark-Curtiss, J. E. & Docherty, M. A. (1989), A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Infect. Dis.* **159**, 7-15.
5. Colloms, S. D., Sykora, P., Szatmari, G. & Sherratt, D. J. (1990), Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichi coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J. Bact.* **172**, 6973-6980.
5. Colmin, C., Pébay, M., Simonet, J.-M. & Decaris, B. (1991), A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 123-128.
7. Darbas, H., Roussenq-Jean, A., Jean-Pierre, H., Boyer, G. & Rivière, M. (1989), Infection urinaire à *Bifidobacterium adolescentis*. *Méd. Mal. Infect.* **19**, 778-780.
8. Darbas, H., Jean-Pierre, H., Rivière, M. & Boyer, G. (1991), Septicémie à *Bifidobacterium longum*. *Méd. Mal. Infect.* **21**, 707-709.
9. De Buyser, M.-L., Morvan, A., Aubert, S., Dilasser, F. & El Solh, N. (1992), Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 889-899.

10. Demuyter, P., Leblond, P., Decaris, B. & Simonet, J.-M. (1988), Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2001-2007.
11. Dorman, C. J. & Higgins, C. F. (1987), Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J. Bact.* **169**, 3840-3843.
12. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988), High efficiency of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
13. Eisenach, K. D., Crawford, J. T. & Bates, J. H. (1988), Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2240-2245.
14. Grimont, F., Lefèvre, M., Ageron, E. & Grimont, P. A. D. (1989), rRNA gene restriction patterns of *Legionella* species: a molecular identification system. *Res. Microbiol.* **140**, 615-626.
15. Korolik, V., Coloe, P. J. & Krishnapillai, V. (1988), A specific DNA probe for the identification of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 521-529.
16. Lauer, E. & Kandler, O. (1983), DNA-DNA homology, murein types, and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 42-64.
17. Mahillon, J. & Lereclus, D. (1988), Structural and functional analysis of Tn4430: identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate resolution process. *EMBO J.* **7**, 1515-1526.

18. Mangin, I., Bourget, N., Bouhnik, Y., Bisetti, N., Simonet, J.-M. & Decaris, B. (1994), Identification of *Bifidobacterium* strains by ribosomal RNA restriction patterns. *App. Environ. Microbiol.* In Press.
19. Mitsuoka, T. (1984), Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobact. Microflora*. **3**, 11-28.
20. Murphy, E., Huwyler, L. & do Carmo de Freire Bastos, M. (1985), Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J.* **4**, 3357-3365.
21. Pargellis, C. A., Nunes-Duby, S. E., Moitoso de Vargas, L. & Landy A. (1988), Suicide recombination substrates yield covalent lambda Int-DNA complexes and lead to the identification of the active site tyrosine. *J. Biol. Chem.* **263**, 7678-7685.
22. Reuter, G. (1971), Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 273-275.
23. Roy, D. & Ward, P. (1990), Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 739-749.
24. Sadowski P. (1986), Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J. Bact.* **165**, 341-347.
25. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning : a laboratory manual, p. 1.25-1.26, p. 9.31-9.57. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
26. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

27. **Scardovi, V.** (1986), Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore.
28. **Scardovi, V., Trovatelli, L. D., Zani, G., Crociani, F. & Matteuzzi, D.** (1971), Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 276-294.
29. **Scardovi, V. & Crociani, F.** (1974), *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 6-20.
30. **Sundström, L., Radström, P., Swedberg, G. & Sköld, O.** (1988), Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *Sull* and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 191-201.
31. **Wickes, B. L., Hicks, J. B., Merz, W. G. & Kwong-Chung, K. J.** (1992), The molecular analysis of synonymy among medically important yeasts within the genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 901-907.
32. **Woolley, R. C., Pennock, A., Ashton, R.J., Davies A. & Young, M.** (1989),. Transfer of Tn1545 and Tn916 to *Clostridium acetobutylicum*. *Plasmid.* **22**, 169-174.
33. **Yamamoto, T., Morotomi, M. & Tanaka, R.** (1992), Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *App. Environ. Microbiol.* **58**, 4076-4079.

Table 1: *Bifidobacterium* strains used in this study

No	Species	Strain no.	No	Species	Strain no.
1.	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC15707 ^T	16.	" "	CIP64.60
2.	" "	ATCC15708	17.	" "	CIP64.61
3.	" "	NBS3	23.	" "	CE2
22.	" "	CE1	28.	" "	CE7
24.	" "	CE3	29.	" "	CE8
25.	" "	CE4	32.	" "	CE11
27.	" "	CE6	33.	" "	ATCC11146
30.	" "	CE9	18.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC27536
31.	" "	CE10	19.	" "	ATCC25527 ^T
4.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CIP56.7 ^T	20.	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC25525 ^T
5.	" "	CIP64.64	21.	<i>Bifidobacterium suis</i>	CIP103377 ^T
6.	" "	CIP64.65	34.	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535 ^T
7.	<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC15697 ^T	35.	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC25910 ^T
8.	" "	ATCCC25962	36.	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC27539 ^T
9.	" "	CIP63.78	37.	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC25911 ^T
10.	<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC15698	38.	<i>Bifidobacterium globosum</i>	ATCC25865 ^T
11.	" "	CIP64.68	39.	<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC25912 ^T
12.	" "	CIP64.69 ^T	40.	<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC27540 ^T
13.	" "	CIP64.70	41.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	ATCC25526 ^T
14.	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CIP64.58	26.	<i>B. species</i> (unidentified)	CE5
15.	" "	CIP64.59 ^T			

T: type strain (Reuter, 1971)

Fig. 1 : Dot-blot hybridization between native DNA of *Bifidobacterium* strains and species-specific DIG-labeled L6/45 probe.

Numbers correspond to strains listed in Table 1. Positive results were obtained only with *B. longum* DNA. The exposure time was 3h at room temperature.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41							

Fig. 2 : Autoradiogram of *Bam*HI-digested DNA (A) or *Xho*I- digested DNA (B) from *Bifidobacterium longum* strains probed with [α - 32 P]dCTP- labeled fragment L6/45.

Lane λ , hybridization of [α - 32 P]dCTP- labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; lane 1, *B. longum* ATCC15707; lane 2, *B. longum* ATCC15708; lane 3, NBS3; lane 4, CE1; lane 5, CE3; lane 6, CE4; lane 7, CE6; lane 8, CE9 and lane 9, CE10. The exposure time was 20h at room temperature.

Fig. 3 : Alignment of the L6/45 ORF sequence to sequences of other site-specific recombinases of the lambda integrase family. Only the two most conserved regions (domain 1 and 2) are shown although L6/45, *XerC*, *FimB*, *FimE* and other recombinases can be aligned in the region between domains 1 and 2. Gray regions show conserved residues. Gaps (dashes) have been introduced to maximize the homology. *XerC* and *F:D-Prot* (Colloms *et al.*, 1990); *E2-pLMO20* (Sundström *et al.*, 1988); *FimB* and *FimE* (Dorman and Higgins, 1987); *Tn554-TnPI* (Mahillon and Lereclus, 1988); *Tn554-TnpA* and *TnpB* (Murphy *et al.*, 1985); *P1-Cre*, *P22-Int*, *lambda-Int* and *Flp* (Argos *et al.*, 1986).

Fig. 4 : Autoradiogram of *Hind*III (A), *Eco*RV (B), and *Bam*HI (C) digested DNA from *Bifidobacterium adolescentis* strains probed with [α - 32 P]dCTP- labeled fragment A6/17.

Lane λ , hybridization of [α - 32 P]dCTP- labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; lanes 1 and 9, *B. adolescentis* CIP64.58; lanes 2, *B. adolescentis* CIP64.59T; lanes 3 and 10, *B. adolescentis* CIP64.60; lane 4, *B. adolescentis* CIP64.61; lanes 5 and 11, CE2; lanes 6 and 12, CE7; lane 7, CE8 and lane 8, CE11. The exposure time was 24h at -70°C with two intensifying screens.

FIG. 5 : A. Dot-blot hybridization between native DNA of *Bifidobacterium* strains and species-specific DIG labeled *ba7/2* probe. Order of strains is the same as in Fig. 1. Positive results were obtained only with *B. bifidum* DNA. The exposure time was 3h at room temperature.

B. Autoradiogram of *Bam*HI-digested DNA from *Bifidobacterium bifidum* strains probed with [α - 32 P]dCTP- labeled fragment *ba7/2*.

Lane λ , hybridization of [α - 32 P]dCTP- labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; lane 1, *B. bifidum* CIP56.7T; lane 2, *B. bifidum* CIP64.64 and lane 3, *B. bifidum* CIP64.65. The exposure time was 24h at -70°C with two intensifying screens.

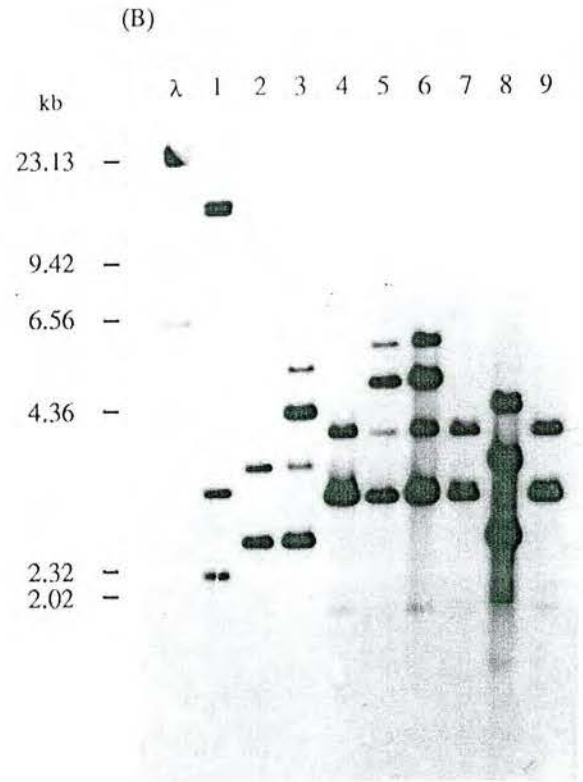
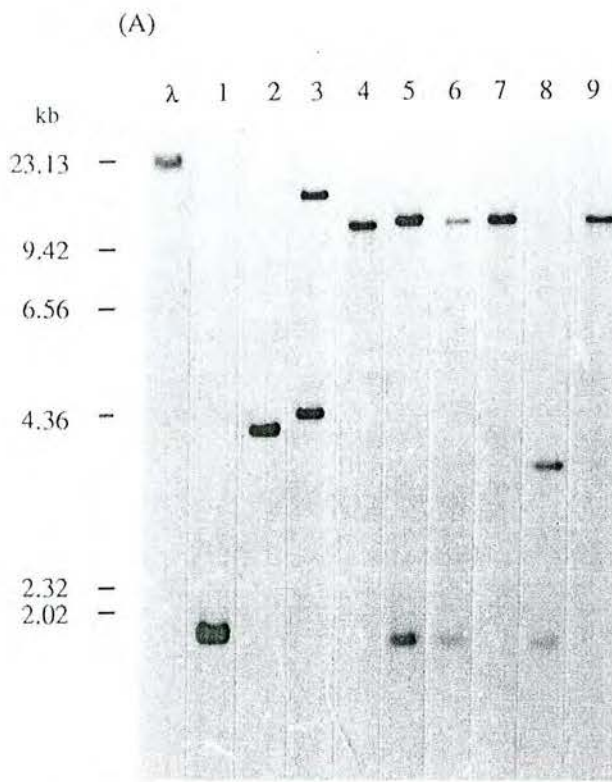
Fig. 6.

A. Dot-blot hybridization between native DNA of *Bifidobacterium* strains and species-specific DIG-labeled *an1* probe.

Order of strains is the same as in Fig. 1. Positives results were obtained only with *B. animalis* DNA. The exposure time was 3h at room temperature.

B. Autoradiogram of *Bam*HI- or *Pvu*II- digested DNA from *Bifidobacterium animalis* strains probed with DIG-labeled fragment *an1*.

Lane λ , hybridization of DIG-labeled λ DNA with *Hind*III-digested λ DNA; lane 1, *B. animalis* ATCC25527, *Bam*HI; lane 2, *B. animalis* ATCC27536, *Bam*HI; lane 3, *B. animalis* ATCC25527, *Pvu*II; lane 4, *B. animalis* ATCC27536, *Pvu*II. The exposure time was 15h at room temperature.



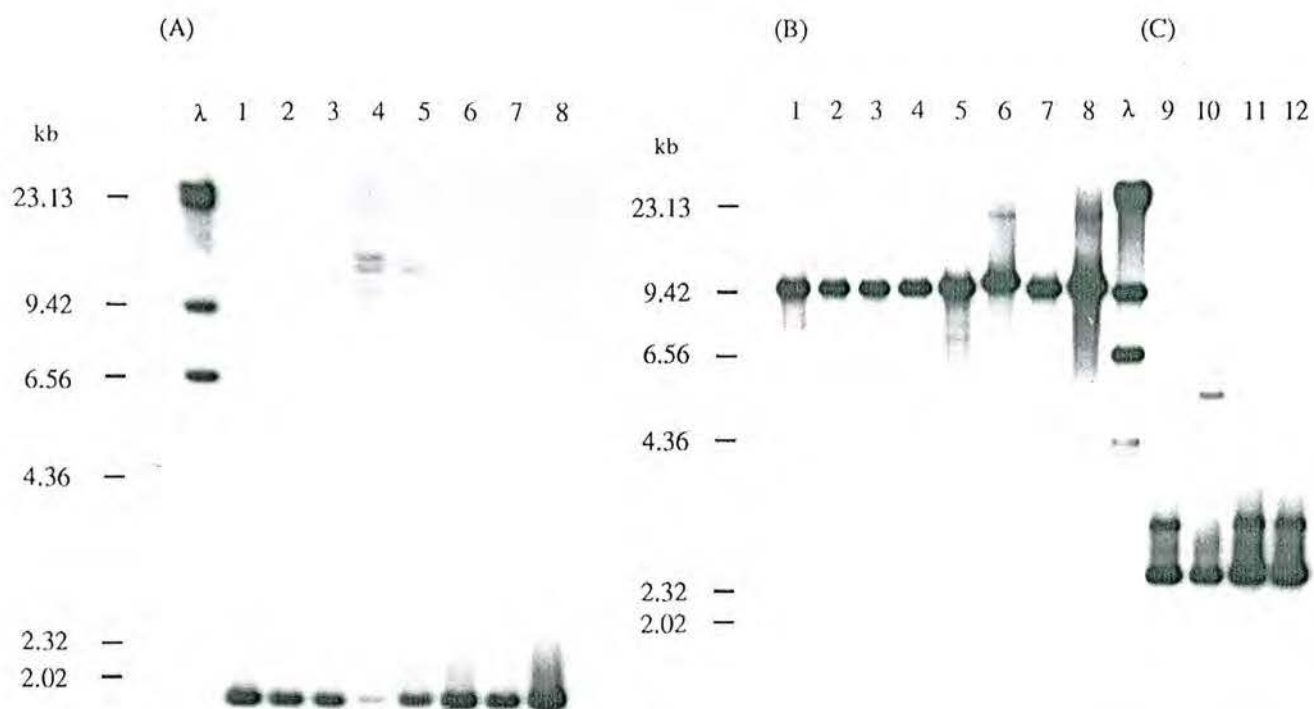
Domain 1

<i>L6/45</i>	AATTLLSETC	GLRACDVIGL	RTADVWD
<i>XerC</i>	RAMLEV MYGA	GLRLSELVGL	DIKHEDLE
<i>FimB</i>	YCLTLLECFIH	GFRASEICRL	RISDIDLK
<i>FimE</i>	YCLILLAYRH	GMPISELIDL	HYQDIDLN
<i>E2-pLMO20</i>	RLFAQLLYGT	GMPISEGLQL	RVKDIDFD
<i>Tn4430-TnpI</i>	YAIATLLAYT	GVRISEALSI	KMNDFNLQ
<i>Tn554-TnpA</i>	KLILMLMYEG	GLRIGEVLSL	RLEDIVTW
<i>Tn554-TnpB</i>	ATMTMIVQEC	GMPISELCTL	KKGCILED
<i>Tn1545-int</i>	YDEILILIKT	GLPISFEGGL	TLPDIDFE
<i>F:D-Prot</i>	KMLLATLWNT	GARINEALAL	TRGDFSIA
<i>P1-Cre</i>	TAGVEKALSL	GVTKLVERWI	SVSGVADD
<i>P22-Int</i>	KSVVEFALST	GLRRSNIINL	EWQQIDMQ
<i>Lambda-Int</i>	RLAMELAVVT	GQVVDLCM	KWSDIVDG

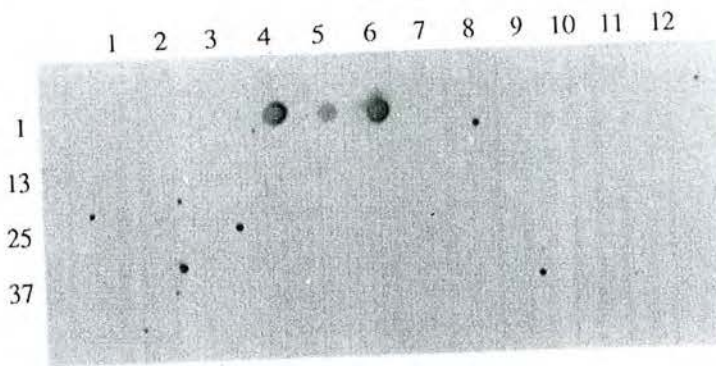
Domain 2

<i>L6/45</i>	RLRRNAATR	MLEAA-TPLP	TISAVLGHAD	-PDST-RVYM	A
<i>XerC</i>	HKLRHSEATH	MLESS-GDLR	GVQELLGHAN	-LSTT-QIYT	H
<i>FimB</i>	HMLRHSCGFA	LANMG-IDTR	LIQDYLGHAN	-IRHT-VWYT	A
<i>FimE</i>	HMLRHACGYE	LAERG-ADTR	LIQDYLGHAN	-IRHT-VRYT	A
<i>E2-PLMO20</i>	HTLRHSFATA	LLRSG-YDIE	TVQDLLGHSD	-VSTT-MIYT	H
<i>Tn4430-TnpI</i>	HOLRHFFCTN	AIEKG-FSIH	EVANQAGHSN	-IHTT-LLYT	N
<i>Tn554-TnpA</i>	HMLPHTHATO	LIREG-WDVA	FVQKRLGHAH	VQTTL-NTYV	H
<i>Tn554-TnpB</i>	HAFRHTVGTR	MINNG-MPQH	IVQKFLGHES	-PEMT-SRYA	H
<i>Tn1545-Int</i>	HSLRHTECTN	YANAG-MNPK	ALOYIMGHAN	-IATLNYIA	H
<i>F:D-Prot</i>	HTFRHSYAMH	MLYAG-IPLK	VLOSIMGHKS	-ISST-EVYT	K
<i>P1-Cre</i>	HSAPVGAARD	MARAG-VSIP	EIMQAGGWTN	-VNIV-MNYI	R
<i>P22-Int</i>	HDLRHTWASW	LVOAG-VPIS	VLOEMGGWES	-LEMV-RRYA	H
<i>Lambda-Int</i>	HELASLSA-R	LYEKO-ISDK	FAQHLLGHKS	-DTMA-SQY-	R
<i>Flp</i>	HIGRHLMTSF	LSMKGLTELT	NVVGNWSDKR	ASAVARTTYT	H

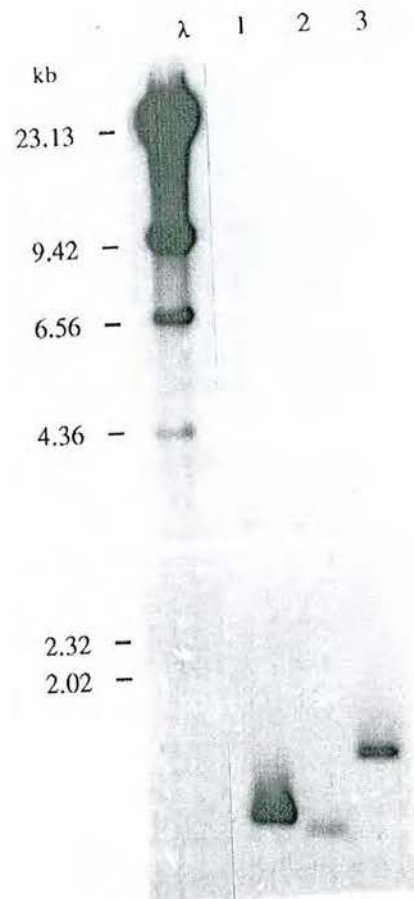
Fig. 3



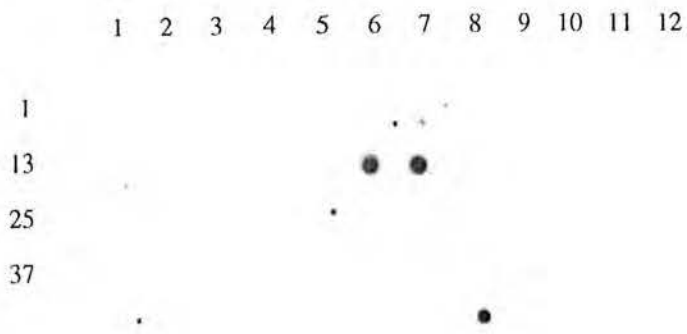
(A)



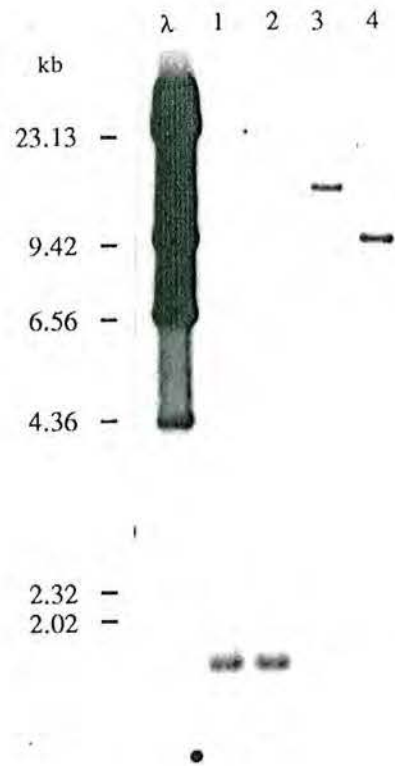
(B)



(A)



(B)



4. DISCUSSION

4. DISCUSSION

L'identification des espèces ou des souches bactériennes repose sur la mise en évidence du polymorphisme génétique intragénérique et intraspécifique. Le but de ce travail a donc été de rechercher diverses méthodes de révélation du polymorphisme génétique, applicables au genre *Bifidobacterium*. Trois méthodes ont été utilisées successivement. Compte-tenu de la taille relativement réduite du génome des souches du genre *Bifidobacterium*, la première méthode a consisté à visualiser directement le polymorphisme de restriction par l'obtention des profils de restriction de chaque souche après électrophorèse classique. La deuxième méthode, communément appelée ribotypage, a consisté à hybrider sur ces profils de restriction une sonde spécifique codant les ARN ribosomiques. La troisième méthode utilisée, se caractérise par une spécificité encore plus grande. Son objectif visait à rechercher des sondes spécifiques du genre, d'une espèce ou d'une souche. Ces trois méthodes ont été utilisées sur des souches de collection et sur des souches industrielles. Leur validité a été testée dans le cadre d'une expérience clinique sur la flore intestinale humaine.

D'autres méthodes auraient également pu être utilisées. Citons par exemple, la mise en évidence de profils de restriction de grands fragments d'ADN séparés par la méthode d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE), ou le séquençage de zones caractéristiques d'un genre, d'une espèce ou d'une souche. Ces deux dernières méthodes n'ont pas été utilisées dans le cadre de cette thèse.

4.1. CARACTERISATION DES SOUCHES PAR TYPAGE MOLECULAIRE

Le polymorphisme de restriction au sein du genre *Bifidobacterium* a été mis en évidence par l'analyse de restriction de l'ADN total de nombreuses souches composant ce genre, en utilisant les enzymes *Bam*HI (G/GATCC), *Eco*RV (GAT/ATC), *Hind*III (A/AGCTT) et *Pvu*II (CAG/CTG). Chaque souche a ainsi été caractérisée par son profil de restriction. Le polymorphisme de restriction est en effet aussi bien interspécifique qu'intraspécifique. Parmi les méthodes utilisées, c'est celle qui révèle le plus d'informations sur la variabilité du génome d'une souche. Cependant, cette grande quantité d'informations rend difficile la réalisation de comparaisons entre un grand nombre de profils. L'automatisation de la lecture d'un profil pourrait être envisagée comme celle d'un "code barre" permettant ensuite une comparaison rapide par rapport à une banque de données.

Un polymorphisme de restriction a également été mis en évidence avec la sonde I41, qui contient une partie d'un gène codant l'ARN ribosomique 23S. Les profils ribosomiques ont en effet permis de caractériser toutes les souches de *Bifidobacterium* et de procéder, comme avec les profils de restriction, mais de façon plus évidente, à des regroupements en espèces. En effet, l'hybridation de la sonde ribosomique sur les profils de restriction de souches appartenant à la même espèce a montré que celles-ci possédaient des bandes ribosomiques communes,

traduisant leur proximité phylogénétique. Certaines espèces bactériennes sont même si homogènes génétiquement que les souches d'une même espèce peuvent donner un seul profil de restriction des gènes ARNr : c'est l'exemple des *Brucella*, dont les souches ne peuvent pas être séparées par les profils ribosomiques (Verger *et al.*, 1987). Dans le cas des *Bifidobacterium*, certaines souches d'une même espèce possédaient également un profil ribosomique identique, alors que leur profil de restriction était visiblement différent. La caractérisation précise de chaque souche par son profil ribosomique a néanmoins été réalisée en hybridant la sonde sur un deuxième, voire un troisième profil de restriction. Néanmoins, cette observation n'est pas valable pour les trois souches de l'espèce *B. infantis*, ni pour celles de l'espèce *B. animalis*. Quel que soit le ribotype choisi, ces souches ne possèdent en effet aucune bande ribosomique commune. Une sonde spécifique a cependant été sélectionnée pour les deux souches de l'espèce *B. animalis*, alors que ce n'est pas le cas pour les souches de l'espèce *B. infantis*, remettant donc en cause leur appartenance à une même espèce. Nous avons également montré que ce polymorphisme génomique était dû non seulement au RFLP mais aussi à la variabilité du nombre d'opérons ribosomiques au sein des espèces. On dénombre en effet au moins 5 loci *rrn* de l'opéron ribosomique chez la souche type de l'espèce *B. catenulatum*, 4 chez les souches des espèces *B. longum*, *B. adolescentis* et *B. animalis*, 4 également pour les souches type des espèces *B. pseudolongum*, *B. suis*, *B. thermophilum*, *B. angulatum*, *B. globosum* et *B. magnum*, 4 aussi pour une souche de l'espèce *B. infantis* (ATCC15697^T), 3 pour les souches de l'espèce *B. breve*, les autres souches de l'espèce *B. infantis*, 2 ou 3 pour les souches de l'espèce *B. bifidum* et 2 pour les souches type des espèces *B. asteroides* et *B. coryneforme*. Certains groupes n'étant constitués que par la souche type de l'espèce, une augmentation de l'échantillonnage permettrait de vérifier ces chiffres ainsi que l'hypothèse de l'existence de bandes ribosomiques communes à l'intérieur d'une même espèce. Ces résultats montrent que le ribotypage constitue également une méthode adaptée à la caractérisation des souches du genre *Bifidobacterium*. Du fait de l'utilisation industrielle de cet organisme, une telle identification des souches est intéressante, aussi bien au niveau du contrôle de qualité, que de leur propriété industrielle.

Une identification particulière des espèces a été également initiée dans ce travail. Elle est basée sur l'hybridation d'une sonde espèce-spécifique détectant le polymorphisme de restriction. Les trois méthodes ci-dessus nous ont permis de caractériser les souches de *Bifidobacterium* du laboratoire. Elles ont également permis de déceler une incompatibilité entre le classement des deux souches *B. infantis* ATCC15697^T et *B. indicum* 25912^T qui se révèlent avoir un génotype extrêmement proche. Le classement de ces deux souches dans des espèces différentes reposait sur le faible pourcentage d'identité ADN-ADN (18%, Lauer et Kandler, 1983). Plutôt que de révéler une erreur de classification, nos résultats suggèrent fortement une erreur de la collection ATCC. L'absence de ressemblances des profils ribosomiques, la non hybridation de la sonde A6/17, spécifique de l'espèce *B. adolescentis*, confirment la non

traduisant leur proximité phylogénétique. Certaines espèces bactériennes sont même si homogènes génétiquement que les souches d'une même espèce peuvent donner un seul profil de restriction des gènes ARNr : c'est l'exemple des *Brucella*, dont les souches ne peuvent pas être séparées par les profils ribosomiques (Verger *et al.*, 1987). Dans le cas des *Bifidobacterium*, certaines souches d'une même espèce possédaient également un profil ribosomique identique, alors que leur profil de restriction était visiblement différent. La caractérisation précise de chaque souche par son profil ribosomique a néanmoins été réalisée en hybridant la sonde sur un deuxième, voire un troisième profil de restriction. Néanmoins, cette observation n'est pas valable pour les trois souches de l'espèce *B. infantis*, ni pour celles de l'espèce *B. animalis*. Quel que soit le ribotype choisi, ces souches ne possèdent en effet aucune bande ribosomique commune. Une sonde spécifique a cependant été sélectionnée pour les deux souches de l'espèce *B. animalis*, alors que ce n'est pas le cas pour les souches de l'espèce *B. infantis*, remettant donc en cause leur appartenance à une même espèce. Nous avons également montré que ce polymorphisme génomique était dû non seulement au RFLP mais aussi à la variabilité du nombre d'opérons ribosomiques au sein des espèces. On dénombre en effet au moins 5 loci *rrn* de l'opéron ribosomique chez la souche type de l'espèce *B. catenulatum*, 4 chez les souches des espèces *B. longum*, *B. adolescentis* et *B. animalis*, 4 également pour les souches type des espèces *B. pseudolongum*, *B. suis*, *B. thermophilum*, *B. angulatum*, *B. globosum* et *B. magnum*, 4 aussi pour une souche de l'espèce *B. infantis* (ATCC15697^T), 3 pour les souches de l'espèce *B. breve*, les autres souches de l'espèce *B. infantis*, 2 ou 3 pour les souches de l'espèce *B. bifidum* et 2 pour les souches type des espèces *B. asteroides* et *B. coryneforme*. Certains groupes n'étant constitués que par la souche type de l'espèce, une augmentation de l'échantillonnage permettrait de vérifier ces chiffres ainsi que l'hypothèse de l'existence de bandes ribosomiques communes à l'intérieur d'une même espèce. Ces résultats montrent que le ribotypage constitue également une méthode adaptée à la caractérisation des souches du genre *Bifidobacterium*. Du fait de l'utilisation industrielle de cet organisme, une telle identification des souches est intéressante, aussi bien au niveau du contrôle de qualité, que de leur propriété industrielle.

Une identification particulière des espèces a été également initiée dans ce travail. Elle est basée sur l'hybridation d'une sonde espèce-spécifique détectant le polymorphisme de restriction. Les trois méthodes ci-dessus nous ont permis de caractériser les souches de *Bifidobacterium* du laboratoire. Elles ont également permis de déceler une incompatibilité entre le classement des deux souches *B. infantis* ATCC15697^T et *B. indicum* 25912^T qui se révèlent avoir un génotype extrêmement proche. Le classement de ces deux souches dans des espèces différentes reposait sur le faible pourcentage de similarité ADN-ADN (18%, Lauer et Kandler, 1983). Plutôt que de révéler une erreur de classification, nos résultats suggèrent fortement une erreur de la collection ATCC. L'absence de ressemblances des profils ribosomiques, la non hybridation de la sonde A6/17, spécifique de l'espèce *B. adolescentis*, confirment la non

appartenance de la souche *B. adolescentis* ATCC11146 à cette espèce. De plus, le fait qu'elle ne possède pas l'activité fructose-6-phosphate phosphocétolase, spécifique du genre, indique que cette souche n'appartiendrait peut-être pas au genre *Bifidobacterium* (Chevalier *et al.*, 1990).

Ainsi, le moyen le plus sûr à employer pour caractériser une souche semble être l'utilisation simultanée de ces trois méthodes. En effet, chacune d'elles possède des avantages et des inconvénients :

- l'utilisation de la sonde ribosomique a permis d'identifier un grand nombre de souches. Cependant, à moins de réaliser plusieurs ribotypes de la même souche, cette méthode ne permet pas toujours de différencier des souches très proches (appartenant à la même espèce). Le choix de l'enzyme de restriction est donc déterminant : les ribotypes réalisés avec *PvuII* assurent la meilleure analyse des espèces et souches du genre *Bifidobacterium*. Combinés avec les ribotypes *EcoRV*, ils offrent un moyen hautement sélectif pour le typage moléculaire de ces souches. De plus, ils sont reproductibles et pourraient donc être également codés par analyse numérique. Ainsi, l'identification d'une souche nouvelle serait facilitée.

Pourtant, à la différence des sondes spécifiques, I41 ne permet pas d'assurer l'appartenance d'une souche au genre *Bifidobacterium*.

- la sonde *bA7/2* a permis de caractériser les souches de l'espèce *B. bifidum* de manière unique. Cette sonde devrait permettre de confirmer l'appartenance ou non d'une souche à cette espèce. Il serait intéressant de connaître la nature de ce fragment spécifique, qui est dispensable chez les autres espèces ou a très vite évolué. Le séquençage permettrait en outre de définir les amorces nucléotidiques nécessaires à l'emploi de la technique de PCR. Cette méthode d'amplification de l'ADN permet en effet la détection de bactéries dans des milieux complexes, en amplifiant la séquence cible recherchée. Elle évite donc d'avoir à isoler préalablement la souche recherchée. La seule étape limitante consiste à obtenir une sonde spécifique.

- une remarque identique pourrait être formulée en ce qui concerne la sonde *An1*, spécifique de l'espèce *B. animalis*. Cette sonde a permis une identification sûre de certaines souches industrielles alors que la comparaison des ribotypes n'avait pas permis de conclure.

- la sonde *A6/17*, spécifique de l'espèce *B. adolescentis*, ne permet pas de détecter un grand polymorphisme de restriction au sein des souches de cette espèce. Elle a cependant permis de classer rapidement des souches provenant d'une expérience clinique dans l'espèce *B. adolescentis*. La confirmation par la réalisation de nouveaux ribotypes n'a eu lieu qu'après cette approche.

- l'hybridation de la sonde *L6/45* sur les ADN de souches de l'espèce *B. longum* a permis de confirmer les résultats des ribotypes à propos de souches provenant de l'expérience clinique. Néanmoins, deux des 15 souches classées dans cette espèce ne sont pas détectées. En outre, cette sonde ne permet pas de caractériser chaque souche de manière unique. Sur 13 profils de restriction différents, on observe 7 types de signaux, démontrant l'extrême proximité de ces souches par rapport à ce fragment.

- la méthode de caractérisation la plus fine reste l'établissement des profils de restriction d'une souche. Les souches industrielles BB42 et BL2 ne sont différenciées de la souche de collection *B. longum* ATCC15707^T que par une bande supplémentaire sur leur profil de restriction *PvuII*, alors que leurs ribotypes et profils d'hybridation avec la sonde *L6/45* sont identiques.

Il existe une autre méthode permettant de simplifier l'exploitation de la variabilité inter et intraspécifique chez *Bifidobacterium* : la réalisation de profils de restriction en électrophorèse en champs-pulsés (PFGE), après hydrolyse de l'ADN de la bactérie considérée par des endonucléases à sites de coupure rares. Ces enzymes génèrent des fragments de plus grande taille et donc moins nombreux, ce qui peut permettre de visualiser la totalité du génome. Cette technique a été optimisée sur l'ADN de souches du genre *Bifidobacterium* par Bourget *et al.* (1993). Le problème majeur rencontré chez ce genre reste celui de l'enzyme utilisée. Comme le pourcentage en bases G+C des bifidobactéries est compris entre 57 et 64 %, des enzymes ayant un site de coupure riche en A+T ou G+C ont été testées ainsi que les enzymes à sites de coupure rares. Celles générant le plus petit nombre de fragments après clivage de l'ADN des souches de l'espèce *B. breve* sont *AseI* (AT/TAAT), *XbaI* (T/CTAGA), *DraI* (TTT/AAA) et *SpeI* (A/CTAGT). Les profils d'ADN obtenus par cette technique permettent de visualiser d'une autre manière le polymorphisme intraspécifique. Les profils obtenus sont en effet très différents les uns des autres. Des changements relativement petits au niveau chromosomique (mutations ponctuelles) peuvent en effet aboutir à de grandes différences de profils. Cependant, le fait qu'on observe peu de différences quand on utilise des enzymes clivant le génome des souches de l'espèce *B. breve* à haute fréquence et beaucoup quand on le clive par des enzymes à site de coupure rare n'est pas compatible avec des réarrangements de type ponctuel. La distribution des sites de restriction pourrait être due à des réarrangements tels que les translocations ou bien les inversions (Bourget *et al.*, 1993). En effet, l'hypothèse de l'existence de petites délétions ou insertions ne peut être éliminée.

Roy et Ward (1993) ont également étudié les profils de PFGE de 23 souches issues de préparations commerciales, ainsi que ceux de 28 souches de référence. Leurs résultats

confirment ceux obtenus au laboratoire, notamment concernant le grand polymorphisme de restriction inter et intraspécifique des bactéries du genre *Bifidobacterium*. Par exemple, la digestion de l'ADN génomique des différentes souches par *Xba*I et *Spe*I a permis de différencier chacune des souches testées : 5 profils de restriction différents ont été obtenus pour les souches de l'espèce *B. bifidum* (9 à 14 fragments *Xba*I; 12 à 16 fragments *Spe*I), 5 profils également pour les souches de l'espèce *B. breve* (16 à 19 fragments *Xba*I; 14 à 22 fragments *Spe*I), 8 pour les souches de l'espèce *B. longum* (13 à 20 fragments *Xba*I; 16 à 19 fragments *Spe*I) et 4 pour les souches de l'espèce *B. animalis* testées (12 à 14 *Xba*I; 12 à 16 fragments *Spe*I). Par conséquent, des profils de PFGE spécifiques à chaque souche ont été obtenus comme c'était déjà le cas pour les profils d'électrophorèse classique. Néanmoins, un rapprochement entre souches appartenant à la même espèce n'est pas réalisable sur ce critère, les profils étant trop différents.

La méthode de champs-pulsés a de plus permis une bonne estimation de la taille du génome de cinq souches de l'espèce *B. breve* : celle-ci a été estimée par l'utilisation de trois enzymes différentes à environ 2,1 Mb (Bourget *et al.*, 1993).

Au laboratoire, des profils *Sma*I spécifiques, composés d'environ 20 fragments ont été obtenus pour trois souches de l'espèce *Streptococcus thermophilus*, indiquant que cette technique est sans doute applicable à toutes les souches de *S. thermophilus* (Roussel, en préparation). La technique des électrophorèses en champs-pulsés peut également être utilisée pour la réalisation de profils de restriction discriminant entre les souches chez des espèces bactériennes dont la taille du génome est élevée. En effet, plus celle-ci est élevée, plus les profils de restriction en électrophorèse classique seront difficiles à analyser, car composés d'un trop grand nombre de bandes. Au laboratoire, des travaux réalisés sur la bactérie *Streptomyces ambofaciens* ont permis d'estimer la taille du génome de 6 500 à 8 200 kb selon les souches et ont montré que pour les quatre souches étudiées, trois profils de restriction pouvaient être obtenus (Leblond *et al.*, 1990).

En vue de détecter les souches de *Campylobacter jejuni* et *C. coli* au sein de milieux complexes, la séquence intergénique variable située entre les gènes flagellaires *flaA* et *flaB* a été amplifiée et caractérisée à l'aide de 2 amorces oligonucléotidiques localisées dans des régions conservées de ces gènes (Wegmüller *et al.*, 1993). Les produits PCR obtenus varient de 340 à 380 pb selon les souches testées. Une troisième amorce correspondant à une région hautement conservée de la séquence intergénique a également été utilisée avec l'une des deux amorces précédentes, pour obtenir un produit PCR de 180 à 220 pb non détectable chez une espèce proche : *C. lari*. Cette technique très fine possède en plus une limite de détection des espèces inférieure à 10 bactéries, aussi bien dans des eaux contaminées artificiellement que dans le lait. Ainsi, elle a permis l'identification de souches pathogènes de *C. jejuni* et *C. coli* sans avoir eu recours à la culture individuelle de ces souches. Parallèlement, l'équipe d'Owen *et al.* (1993) a

déterminé le ribotype de 72 souches comprenant *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* et *C. lari* en utilisant 4 enzymes de restriction : *Hae*III, *Hind*III, *Pst*I et *Pvu*II. Les ribotypes *Hae*III se sont montrés les plus sélectifs, reproductibles et faciles à coder pour l'analyse numérique. Cette méthode est très précise mais plus longue car elle nécessite au préalable, l'isolation de chacune des souches.

L'analyse PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S a souvent été utilisée pour mettre en évidence des différences espèce-spécifiques (clostridia, Gürtler *et al.*, 1991) ou même souche-spécifiques (Vanechoutte *et al.*, 1992) dans de nombreuses espèces bactériennes. La région située entre l'ARN 16S et l'ARN 23S des gènes ribosomiques d'*Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981) et de *Bacillus subtilis* (Loughney *et al.*, 1982) possède une longueur variable. Cette région contient en général des gènes d'ARNt. Parmi les 7 loci *rrn* de l'opéron ribosomique d'*E.coli*, tous contiennent 1 à 3 copies de gènes codant pour des ARNt, alors que chez *B. subtilis*, sur les 10 loci *rrn*, seules 2 des 3 souches testées en contiennent. Dans le but de différencier les souches de *Clostridium difficile*, la longueur de cette région a également été étudiée par Gürtler (1993). Il a ainsi différencié 14 types de produits PCR à partir des 24 souches de départ. De la même façon, Jensen *et al.* (1993) ont étudié l'espace intergénique de bactéries appartenant aux genres *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Proteus*. Ils ont mis en évidence des profils de produits d'amplification caractéristiques pour chaque espèce testée. La région située entre l'ARN 16S et l'ARN 23S des gènes ribosomiques des souches de collection du genre *Bifidobacterium* est en cours d'étude au laboratoire (Bourget N.). Le but de ce travail est d'étudier la phylogénie du genre à partir de cette région variable et notamment de déterminer s'il constitue ou non un genre à part entière.

4.2. ETUDE DE BIFIDOBACTERIES ISOLEES DE LA MICROFLORE INTESTINALE HUMAINE

Les trois méthodes décrites dans le chapitre précédent ont été utilisées pour la première fois sur des bifidobactéries isolées de la microflore intestinale humaine, au cours d'un essai clinique. Alors qu'il est communément admis qu'après un traitement antibiotique, la flore intestinale retrouve rapidement sa composition initiale (Simon et Gorbach, 1987), l'étude approfondie des populations de bifidobactéries après un tel traitement, remet en cause ce concept (publication n°1). En effet, pour les cinq sujets étudiés, les souches de *Bifidobacterium* identifiées avant toute prise d'antibiotiques et celles identifiées après le traitement, sont en général différentes. Alors que pour trois des sujets, l'échantillonnage des souches récoltées après l'antibiothérapie est faible, pour les deux autres, la récolte des souches a été régulièrement effectuée pendant 45 et 68 jours respectivement. Certaines souches ont bien été éliminées par le traitement antibiotique, alors que d'autres, appartenant probablement à la flore sous-dominante,

les ont remplacées. Deux mois après l'arrêt du traitement antibiotique, les souches de *Bifidobacterium* retrouvées au niveau de la flore dominante restent différentes de celles isolées au départ, excepté pour les souches du groupe CE1 isolées de la microflore intestinale du volontaire 1. Pour ce volontaire, des souches identifiées aux espèces *B. longum* (groupe CE1) et *B. adolescentis* (groupe CE2) étaient détectées au jour 0, juste avant le commencement du traitement antibiotique. Dès J3 (3^{ème} jour de l'antibiothérapie), une nouvelle souche de l'espèce *B. longum* apparaît (CE3-1) et est même isolée sur milieu sélectif, indiquant une sélection de souches résistantes par rapport aux autres, alors qu'aucune n'était isolée avant l'antibiothérapie. C'est également le cas des souches du groupe CE4, isolées après la prise du traitement antibiotique. Parallèlement, les souches CE1 n'ont jamais été isolées sur milieu sélectif. On constate donc que chez le volontaire 1, quatre groupes de souches différentes (CE1, CE3, CE4 et CE10) appartenant à l'espèce *B. longum* ont été isolées au cours du temps après le traitement antibiotique, alors que la souche du groupe CE2, classée dans l'espèce *B. adolescentis*, a disparu. Chez le volontaire 2, certaines souches de l'espèce *B. longum* (groupes CE6, CE13) et de l'espèce *B. adolescentis* (groupe CE7) ont été détectées à J0 mais jamais après. Elles ont été remplacées principalement par des souches du groupe CE8, classées dans l'espèce *B. adolescentis* et isolées elles aussi sur milieu sélectif. On trouvera également à J45 une autre souche résistante, CE11, très proche génétiquement des souches du groupe CE8. Cette souche appartient également à l'espèce *B. adolescentis*. L'étude de la flore des cinq sujets, concernant le genre *Bifidobacterium*, a mis en évidence 10 souches différentes de l'espèce *B. longum* et 4 de l'espèce *B. adolescentis*. Une autre souche (groupe CE5) caractérisée chez les volontaires 1 et 2 à une seule occasion n'a pu encore être classée dans une espèce précise. La flore intestinale des sujets étudiés n'est donc pas revenue à son état initial. De plus, le traitement antibiotique a sélectionné des souches de *Bifidobacterium* résistantes à la streptomycine et à la rifampicine chez les volontaires 1 et 2. Cette forte résistance est encore retrouvée chez ces deux sujets 2 mois après l'arrêt du traitement. Les Bifidobactéries représentent une part importante de la flore dominante des hommes sains. Les souches principalement isolées chez les nourrissons appartiennent aux espèces *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve* et *B. longum*. Celles isolées chez l'enfant, l'homme adulte et le vieillard appartiennent aux espèces *B. longum* et *B. adolescentis*, bien que chez le vieillard, les souches de l'espèce *B. adolescentis* soient majoritaires (Mitsuoka, 1984). Les espèces de *Bifidobacterium* prédominantes détectées dans ce travail étant *B. longum* et *B. adolescentis*, nos résultats sont en accord avec ceux démontrés précédemment. De plus, on a pu mettre en évidence que quatre souches d'une même espèce (*B. longum*) pouvaient coexister dans une même flore.

4.3. MISE EN EVIDENCE DE L'ECHEC DE LA TENTATIVE D'IMPLANTATION DE LA SOUCHE EXOGENE BOSR DANS LA FLORE INTESTINALE

Le traitement antibiotique prescrit aux volontaires avait pour but d'abaisser fortement la flore de barrière en vue d'introduire de nouveaux organismes potentiellement bénéfiques appelés probiotiques, au niveau du tractus digestif. Il avait été précédemment montré par l'utilisation d'un lait fermenté contenant la souche de *Bifidobacterium* BOSR, que celle-ci atteignait un taux moyen dans les selles de 6×10^8 à 7×10^8 CFU par gramme tant que le produit était ingéré, ce qui revient à un taux de recouvrement de 30 % (Bouhnik *et al.*, 1992b). Ces chiffres renforcent l'idée que les bifidobactéries pourraient représenter des organismes privilégiés pour une action probiotique. Elles appartiennent en effet à la flore dominante de l'hôte et peuvent traverser le tractus intestinal sans perdre leur viabilité. De plus, certaines souches de *Bifidobacterium* ont la propriété d'adhérer aux surfaces muqueuses, ce qui est indispensable pour le maintien dans le tractus gastro-intestinal (Bernet *et al.*, 1993). Cependant, ces facteurs d'adhésion ne sont pas exprimés chez toutes les souches. Par l'implantation dans la flore d'une souche bénéfique, on espère améliorer la résistance de l'hôte aux bactéries pathogènes, soit en renforçant l'effet de barrière par modification du profil de la flore colique et de sa capacité enzymatique, soit en stimulant le système immunitaire (Rambaud *et al.*, 1993). Le suivi des populations de *Bifidobacterium* au cours du temps montre que des souches correspondant à la souche exogène résistante BOSR sont retrouvées pendant l'ingestion du produit laitier fermenté mais qu'elles disparaissent rapidement après l'arrêt de l'ingestion. Pour l'un des volontaires, cette souche a été retrouvée à J16, donc 7 jours après l'arrêt du produit laitier, indiquant que la souche exogène a persisté dans l'intestin pendant une période plus longue que le transit normal, peut-être à cause d'une légère adhésion aux cellules muqueuses. Par conséquent, malgré la tentative visant à altérer la barrière constituée par les bactéries de la flore dominante, l'implantation attendue n'a pas été détectée. En effet, pour affecter son environnement, le microorganisme doit atteindre une population d'au moins 10^7 à 10^8 CFU dans l'intestin (Ducluzeau et Raibaud, 1989). L'effet de barrière de la flore endogène, même diminué, a apparemment encore pu éliminer la souche exogène BOSR. Peut-être s'agit-il d'un effet de souche ? En effet, des effets probiotiques avaient précédemment été mis en évidence avec la souche *B. longum* BB536 qui induisait une augmentation du nombre de bifidobactéries dans les selles parallèlement à une régression des *Clostridium*, coliformes et *Bacteroides*. Ces effets probiotiques qui persistaient trois semaines après l'arrêt de l'ingestion, n'ont pas été observés lors de l'absorption de laits fermentés avec *B. animalis*, *B. bifidum* ou même *B. longum* ATCC15707^T (Baratte-Euloge, 1992). La souche BOSR étant un variant de la souche *B. animalis* ATCC27536, l'espèce *B. animalis* ne serait apparemment pas le meilleur choix pour une implantation. De plus, nous ne connaissons pas son pouvoir d'adhésion aux cellules intestinales. Selon Bernet *et al.* (1993), les bifidobactéries pourraient adhérer grâce à un

composé protéique labile de surface, alors que les lactobacilles, eux, adhèrent grâce à un composé protéique qu'ils sécrètent. De plus, ces auteurs montrent que les souches de bifidobactéries pouvant adhérer aux cellules (*B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*), peuvent inhiber de façon significative l'adhésion de certains entéropathogènes. Cette exclusion peut être due soit à une compétition pour le site d'attachement, soit à la constitution d'un biofilm de bactéries empêchant l'accès de la surface cellulaire aux bactéries pathogènes.

4.4. RECHERCHE DE LA FONCTION ET DE L'ORIGINE DU FRAGMENT SPECIFIQUE L6/45

Le fragment L6/45, spécifique de souches de l'espèce *B. longum*, contient une partie d'ORF dont la séquence protéique déduite présente des similarités significatives avec une classe de recombinaisons site-spécifiques représentées par la protéine Int du bactériophage lambda (Argos *et al.*, 1986)

Ces recombinaisons appartiennent généralement à des bactériophages, à des plasmides ou à des transposons.

Contrairement aux recombinaisons site-spécifiques représentées par la protéine Hin (résolvases, invertases), celles de la famille de l'intégrase de lambda montrent une large diversité entre elles. Seuls deux domaines situés dans la région C-terminale sont particulièrement conservés chez ce type de recombinaisons (Fig. 66). Pargellis *et al.* (1988) ont montré que le résidu tyrosine (Y) situé à l'extrémité du second domaine et conservé dans toutes les séquences comparées (Y₂₃₆ pour L6/45, Fig.66), formait une liaison covalente avec l'ADN au lieu d'échange des brins. En effet, une intégrase mutante ayant un résidu de phénylalanine à la place du résidu de tyrosine est privée de ses activités de topoisomérase et de recombinaison alors qu'elle peut encore se lier à la région centrale où devrait avoir lieu l'échange des brins et aux autres sites de liaison avec une affinité comparable à celle de l'enzyme sauvage. Cette tyrosine serait incluse dans une structure correspondant à un feuillet β . Au début du second domaine, deux autres résidus sont également conservés chez toutes les intégrases mises à jour. Il s'agit de résidus histidine (H) et arginine (R). Dans le cas de L6/45, l'histidine est remplacée par un résidu arginine (R₂₀₁). Un résidu basique a donc été remplacé par un autre résidu basique. Par contre, l'arginine est conservée (R₂₀₄). Selon Argos *et al.* (1986), ces acides aminés conservés feraient partie du site actif de l'enzyme. Il est intéressant de souligner que les cinq acides aminés situés à l'entrée du domaine 2 appartiennent à une structure secondaire en hélice α , soulevant la possibilité que l'histidine (remplacée par un résidu arginine pour L6/45) et l'arginine conservées chez les intégrases se retrouvent situées du même côté de cette hélice α (Argos *et al.*, 1986).

Par contre, aucune similarité nette n'est observée au niveau de la région N-terminale chez les recombinaisons de la famille de l'intégrase de lambda. Argos *et al.* (1986) ont plus particulièrement étudié les structures primaires des intégrases de 7 phages distincts : λ , $\Phi 80$, P22, P2, 186, P4 et P1, qui utilisent tous un événement de recombinaison site-spécifique pour se maintenir de façon stable dans le génome de la cellule hôte. Chacun des systèmes possède pourtant un site de spécificité différent. Les 7 recombinaisons associées sont basiques et possèdent approximativement la même taille (336 à 340 AA), mais seule la région C-terminale de ces enzymes peut être alignée. Cette divergence de séquences est également observée avec l'ORF2-2 de L6/45. La difficulté rencontrée pour aligner les régions N-terminales de ces protéines suggère qu'elles sont destinées à une fonction particulière à chaque système (par exemple à des séquences de reconnaissance ou d'interactions spécifiques pour une protéine comme Xis, etc...). Trois au moins des protéines Int des 7 phages décrits ci-dessus peuvent interagir avec la même protéine annexe (IHF) et quatre au moins peuvent interagir avec une protéine Xis qui influence la direction de la recombinaison (Argos *et al.*, 1986). Pourtant, si on considère que ces enzymes ont un rôle mécanistique équivalent, cette diversité de séquence primaire est remarquable.

Etant donné les similarités existant avec les recombinaisons de la famille de l'intégrase de lambda, il semble que l'ORF2-2 de L6/45 code effectivement pour une recombinaison site-spécifique.

Les recombinaisons site-spécifiques mises à jours ont différentes origines.

L'intégrase XerC, codée par *Escherichia coli*, présente la plus forte similarité avec l'ORF2-2 de L6/45. Cette protéine, d'origine chromosomique, fait partie d'une unité multicistronique incluant le gène *dapF* et deux autres ORF dont le produit n'a pas été identifié. Avec le produit des gènes *ArgR* et *PepA*, la recombinaison XerC permet de maintenir *ColE1* et les plasmides apparentés à l'état de monomères, leur assurant ainsi une descendance stable (Colloms *et al.*, 1986). En effet, deux copies du gène *cer* (*ColE1*) orientées dans le même sens au sein d'une même molécule plasmidique suffisent à induire un phénomène de recombinaison. La séquence de L6/45 présente également des similarités avec les protéines *FimB* et *FimE*, d'origine chromosomique, impliquées dans l'inversion d'un fragment du chromosome d'*Escherichia coli* nécessaire à l'expression d'un gène codant pour des protéines d'adhésion aux cellules eucaryotes (Dorman et Higgins, 1987).

Par ailleurs, la séquence codée par l'ORF2-2 de L6/45 présente des similarités, mais moins fortes, avec l'intégrase E2 du plasmide pLMO20 d'*Escherichia coli*, qui a permis l'insertion d'un gène de résistance au triméthopime (*dhfrV*) par un événement de

recombinaison au niveau d'une structure comportant déjà un gène de résistance pour le sulfonamide (*sulI*) (Sundström *et al.*, 1988). Au niveau des bactéries pathogènes, l'extension rapide des résistances aux antibiotiques semble impliquer une incorporation continue de gènes de résistance par recombinaison dans des plasmides ou transposons, vecteurs efficaces de transfert. Une comparaison et un alignement du locus codant pour l'intégrase E2 de pLMO20 met en évidence des séquences identiques dans d'autres plasmides et transposons : Tn21 (résistance à la spectinomycine *aadA* et au sulfonamide *sulI*, plasmides R6-5, R100), Tn2426 (même groupe que Tn21), plasmide R388 (résistance au triméthoprim *dhfrI* et au sulfonamide *sulI*), R46 (contient une zone similaire à Tn21) et R1033 de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette séquence s'avère également très similaire à celle de l'intégrase potentielle du transposon Tn7 (résistance au triméthoprim *dhfrI*).

Cette intégrase est donc retrouvée dans des transposons provenant de sources différentes. L'existence d'un nombre différent de copies du fragment L6/45 selon les souches de l'espèce *B. longum* (0 à 4), suggère qu'il fait partie d'une structure de type transposon. D'ailleurs, des similarités plus faibles existent pour d'autres intégrases de transposons, notamment avec l'une des deux intégrases de Tn554 (*Em*, *Sp*). Ce transposon possède un site d'insertion très spécifique sur le chromosome de son hôte *Staphylococcus aureus* et s'insère généralement à un site unique et dans la même orientation. Il est constitué de 6 ORF dont 3 sont nécessaires à la transposition : TnpA, B et C (Murphy *et al.*, 1985). Les protéines TnpA et TnpB présentent en particulier des homologies avec les recombinases de la famille de l'intégrase de lambda. L'homologie avec la recombinase de L6/45 concerne TnpA. Néanmoins, la structure portant le gène pour l'intégrase de L6/45 est répétée dans le génome de certaines souches de *B. longum*, alors que dans le cas de Tn554, une seule copie du transposon est observée. Une comparaison pourrait également être effectuée avec deux transposons de la même classe que Tn554 (classe V): le transposon Tn916 (*Tc*) d'*Enterococcus faecalis* (Senghas *et al.*, 1988) et le transposon Tn1545 (*Em*, *Km*) de *S. pneumoniae* (Courvalin et Carlier, 1986). Des mutations par insertion de Tn5 dans Tn916 ont montré qu'une région de 1 kb à l'une des extrémités du transposon était essentielle pour que l'excision de l'élément et sa transposition aient lieu. La région correspondante sur Tn1545 a révélé l'existence de deux gènes dont les produits sont absolument nécessaires à l'excision de l'élément. Il s'agit de protéines présentant de fortes homologies avec les protéines Xis et Int du bactériophage lambda. La protéine Int-Tn seule est capable de catalyser l'intégration de l'intermédiaire circulaire d'un mutant de Tn1545 défectif pour l'intégration et l'excision (Poyart-Salmeron *et al.*, 1990). Ces auteurs observent également qu'en présence d'un plasmide muticopie dans lequel est cloné le gène Xis-Tn, l'excision du transposon de type sauvage était fortement stimulée. De plus, ces deux transposons peuvent s'insérer à des sites multiples lors de la transposition (Wooley *et al.*, 1989; Procino *et al.*, 1988), ce qui expliquerait la répétition

également observée pour le fragment L6/45. Cependant, le gène *xis* n'a pas été détecté en amont de L6/45, comme c'est le cas pour les transposons Tn916, Tn1545, les phages λ , P22 et ϕ 80.

Une intégrase a également été mise en évidence au niveau du transposon Tn4430 porté par le plasmide pGI2 de *Bacillus thuringiensis* (Mahillon et Lereclus, 1988). Ce transposon génère la formation de co-intégrats avec duplication de l'élément Tn4430 lors de la recombinaison transpositionnelle. Pourtant, la molécule impliquée dans la résolution du co-intégrat généré entre le réplicon et Tn4430 n'appartient pas à la famille des résolvasse-invertases comme c'est le cas pour Tn3 et les transposons apparentés, mais à celle de l'intégrase de λ . Les similarités observées entre d'une part la protéine TnpI de Tn4430 et son site de recombinaison potentiel, et d'autre part avec le système λ att-Int est frappant. Selon Campbell (1981, 1983), les gènes *int* et *xis* seraient originaires d'un transposon ancêtre (Tn λ) qui aurait eu une activité de résolution de co-intégrats. Les résultats précédents ainsi que l'existence dans Tn4430 d'une résolvasse appartenant à la même famille que λ int corroborent effectivement ce modèle d'évolution.

Le fragment L6/45, répété chez différentes souches de l'espèce *B. longum*, pourrait donc faire partie d'une structure de type transposon impliquant une recombinase site-spécifique. Le clonage des parties adjacentes de ce fragment permettrait une meilleure compréhension du rôle qu'il tient chez les souches de l'espèce *B. longum* qui le possèdent. Peut-être est-il associé à un gène de résistance. Deux des souches de cette espèce ne possédant pas le fragment L6/45, celui-ci n'est en tout cas pas essentiel à l'espèce. Son origine est peut-être plasmidique (plasmide intégré) ou phagique bien que la plus forte similarité concerne deux intégrases d'origine chromosomique. Mais ces chiffres sont-ils réellement significatifs au niveau parenté ? Ils ne tiennent pas compte notamment de l'alignement réalisable ou non entre les régions conservées. Des phages tempérés ont en effet été détectés chez certaines souches de cette espèce (Sgorbati *et al.*, 1983). De même, une large variété de plasmides a été détectée chez 70 % des souches de l'espèce *B. longum* (les souches de collection et industrielles n'en possèdent apparemment pas). Mais jusqu'à présent, aucune propriété phénotypique liée à la présence de ces plasmides n'a été observée (Sgorbati *et al.*, 1982). Il serait également intéressant de déterminer s'il existe des transcrits correspondant au gène de la recombinase de L6/45. On pourrait ainsi savoir si ce gène est fonctionnel ou non.

Etant donné la possibilité d'une transposition ailleurs, peut-on encore parler de sonde espèce-spécifique pour ce fragment ? On ne s'explique pas pourquoi on ne le retrouve actuellement que chez des souches de l'espèce *B. longum*. L'interrogation de la banque NCBI concernant la séquence nucléotidique correspondant à l'ORF2-2 n'a révélé aucune homologie significative avec une séquence connue. La présence de transposons similaires au niveau

d'organismes différents suggère que les transferts horizontaux de ce type d'éléments sont fréquents. Certains transposons, notamment Tn1545 et Tn916, sont en effet conjugatifs. Compte-tenu de ces transferts, on ne peut affirmer que le fragment L6/45 soit spécifique exclusivement de souches de l'espèce *B. longum*. Sa présence explique néanmoins l'une des variabilités génomiques rencontrées entre les espèces d'un même genre.

5. PERSPECTIVES

5. PERSPECTIVES

Les 3 méthodes moléculaires utilisées pour le typage de souches du genre *Bifidobacterium* ont permis d'identifier un certain nombre de souches. Par conséquent, ces méthodes pourraient permettre d'étudier de façon plus approfondie la variation des populations de bifidobactéries de la flore intestinale, sachant qu'une différence de métabolisme liée à un changement de souche peut parfois être conséquent.

Dans cette optique, la détermination des profils ribosomiques de souches dont l'espèce n'est pas encore dans la collection du laboratoire ainsi que de souches autres que la souche type quand c'est la seule représentante, doit être réalisée.

Le séquençage du fragment spécifique L6/45 a montré qu'il pouvait s'apparenter à un gène de recombinaison site-spécifique. Il s'agit donc là d'une fonction intéressante. Le séquençage des autres fragments spécifiques déterminés au cours de cette étude pourrait donc également donner des résultats intéressants.

Il permettrait en outre de définir les amorces nucléotidiques nécessaires à l'emploi de la technique de PCR. En effet, en amplifiant la séquence cible recherchée, cette technique permet la détection de bactéries dans des milieux complexes sans avoir à les isoler préalablement. On pourrait donc de cette manière étudier l'évolution d'une flore complexe après un traitement donné.

Cette détection spécifique rapide des souches pourrait être également particulièrement utile au niveau industriel.

Dans ce but, la recherche d'autres sondes espèces-spécifiques apparaît indispensable.

Une autre perspective concerne le clonage des parties adjacentes de L6/45 qui permettrait peut-être de confirmer si nous sommes bien en présence d'une partie de transposon. De plus, l'hybridation de la sonde L6/45 sur l'ADN de souches ayant un fort pourcentage en bases G+C permettrait peut-être de mettre en évidence un éventuel transfert intergénérique.

6. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAMS G. D. 1980. Morphological aspect of gastro-intestinal tract colonization. p. 65-75. *In* Les anaérobies, Symposium, Paris, Masson (ed.).
- ABREMSKI K. and R. HOESS. 1984. Bacteriophage P1 Site-specific recombination. *J. Biol. Chem.* **259** : 1509-1514.
- ALLARDET-SERVENT A., BOURG G., RAMUZ M., PAGES M., BELLIS M. and G. ROIZES. 1988. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bact.* **170** : 4603-4607.
- ANDREMONT A., RAIBAUD P., TANCREDE C., DUVAL-IFLAH Y and R. DUCLUZEAU. 1985. The use of germ-free mice associated with human fecal flora as an animal model to study enteric bacterial interactions. p.219-228. *In* Bacterial diarrheal diseases. Y. Takeda & T. Miwatani (eds.). KTK Scientific Publishers, Tokyo.
- ARGOS P., LANDY A., ABREMSKI K., EGAN J. B., HAGGARD-LJUNGQUIST E., HOESS R. H., KAHN M. L., KALIONIS B., NARAYANA S. V. L., PIERSON III L. S., STERNBERG, N. and J. M. LEONG. 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5** : 433-440.
- AUSTIN S., ZIESE M. and N. STERNBERG. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell.* **25** : 729-736.
- BALLONGUE J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. *In* Lactic Acid Bacteria. Salminen & von Wright (ed.) Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong Kong.
- BALOGA A. O. and S. K. HARLANDER. 1991. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological survey. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2324-2331.
- BARATTE-EULOGE P. 1992. Action comparée sur la flore intestinale de trois laits fermentés au *Bifidobacterium*. Evaluation de propriétés probiotiques et du comportement de la souche BB536 de *Bifidobacterium longum* chez l'homme. Thèse de l'Université de Nancy I en Biologie appliquée à la nutrition et aux bioindustries.
- BARZA M., GIULANO M., JACOBUS N. V. and S. L. GORBACH. 1987. Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on "colonization resistance" of intestinal microflora of humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31** : 723-727.
- BENNO Y., SAWADA K. and T. MITSUOKA. 1984. The intestinal microflora of infants : Composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* **28** : 975-986.
- BEERENS H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11** : 155-157.

- BEERENS H. 1993. Detection of Bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2418-2419.
- BERNET M.-F., BRASSART D., NEESER J.-R. and A. L. SERVIN. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Env. Microbiol.* **59** : 4121-4128.
- BEZIRTOGLOU E. and C. ROMOND. 1990. Occurrence of *Bifidobacterium* in the feces of newborns delivered by cesarean section. *Biol. Neonate.* **58** : 247-251.
- BIAVATI B., CASTAGNOLI P., CROCIANI F. and L. D. TROVATELLI. 1984. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiologica.* **7** : 341-345.
- BIAVATI B., CASTAGNOLI P. and L. D. TROVATELLI. 1986. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults. *Microbiologica.* **9** : 39-45.
- BIAVATI B. and P. MATTARELLI. 1991. *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41** : 163-168.
- BIAVATI B., SCARDOVI V. and W. E. C. MOORE. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:358-373.
- BISERCIC M. and H. OCHMAN. 1993. Natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* harbor the same classes of insertion sequences. *Genetics.* **133** : 449-454.
- BOUHNİK Y., MANGIN I., POCHART P., BISETTI N., SIMONET J.-M., DECARIS B. and J. C. RAMBAUD. 1992a. Can exogenous bacteria colonize the colonic flora ? An *in vivo* study in man. *Gastroenterology.* **102**, A598.
- BOUHNİK Y., POCHART P., MARTEAU P., ARLET G., GODEREL I. and J.-C. RAMBAUD. 1992b. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology.* **102** : 875-878.
- BOURGET N., SIMONET J.-M. and B. DECARIS. 1993. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. *FEMS Microbiol. Lett.* **110** : 11-20.
- BOUZAR H. and L. W. MOORE. 1987. Complementary methodologies to identify specific *Agrobacterium* strains. *Appl. Env. Microbiol.* **53** : 2660-2665.
- BROSIUS J., DULL T. J., STEETER D. D. and H. F. NOLLER. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148** : 107-127.

- BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBONS. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, VIII^{ème} ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
- CAMPBELL A. 1981. Some general questions about movable elements and their implications. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45** : 1-9.
- CAMPBELL A. 1983. Mobile Genetic Elements. p. 66-104. In Shapiro J. ed., Academic Press, N. Y.
- CHEVALIER P., ROY D. and P. WARD. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* **68** : 619-624.
- CHUBA P. J., PELZ K., KREKELER G., DE ISELE T. S. and U. GÖBEL. 1988. Synthetic oligodeoxynucleotide probes for the rapid detection of bacteria associated with human periodontitis. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 1931-1938.
- CLARK-CURTISS J. E. and M. A. DOCHERTY. 1989. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Infect. Dis.* **159** : 7-15.
- COLLINS D. and G. W. DE LISLE. 1987. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. *J. Gen. Microbiol.* **133** : 1431-1434.
- COLLOMS S. D., SYKORA P., SZATMARI G. and D. J. SHERATT. 1990. Recombination at *ColE1 cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J. Bact.* **172** : 6973-6980.
- COLMIN C., PEBAY M., SIMONET J.-M. and B. DECARIS. 1991. A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol. Lett.* **81** : 123-128.
- COURVALIN P. and C. CARLIER. 1986. Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **205** : 291-297.
- CUMMINS C. S., GLENDENNING O. M. and H. HARRIS. 1957. Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature.* **180** : 337-338.
- DARBAS H., ROUSSENQ-JEAN A., JEAN-PIERRE H., BOYER G. and M. RIVIERE. 1989. Infection urinaire à *Bifidobacterium adolescentis*. *Méd. Mal. Infect.* **19** : 778-780.
- DARBAS H., JEAN-PIERRE H., RIVIERE M. and G. BOYER. 1991. Septicémie à *Bifidobacterium longum*. *Méd. Mal. Infect.* **21** : 707-709.
- DARRASSE A., KOTOUJANSKY A. and Y. BERTHEAU. 1994. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Env. Microbiol.* **60** : 298-306.

- DAUGA C. et P. A. D. GRIMONT. 1993. Identification bactérienne par séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S, amplifiés à partir de prélèvements cliniques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **8** : 79-82.
- DEBURE A., COLOMBEL J.-F., FLOURIE B. RAUTUREAU M. and J.-C. RAMBAUD. 1989. Comparaison de l'implantation et de l'activité métabolique d'une flore fécale de rat et d'une flore fécale humaine inoculées chez le rat axénique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **13** : 25-31.
- DE BUYSER M.-L., MORVAN A., AUBERT S., DILASSER F. and N. EL SOLH. 1992. Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 889-899.
- DELLAGLIO F. 1989. Approches moléculaires et chemiotaxonomiques dans la classification des bactéries lactiques. In : *Bifidobacterium* et facteurs bifidigènes. Rôle en santé humaine. ARRBA (Ed). pp 55-72.
- DEMUYTER P., LEBLOND P., DECARIS B. and J.-M. SIMONET. 1988. Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 2001-2007.
- DEHNERT J. 1957. Untersuchungen über die gram-positive Stuhlflora des Brustmilchkindes. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionsk. Hyg. Abt. 1. Orig.* **169** : 66-79.
- DORMAN C. J. and C. F. HIGGINS. 1987. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J. Bact.* **169** : 3840-3843.
- DOWER W. J., MILLER J. F. and C. W. RAGSDALE. 1988. High efficiency of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16** : 6127-6145.
- DUCLUZEAU R. and P. RAIBAUD. 1979. INRA. Actualités scientifiques et agronomiques. Ecologie microbienne du tube digestif. Masson (ed.).
- DUCLUZEAU R. and P. RAIBAUD. 1989. Les interactions bactériennes dans le tube digestif. *Revue scientifique et technique Off. int. Epiz.* **8** : 291-311.
- DUVAL-IFLAH Y., RAIBAUD P. and M. ROUSSEAU. 1981. Antagonisms among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Infection and Immunity.* **34** : 957-969.
- DUVAL-IFLAH Y., OURIET M.-F., MOREAU C., DANIEL N., GABILAN J.-C. and P. RAIBAUD. 1982. Implantation précoce d'une souche d'*Escherichia coli* dans l'intestin de nouveaux-nés humains : effet de barrière vis-à-vis de souches d'*E. coli* antibiorésistantes. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).* **133** : 393-408.

- EARLY P., HUANG H., DAVIS M., CALAME K and L. HOOD. 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region is generated from three segments of DNA: V_H, D, and J_H. *Cell*. **19** : 981-992.
- EISENACH K. D., CRAWFORD J. T. and J. H. BATES. 1986. Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133** : 1065-1068.
- EISENACH K. D., CRAWFORD J. T. and J. H. BATES. 1988. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **26** : 2240-2245.
- ENDTZ H. P., GIESENDORF B. A. H., VAN BELKUM A., LAUWERS S. J. M., JANSEN W. H. and W. G. V. QUINT. 1993. PCR-mediated DNA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with recurrent infections. *Res. Microbiol.* **144** : 703-708.
- FERRELL R. V., HEIDARI M. D., WISE K. S. and M. A. McINTOSH. 1989. A *Mycoplasma* genetic element resembling prokaryotic insertion sequence. *Mol. Microbiol.* **3** : 957-967.
- FRY N. K., WARWICK S., SAUNDERS N. A. and T. M. EMBLEY. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **137** : 1215-1222.
- FUKUNAGA M., SOHNAKA M. and Y. YANAGIHARA. 1993. Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 1141-1146.
- FULLER R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66** : 365-378.
- FULLER R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut*. **32**:439-442.
- GASCOIGNE N. R. J., CHIEN Y., BECKER D. M., KAVALER J. and M. M. DAVIS. 1984. Genomic organization and sequence of T-cell receptor β -chain constant- and joining-region genes. *Nature* (London). **310** : 387-391.
- GAVINI F. 1989. *Bifidobacterium* : classification; aspect critique. In : *Bifidobacterium* et facteurs bifidigènes. Rôle en santé humaine. ARRBA (Ed). pp 47-53.
- GAVINI F., POURCHER A. M., BAHAKA D., FRENEY J., ROMOND C. et D. IZARD. Le genre *Bifidobacterium*. Classification, identification, aspects critiques. *Méd. Mal. Infect.* **20** hors série : 53-62.
- GIOVANNETTI L., VENTURA S., BAZZICALUPO M., FANI R. and R. MATERASSI. 1990. DNA restriction fingerprint analysis of the soil bacterium *Azospirillum*. *J. Gen. Microbiol.* **136** : 1161-1166.

- GLICK M.C., SALL T., ZILLIKEN F. and S. MUDD. 1960. Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell-wall precursor. *Biochim. Biophys. Acta*, **37** : 361-363.
- GÖBEL U. B., GEISER A. and E. J. STANBRIDGE. 1987. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *J. Gen. Microbiol.* **133** : 1969-1974.
- GOLDEN J. W., ROBINSON S. J. and R. HASELKORN. 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* (London), **314** : 419-423.
- GOLDIN B. R. 1986. In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Ann. Rev. Microbiol.* **40** : 367-393.
- GRIMONT F. et P. A. D. GRIMONT. 1990. La carte d'identité génétique des bactéries. *Biofutur*. nov. 90. pp 50-52.
- GRIMONT F. et P. A. D. GRIMONT. 1991. La carte moléculaire des bactéries. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **6** : 9-12.
- GRIMONT F. and P. A. D. GRIMONT. 1986. Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Restriction Patterns as Potential Taxonomic Tools. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur) **137** : 165-175.
- GRIMONT F., LEFEVRE M., AGERON E. and P. A. D. GRIMONT. 1989. rRNA gene restriction patterns of *Legionella* species: a molecular identification system. *Res. Microbiol.* **140** : 615-626.
- GRONOSTAJSKI R. M. and P. D. SADOWSKI. 1985. The FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 µm plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. *Mol. Cell. Biol.* **5** : 3274-3279.
- GÜRTLER V. 1993. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 3089-3097.
- HAVENAAR R. and J. H. J. HUIS IN'T VELD. 1992. Probiotics ; a general review. *In The lactic Acid Bacteria in Health & Disease*. B. J. B. Wood (ed.), Elsevier Applied Science.
- HOSKINS L. C., AGUSTINES M., MC KEE W. B., BOULDING E. T., KRIARIS M. and NIEDERMEYER G. 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.* **75** : 944-953.
- HUNGATE R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **14** : 1-49.

- HUSAIN I., POUPARD J. A. and F. NORRIS. 1972. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J. Bact.* **111** : 841-844.
- IWATA M. and T. MORISHITA. 1989. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Lett. Appl. Microbiol.* **9** : 165-168.
- JENSEN M. A., WEBSTER J. A. and N. STRAUS. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Env. Microbiol.* **59** : 945-952.
- KÄMPFER P. and R. M. KROPPESTEDT. 1991. Probabilistic identification of streptomycetes using miniaturized physiological tests. *J. Gen. Microbiol.* **137** : 1893-1902.
- KANDLER O. and E. LAUER. 1974. Neuere Vorstellungen zur Taxonomie der Bifidobacterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionsk. Hyg. Abt. 1. Orig. Reihe A.* **228** : 29-45.
- KESSLER C., NEUMAIER P. S. and W. WOLF. 1985. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases - a review. *Gene.* **33** : 1-102.
- KLIJN N., WEERKAMP A. H. and W. M. DE VOS. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *App. Env. Microbiol.* **57** : 3390-3393.
- KOJIMA M., SUDA S., HOTTA S. and K. HAMADA. 1968. Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* **95** : 710-711.
- KOJIMA M., SUDA S., HOTTA S. and K. HAMADA. 1970a. Induction of pleomorphy and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* **102** : 217-220.
- KOJIMA M., SUDA S., HOTTA S. and K. HAMADA. 1970b. Necessity of calcium ion for cell division in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* **104** : 1010-1013.
- KOROLIK V., COLOE P. J. and V. KRISHNAPILLAI. 1988. A specific DNA probe for the identification of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 521-529.
- LANE D., DE FEYTER R., KENNEDY M., PHUA S. H. and D. SEMON. 1986. D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site specific resolvase. *Nucleic Acids Res.* **14** : 9713-9728.
- LAUER E. 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 100-102.
- LAUER E. and O. KANDLER. 1983. DNA-DNA homology, murein types, and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4** : 42-64.

- LEBLOND P., FRANCOU F. X., SIMONET J.-M. and B. DECARIS. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **72** : 79-88.
- LEDERBERG J., E. M. LEDERBERG. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63** : 399-406.
- LECLERC H. and J. C. MORIAMEZ. 1980. Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathol. Biol.* **58** : 217-226.
- LEE B. H., HACHE S. and R. E. SIMARD. 1986. A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J. Ind. Microbiol.* **1** : 209-212.
- LOUGHNEY K., LUND E and J. E. DAHLBERG. 1982. tRNA genes are found between the 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **10** : 1607-1624.
- LOVETT S. T. and R. D. KOLODNER. 1991. Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* *recJ* chromosomal region and construction of RecJ-overexpression plasmids. *J. Bact.* **173** : 353-364.
- MCFADDEN J. J., BUTCHER P. D., THOMPSON J., CHIODINI R. and J. HERMON-TAYLOR. 1987. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.* **1** : 283-291.
- MC LEOD M., VOLKERT F. and J. BROACH. 1984. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49** : 779-787.
- MAHILLON J. and D. LERECLUS. 1988. Structural and fonctionnal analysis of Tn4430: identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate resolution process. *EMBO J.* **7** : 1515-1526.
- MARTEAU P., POCHART P., BOUHNİK Y., ZIDI S., GODEREL I. and J. C. RAMBAUD. 1992. Survie dans l'intestin grêle de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium sp.* ingérés dans un lait fermenté : une base rationnelle à l'utilisation de probiotiques chez l'homme. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **16** : 25-28.
- MATTARELLI P., BIAVATI B., CROCIANI F., SCARDOVI V. and G. PRATI. 1993. Bifidobacterial cell wall proteins (BIFOP) in *Bifidobacterium globosum*. *Res. Microbiol.* **144** : 581-590.
- MATTEUZZI D. 1981. Taxonomy of the genus *Bifidobacterium*. *Rev. Inst. Pasteur Lyon.* **14** : 13-17.
- MATTEUZZI D., BRIGIDI P., ROSSI M. and D. DI. 1990. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1. *Lett. Appl. Microbiol.* **11** : 220-223.

- MATTEUZZI D., CROCIANI F., ZANI G. and L. D. TROVATELLI. 1971. *Bifidobacterium suis* n. sp. : a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Zeitschrift. Allgemeine Mikrobiol.* **11** : 387-395.
- MEGHROUS J., EULOGE P., JUNELLES A. M., BALLONGUE J. and H. PETITDEMANGE. 1990. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnol. Letters.* **12** : 575-580.
- MINOWA T., IWATA S., SAKAI H., MASAKI H. and T. OHTA. 1989. Sequence and characteristics of the *Bifidobacterium longum* gene encoding L-lactate dehydrogenase and the primary structure of the enzyme: a new feature of the allosteric site. *Gene.* **85** : 161-168.
- MITSUOKA T. 1969. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1. Orig.* **195** : 455-469.
- MITSUOKA T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora.* **1** : 3-24.
- MITSUOKA T. 1984. Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* **3** : 11-28.
- MODLER H. W., MC KELLAR R. C. and M. YAGUCHI. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23** : 29-41.
- MOORE W. E. C. and L. V. HOLDEMAN. Discussion of current bacteriological investigations of the relationships between intestinal flora, diet, and colon cancer. *Cancer research.* **35** : 3418-3420.
- MURPHY E., HUWYLER L. and M. DO CARMO DE FREIRE BASTOS. 1985. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J.* **4** : 3357-3365.
- MUTAI M. and R. TANAKA. 1987. Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora.* **6** : 33-41.
- MUTO A. and S. OSAWA. 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 166-169.
- NORD C.E., KAGER L. and A. HEIMDAHL. 1984. Impact of antimicrobial agents on the gastrointestinal microflora and the risk of infections. *Am. J. Med.* **76** : 99-106.
- OP DEN CAMP H. J. M., PEETERS P. A. M., OOSTERHOF A. and J. H. VEERKAMP. 1985. Immunochemical studies on the lipoteichoic acids of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. *J. Gen. Microbiol.* **131** : 616-668.

- ORLA-JENSEN S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*. **4** : 468-480.
- OWEN R.J., BECK A., DAYAL P. A. and C. DAWSON. 1988. Detection of genomic variation in *Providencia stuartii* clinical isolates by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms containing rRNA cistrons. *J. Clin. Microbiol.* **26** : 2161-2166.
- OWEN R. J., DESAI M. and S. GARCIA. 1993. Molecular typing of thermotolerant species of *Campylobacter* with ribosomal RNA gene patterns. *Res. Microbiol.* **144** : 709-720.
- OWEN R. J. and D. PITCHER. 1985. Currents methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. Chemical methods in bacterial systematics.
- PARGELLIS C. A., NUNES-DUBY S. E., MOITOSO DE VARGAS L. and A. LANDY. 1988. Suicide recombination substrates yield covalent lambda Int-DNA complexes and lead to the identification of the active site tyrosine. *J. Biol. Chem.* **263** : 7678-7685.
- PEBAY M., COLMIN C., GUEDON G., DE GASPERI C., DECARIS B. and J.-M. SIMONET. 1992. Detection of intraspecific DNA polymorphism in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by a homologous rDNA probe. *Res. Microbiol.* **143** : 37-46.
- PETSCHOW B. W. and R. D. TALBOTT. 1991. Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatric research*. **29** : 208-213.
- PICARD B., JOURNET-MANCY C., PICARD-PASQUIER N. and P. GOULLET. 1993. Genetic structures of the B2 and B1 *Escherichia coli* strains responsible for extra-intestinal infections. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 3079-3088.
- PICKUP R. W. 1991. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* **137** : 1009-1019.
- POCHART P., DEWIT O., DESJEUX J.-F. and P. BOURLIOUX. 1989. Viable starter culture, β -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **49** : 828-831.
- POUPARD J. A., HUSAIN I. and R. F. NORRIS. 1973. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* **37** : 136-165.
- POYARD-SALMERON C., TRIEU-CUOT P., CARLIER C. and P. COURVALIN. 1990. The integration-excision system of the conjugative transposon Tn1545 is structurally and functionally related to those of lambdoid phages. *Mol. Microbiol.* **4** : 1513-1521.

- PROCINO J. K., MARRI L., SHOCKMAN G. D. and L. DANEO-MOORE. 1988. Tn916 insertional inactivation of multiple genes on the chromosome of *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect Immun.* **56** : 2866-2870.
- RAMBAUD J.-C., BOUHNİK Y., MARTEAU P. and P. POCHART. 1993. Manipulation of the human gut microflora. *Proc. Nutr. Soc.* **52** : 357-366.
- RASIC J. Lj. 1983. The role of dairy foods containing bifido- and acidophilus bacteria in nutrition and health ? *North European Dairy J.* **49** : 80-88.
- RASIC J. Lj. and J. A. KURMANN. 1983. Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag. Basel.
- RAUCH P. J. G. and W. M. De Vos. 1994. Identification and characterization of genes involved in excision of the *Lactococcus lactis* conjugative transposon Tn5276. *J. Bacteriol.* **176** : 2165-2171.
- REDDI P. P., TALWAR G. P. and P. S. KHANDEKAR. 1988. Repetitive DNA sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of differential hybridization pattern with other Mycobacteria. *Int. J. Lepr.* **56** : 592-598.
- REED R.R. and N. D. F. GRINDLEY. 1981. Transposon-mediated site-specific recombination *in vitro*: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell.* **25** : 721-728.
- REGENSBURGER A., LUDWIG W. and K.-H SCHLEIFER. 1988. DNA probes with different specificities from a cloned 23S rRNA gene of *Micrococcus luteus*. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 1197-1204.
- REUTER G. 1963-64. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A.* **191** : 486-507.
- REUTER G. 1971. Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21** : 273-275.
- REUTER G. 1989. *Bifidobacterium* characteristics and classification. In : Les laits fermentés. Actualité de la recherche. John Libbey Eurotext Ltd. p. 49-58.
- ROBERTS M. C. and S. L. HILLIER. 1985. Comparison of Gram stain, DNA probe and culture for the identification of species of *Mobiluncus* in female genital specimens. *J. Infect. Dis.* **152** : 74-77.
- ROMOND M.-B., HAMZE M., ROMOND C. and P. BOURLIOUX. 1990. Etude des interactions hôte-*Bifidobacterium* chez la souris axénique : caractérisation partielle des facteurs bifidogènes du contenu intestinal. *Can. J. Microbiol.* **36** : 286-291.

- ROSSAU R., VANMECHELEN E., DE LEY J. and H. VAN HEUVERSWIJN. 1989. Specific *Neisseria gonorrhoeae* DNA-probes derived from ribosomal RNA. *J. Gen. Microbiol.* **135** : 1735-1745.
- ROY D., DUSSAULT F. and P. WARD. 1990. Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft.* **45** : 500-502.
- ROY D. and P. WARD. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69** : 739-749.
- ROY D. and P. WARD. 1993. Genomic fingerprinting of dairy-related *Bifidobacteria* by pulsed-field gel electrophoresis. Fourth Symposium on Lactic Acid Bacteria Genetics, Metabolism and Applications. Noorwijkerhout, the Netherlands, 5-9 Septembre 1993, poster H6-P151.
- SADOWSKI P. (1986), Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J. Bact.* **165** : 341-347.
- SALAMA M., SANDINE W. and S. GIOVANNONI. 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Env. Microbiol.* **57** : 1313-1318.
- SALYERS A. A., LYNN S. P. and J. F. GARDNER. 1983. Use of randomly cloned DNA fragments for identification of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bact.* **154** : 287-293.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. and T. MANIATIS. 1989. Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANGER F., NICKLEN S. and A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.
- SATO J., MOCHIZUKI K. and N. HOMMA. 1982. Affinity of the *Bifidobacterium* to intestinal mucosal epithelial cells. *Bifidobacteria Microflora.* **1** : 51-54.
- SCARDOVI V. 1986. Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore.
- SCARDOVI V., CASALICCHIO F. and N. VICENZI. 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** : 312-327.
- SCARDOVI V. and F. CROCIANI. 1974a. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** : 6-20.

- SCARDOVI V. and B. SGORBATI. 1974c. Electrophoretic types of transaldolase, transketolase and other enzymes in bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **40** : 427-440.
- SCARDOVI V., SGORBATI B. and G. ZANI. 1971a. Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* **106** : 1036-1039.
- SCARDOVI V. and L. D. TROVATELLI. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **15** : 19-29.
- SCARDOVI V. and L. D. TROVATELLI. 1969. 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. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2* **123** : 64-88.
- SCARDOVI V. and L. D. TROVATELLI. 1974b. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** : 21-28.
- SCARDOVI V. TROVATELLI. L. D., BIAVATI B. and G. ZANI. 1979a. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* : four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int J. Syst. Bacteriol.* **29** : 291-311.
- SCARDOVI V. TROVATELLI. L. D., CROCIANI F. and B. SGORBATI. 1969. Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium* : *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. *Archiv. Mikrobiol.* **68** : 278-294.
- SCARDOVI V., TROVATELLI L. D., ZANI G., CROCIANI F. and D. MATTEUZZI. 1971b. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21** : 276-294.
- SCARDOVI V. and G. ZANI. 1974d. *Bifidobacterium magnum* sp. nov. : a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* **24** : 29.
- SCARDOVI V., ZANI G. and D. TROVATELLI. 1970. Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch. Mikrobiol.* **72** : 318-325.
- SCHWARTZ E., KRÖGER M. and B. RAK. 1988. IS150 : distribution, nucleotide sequence and phylogenetic relationships of a new *E. coli* insertion element. *Nucleic Acids Res.* **16** : 6789-6802.
- SEBALD M., GASSER F. et H. WERNER. 1965. Teneur GC% et classification. Application au groupe des bifidobactéries et à quelques genres voisins. *Ann. Inst. Pasteur.* **109** : 251-269.

- SENGHAS E., JONES J. M., YAMAMOTO M, GAWRON-BURKE C and D. B. CLEWELL. 1988. Genetic organization of the bacterial conjugative transposon Tn916. *J. Bacteriol.* **170** : 245-249.
- SGORBATI B. 1979. Preliminary quantification of immunological relationships among the transaldolase of the genus *Bifidobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **45** : 557-564.
- SGORBATI B. and J. LONDON. 1982a. Demonstration of phylogenetic relatedness among members of the genus *Bifidobacterium* using the enzyme transaldolase as an evolutionary marker. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32** : 37-42.
- SGORBATI B. and V. SCARDOVI. 1979. Immunological relationships among transaldolases in the genus *Bifidobacterium*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **45** : 129-140.
- SGORBATI B., SCARDOVI V. and D. J. LeBLANC. 1982b. Plasmids in genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* **128** : 2121-2131.
- SGORBATI B., SCARDOVI V. and D. J. LeBLANC. 1986. Related structures in the plasmid profiles of *Bifidobacterium longum*. *Microbiologica.* **9** : 415-422.
- SGORBATI B., SMILEY M. B. and T. SOZZI. 1983. Plasmids and phages in *Bifidobacterium longum*. *Microbiologica.* **6** : 169-173.
- SIMON G. L. and S. L. GORBACH. 1986. The human intestinal microflora. *Dig. Dis. Sci.* **31** : 147S-162S.
- SIMON G. L. and S. L. GORBACH. 1987. Intestinal flora and gastrointestinal function, p. 1729-1746. *In* L. R. Johnson (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. Raven Press, New York.
- SIMON M., ZIEG J., SILVERMAN M., MANDEL G. and R. DOOLITTLE. 1980. Phase variation: evolution of a controlling element. *Science.* **209** : 1370-1374.
- STACKEBRANDT E. and C. R. WOESE. 1981. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related taxa. *Curr. Microbiol.* **5** : 197-202.
- STACKEBRANDT E. and O. CHARFREITAG. 1990. Partial 16S rRNA primary structure of five *Actinomyces* species : phylogenetic implications and development of an *Actinomyces israelii*- specific oligonucleotide probe. *J. Gen. Microbiol.* **136** : 37-43.
- STAM W. T and B. K. STULP. 1988. New Taxonomic Methods : DNA-DNA Hybridization. *In* *Methods in Enzymology*. Vol 167. Packer & Glazer (ed.) Academic Press, Inc. San Diego, California.

- STIRLING C. J., STEWART G. and D. J. SHERRATT. 1988. Multicopy plasmid stability in *Escherichia coli* requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination. *Mol. Gen. Genet.* **214** : 80-84.
- STULL T. L., LiPUMA J. J. and T. D. EDLIND. 1988. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of Bacteria : ribosomal RNA. *Journal of Infectious Diseases.* **157** : 280-286.
- SUNDSTRÖM L., RADSTRÖM P., SWEDBERG G. and O. SKÖLD. 1988. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *Sull* and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet.* **213** : 191-201.
- SZYBALSKY W. and V. BRYSON. 1952. Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.* **64** : 489-499.
- TANNOCK G. W., FULLER R., SMITH S. L. and M. A. HALL. 1990. Plasmid profiling of Members of the Family *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilli*, and *Bifidobacteria* to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* **28** : 1225-1228.
- TENOVER F. C. 1988. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clinical Microbiology reviews.* **1** : 82-101.
- TISSIER H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. Thèse, Paris.
- TRIEU-CUOT P., POYARD-SALMERON C., CARLIER C. and P. COURVALIN. 1993. Sequence requirements for target activity in site-specific recombination mediated by the Int protein of transposon Tn1545. *Mol. Microbiol.* **8** : 179-185.
- VAN DE PUTTE P., CRAMER S. and M. GIPHART-GASSLER. 1980. Invertible DNA determines host specificity of bacteriophage Mu. *Nature (London).* **286** : 218-222.
- VAN DER VLIET G. M. E., SCHUKKINK R. A. F., VAN GEMEN B., SCHEPERS P. and P. KLATSER. 1993. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 2423-2429.
- VANNEECHOUTTE M., ROSSAU R., DE VOS P., GILLIS M., JANNSENS D., PAEPE N., DE ROUCK A, FIERIS T., CLAYES G and K. KERSTERS. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93** : 227-234.
- VEERKAMP J. H., HOELEN G. E. J. M. and H. J. M. OP DEN CAMP. 1983. The structure of a mannitol teichoic acid from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **755** : 439-451.

- VEERKAMP J. H., LAMBERT R. and Y. SAITO. 1965. The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **112** : 120-125.
- VERGER J.-M., GRIMONT F., GRIMONT P. A. D. and M. GRAYON. 1987. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur-Microbiol.* **138** : 235-238.
- WAYNE L. G., BRENNER D. J., COLWELL R. R., GRIMONT P. A. D., KANDLER O., KRICHEVEVSKY M. I., MOORE L. H., MOORE W. E. C., MURRAY R. G. E., STACKEBRANDT E., STARR M. P. and H. G. TRÜPER. 1987. Report on the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37** : 463-464.
- WATABE J., BENNO Y. and T. MITSUOKA. 1983. *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov. : a new species isolated from the ceca of chickens. *Int J. Syst. Bacteriol.* **33** : 127-132.
- WEISBERG R. A. and A. LANDY. 1983. Site-specific recombination in phage lambda, p. 211-250. In R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl and R. A. Weisberg, ed., *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- WEGMÜLLER B., LÜTHY J. and U. CANDRIAN. 1993. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl. Env. Microbiol.* **59** : 2161-2165.
- WICKES B. L., HICKS J. B., MERZ W. G. and K. J. KWONG-CHUNG. 1992. The molecular analysis of synonymy among medically important yeasts within the genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.* **138** : 901-907.
- WOESE C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51** : 221-271.
- WOOLLEY R. C., PENNOCK A., ASHTON R.J., DAVIES A. and M. YOUNG. 1989. Transfer of Tn1545 and Tn916 to *Clostridium acetobutylicum*. *Plasmid.* **22** : 169-174.
- YAMAMOTO T., MOROTOMI M. and R. TANAKA. 1992. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *App. Environ. Microbiol.* **58** : 4076-4079.

7. ANNEXES

Type name, address, and telephone number of author who should receive correspondence in Box C and complete boxes A through F.

(For office use)

CAN EXOGENOUS BACTERIA COLONIZE THE COLONIC FLORA ? AN in vivo STUDY IN MAN. Y. Bouhnik, I. Mangin*, Ph. Pochart, N. Bisetti, JM. Simonet*, B. Decaris*, JC. Rambaud. INSERM U.290, Hôpital St-Lazare, Paris and *Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences, Vandoeuvre-les-Nancy, FRANCE.

The dominant anaerobic component of the indigenous intestinal microflora exerts resistance to colonization by exogenous microorganisms. We have recently shown that, under physiological conditions, exogenously administered *Bifidobacterium* sp (Bif), which is a natural component of the dominant colonic microflora, reached high colonic concentrations but did not colonize the human colon. The strain of Bif previously used was selected on antibiotics (AB) resistance characters and the aim of this present work was to study the fate of this selected Bif after colonic bacterial imbalance induced by these AB. Methods. Six healthy volunteers received for 6 days oral rifampicine (300 mg bid) and streptomycine (1000 mg/day), to which the selected Bif was resistant. The administration of selected Bif started 3 days later, in form of fermented dairy product (FDP) t.i.d. for 6 days. Stools were regularly collected throughout the study, which lasted 8 wks. The exogenous selected Bif and the total Bif (indigenous and exogenous) were enumerated using selective media, and identified on the basis of genetic characters, using the finger-print and ribotype methods. Results. Exogenous Bif rapidly appeared in stools, and reached a mean level of 8.8 log CFU/g. This level was maintained as long as the FDP was consumed. When its ingestion was stopped, the exogenous Bif gradually decreased and after 8 days cessation, was no longer detectable; total Bif remained at a high fecal level. Genotypic identification of exogenous Bif confirmed the colonic clearance of this microorganism. However, when this method was applied to indigenous Bif, significant modifications were noted, and some Bif species, not detectable before the AB administration, appeared in the dominant colonic flora. These effects remained stable throughout the study, i.e. 7 wks after the AB were stopped. We conclude that even under experimental conditions that could impair the resistance to colonization, exogenous bacteria cannot colonize the human colon. Moreover, the 6 days administration of antibiotics induces a significant and prolonged colonic flora alterations.

E. If submitted for Student Research Prize competition check here: _____
(Student's name) _____ (Sponsor's name) _____

F. If you are not a member of AGA or AASLD and would like to receive registration information, check here: ☐

Yoram BOUHNIC
INSERM U.290 - Hôpital Saint-Lazare
107, rue du Faubourg Saint-Denis
75010 PARIS, FRANCE

Telephone, Office: _____ Home: _____
(area code) (area code)

A. ABSTRACT DESCRIPTORS

A numbered list of abstract descriptors appears on the reverse side of this form. Please enter below the number of the descriptor you have circled on the reverse side which best fits the subject of your abstract. DO NOT SELECT MORE THAN ONE DESCRIPTOR.

DESCRIPTOR NUMBER 57

B. COST OF PUBLICATION

Payment enclosed (\$40.00)

Check no. _____
(payable to W.B. Saunders Company)

Payment delayed (\$50.00)

Purchase order no. _____
Issued by _____

(Institution name)

A copy of this abstract *must* be attached to original purchase order for identification. Payment must be made in U.S. currency. No payment required for student research abstracts.

ALL ABSTRACTS SUBMITTED ARE PUBLISHED

C. Poster Presentation Only ☒
(video not allowed)

D. IMPORTANT

The principal author affirms that the material herein: 1) will not have been published as an article by May 10, 1992 or have been presented in the U.S. at a national meeting of a national society. 2) that if human subjects were exposed to risks not required by their medical needs, the study was approved by an appropriate committee or, if no such committee was available and informed consent was needed, it was obtained in accordance with the principles enunciated in "The Belmont Report: Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research," U.S. Government Printing Office 1983-381-132:3205 or 3) any animal studies conform with the "Guiding Principle in the Care and Use of Animals" of the American Physiological Society.

(Signature of Principal Author)

DO NOT FOLD THIS ABSTRACT FORM,
mail with one (1) copy (Xerox or equivalent) to
AASLD Abstracts
Black Incorporated
6900 Grove Road
Thorofare, NJ 08086-9447

Abstracts must be received by December 13, 1991

Revised September 1991

LONG TERM ALTERATIONS OF THE COLONIC BACTERIAL FLORA INDUCED BY ANTIBIOTICS.

Y. BOUHNİK, B. FLOURIE, I. MANGIN*, J.-M. SIMONET*, N. BISETTI, P. MARTEAU, P. POCHART, B. DECARIS* and J. C. RAMBAUD.

INSERM U290, Hôpital St Lazare, 75010 Paris et *Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université de Nancy I, BP 239, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Antibiotics (AB) can induce important alterations of the colonic flora, usually considered reversible after the AB withdrawal. Our aim was to study the effects of AB and viable transiting microorganisms on the fecal flora. Methods : 6 healthy volunteers received for 6 d oral rifampicin (300mg bid) and streptomycin (1000mg/d). Three d after the AB administration was started, they ingested 375g/d of fermented milk containing 10^9 AB resistant Bifidobacterium (ABRB) for 6 d. Stools were regularly collected throughout the study, which lasted 8 wk. The ABRB and total bifidobacteria (endogenous and exogenous) were enumerated using selective media, and identified on the basis of genetic characters, using fingerprint and ribotype methods. Results : In all volunteers, endogenous bifidobacteria decreased 48 h after the AB were started. ABRB were recovered 24 h after its ingestion at a mean level of 6×10^8 /g stool; this level was maintained as long as the fermented milk was consumed. In addition, in 2 volunteers, ABRB persisted at this high level throughout the study, i.e. 7 wk after the AB cessation. However, genotypic analysis of the recovered ABRB in stools showed that it was different both from ingested ABRB and from dominant pre-antibiotherapy fecal bifidobacteria. Conclusion : Our results confirmed that ingested Bifidobacterium can compensate the rapid decrease of endogenous bifidobacteria induced by AB, without colonizing the human colon. While studying the effects of viable transiting microorganisms on the colonic flora after AB treatment, we found that AB could induce significant and sustained alterations of the endogenous dominant colonic flora, only demonstrated by using molecular genetic tools. These alterations could significantly changed the colonic bacterial metabolism.

IDENTIFICATION OF *BIFIDOBACTERIUM* STRAINS OF HUMAN ORIGIN BY RIBOSOMAL RNA GENE RESTRICTION PATTERNS AND USE OF A SPECIFIC NUCLEIC PROBE.

MANGIN I., BOURGET N., BOUHNİK Y[†]., SIMONET J.M[‡] and DECARIS B.

Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université de Nancy I, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[†] INSERM U290, Hôpital Saint-Lazare, 75010 Paris.

[‡] present address : Institut de Génétique et Microbiologie, Université de Paris-Sud, Bât 400, 91405 Orsay.

Hybridization with a ³²P 23S rDNA probe cloned from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (1) on DNA of 121 *Bifidobacterium* isolates collected from intestinal flora of five volunteers, permitted to follow the *Bifidobacteria* populations belonging to the dominant colonic flora in the course of time. The aim of the clinic experiment was to study the fate of an antibiotic resistant exogenous *Bifidobacterium* strain after colonic bacterial imbalance induced by antibiotics. On the 121 strains characterized by their ribotype, only 11 different ribosomic patterns were obtained, in addition with that of the exogenous strain which disappears after stopping administration. None was identical with those of the collection strains, nevertheless, six of the patterns shared homologies with those of *B. longum* (several common ribosomic bands, which were also found in our two strains of *B. longum*). Likewise, two of the five remaining patterns displayed similarities with those of *B. adolescentis*. The use of a specific probe, cloned from the type-strain of *B. adolescentis* species allowed us to confirm ribotype classification and to identify two other *B. adolescentis* strains in the three remaining patterns. The present results showed that antibiotic treatment had caused sustained alterations in *Bifidobacteria* dominant flora : some strains were eliminated while others, which certainly belong to sub-dominant flora, replaced them. Even two months after the antibiotic administration was stopped, the colonic flora remains different from the one observed before treatment. Moreover, antibiotherapy had not permitted colonic colonization of the exogenous strain.

(1) Pébay et al ; 1992.

IDENTIFICATION DE SOUCHES DE *BIFIDOBACTERIUM* D'ORIGINE HUMAINE

MANGIN I., BOUHNİK Y., SIMONET J.M. & DECARIS B.

Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université de Nancy I, BP 239, Vandoeuvre-lès-Nancy

L'inventaire de la flore intestinale dominante de 5 sujets humains a permis d'étudier 130 isolats différents de bifidobactéries. Dans le but d'une caractérisation génotypique, plusieurs méthodes moléculaires ont été utilisées : celle du "fingerprint" (caractérisation des souches par le profil de restriction de leur ADN), celle du ribotypage et enfin, la recherche et l'utilisation de sondes nucléiques spécifiques.

Sur la base du fingerprint, on met en évidence une très grande variabilité de ces souches, en particulier au niveau des plasmides. Sur la base des ribotypes, l'hybridation avec la sonde ribosomique hétérologue I41 (1) les répartit en 10 profils différents qui ont été comparés à ceux réalisés au laboratoire à partir des souches de collection. Six d'entre eux constituent un groupe de souches présentant des similarités (bandes communes) avec les souches de *B. longum* ATCC15707 et 15708. Un 7ème profil présente des similitudes avec celui de *B. adolescentis* ATCC15703. Nous avons commencé à constituer une collection de sondes spécifiques pour les différentes espèces. Actuellement, nous possédons une sonde *B. longum* qui donne des hybridations similaires sur les 6 profils et les 2 souches de collection de *B. longum*, confirmant ainsi les résultats obtenus avec les ribotypes. Une sonde spécifique à l'espèce *B. adolescentis* confirme aussi l'indication donnée par les ribotypes, hybridant également sur un des profils non encore identifié.

Le polymorphisme de restriction allié au ribotypage et à l'utilisation de sondes spécifiques a donc permis l'identification de bifidobactéries intestinales d'origine humaine et l'obtention pour le laboratoire de 6 nouvelles souches de *B. longum* et 2 de *B. adolescentis*, les 2 profils restants étant encore non identifiés au niveau génotypique. Nous avons pu montrer la coexistence chez un même sujet de plusieurs (jusqu'à 4) souches différentes au niveau génotypique, appartenant à la même espèce. D'autre part, ces méthodes ont également permis de constater un changement de flore dominante suite à une antibiothérapie (2).

(1) Pébay M., Colmin C., Guédon G., De Gaspéri C., Decaris B. and Simonet J-M. Research in Microbiology. 1992. 143, 37-46.

(2) Bouhnik Y. Communication orale. CBL-92.

ANALYSE PHYLOGENETIQUE INTRA ET INTERSPECIFIQUE DES BACTERIES DU GENRE *BIFIDOBACTERIUM*

BOURGET Nathalie, MANGIN Irène et DECARIS Bernard

Laboratoire de Génétique et Microbiologie, associé INRA, Université de Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Depuis la description de la première souche du genre *Bifidobacterium* par Tissier (1900) et malgré de nombreuses études, des ambiguïtés persistent tant au niveau de la classification (genre-espèce) que de l'identification.

L'étude de la région (appelée IGS) séparant les gènes ribosomiques 16S et 23S a été entreprise au sein du genre *Bifidobacterium* afin d'établir les relations phylogénétiques intra et interspécifiques.

Dans ce but, l'IGS est amplifiée par la technique de Polymerase-Chain-Reaction à l'aide de deux amorces situées respectivement à l'extrémité 3' du gène 16S et à l'extrémité 5' du gène 23S, puis séquencée. Pour la majorité des souches étudiées (21/22) un seul produit (de taille comprise entre 250 et 550 bp) est généré.

L'analyse informatique des données de séquence a permis de montrer que toutes les souches étudiées de l'espèce *B. breve* sont très proches entre elles, de même que celles appartenant respectivement aux espèces *B. longum* et *B. adolescentis*. Seule la souche *B. adolescentis* 11146 présente une IGS très différente des autres souches de la même espèce, voire du genre *Bifidobacterium*. De plus, l'analyse des données concernant l'espèce *B. infantis* montre que les souches de cette espèce sont dispersées au sein du genre et n'auraient pas d'ancêtre commun proche.

Le résultat est présenté sous forme d'un arbre phylogénétique établi selon la méthode de parcimonie.

POLYMORPHISME DE RESTRICTION ET TAILLE DU GENOME DE SOUCHES DE BIFIDOBACTERIES

BOURGET, N., MANGIN, I., DECARIS, B. et SIMONET, J.M.
Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université Nancy I, BP 239,
Vandœuvre-lès-Nancy Cédex

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* représentent une part importante de la flore intestinale de l'homme. De plus, elles présentent un intérêt économique certain dans le domaine agro-alimentaire. Cependant, la génétique de ces bactéries est très peu connue. Cette étude fondamentale constitue donc un préalable à toute amélioration rationnelle des souches.

L'analyse de l'ADN total de 20 souches appartenant à 8 espèces différentes montre que chacune présente un profil de restriction caractéristique. Cette caractérisation a été confirmée par utilisation de sondes ribosomiques.

De plus, l'analyse des profils de restriction permet de révéler un polymorphisme intraspécifique, confirmé dans certains cas par ribotypage. Cette dernière méthode a mis en évidence la présence de 3 loci ribosomiques dans l'espèce *Bifidobacterium breve*.

L'analyse du contenu plasmidique de 5 souches de *B. breve* montre l'existence d'un plasmide circulaire de 5,6 kb, présent dans deux de ces souches. Des formes topoisomériques de ce plasmide ont pu être visualisées. Sa carte de restriction a été déterminée pour 6 enzymes. L'utilisation de ce plasmide comme sonde sur des profils d'ADN natifs des 3 autres souches de *B. breve* confirme son absence à l'état extra-chromosomique.

La technique d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) a été optimisée sur les bifidobactéries. Les enzymes utilisées (*AseI*, *DraI*, *SpeI* et *XbaI*) ont été choisies afin de générer un nombre restreint de fragments. Les profils d'ADN obtenus par cette technique confirment les données de polymorphisme interspécifique et intraspécifique. Cette méthode a, de plus, permis une bonne estimation de la taille du génome de deux souches différentes de *Bifidobacterium breve* (IP6466 et IP6469).

55

Mots-clés : *Bifidobacterium*, PFGE, Chromosome.



D 095 063193 8

Identification of bacterial species or strains is based on evidence of intraspecific and intrageneric genetic polymorphism. The aim of this study was to find methods for revealing the genetic polymorphism in *Bifidobacterium* genus. Restriction patterns permitted the characterization of all strains tested. Indeed, restriction length fragment polymorphism is inter- and intra-specific. A faster comparison of strains using a specific nucleic probe revealing the ribosomal RNA genes was then employed. The ribosomal patterns allowed all tested strains to be differentiated. Moreover, identical-molecular-size bands for strains of the same species generally permitted regrouping of strains within species. These molecular methods permitted the *Bifidobacterium* populations belonging to the dominant colonic flora of five human volunteers to be monitored over time. We report also the identification of four *Bifidobacterium* species using species-specific DNA probes isolated from recombinant DNA libraries of strains *B. longum* ATCC15707T, *B. adolescentis* CIP64.59T, *B. bifidum* CIP64.65 and *B. animalis* ATCC25527T. A fragment hybridizing specifically with DNA from strains of the same species was isolated. It was then hybridized with restriction digests in order to study the genome polymorphism. One of these, the fragment L6/45, specific for *B. longum* strains, hybridized with several fragments instead of one as expected. Sequence of this fragment revealed the presence of an ORF which had an amino acid sequence similar to the site specific recombinase of lambda integrase family.

