

50376  
1982  
93

50376  
1982  
93

N° d'ordre : 1002

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

# MÉMOIRE

pour l'obtention du titre de

## DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

option Biochimie

par

(SEKA) ASSY

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FACTEURS BIFIDIGÈNES PRÉSENTS DANS LE LAIT MATERNEL



soutenu le 15 Novembre 1982 devant la commission d'examen

MM. les Professeurs : J. MONTREUIL, Président  
G. SPIK, Rapporteur  
G. STRECKER, Rapporteur  
J. MIZON  
C. ROMOND

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de LILLE, sous la direction du Professeur J. MIZON ; avec la collaboration du Laboratoire de Bactériologie du Professeur C. ROMOND du même établissement et du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de LILLE I. du Professeur J. MONTREUIL.

Il a bénéficié d'une aide de l'O.M.S. sous forme de bourse qui m'a été attribuée (numéro d'imputation : AF/IVC/PTR/099/RB/81), ce qui nous a permis de réaliser ce travail. Nous adressons à cet organisme nos vifs remerciements.

MADAME F. ERB, Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Lille, co-promotrice de cette thèse.

J'ai été très sensible à l'attention particulière qu'elle prête à mes problèmes, durant toute ma formation de 3ème cycle.

Sans elle, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé.

Les mots me manquent pour lui témoigner toute ma reconnaissance. Qu'il me soit permis de lui adresser ma profonde gratitude un très grand respect et surtout mes vifs remerciements.

A LA MEMOIRE DE MON PERE,

Trop tôt disparu, il n'aura pas la joie de connaître cette thèse  
que sa vie de travail et de sacrifice m'a permis d'entreprendre.  
En hommage à son courage et son honnêteté.

A MA MERE,

Avec toute mon affection et ma profonde reconnaissance.

A MA FEMME MARIE-AGNES,

Qu'elle trouve dans ce travail, l'expression de mon amour.  
Que le bonheur guide toujours notre chemin.

A MES ENFANTS,

Avec toute ma tendresse.

A MON PRESIDENT DE JURY,

- Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

- . Professeur titulaire de la chaire de chimie biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I. ;
- . Chef du Service de Biochimie cellulaire à l'Institut de Recherches sur le cancer de LILLE.

qui m'a fait le très grand honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

L'étendue de vos connaissances et la haute qualité de votre enseignement m'ont attiré vers la Biochimie.

Veillez trouver dans ce modeste travail, l'hommage de mon profond respect et de ma très grande admiration.

- Mademoiselle le Professeur G. SPIK,

. Professeur de chimie biologique à l'Université des Sciences  
Techniques de LILLE I. ;

. Attachée de Recherche au C.N.R.S.

Qui m'a fait le très grand honneur de siéger parmi  
mes juges.

Pendant plusieurs années, j'ai eu le privilège d'ap-  
précier la haute qualité de votre enseignement.

En jugeant ce modeste travail, veuillez vous montrer  
indulgente et soyez assurée de ma très vive recon-  
naissance et de mon profond respect.

- Monsieur G. STECKER,

. Maître de Recherche au C.N.R.S., du Laboratoire de chimie  
biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir  
apporté votre concours et fait bénéficier de votre  
compétence scientifique en discutant et corrigeant  
ce travail.

Que ce mémoire soit l'occasion pour moi de vous  
formuler ma profonde gratitude et mes vifs  
remerciements.

- Monsieur le Professeur J. MIZON,

. Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de LILLE  
(Université de LILLE II).

Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé pendant deux ans et fait partager votre enthousiasme pour la Recherche.

Votre aide toujours bienveillante et votre disponibilité permanente ont permis la réalisation de cette thèse.

Sous votre direction, j'ai appris la rigueur et la méthode si nécessaires en matière de Recherche.

Qu'il me soit permis de vous formuler dans ce modeste écrit, mes vifs remerciements et ma très grande admiration.

- Monsieur le Professeur C. ROMOND,

. Professeur de Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie  
de LILLE (Université de LILLE II).

Vous m'avez fait l'honneur de guider, dans le cadre  
de votre laboratoire, la partie bactériologique de ce  
travail.

En plusieurs circonstances, vous avez comblé mes  
lacunes et redressé mes erreurs.

Permettez moi de vous témoigner ici mon profond  
respect et ma très profonde gratitude.

Avec ce travail, je tiens à formuler mes plus vifs remerciements :

- à tous les membres du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de LILLE pour leur accueil et aide toujours bienveillants, particulièrement B. Malika et surtout Madame C. Mizon qui, en plusieurs circonstances a bien voulu me proposer son service.
  
- à tous les membres du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de LILLE, en particulier :  
feu Mademoiselle Bernadette  
et Madame Neut C., pour leur immense contribution à la réalisation de ce travail.
  
- au personnel du Lactarium de l'Institut Pasteur de LILLE, pour nous avoir fourni le lait maternel.
  
- à Madame Cordier, pour avoir accepté si gentiment de dactylographier cette thèse.

GENERALITES.

INTRODUCTION.

1

CHAPITRE I. : MISE AU POINT SUR LA FLORE FECALE BIFIDE.

5

A) - Caractéristiques de la flore fécale du nourrisson :

6

1°/ - Nature de la flore fécale du nourrisson alimenté au lait maternel ;

2°/ - Nature de la flore fécale du nourrisson élevé au lait de vache ;

3°/ - Conclusion.

B) - Etude biologique du B. bifidum :

9

I. Classification.

9

II. Identification :

10

1°/ - Morphologie

2°/ - Caractéristiques physiologiques et biochimiques :

a) - Physiologie ;

b) - Besoins nutritionnels ;

c) - Caractères biochimiques.

III. Recherche du B. bifidum dans les selles du nourrisson :

15

1°/ - Milieux de culture

2°/ - Mode opératoire :

a) - Préservation des Bifidobactérium ;

b) - Technique de recherche du B.b. utilisée par NEUT,  
ROMOND et BEERENS.

C) - Implantation du B. bifidum dans l'intestin du nouveau-né :

17

1°/ - Implantation naturelle ;

2°/ - Implantation artificielle ;

3°/ - Conclusion.

D) - <u>Signification de la flore fécale à B. bifidum dominant chez le nourrisson :</u>	19
1°/ - Rôle présumé de B. bifidum :	
a) - Emploi thérapeutique de B.b.	
b) - Action préventive de la flore à B.b.	
2°/ - Controverses autour de la question de B.b.	
3°/ - Mécanisme d'action de B.bifidum :	
a) - Par la production d'acides, il serait antagoniste de la flore de putréfaction ;	
b) - Rôle métabolique de B. bifidum.	
4°/ - Pourquoi persévérer dans l'exploration de la flore bifide dont le rôle est encore très contesté.	

E) - <u>Conclusion.</u>	25
-------------------------	----

## CHAPITRE II. : CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES FACTEURS BIFIDIGENES. 26

A) - <u>Introduction.</u>	27
B) - <u>Méthodes de mise en évidence de l'activité bifidigène :</u>	27
I. <u>Méthode en milieu liquide :</u>	27
1°/ - Méthode de GYORGY et Coll.	
2°/ - Méthode de BEZKOROVAINY	
II. <u>Méthode en milieu solide de ROMOND, NEUT, et BEERENS.</u>	31
C) - <u>Facteurs bifidigènes :</u>	34
I. <u>Le lactose ;</u>	34
II. <u>Le lactulose ;</u>	35
III. <u>Le facteur bifidus I de GYORGY :</u>	36
1°/ - Mise en évidence ;	
2°/ - Relation structure et activité ;	
3°/ - Mode d'action ;	
4°/ - Les oligosaccharides du lait maternel :	

a) - Les oligosaccharides neutres ;	
b) - Les oligosaccharides acides :	
∞) - relation des oligosides neutres avec les substances de groupes sanguins.	
c) - Les glycoprotéines et glycopeptides du lait de femme.	
5°/ - Application clinique du facteur de GYORGY.	
IV. - <u>Autres composés pourvus d'activité bifidigène :</u>	56
1°/ - Facteur bifidus II de RAYNAUD	
a) - Etude de la nature chimique du BF II	
D) - <u>Conclusions.</u>	60
CHAPITRE III. : TRAVAUX PERSONNELS.	61
<hr/>	
A) - <u>Introduction.</u>	62
B) - <u>Préparation de la fraction active du lait maternel :</u>	62
I. - <u>Etudes préliminaires</u>	62
II. - <u>Fractionnement du lait maternel :</u>	63
1°/ - Précipitation de la caséine :	
a) - Mode opératoire	
b) - Résultats.	
2°/ - Fractionnement au sulfate d'ammonium :	
a) - Mode opératoire	
b) - Résultats.	
3°/ - Précipitation à l'acide perchlorique :	
a) - Mode opératoire	
b) - Résultats.	
III. - <u>Etude de la fraction active du lait maternel :</u>	70
1°/ - Concentration :	
a) - Ultrafiltration ;	
b) - Lyophilisation	
2°/ - Traitement par la chaleur	

3°/ - Hydrolyse acide

4°/ - Conclusion.

IV. - Chromatographie par gel filtration de la fraction active de lait de femme.

74

1°/ - Gel filtration sur biogel P6 :

a) - Mode opératoire ;

b) - Résultats.

2°/ - Gel filtration sur biogel P2 :

a) - Mode opératoire ;

b) - Résultats.

V. - Fractionnement de la fraction active FA du lait maternel par chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

77

1°/ - Chromatographie sur résine échangeuse de cations, Dowex

50 x 8, forme acide :

a) - Mode opératoire ;

b) - Résultats

2°/ - Chromatographie sur résine échangeuse d'anions Dowex 1 x 8,

forme acétate :

a) - Mode opératoire

b) - Résultats.

VI. - Conclusion.

82

C) - Etude de l'activité bifidigène de la fraction FA du lait de femme sur la croissance

84

des souches appartenant au genre bifidobactérium :

1°/ - Mode opératoire

2°/ - Résultats.

D) - <u>Etude structurale de la fraction FA de lait humain :</u>	87
I. - <u>Définition du motif structural bifidigène :</u>	87
a) - Etude de l'activité bifidigène des oligosides du lait de femme de structure connue :	
1°/ - Mode opératoire ;	
2°/ - Résultats.	
b) - Dégradation ménagée du lacto-N-tétraose :	
1°/ - Hydrolyse acide partielle	
2°/ - Désacétylation par hydrzzinolyse :	
a. Réduction par $BH_4K$	
b. Désacétylation	
c. Résultats.	
II. - <u>Recherche du motif structural bifidigène dans la fraction FA de lait humain :</u>	101
1°/ - Détermination de la composition en oses par chromatographie en phase gazeuse :	
a. Mode opératoire	
b. Résultats.	
2°/ - Réduction du produit FA pour $BH_4K$	
3°/ - Hydrolyse acide ménagée :	
a. Avec l'acide trifluoroacétique ;	
b. Avec l'acide sulfurique.	
4°/ - Conclusion.	
<u>CONCLUSIONS.</u>	107
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	110
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	118

## A B R E V I A T I O N S   U T I L I S E E S

---

---

### GLUCIDES

gal	: galactose
glc	: glucose
Fuc	: fucose
Man	: mannose
glcN	: glucosamine
ManNAC	: N-acétyl Mannosamine
glcNAC	: N-acétyl glucosamine
NANA	: Acide N-acétyl neuraminique
NeuAC	: Acide neuraminique

### ACIDES AMINES

Val	: valine
Asn	: asparagine
gln	: glutamine
-Ⓟ	: radical phosphate.

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

---

---

Il a été établi par l'observation clinique que les nourrissons alimentés au sein souffrent moins de troubles digestifs, de diarrhées infectieuses et ont un moindre taux de mortalité et de morbidité que les nouveau-nés élevés au lait de vache ou aux laits artificiels. Les études statistiques de GYORGY (49) sont à cet égard démonstratives.

Il apparaît que le mécanisme protecteur est très complexe et fait intervenir essentiellement :

- des facteurs chimiques dont les plus importants paraissent être les immunoglobulines A de sécrétion (IgAs), la lactotransferrine et le lysozyme ;
- des facteurs microbiens représentés par l'espèce Bifidobacterium bifidum, spécifique des selles de nourrissons alimentés au lait maternel  
BEERENS, ROMOND et NEUT (5).

Ces deux types de facteurs semblent d'ailleurs agir en étroite association.

Le but de ce travail est d'étudier les facteurs bifidigènes contenus dans le lait de femme qui favorisent spécifiquement la croissance de B. bifidum. En leur absence, cette souche est incapable de se développer.

La connaissance de leur nature chimique pourrait permettre de comprendre le rôle exact joué par la flore bifide et conduire éventuellement à leur préparation par synthèse chimique ou par voie microbiologique, afin de lutter efficacement contre les diarrhées infectieuses des nourrissons si redoutables en bas âge.

Après avoir fait le point des nombreux travaux qui sont parus sur cette question, nous nous sommes attachés à isoler à partir du lait humain, une fraction contenant l'essentiel de son activité biologique. Celle-ci a été ensuite purifiée à l'aide des techniques classiques de chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions. Enfin, nous avons cherché à préciser la nature chimique du motif structural responsable de cette activité biologique.

TYPE D'ALIMENTATION	NOMBRE DE CAS	MORTALITE p. 1000	MORBIDITE p. 1000	MORTALITE PAR MORBIDITE p. 100
- Sein	971	10,2	223,4	4,6
- Mixte	1441	25,7	464,2	5,5
- Artificielle	854	57,3	573,7	10,0

TABLEAU 1. - Taux de morbidité et de mortalité chez les enfants nourris au sein ou recevant une alimentation mixte ou artificielle (GYÖRGY P. cité par MONTREUIL J. -94-).



G E N E R A L I T E S

---

---

C H A P I T R E I. MISE AU POINT SUR LA FLORE FECALE BIFIDE

---

---

#### A. - Caractéristiques de la flore fécale du nourrisson.

-----

Le tube digestif du nouveau-né, stérile à la naissance, est envahi en quelques jours par des espèces microbiennes variées. On peut distinguer parmi celles-ci :

- des germes potentiellement pathogènes ;
- des germes saprophytes dont certains sont bénéfiques pour l'hôte. Parmi ces derniers, *Bifidobacterium bifidum* (B.b.) semble jouer un rôle particulièrement intéressant pour le nourrisson.

#### 1°/ - Nature de la flore fécale du nourrisson alimenté au lait maternel :

Les selles des enfants nourris au sein présentent un aspect granuleux, une odeur aigrelette, un pH acide (4,8 à 5,2) caractéristique NEIMANN et Coll. (100). Ceci est sans doute en rapport avec la composition particulière de la flore fécale de ces derniers qui est formée à 90% par *B. bifidum* LEVESQUE (80). Ceci avait été mis en évidence par les travaux de NEIMANN et Coll., SMITH et Coll. (136, 137), TISSIER (144, 145) et plus récemment par ROMOND, BEERENS et NEUT (126) qui trouvent un nombre de l'ordre de  $10^{10}$  par gramme de selles contre  $10^8$  bactéries par gramme de matières fécales pour les Entérobactériaceae.

Toutefois, le B.b. perd sa prédominance dans les selles dès que l'on passe à l'allaitement mixte ou au lait de vache, au profit des Entérobactériaceae (ROMOND, BEERENS, NEUT et MONTREUIL (126), avec un taux de  $10^{10}$  *E. coli* par gramme de selles, alors que le nombre des *B. bifidum* devient mineur. Quant au pH des selles, il se situe à des valeurs proches de celles de l'adulte pH 6,5, BULLEN et WILLIS (19). Selon LEVESQUE (81), quand le lait de femme représente 1/3 ou 1/4 de la ration alimentaire de l'enfant, le B.b. disparaît. Les derniers auteurs pensent que les B.b. ne sont pas responsables des conditions particulières de l'intestin des nourrissons élevés au sein, mais que c'est le tube digestif qui offre un biotope tel qu'il se produit une sélection des *Bifidobacterium*. Ils suggèrent que le taux élevé du lactose, la faible teneur en protéines et le pouvoir tampon inférieur

du lait maternel donnent des conditions plus favorables au développement des Bifidobactérium. Au contraire, les autres bactéries sont plus ou moins inhibées par la teneur élevée en lactotransferrine ainsi que par la présence d'anticorps spécifiques (IgAs).

LEVESQUE J., AICARDI P. et GAUTIER (79) confirment que la bonne adaptation du métabolisme du lait de femme au tube digestif du nourrisson est responsable de la flore bifide.

## 2°/ - Nature de la flore fécale du nourrisson alimenté au lait de vache :

L'alimentation artificielle ou le lait de vache amène une diversification de la flore intestinale chez le nouveau-né.

Les selles prennent un aspect caractéristique proche de celles de l'adulte. Elles sont d'une consistance ferme avec une odeur putride et un pH compris entre 6,0 et 7,0 (NEUT et Coll. (98). L'examen microbiologique révèle un nombre élevé :

- d'Entérobactéries  $10^6$  à  $10^8$  cellules par gramme de selles ;
- d'Entérocoques :  $10^7$  à  $10^9$  bactéries par gramme de selles ;
- d'Anaérobies gram négatifs :  $10^7$  à  $10^8$  bactéries/g de selles.

De temps à autre, Bactéroïdes et Clostridium apparaissent favorisant l'alcalinisation du milieu et la putréfaction TASSOVATZ et KOTSITCH (138). Les Bifidobactérium sont également présents, mais à un taux inférieur à celui de l'enfant nourri maternellement. Ils représentent en moyenne 1% de la flore totale.

Dans ces conditions, on est en droit de se demander si le lait de vache s'oppose à la multiplication des Bifidobactérium. Beaucoup d'auteurs l'admettent et attribuent ce fait à la richesse en calcium et à la richesse en protéines du lait de vache. TORNARELLI et Coll. (147) trouvent que les graisses du lait de vache sont aussi un élément inhibiteur des B.b..

Pour confirmer cette affirmation, LEVESQUE (80, 81) a rapporté les conclusions des travaux faits par GYORGY aux Etats Unis et qui portent sur le rôle des lipides présents dans le lait de vache. Ce dernier remplace dans le lait de vache, ses graisses par des huiles végétales riches en acides gras non saturés : acide linoléique et acide linoléique.

Et selon LEVESQUE, les laits ainsi obtenus auraient permis une implantation du B. b. comparable à celle de l'allaitement maternel. Mais, de l'aveu de ce dernier, ces laits ne semblent pas d'une innocuité absolue. Comme par ailleurs, le métabolisme du lait de vache est incomplet dans le tube digestif du nourrisson d'après LEVESQUE, il est possible que toutes ses qualités bifidigènes ne s'expriment pas dans ces conditions.

3°/ - Conclusion :

Il ressort donc de cette opposition entre les deux types d'allaitement que :

- le Bifide se multiplie jusqu'à devenir l'hôte prédominant des selles en cas d'allaitement maternel ;
- l'allaitement artificiel ou mixte empêche son développement.

Il reste à savoir si cette différence influe sur la bonne santé du nourrisson.

B. - Etude biologique du *Bifidobactérium bifidum* :

---

I. - Classification :

Depuis 1899, la terminologie de ce genre a subi plusieurs modifications. Elles ont d'abord été confondues avec les Bactéroïdes, puis ensuite avec les *Lactobacillus*, ce qui explique les nombreuses terminologies que l'on trouve dans la littérature :

- *Bacillus bifidus Communis* (TISSIER, 1900) ;
- Bactéroïdes *bifidus* (CASTELIANI et CHALMERS, 1919) ;
- *Lactobacillus bifidus* (KUIP et RETTGER, 1924) ;
- *Bifidobactérium bifidum* (ORIA-JENSEN, 1924).

Les Bifidobactéries sont désormais regroupées dans un genre propre intitulé : "Bifidobactérium", du latin *Bifidus* = divisé et du grec : *baktérion* = baton.

Ce genre comprend 11 espèces parmi lesquelles : *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis* sont celles que l'on trouve souvent dans les selles d'enfants ou d'adultes. *B. bifidum* est l'espèce spécifique des selles des nourrissons alimentés au lait de femme. La souche type de cette dernière est celle de TISSIER (ou souche Ti) qui est entretenue en collection. Mais elle présente quelques réactions bien particulières du fait de ses conditions de conservation.

Quant à *B. bifidus*, variété *Pennsylvanicus* (var Penn) c'est une souche mutante, particulière de *B. bifidum*. Elle a été isolée pour la première fois par GYORGY et Coll. (44) à partir des selles d'enfants ou de sécrétions vaginales de femmes enceintes.

Les *Bifidobactérium* représentent un groupe homogène, individualisé par leur pourcentage de guanine-cytosine qui est de  $60,1 \pm 0,33\%$  contre moins de 50% pour les *Lactobacillus* SCARDOVI et Coll. (128, 129).

## II. - Identification :

Elle repose sur les caractères suivants :

### 1°/ - Morphologie :

B. bifidum est un bâtonnet asporulé, immobile, acillé gram-positif ayant une longueur de 2 à 5  $\mu\text{m}$ , une épaisseur de 0,5  $\mu\text{m}$  à 0,7  $\mu\text{m}$  PREVOT (117). Il est soit isolé, soit groupé en paire ou bien en amas. Ses contours sont irréguliers, ondulés avec des extrémités soit effilées, soit renflées en massue ou souvent bifurquées.

Son polymorphisme prononcé a donné lieu à la description de différentes formes : fines, épaisses, bifides, en "Y" ou en "V" qui dépendent des conditions culturales et nutritionnelles. HAYWARD et Coll. (164) ont observé que si les cultures de B.b. sont répétées, on note moins de polymorphisme avec prédominance de la forme en bâtonnet.

Les colonies présentent des formes variées ; on y distingue trois types R, S, M. Elles ont un centre jaunâtre d'aspect porcelainé, visible à l'examen du tube par transparence sur fond éclairé (89). Par ce caractère, elles se différencient des colonies lenticulaires et régulières que donnent le colibacille et l'entérocoque en gélose profonde. BEERENS, GERARD et GUILLAUME (4) pensent que l'aspect morphologique des B.b. n'est pas toujours caractéristique du groupe. Le seul intérêt de la morphologie, selon ces auteurs, réside dans la différenciation entre Bifidobactérium et Actinomycès. En aucun cas, les premiers ne donnent de croissance mycélienne, alors que les seconds le font.

### 2°/ - Caractéristiques physiologiques et biochimiques :

#### a) - Physiologie :

B. bifidum est anaérobie strict. Certaines souches sont microaérophiles et d'autres peuvent devenir anaérobies facultatives. Il n'est pas considéré comme pathogène. Sa température optima de croissance est de 37°C ; le pH optimum de multiplication se situe entre 5,5 et 5,9 TASSOVATZ et Coll. (139). NEUT, ROMOND et BEERENS (98) considèrent l'espèce B.b. comme un groupe nutritionnel homogène. Ils ont observé en effet pour les souches de ce groupe, un

comportement identique au cours d'une étude des besoins nutritionnels de celles-ci. JAMES A. et Coll. (59) et RAYNAUD (118) ne sont pas de cet avis. Pour eux, l'espèce B. bifidum doit être considérée comme hétérogène, comprenant divers types nutritionnels et divers types sérologiques.

Les souches appartenant à l'espèce B. bifidum présentent une certaine tendance à la mutation. Une de ces mutations conduit à la perte du caractère anaérobie strict et simultanément à une modification morphologique et antigénique. NORRIS, FLANDRES, TORNARELLY et GYORGY (106) proposent d'appeler cette variante aérobie et dépourvue de ramification : "Lactobacillus parabifidus".

b)- Besoins nutritionnels :

On peut observer dans le genre Bifidobactérium, comme dans beaucoup d'autres, des variations plus ou moins importantes dans les besoins nutritionnels, des souches distinctes rattachables à la même espèce par leurs caractères généraux.

Différents biotypes ont été séparés au sein du groupe Bifidobactérium, en fonction de leurs besoins nutritionnels NEUT et Coll. (98). BERGEY (6) et, plus particulièrement, en fonction de la nature des sucres ferments (TABLEAU 2). Il ressort de l'étude faite par HASSINEN et Coll. (54) sur les besoins minima de cette espèce que :

- les vitamines indispensables au développement de B. bifidum sont : la biotine et la pantothénate de calcium ;
- les purines et pyrimidines ne sont pas essentielles ;
- le seul amino-acide indispensable est la cystéine. Celle-ci peut être remplacée par la cystine. Mais, elle ne peut pas l'être par la méthionine, ni par l'homocystéine ;
- les besoins azotés peuvent être couverts par la cystéine et un sel d'ammonium.

E S P E C E S	Arabinose	Xylose	Ribose	Cellobiose	Lactose	Mannitol	Maltose	Saccharose
- <i>B. Bifidum</i> (ORLA-JENSEN, 1924)	-	-	-	+	+	-	-	- ou +
- <i>B. infantis</i> (REUTER 1963 et 1971)	-	-	+	-	+	-	+	+
- <i>B. Longum</i> (REUTER, 1963)	+	+	+	-	+	-	+	+
- <i>B. breve</i> (REUTER, 1963)	+	+	+	-	+	+	+	+
- <i>B. adolescentis</i> (REUTER, 1963)	+	+	+	+	+	-	+	+

TABLEAU 2 - Caractères biochimiques des espèces du genre *Bifidobacterium*.  
NEUT, ROMOND et BEERENS (97) ; BERGEY, 1974 (6).



c) - Caractères biochimiques :

La question a été étudiée en 1957 par BEERENS, GERARD et GUILLAUME (4), puis par PREVOT (117) en 1961.

Ces travaux révèlent :

- l'absence de catalase, de réduction des nitrates, de production d'Indole, de fermentation du glycérol ;
- le lait est rapidement et complètement coagulé, mais sans formation de gaz ;
- les protéines coagulées ne sont pas attaquées ;
- l'eau peptonée est troublée ;
- la gélatine n'est pas liquéfiée ;
- il y a fermentation du glucose, du lactose, du lévulose et du galactose avec forte acidification du milieu.

Plusieurs auteurs MAYER et MOSER (98), MALYOTTE et BAUER (83) ont signalé la variabilité des autres caractères de fermentations sucrées, en particulier pour l'arabinose, le saccharose, le xylose et le mannitol (TABLEAU 2).

La fermentation du mannitol est un caractère qui permet de présumer de l'origine buccale de la souche de B. bifidum. Par contre, l'absence de fermentation de cet alcool reste l'apanage de la majorité des souches fécales BEERENS (4). On peut se demander s'il s'agit d'un caractère adaptatif à un habitat déterminé ou d'un caractère propre à une variété de l'espèce ? GUILLAUME, BEERENS et OSTEUR ont signalé en 1956 que seul l'acide acétique se forme au cours de la fermentation du glucose par B.b. Ce type fermentaire particulier a été confirmé en 1957 par BEERENS et Coll., puis en 1961 par PREVOT. Mais ce dernier ajoute qu'il se forme aussi de l'acide lactique dans le rapport : trois parties d'acide acétique pour une partie d'acide lactique et de petites quantités d'acides formique et succinique.

Pour KUHN et TEDMANN (66), la fermentation du glucose se fait par voie glycolytique pour conduire à la formation des acides lactique et acétique. En 1967, la voie de la fermentation des hexoses a été élucidée par VRIES et STOUTHAMER (153) et en 1976 par LAUER et KANDLER (76) par dosage des produits

formés après fermentation du glucose  $^{14}\text{C} - 1$ . Ces auteurs pensent que la fructose-6(P)phosphokétolase est l'enzyme principale de cette voie métabolique. Celle-ci a été découverte par SCHRAMM et Coll. (133) dans une bactérie aérobie, Acétobacter xylinum, ensuite mise en évidence dans Ieuconostoc mésentéroïdes. Les différentes étapes de cette voie de fermentation peuvent se résumer de la façon suivante : les hexoses sont d'abord transformés en fructose-6(P) qui est ensuite coupé par une phosphokétolase pour former l'érythrose-4(P) et l'acétyl(P). L'érythrose-4(P) et le fructose-6(P) donnent naissance à deux molécules de pentose-(P) grâce à l'action d'une transaldolase et d'une transkétolase. Le xylulose-5(P) formé est alors coupé par la phosphokétolase en acétyl (P) et 3(P)glycéraldéhyde. Le dernier composé se transforme finalement en pyruvate qui est, soit réduit en lactate, soit transformé en acétate et formiate probablement grâce à une réaction de phosphorylation. Les produits formés en définitive sont : les acides acétique et lactique dans le rapport 1,5/1,0 selon MATTEUZZI (87). L'existence de toutes ces réactions biochimiques chez B. bifidum démontre la richesse et la complexité de l'équipement enzymatique dont dispose celui-ci. Cela confirme la thèse défendue en 1971 par MONTREUIL (94), en 1977 par BEZKOROVAINY (10) et en 1978 par FONTAINE (28, 29, 30), qui avaient déjà signalé la présence d'une multitude d'enzymes dans cette bactérie.

### III. - Recherche du B. bifidum dans les selles de nourrisson :

#### 1°/ - Milieux de culture :

La recherche du B. bifidum dans les selles de nourrisson a repris un intérêt nouveau depuis les travaux consacrés par divers auteurs aux régimes bifidigènes artificiels (88) et milieux de culture.

TISSIER en 1900, utilise avec succès la gélose Veillon ordinaire pour l'isolement du B. bifidum.

Divers milieux synthétiques simples ont été proposés par la suite par VON PLOTTHO(152), HASSINEN (54), PETUELY et LYNAU (113). RAYNAUD et I EVESQUE pensent que ces milieux ne peuvent être d'un emploi général. En effet, ils ne permettent d'isoler que des souches de Bifidobactérium à besoins minima, qui ne constituent qu'une faible proportion de la flore du nouveau-né. Le milieu TORNARELLI-NORRIS (146) a fourni de bons résultats aux chercheurs américains qui ont pu isoler de nombreuses souches à partir des selles de nourrissons au sein. Appliqué à la recherche du B. bifidum dans les sécrétions vaginales où ce germe n'est pas l'élément prédominant de la flore, il a permis à HARRISSON et al. (52) d'isoler le B. bifidum. Le milieu de NORRIS-TORNARELLI par addition de lait humain ou d'autres sources de facteurs bifidigènes favorise l'isolement de la souche Penn.

Pour isoler le B. bifidum à partir des selles, RAYNAUD recommande le milieu de BLAUROCK (16, 17). Cependant, NORRIS et al. (106) le trouvant peu efficace, ont cherché à l'améliorer par des additions diverses : jus de fruit, jus de végétaux, lait maternel.

Mais aucune de ces combinaisons ne leur est apparue satisfaisante, et ils ont proposé une formule modifiée de ce milieu en fixant le taux de cystine à un niveau (2,5 à 10 mg/l) plus bas que celui qui est utilisé par BLAUROCK (100 mg/l).

Le milieu ainsi obtenu se révèle de beaucoup le plus efficace affirment ces auteurs.

Lorsqu'on s'adresse à une source riche en B. bifidum comme les selles de nourrissons au sein, RAYNAUD recommande le milieu de BLAUROCK modifié.

Si le B.b. est plus rare dans le matériel étudié : selles d'enfants

à régimes faiblement bifidigènes, selles d'adultes, sécrétions vaginales, on a intérêt à ajouter de l'acide sorbique neutralisé, au taux final de 0,12% pour améliorer sa sélectivité.

2°/ - Mode opératoire (97, 98, 99) :

a) - Préservation des Bifidobactérium :

La fragilité du B.b. et l'anaérobiose indispensable pour son développement rendent nécessaires certaines précautions de prélèvements. En effet, sa mise en culture impose :

- de la rapidité dans les manipulations, afin d'éviter tout contact prolongé du germe avec l'oxygène ;
- l'utilisation des jarres hermétiques permet d'obtenir l'anaérobiose nécessaire grâce au système gaspack, petites pochettes contenant 2 comprimés : l'un de bicarbonate de sodium et de l'acide tartrique, l'autre de l'hydruure de bore, dégageant en présence d'eau, soit du CO<sub>2</sub> ou de l'hydrogène. De l'aluminate de palladium, jouant un rôle catalyseur, est incorporé au couvercle de la jarre.

b) - Technique de recherche du B. bifidum utilisée par NEUT, ROMOND et BEERENS (126) :

Les selles sont prélevées, soit par écouvillonnage rectal, soit immédiatement après leur émission sur langes stériles. Elles sont en général conservées en jarre anaérobie, et depuis peu de temps, par culturette.

Les culturettes sont fabriquées par Marion Scientific Corporation, USA. Les prélèvements sont examinés et mis en culture dans les six heures qui suivent. Après des dilutions faites dans du Ringer Cystéiné, ils sontensemencés sur du milieu V. L. solide additionné de sang de cheval. Après 5 jours d'incubation à 37°C, en anaérobiose, les Bifidobactérium sont isolés et identifiés en fonction de leur morphologie, des caractéristiques biochimiques décrites selon BERGEY. Les souches isolées sont conservées sous forme congelée à -20°C dans un milieu Rosenow cystéiné et paraffiné.

### C. - Implantation du B.b. dans l'intestin du nourrisson.

De nombreuses questions sont évoquées au sujet de la colonisation de l'intestin du nourrisson par le B.b. Tout d'abord, d'où vient le Bifide?

Comment les premiers germes s'implantent-ils chez le nouveau-né?

A quel âge se fait cette implantation ? et dans quelles proportions se fait-elle?

Autant de questions qui attendent une réponse pour mieux comprendre le mystère qui se développe autour de la question du B.b.

#### 1°/ - Implantation naturelle :

Il apparaît incontestable que le B.b. fait partie de la flore vaginale et qu'il s'implante chez le nourrisson dès le premier jour de sa naissance, au plus tard le troisième jour dans les cas d'accouchement par les voies naturelles ; plus irrégulièrement et tardivement après césarienne (RIESS cité par MAYER). Ces faits sont à rapprocher des constatations de BLAUROCK (17) qui affirme que 90% des femmes examinées par lui présentent le B.b. dans les sécrétions vaginales. D'après cet auteur, il est probable que dans les maternités, les mains des infirmières et des accouchées soient l'un des modes de diffusion de B.b. MAYER et MOSER (88) ont montré sa présence 30 fois sur 110 échantillons de lait de femme et dans le colostrum avant toute tétée, donc sans contamination possible par la bouche de l'enfant.

Les mêmes auteurs admettent sa présence dans la glande mammaire.

Toutes ces constatations viennent donc confirmer les travaux de HOWE et HATCH en 1919, HALL et PREVOT en 1937, cités par BEERENS et Coll. (4) qui rapportent que l'intestin du nourrisson n'est pas le seul habitat du B.b. En effet ces chercheurs affirment l'avoir trouvé dans les caries dentaires.

Quoiqu'il en soit, le B.b. est présent dès les premières selles du nouveau-né LEVESQUE (81).

Mais d'après TASSOVATZ et al. (139), le Bifide ne se maintient que si l'enfant est en équilibre parfait. Car, disent-ils, le moindre dérèglement : diarrhées, infections le fait disparaître des selles ; et une flore ordinaire contenant des E. coli, entérocoques... etc. pullule à sa place.

TASSOVATZ et KRAGOUYEVITCH pensent que l'implantation naturelle du B. bifidum passe obligatoirement par le maintien de l'enfant au sein ou par la prise quotidienne de lait de femme frais non pasteurisé, à la dose minima de 400 grammes.

2°/ - Implantation artificielle du Bifide chez le nouveau-né :

Elle fut réalisée d'abord par TISSIER, à l'aide d'une culture fraîche de B. bifidum prise per os.

LEVESQUE, AICARDI et GAUTIER (79) ont utilisé par la suite du B.b. lyophilisé. Ils pensent que l'implantation artificielle du Bifide est plus facilement réalisable à l'aide de cette dernière préparation. En utilisant une culture de B.b. lyophilisé, ces chercheurs ont réussi à obtenir une implantation du B. bifidum chez des enfants nourris au lait de vache.

Pour qu'il y ait une implantation suffisante, ils préconisent d'administrer 10 millions de germes (cultures de bifidum lyophilisé) par jour, avec des régimes non bifidigènes.

Nous avons obtenu disent-ils, grâce à cette méthode, en deux ou trois jours, chez des nourrissons bien portants, des implantations de 40 à 70% de bifidum qui persistaient après arrêt de l'administration. Mais, selon eux, il ne faut pas donner de trop fortes doses de cultures lyophilisées. En effet, une dose de l'ordre de 100 millions de germes par jour provoque de brusques diarrhées qui vont à l'encontre du résultat cherché.

Mais une telle pratique reste critiquable, dans la mesure où :

- d'une part il n'existe aucune corrélation qui lie l'implantation du B. bifidum et la quantité de germes lyophilisés administrée. D'ailleurs, on ne peut pas attribuer totalement l'apparition de la flore bifide dans les matières fécales du nouveau-né au seul fait d'administrer une culture de B.b. lyophilisée. En effet, les enfants nourris au lait de vache présentent quand même un nombre non négligeable de B.b. dans leurs selles ;
- d'autre part, le problème qui se pose est celui de la définition de la dose limite de B.b. à ne pas dépasser. En effet, si l'on tient compte de l'extrême fragilité de la flore bifide à la moindre perturbation de l'organisme du petit enfant, la définition d'un tel seuil doit prendre

en compte l'état physiologique de chaque patient, et surtout sa tolérance au régime proposé.

### 3°/ - Conclusion :

Il est donc admis par tous que le B. bifidum existe chez le nouveau-né dès les premiers jours de sa naissance. Et, il est possible de l'implanter dans les selles de celui-ci s'il en est absent, en administrant des cultures de B.b. pourvu que ce soit à des doses modérées. Mais, le germe ne se maintiendra que si l'enfant est en bonne santé.

#### D. - Signification de la flore fécale à B. bifidum dominant chez le nouveau-né.

Que signifie cette prédominance de B.b. quand le nouveau-né est allaité par sa mère?

On peut se demander si la flore bifide est à l'origine de la plus grande résistance aux troubles digestifs du nourrisson élevé au lait maternel par rapport à ceux qui sont nourris au lait de vache? Selon les statistiques de GYORGY (49), les enfants au sein présentent une morbidité et une mortalité plus faibles.

### 1°/ - Rôle présumé du B.b. dans l'intestin :

#### a) - Emploi thérapeutique du Bifide :

D'après les constatations faites par TISSIER en 1900 chez les nourrissons au sein, la flore bifide s'oppose au développement des autres germes. Elle joue par conséquent un rôle de protection de l'intestin contre l'action des bactéries pathogènes.

Pour confirmer ses observations, TISSIER (142) tente en 1905 un traitement des infections intestinales chez des nourrissons par modification de la flore bactérienne. D'après cet auteur, les infections intestinales du petit enfant, étant dues essentiellement à l'action des bactéries putréfiantes, le processus putride peut être arrêté en favorisant dans le tube digestif, le développement des bactéries acidophiles, analogues à celles de la flore fécale du nourrisson normal. Pour arriver à ce résultat, il fait administrer aux patients une culture pure de *Lactobacillus* ou

d'un mélange de cette espèce avec B. b. , quand ceux-ci sont absents de l'intestin. En produisant des acides, ces derniers inhibent l'action des germes putréfiants et leur degré de développement s'ajustera aux conditions de pH du milieu pour maintenir son acidité. Ceci étant complété par un régime riche en hydrates de carbone, ne contenant qu'une infime quantité de substances protéiques. La régression en quelques jours des troubles digestifs et de la fétidité des selles, la restauration en deux ou trois mois de la flore intestinale, ont confirmé son hypothèse. Parallèlement à ses recherches, TISSIER étudie le phénomène de putréfaction. Cette étude lui permet de distinguer dans les selles (144, 145) :

- une flore permanente dont les germes saccharolytiques, parmi lesquels on cite B. bifidum, ont un rôle inhibiteur vis-à-vis des germes pathogènes grâce à une fermentation acétique ;
- une flore accessoire, labile, à laquelle participeraient les germes de putréfaction et dont il démontre la variabilité en fonction de l'alimentation.

TASSOVATZ et KRAGOUYEVITCH (139), reprenant les expériences faites par TISSIER, réalisent le traitement de l'entéro-colite aiguë bactérienne chez le nouveau-né par ingestion de culture lyophilisée de B. bifidum.

L'expérience clinique de ces derniers, se limite aux cas d'entéro-colite aiguë de gravité moyenne, comportant un changement de l'état général d'intensité modérée, avec émission de selles d'aspect caractéristique d'une entérite. Comme agent thérapeutique, ils utilisent une culture de B. bifidum lyophilisé, administré per os, sans addition d'aucune préparation médicamenteuse, ni antibiotique, ni vitaminique. Ce traitement a permis d'obtenir, affirment-ils, chez les patients, une amélioration rapide des selles, suivie bientôt de guérison.

Des résultats analogues auraient été également obtenus avec des enfants allaités au lait de vache et atteints de diarrhées infectieuses.

b) - Action préventive de la flore à B. bifidum :

Dans le but de confirmer l'hypothèse de TISSIER d'un rôle protecteur du B. b. , TASSOVATZ et KOTSICH en 1961 (138) démontrent que la flore

fécale à B.b. parvient à réaliser chez le nouveau-né une protection naturelle efficace contre les E. coli pathogènes.

Il est particulièrement remarquable que ces travaux plus récents viennent confirmer les résultats originaux obtenus par TISSIER, il y a plus de 70 ans. Pour étayer leur démonstration, TASSOVATZ et KOTSICH ont étudié sur des nourrissons, en milieu hospitalier, des cas d'infection endémique par les colibacilles ( $O_{111} B_4$ ) avec présence constante durant six mois de porteurs de germes parmi les enfants, et apparition périodique de cas d'entéro-colites aiguës.

La disparition des porteurs de germes et l'assainissement du milieu hospitalier furent réalisés affirmant-ils d'une façon durable, grâce au développement de la flore intestinale à B.b. Cette flore fut obtenue par l'allaitement au sein exclusif ou bien par l'allaitement avec du lait de femme frais, non pasteurisé, donné immédiatement après traite aseptique.

Quant à MATA et URRUTIA (86), ils ont étudié des cas d'infection par des E. coli entéropathogènes chez des enfants nourris au sein, en milieu rural, au Guatemala. Les auteurs n'ont trouvé aucune infection à E. coli chez les patients. Ils en ont conclu que c'est la prédominance des Bifides dans les matières fécales de ces enfants qui est responsable de la résistance de ces derniers à l'infection par les E. coli entéropathogènes.

De même en 1969, MATA et al. (86) parviennent à la même conclusion, en travaillant sur des cas d'infection de Shigella au Guatemala. Sur 209 enfants étudiés par ces chercheurs, 109 sont soumis à l'allaitement maternel dont 4 seulement ont eu une infection par Shigella avec diarrhées graves.

MAYER (88) de son côté, a mis en évidence en 1965, l'inhibition de virus entériques par les Bifides. Ceci a été confirmé par TASSOVATZ et KRAGOUYEVITCH en 1964 et par HAENEI (53) en 1970.

## 2°/ - Controverses autour de la question du Bifide :

Malgré toutes les preuves concrètes et évidentes apportées par TISSIER et bien d'autres, tout le monde ne partage pas la thèse défendue par ceux-ci.

En effet, certaines constatations cliniques faites par PETUEI Y et

Coll. (113, 114) et par LEVESQUE (80, 81) sont contraires à celle-ci. Il s'agit de l'instabilité de la flore bifide lors de diverses affections. Un simple trouble digestif ou bien une infection parentérale sans gravité ont, semble-t-il pour effet la disparition du B. bifidum et sa substitution par une flore mixte de putréfaction (Bactéroïdes, Clostridium... etc). Il y a tout de même, dans cette fragilité de l'équilibre bifide de l'intestin, quelque chose d'étonnant et qui est préjudiciable au rôle présumé d'agent de protection de ce germe. Pour LEVESQUE, il n'y a pas de parallélisme entre la présence ou l'absence du Bifide et la survenue ou non d'accidents sévères, de troubles digestifs chez le petit enfant. Dans ces conditions, ce qui protège le nourrisson contre la maladie ne serait pas un principe bifidigène. WAGNER et STAR (154) à ce sujet restent plutôt prudents dans les conclusions de leurs travaux sur le comportement des souris germfree en présence d'une culture bactérienne contenant des B.b. et des Salmonella typhimurium. Ces auteurs ont observé que si l'on administre le mélange de ces deux germes à des souris germfree, le Bifide disparaît de l'intestin des animaux après 14 jours d'expérience. Mais la question est de savoir si l'on peut imputer la disparition des B.b. de l'intestin à un effet inhibiteur exercé par les Salmonelles ou bien à des conditions peu favorables au développement des Bifides offertes par l'intestin des souris.

Devant cette énigme, les auteurs pensent que de tels résultats ne sont pas assez concluants pour attribuer au B.b. un rôle protecteur de l'intestin contre l'action des bactéries pathogènes.

Si le Bifide s'avoue vaincu avec une telle facilité et disparaît ainsi au moindre fléchissement de l'organisme, est-il vraiment un acteur? N'est-il pas simplement un élément utile à la croissance, un témoin de la bonne santé de l'enfant?

L'ensemble des auteurs allemands paraît admettre que B.b. est au premier rang des bacilles utiles.

Pour METCHNIKOFF (174), la flore acidifiante est un gage de bonne santé. L'usage des laits fermentés, yoghourts est le témoin d'une longue tradition à ce sujet.

Si B.b. n'est pas seulement un témoin de bonne santé du tractus digestif, par quels mécanismes participe-t-il activement à sa défense ?

3°/ - Mécanisme d'action du B. bifidum.

- a) - Par la production d'acides variés, il serait antagoniste  
de la flore de putréfaction.

Tout un groupe d'auteurs, PREVOT et RAYNAUD (116), ORIA-JENSEN (109) ainsi que MANCIAUX (85) ont constaté que, dans leurs études expérimentales, la flore à B.b. détermine in vitro l'apparition des acides lactique et acétique ainsi que des acides propionique, formique et butyrique. Cette production d'acide, en abaissant le pH des matières fécales de l'enfant au sein à 4, inhibe le développement des autres germes intestinaux, tels que : les Klebsiella, les Salmonellae, les Shigellae, les Staphylocoques. Tous ces germes disparaissent déjà à pH 4,6.

Par contre, B.b. subsiste bien que son pH optimal de croissance soit de 5,5. WILLIS et Coll. (155) pensent que l'accumulation d'acide acétique est un facteur important de prévention de la prolifération intestinale d'Entérobacteriaceae. NEIMANN, LAVERGUE et MANCIAUX (100) rapportent que cet antagonisme biologique entre flore naturelle à B.b. d'une part, et de tous les autres germes intestinaux, saprophytes, pathogènes d'autre part est fondé sur les changements de pH du milieu intestinal ainsi que sur l'appauvrissement de ce milieu en substances nutritives. Pour DELBOVE, FRISEL et GYORGY cités par NEIMANN et Coll. (100), cet antagonisme est surtout basé sur l'utilisation du milieu nutritif. Chez le petit enfant nourri maternellement, la croissance de B.b. étant favorisée par le "Bifidus factor", les autres germes restent privés de leurs éléments nutritifs et finissent par disparaître.

Malheureusement, cette action reste négligeable in vitro par suite de la déroutante fragilité du B.b. qui amène sa disparition à la moindre agression de l'organisme.

b) - Rôle métabolique de B. bifidum.

D'après les recherches faites par I EVESQUE en 1959 et par TASSOVATZ et Coll. en 1961, le B.b. est un agent de synthèse des vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et K.

Ceci a été confirmé en 1965 par NEIMANN et Coll. Ces derniers constatent que la forte acidification du milieu intestinal, du fait de la synthèse d'une multitude d'acides par B.b. favorise l'assimilation du calcium ionisé, des vitamines liposolubles, une absorption accrue des lipides et une épargne protidique.

4°/ - Pourquoi persévérer dans l'exploration de la flore bifide dont le rôle est encore très contesté?

Compte-tenu des controverses qui se développent autour du rôle exact du B.b.

Quel intérêt y a-t-il à essayer de l'implanter dans l'intestin de l'enfant?

Parce que le Bifide est au minimum un critère de bonne santé et un témoin d'équilibre nutritionnel de l'enfant.

Et que, par ailleurs, la découverte d'un facteur nécessaire à la croissance in vitro d'un microbe peut équivaloir à la découverte d'un facteur nutritionnel pour l'homme. Un certain nombre de vitamines (B<sub>12</sub>, acide folique) ont ainsi été identifiées.

Si le Bifide en soi n'a pas d'action visible sur la santé du nouveau-né, peut-être les facteurs bifidigènes en ont-ils une, située à un autre niveau, jusqu'ici cachée, que l'on découvrira peut-être un jour.

E. - Conclusion :

I'alimentation au sein assure l'hygiène du nourrisson sur le plan de la flore intestinale.

Toutefois, le problème reste entier quant à savoir si les germes de B. bifidum interviennent directement en inhibant la prolifération des bactéries pathogènes, ou s'ils sont simplement le reflet d'un état satisfaisant de l'intestin, et donc de bonne santé du nourrisson.

CHAPITRE II. - CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES  
FACTEURS BIFIDIGENES

## A. - INTRODUCTION.

Différents facteurs favorisant la croissance du B.b. ont été trouvés non seulement dans le lait humain, mais aussi dans de nombreuses substances biologiques. Depuis l'époque des premiers travaux menés par TISSIER, il nous a semblé intéressant de passer en revue les principales méthodes de caractérisation de ces facteurs.

## B. - METHODES DE MISE EN EVIDENCE.

### I. - Méthode en milieu liquide :

Elle fut d'abord décrite par GYORGY et al. (46), puis reprise par RAYNAUD et BIZZINI (122), BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN (13).

Le principe de la méthode consiste à inclure le composé à tester dans le milieu de culture bactérienne préalablement stérilisé à l'autoclave. On y incorpore ensuite l'inoculum standardisé, préparé à partir de la souche de B. bifidum. L'incubation se fait à 38°C pendant 5 jours en anaérobiose. GYORGY, NORRIS et ROSE (44) grâce à cette méthode, évaluent la vitesse de croissance bactérienne par titration des acides formés dans le milieu de culture. La figure 1 représente la variation de la croissance bactérienne en fonction du logarithme des quantités de lait humain requises pour obtenir cette croissance. Les essais sont faits simultanément sur le lait de femme écrémé et celui de vache.

Cette étude a permis à GYORGY, JEANIOZ et ZILIKEN (50) de définir par la suite l'unité de facteur bifidigène comme étant : la quantité de composé qui, ajoutée à un milieu déterminé, donne une croissance égale à celle que permet une certaine quantité de substance étalon. L'étalon choisi est le lait maternel qui, à la dose de 0,06 ml par tube, donne la moitié environ de la croissance optimale possible pour le milieu considéré. RAYNAUD et BIZZINI (121, 122) se sont intéressés également à la question de dosage de l'activité des facteurs de croissance en milieu liquide. Et, reprenant la méthode décrite par GYORGY, ils démontrent

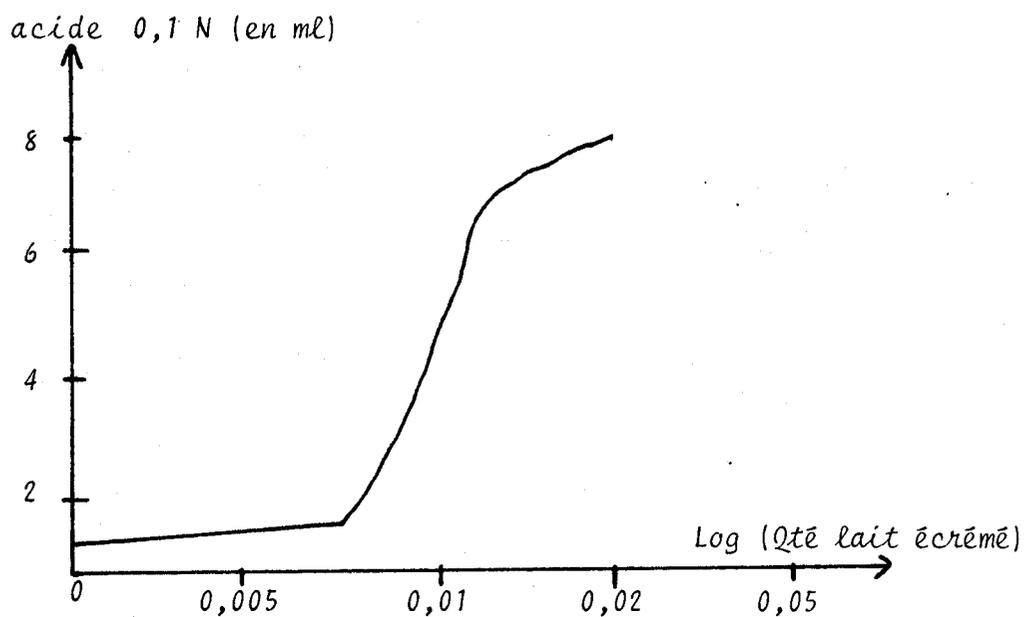


FIGURE 1 : Représentation graphique de la vitesse de croissance bactérienne (exprimée en acidité) en fonction du logarithme de la quantité de facteur de croissance (44).

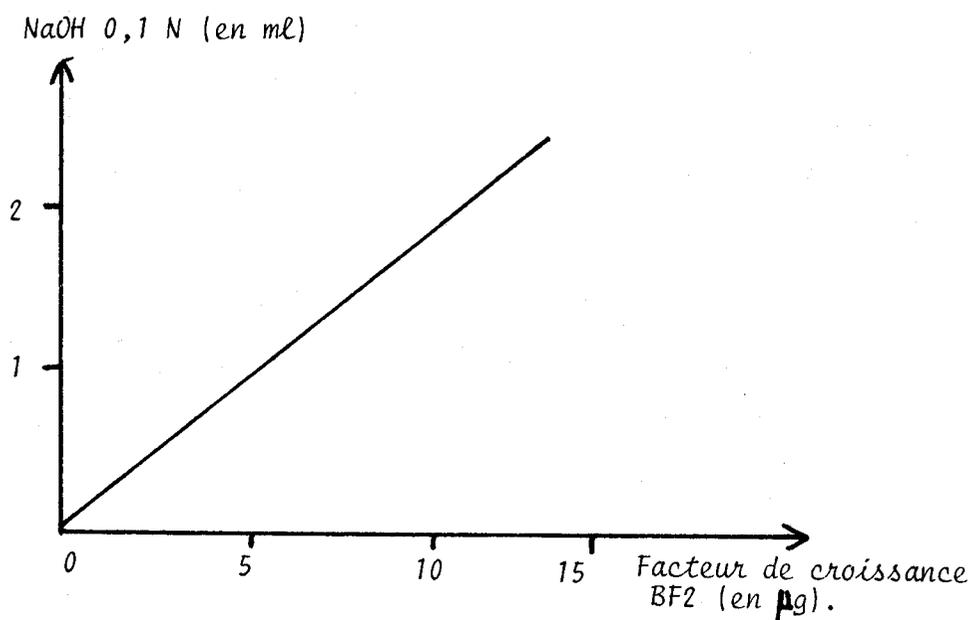


FIGURE 2 : Relation entre la croissance de B.b. et la quantité de facteur de croissance introduite dans le milieu (122).

l'existence d'une proportionnalité entre la croissance bactérienne, exprimée en acidité et la quantité de facteur de croissance purifié (exprimée en microgramme), incorporé au milieu de culture (Fig. 2).

Avec des préparations non purifiées de facteurs de croissance, la courbe se partage en deux parties (Fig. 3).

Au-delà d'une certaine quantité de facteur ajoutée, la pente de la courbe change. Celle-ci ne peut plus alors être extrapolée à une droite passant par l'origine. Les auteurs expliquent cela par le fait que les préparations impures peuvent contenir des substances inhibitrices qui, soit bloquent la croissance bactérienne, soit modifient la relation entre la croissance et l'acidité finale. Cela peut vouloir dire aussi que les préparations utilisées contiennent probablement plusieurs facteurs de croissance qui sont utilisés l'un après l'autre suivant l'affinité que la bactérie manifeste pour chacun de ces facteurs.

RAYNAUD attire l'attention sur la standardisation de l'inoculum qui selon lui, est un détail technique important, qui doit être respecté rigoureusement, comme dans la plupart des déterminations de facteurs de croissance. Avec un inoculum trop fort, il apporte une quantité incontrôlée de facteurs de croissance.

S'il est trop faible, on obtient des résultats irréguliers.

Contrairement au procédé de GYORGY et Coll. où l'incubation dure 5 jours, BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN (13) préconisent une incubation à 37°C pendant 18 heures.

Ces derniers chercheurs font une représentation graphique réciproque des résultats obtenus (Fig. 4) par analogie avec la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK. Dans ces conditions, la variation de la croissance bactérienne en fonction de la quantité des facteurs bifidigènes est représentée par une droite. Ceci permet de déterminer pour chaque facteur de croissance, une constante  $K 1/2 MGA$ , analogue à la constante de MICHAELIS-MENTEN ( $K_m$ ). Celle-ci est définie comme étant la quantité de facteurs permettant d'obtenir une croissance demi-maximum

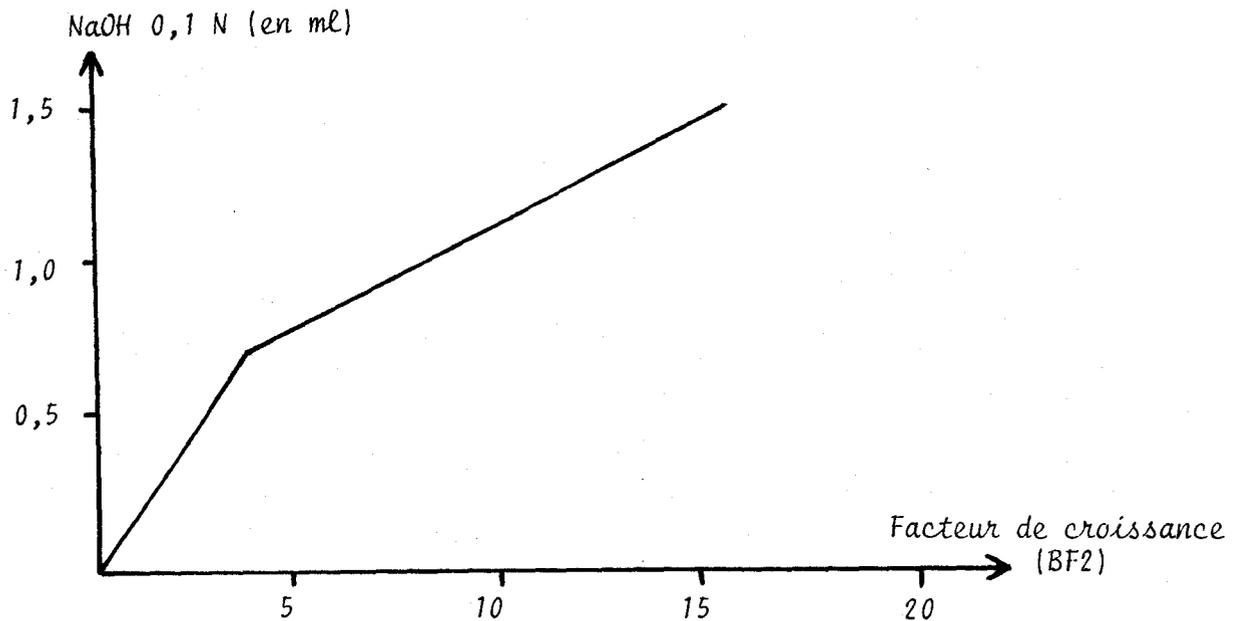


FIGURE 3 : Relation entre la croissance bactérienne et la quantité de facteur de croissance brut ajoutée au milieu de culture GYORGY et Coll. (44).

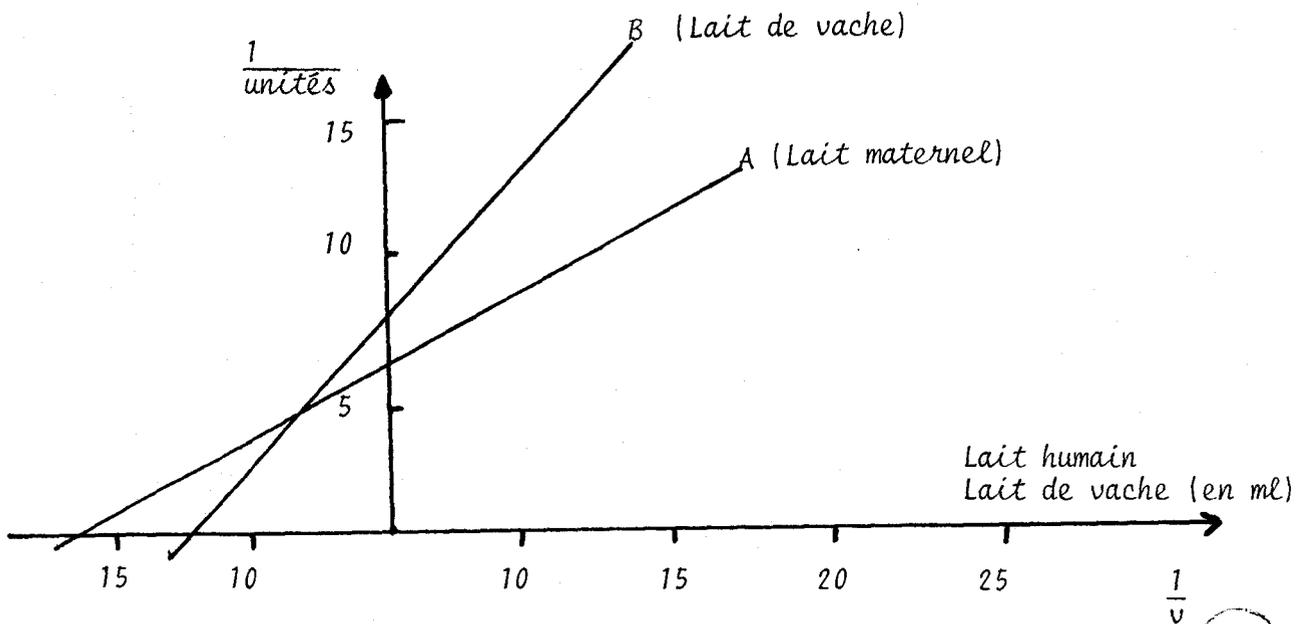


FIGURE 4 : Représentation graphique de la croissance de la souche Penn. (exprimée en unité) en fonction de la quantité de facteurs de croissance ; une unité est définie en milli-équivalents de NaOH requises pour titrer l'acide produit par la bactérie pour 5 ml de milieu de culture. Les facteurs de croissance étant le lait humain ou le lait de vache BEZKOROVAINY et Coll. (13).

## II. - Méthode de diffusion en milieu solide :

### 1°/ - Principe :

Elle a été décrite par ROMOND, BEERENS, NEUT et CATTEAU (165). La méthode fait appel à une culture jeune de B. bifidum qu'on incorpore au milieu de culture qui est le milieu de GARCHES gélosé (119) réparti dans des boîtes de Pétri. Les solutions des produits à tester à différentes concentrations sont stérilisées par passage sur filtre millipore (45  $\mu$ m). Des disques de papier stériles sont ensuite imprégnés de ces différentes solutions, puis déposés sur le milieu gélosé. Les essais sont incubés en atmosphère anaérobie à 37°C pendant 5 jours. La lecture des résultats se fait par appréciation de l'anneau de culture bactérienne se développant autour des disques. Il est possible de mesurer le diamètre de cet anneau pour comparer l'effet du même composé sur différentes souches de Bifidobactérium. L'activité bifidigène s'exprime par la dernière dilution positive.

Cependant, on reproche à cette méthode de dosage d'être semi-quantitative, ce qui limite considérablement son emploi pour déterminer l'activité biologique relative de plusieurs dérivés.

Il convient de noter également l'importance de la diffusion dans le milieu des composés à étudier. En effet, lorsque ceux-ci diffusent peu dans le milieu gélosé, la zone de croissance aura un faible diamètre. On serait alors tenté de conclure à une activité relativement faible, alors qu'en fait un produit très actif sur la croissance bactérienne peut mal diffuser dans le milieu de culture pour diverses raisons :

- . raisons d'ordre technique : gélose mal coulée, milieu non homogène ;
- . raisons propres au composé à étudier ; il peut s'agir de produits de haut poids moléculaire ou de composés visqueux ayant une vitesse de diffusion pratiquement nulle dans la gélose.

## 2°/ - Avantages de la méthode de diffusion en milieu solide :

C'est une méthode simple. Elle permet de tester plusieurs composés dans une même boîte de Pétri et dans les mêmes conditions opératoires ; ceci est pratiquement impossible à réaliser avec la méthode en milieu liquide qui demande l'utilisation d'un tube à essai par chaque composé à étudier.

C'est une technique d'une grande utilité pour étudier in-vitro l'influence sur la flore intestinale, des substrats susceptibles de jouer un rôle de facteurs de croissance microbienne.

L'utilisation des boîtes de Pétri évite de faire des témoins pour chaque dosage. Le fond de la boîte sert de témoin négatif dans cette méthode en milieu solide.

Il s'agit donc d'une méthode économique qui nécessite l'emploi de très peu de milieu de culture.

Elle fait appel au milieu de GARCHES qui est un milieu minimum, nécessaire pour l'étude des facteurs de croissance. Compte-tenu de ses nombreux avantages, nous avons choisi celle-ci pour la mise en évidence de l'activité biologique des préparations de lait de femme. Le mode opératoire de la méthode de diffusion est décrit dans l'appendice technique.

## III. - Méthode in-vivo :

Plusieurs auteurs, en particulier WAGNER et STAR (154) pensent que l'idéal est de réaliser les essais de mise en évidence de l'activité des composés reconnus comme bifidigènes dans des conditions proches de celles qu'offre l'intestin du nouveau-né. Mais le rôle de barrière à l'égard des bactéries pathogènes exercé par la flore du tube digestif humain ne peut naturellement pas être étudié expérimentalement chez l'homme (26).

Dans ce cas, le recours au modèle animal s'impose.

Ceci permettrait non seulement une meilleure approche des mécanismes physiologiques, mais cela aurait également l'avantage de rendre les résultats moins dépendants de la souche bactérienne. En effet, les tests in vitro font appel à des souches

qui au fur et à mesure des repiquages peuvent voir leurs propriétés modifiées. Pour cela, l'équipe de DUCI UZEAU propose la souris gnotoxénique comme modèle animal.

Quant à WAGNER et STAR (154), ils ont étudié le comportement des souris germfree en présence d'une culture de B. bifidum dans le but de l'implanter chez ces animaux et d'étudier le rôle protecteur de l'intestin, attribué à celui-ci. De l'avis des auteurs, les résultats sont décevants puisque la bactérie disparaît du milieu après 14 jours d'expérience.

Cette disparition s'explique peut-être par l'énorme différence existant entre le contenu intestinal du nourrisson et celui de la souris germfree. Ce dernier ne réunissant pas toutes les conditions physiologiques requises pour la croissance de B.b., celui-ci finit par disparaître du milieu intestinal de l'animal test.

### C. - ETUDE DES FACTEURS BIFIDIGENES.

Vers 1900, on commence à soupçonner la présence de facteurs bifidigènes spécifiques, responsables de la croissance de B. bifidum dans le lait de femme.

Dès 1926, SCHÖNFELD (132) démontre la présence d'un facteur de croissance pour B.b. dans la fraction non protéique du petit lait, à côté du lactose. Il n'est de nature ni minérale, ni protidique, ni lipidique. Divers composés ont été considérés par la suite comme facteurs de croissance pour B.b.

#### I. - I e lactose :

De nombreux auteurs ont attribué au lactose la propriété de favoriser la prolifération de B. bifidum. Cela confirme une notion établie en 1938 par MALYOTH (83) qui attribue la propriété du lait maternel de stimuler la croissance de B.b. à sa richesse en lactose. Mais très rapidement, les avis divergent sur la quantité de lactose nécessaire pour obtenir cette activité. MANCIAUX et Coll. (85) testant différentes préparations dont le taux de lactose varie de 3 à 12% ne trouve une flore gram-positif qu'avec ce dernier taux.

BESSAU (7) estime que les 62 g de lactose par litre de lait de femme sont suffisants pour obtenir une flore appréciable. Certains auteurs comme MALYOTH attribuent l'activité biologique du lactose à son anomère  $\beta$ . Mais, ce dernier n'a jamais pu fournir des preuves démonstratives pour soutenir cette affirmation.

Quant à PETUELY (113) et MAYER (88, 89), ils ne trouvent aucune action bifidigène pour le lactose, ni pour son isomère  $\beta$ .

Cette contradiction a été également confirmée par MONTREUIL (94) qui doute du maintien de l'une ou l'autre forme anomérique du lactose jusqu'au moment de son absorption par l'intestin du nourrisson.

LEVESQUE (80, 81) de son côté, observe un faible pouvoir bifidigène avec du lait de vache enrichi au lactose, mais indépendamment de la forme  $\beta$  du lactose. Pour ce chercheur, l'action bifidigène constatée n'est due qu'à un dextrine-maltose spécial ajouté au lait au cours de ses expérimentations réalisées en 1959 sur du lait de vache enrichi de lactose (18%).

I e dextrine-maltose spécial est obtenu grâce à l'action fermentative d'*Aspergillus orizae*.

## II. - Le lactulose de PETUELY :

Reprenant les idées de SCHÖNFELD sur l'existence d'une substance fonctionnelle dans le lait de femme, PETUELY (113, 114) tente de préciser la structure chimique de cette substance et à quelle fraction du lait de femme appartenait-elle? Et traitant d'une manière semi-industrielle de grandes quantités de lait de femme, il a pu démontrer que, ni le dégraissage par centrifugation et l'extraction des graisses à l'éther, ni l'élimination du lactose par cristallisation fractionnée ne diminuent sensiblement le pouvoir biologique du lait. A ce stade, les préparations de lait ne contiennent plus que des sels minéraux, de faibles traces de lactose et des oligosaccharides.

L'élimination ultérieure des sels minéraux et l'extraction des sucres par chromatographie sur colonne de cellulose permettent à PETUELY d'attribuer l'effet bifidigène du lait étudié à un dérivé de lactose, le  $\beta$  galactosidofructose ou lactulose : Gal  $\xrightarrow{\beta-1,4}$  fru.

Il s'agit d'un composé thermolabile, analogue aux vitamines. Son effet est étroitement dépendant de certaines conditions intrinsèques de l'organisme du nourrisson qui le rendent parfois inopérant.

La démonstration de PETUELY est partagée en 1965, par NEIMANN et Coll. (100). Ces derniers affirment que si l'on ajoute le lactulose dans les proportions de 1 à 1,5 g par Kg de poids et par jour, à un régime quelconque, le lactulose produit une pullulation de B. bifidum en un à quatre jours, à condition que ce régime comporte un rapport lactose -albumine égal ou supérieur à 2,6. Dans le but de défendre son hypothèse par des preuves concrètes, PETUELY a expérimenté son "Bifidus Factor" chez plus de 300 nourrissons avec, dans tous les cas, une excellente tolérance, des selles dont l'aspect se rapproche des selles d'enfants nourris au sein. D'autres résultats ont été obtenus par différents auteurs, en particulier MAYER et Coll. (88), ont expérimenté un lait en poudre enrichi en lactulose. Ils ont constaté une modification de la flore intestinale dans le sens de celle des enfants au sein, avec augmentation du pourcentage de B.b. dans les selles et baisse du pH. Les mêmes auteurs trouvent que le produit étudié occasionne dans tous les cas une croissance pondérale satisfaisante, mais exerce toutefois une certaine action laxative.

Cependant, le lactulose, de l'aveu même de son auteur, n'existe pas à l'état libre dans le lait maternel et il est inactif in vitro sur la croissance de B.b. ; c'est pourquoi RAYNAUD (118), RAYNAUD et BIZZINI (121) lui dénie le nom de facteur bifidigène. PETUELY explique le pouvoir bifidigène de ce sucre par sa résistance à la dégradation par les lactases du tube digestif supérieure à celle du lactose. Selon lui, le lactulose arrive ainsi en forte quantité au niveau du côlon, où B.b. peut l'utiliser pour sa croissance.

### III. - I e facteur bifidus de GYORGY :

#### 1°/ - Mise en évidence du facteur bifidus :

GYORGY, KUHN, NORRIS, CATHARINE et ZILLIKEN (44, 46) isolent en 1954 une souche mutante de B.b., le Bifidus, variété Pennsylvaniens (var. Penn) ayant la propriété de ne proliférer qu'en présence de lait maternel. Ceci leur permet d'aborder l'étude des facteurs bifidigènes dans de meilleures conditions.

Ces auteurs, à la suite d'une longue série de recherches, parviennent à la conclusion que le maintien du Bifide dans les selles du nourrisson élevé au sein est dû à la présence dans le lait de femme d'un facteur de croissance spécial qu'ils appellent "Bifidus Facteur" et qui est dénommé par RAYNAUD "Facteur Bifidus I de GYORGY" : FBI. L'activité biologique de celui-ci persiste après chauffage à l'autoclave (44).

Poursuivant leurs travaux (47), ils démontrent que le gynolactose de POIONOVSKI et LESPAGNOI est le support de l'activité bifidus factor du lait de femme.

KUHN, GYORGY et Coll. (33) observent que les oligosaccharides non azotés du lait humain ne possèdent pas d'activité B. bifidus var. Penn. tandis que les oligosaccharides azotés sont des facteurs de croissance pour cette souche in vitro.

Une étude comparative faite en 1954 sur l'activité bifidigène des différents laits de mammifères révèle que (45) le colostrum humain est plus actif, suivi par le colostrum de rate, puis viennent le lait maternel et celui de rate. Le lait de chatte a été trouvé très actif, suivi par celui de l'âne, chien, singe et lapin. Le lait des ruminants : vache, mouton et chèvre s'est révélé faiblement actif.

Par contre, GYORGY, KUHN et ZII LIKEN trouvent une concentration appréciable de facteur de croissance bifidus dans le colostrum de vache. Celui-ci contient 10 fois plus de facteur de croissance que le lait de vache.

GYORGY voit dans la haute teneur du colostrum humain en facteur bifidus var. Penn. un élément susceptible d'expliquer la rapide implantation de B.b. dans l'intestin du nouveau-né. Et le lait humain doit à la présence d'oligosaccharides azotés de posséder l'activité B. bifidus var. Penn. la plus élevée.

On comprend donc l'acharnement des chercheurs à déterminer la constitution chimique des oligosaccharides du lait de femme.

## 2°/ - Relation structure et activité :

Seule une bonne connaissance de la structure des oligosides du lait maternel permettra d'établir une relation entre la structure et leur activité bifidigène et peut-être de mieux comprendre leur mode d'action.

En suivant la vitesse avec laquelle ils dialysent, GYORGY et Coll. (46) démontrent que les facteurs de croissance B.b. var. Penn. contenus dans le lait de femme et le colostrum ne sont pas des éléments homogènes quant à leur masse moléculaire. Les facteurs actifs en effet peuvent être séparés en une fraction dialysable représentant 40 à 75% de l'activité totale des constituants actifs du lait de femme, et une fraction non dialysable correspondant à 25 à 60% de l'activité totale. Dans le but de déterminer la structure chimique nécessaire à l'activité biologique des facteurs bifidigènes, GYORGY et Coll. (33) traitent de grandes quantités de lait humain par chromatographie sur colonne de charbon-celite, suivie d'une chromatographie sur papier. Ils obtiennent dans ces conditions, des fractions très actives de lait contenant : la D-glucosamine, le I-fucose, le D-glucose et le D-galactose. Plus tard, en étudiant l'activité microbiologique de composés analogues simples des oligo et polysaccharides azotés du lait humain, ROSE, KUHN, ZII LIKEN et GYORGY (127) constatent que les  $\alpha$  et  $\beta$  methyl N-acetyl D-glucosamine présentent des propriétés intéressantes.

En effet, le  $\beta$ -méthyl-N-acétyl-D-glucosaminide est actif comme facteur de croissance de B. bifidum var. Penn. Par contre, l'anomère  $\alpha$  est inactif.

KUHN et KIRSCHENLOHR (69) avaient isolé auparavant, à partir du méconium, un disaccharide dont le comportement physique s'avère identique à celui obtenu à partir de la mucine de porc.

C'est un fait très remarquable que d'aboutir au même composé tout en travaillant sur des substances biologiques aussi différentes que le lait humain, le méconium et la mucine gastrique de porc. Cela peut s'expliquer par la présence de la N-acétyl-D-glucosamine dans la structure des oligosaccharides contenus dans ces composés naturels.

L'ensemble des résultats précédents donne à penser que la glc NAC joue un rôle essentiel pour l'activité bifidigène. Cependant la glc NAC à l'état libre présente une activité beaucoup plus faible qu'à l'état combiné RAYNAUD (118).

### 3°/ - Mode d'action :

O'BRIEN, GLICK et ZILLIKEN (107) étudient en 1959 la destinée de la glc NAC dans la bactérie B.b. var. Penn, compte-tenu de son intérêt biologique. Ils utilisent pour cela le  $\alpha\beta$ -méthyl-N-acétyl-glycosaminides ( $^{14}\text{C}$ -1) qu'ils introduisent dans le milieu de culture de la bactérie comme facteur de croissance.

L'étude électrophorétique de l'acide muramique extrait de la paroi bactérienne après 25 minutes de culture a permis de constater que le  $\beta$  glycoside marqué s'incorpore dans cet acide qui est le précurseur de la muréine. D'où l'importance de la glc NAC dans la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Une explication biochimique de l'incorporation de la glc NAC dans la paroi bactérienne est apportée par LAMBERT et ZILLIKEN (74). Pour eux, la souche Penn. n'est pas capable de produire une quantité suffisante de glcNAC à partir de son anabolisme pour l'utiliser dans la synthèse de sa paroi cellulaire. Elle doit pour cela recourir à des sources extérieures pour satisfaire ses besoins en hexosamine. Et la grande activité bifidigène des  $\beta$  glycosides peut s'expliquer par la présence d'une phosphorylase hypothétique qui convertit le  $\beta$  glycoside en N-acétyl-D-glucosamine-1-phosphate. La glc NAC libre au contraire doit être d'abord phosphorylée en position 6 par une kinase à Mg dont on connaît la présence dans les extraits bruts de la souche Penn. pour être convertie ensuite en dérivé 1-phosphate.

LAMBERT et ZILLIKEN ont alors cherché à obtenir par synthèse d'autres dérivés de la glucosamine dont ils ont déterminé l'activité bifidigène.

Si l'on met en présence les deux anomères, l' $\alpha$ -glucoside exalte l'activité du  $\beta$ -glucoside. Cet effet exercé par l' $\alpha$ -glucoside disparaît quand le  $\beta$  méthyl-N-acétyl-D-glucosaminide est remplacé par ses homologues supérieurs,  $\beta$ -éthyl ou propyl-N-acétyl-D-glucosaminides avec facteur de croissance bifidus.

Les mêmes auteurs constatent d'autre part que l'hydrolyse enzymatique du  $\beta$  glycoside par des extraits bruts d'enzyme de B.b. (var. Penn.) est inhibée en présence de  $\alpha$ -glycoside. Ce dernier composé par contre n'est pas hydrolysé. Ceci confirme l'existence de  $\beta$  glycosidase et l'absence d' $\alpha$ -glycosidase signalées par ces auteurs. Pour eux, l'inhibition de l'hydrolyse du  $\beta$ -glycoside le garde intacte. Ce qui préserve son activité bifidigène.

Toutes ces constatations incitent ZILLIKEN, ROSE, BRAUN et GYORGY (159) à s'intéresser davantage aux homologues supérieurs alkylés des N-acétyls  $\alpha$  et  $\beta$ -D-glucosaminides et à les préparer par synthèse chimique. Les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi obtenus sont séparés sur colonne de charbon-célite. Les dérivés  $\beta$  sont actifs sur la croissance de la souche Penn. alors que les anomères  $\alpha$  se montrent inactifs.

(Le tableau 3) rapporte le titre en facteur bifidus I de divers glycosides naturels ou de synthèse (118, 147, 159). Ces résultats viennent donc confirmer les observations faites auparavant par les mêmes auteurs sur l'activité des  $\alpha$  et  $\beta$  glycosides.

TORNARELLI et Coll. (147) isolent par la suite, à partir de la mucine de porc, par hydrolyse douce un disaccharide formé de galactose et N-acétyl-D-glucosamine, et qui se révèle hautement actif comme facteur de croissance de la souche Penn.

C'est finalement ZILLIKEN et son équipe (163) qui parachèvent un an plus tard, l'identification du disaccharide isolé de la mucine de porc, comme étant le 4-O  $\beta$ -D-Galactopyranosyl-N-acétyl-D-glucosamine (Figure 5). Les mêmes chercheurs ont synthétisé par la suite, à partir du lactose et de la N-acétyl-D-glucosamine, en présence d'enzyme extraite de Penn, un disaccharide qui a été trouvé identique à celui de la mucine de porc.

C O M P O S E S	(*)UNITÉ (EN MG)
4-O- $\beta$ -D galactopyranosyl-N-acétyl-D-glucosamine	0,06
3-O- $\beta$ -D " " "	1,50
6-O- $\beta$ -D " " "	0,90
N N'-diacétyl-chitobiose	1,2-2,2
$\alpha$ -alkyl-N-acétyl-D-glucosaminides	inactifs
$\beta$ -méthyl-N-acétyl-D-glucosaminide	0,1-0,2
$\beta$ -éthyl " "	0,04-0,06
$\beta$ -n propyl " "	0,04-0,06
$\beta$ -isopropyl " "	0,09
$\beta$ -n butyl " "	0,065
$\beta$ -beuzyl " "	0,095
$\beta$ -phényl " "	0,05

TABLEAU 3 : Titre en facteur bifidus I de divers oligosaccharides obtenus par synthèse chimique (45, 147).

(\*) UNITE = quantité de substance qui, ajoutée à un milieu de culture, donne une croissance égale à celle que permet une certaine quantité de substance étalon.



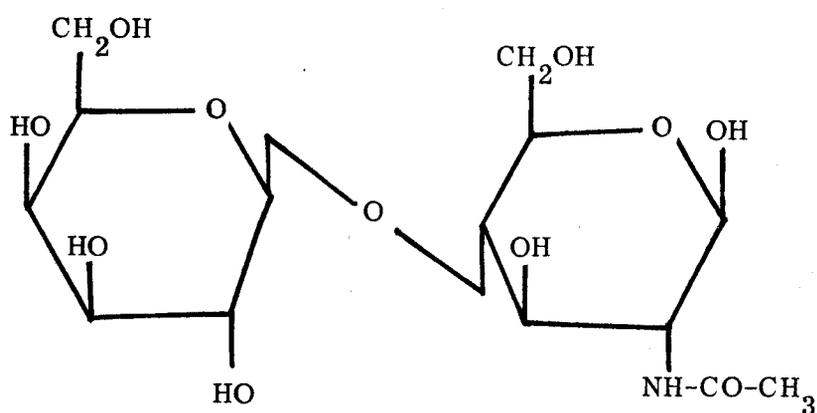
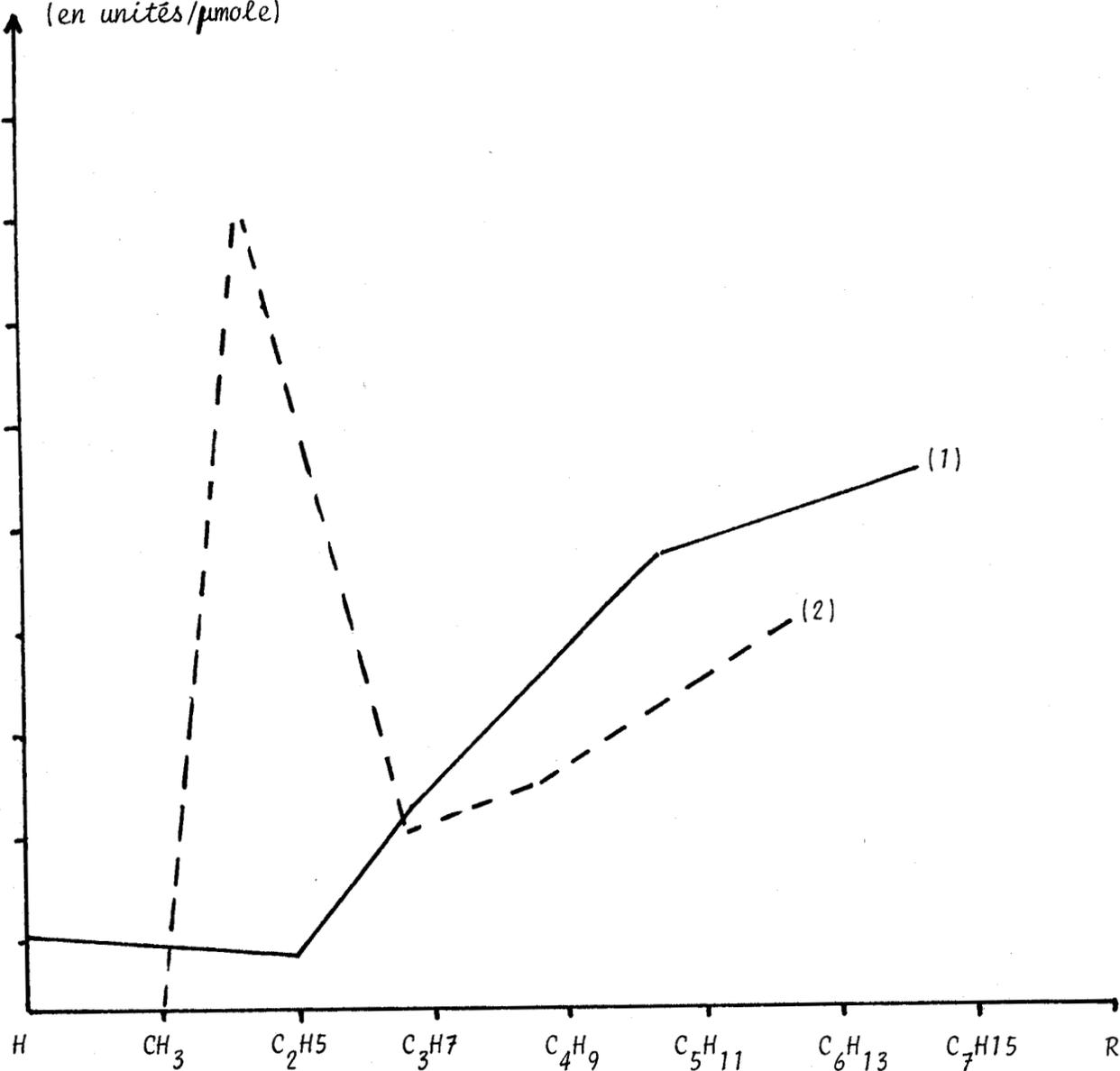
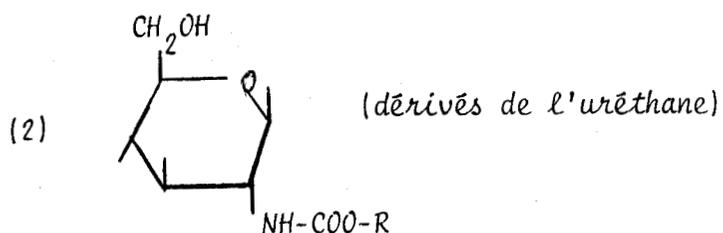
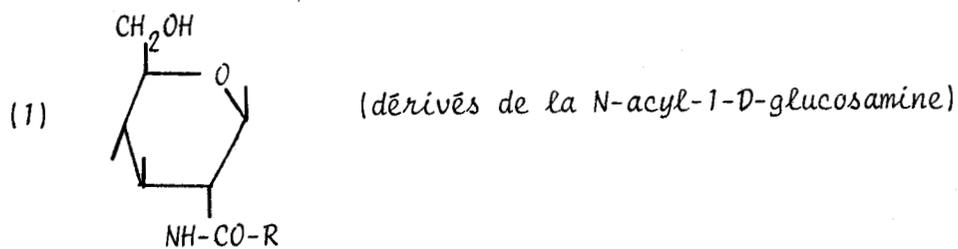


FIGURE 5 : 4- $\beta$ -galactopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamine (163)  
(N-acetyl Lactosamine).

Activité de croissance  
(en unités/ $\mu$ mole)



**FIGURE 6** : Activité de croissance des homologues de la N-acyl-1-D-glucosamine et des dérivés de l'urêthane, d'après LAMBERT et ZILLIKEN (74).



Les résultats de leurs études révèlent d'une part une très grande activité biologique pour les dérivés suivants : la N-Carboéthoxy-D-glucosamine, la N-benzoyl-D-glucosamine et la  $\beta$ -éthyl-N-acétyl-D-glucosamine ; d'autre part, une augmentation régulière de l'activité de croissance si le groupement acétyl est remplacé par ses homologues supérieurs, (figure 6), à partir du chaînon propionyl. Les auteurs expliquent ces résultats par une pénétration plus facile des facteurs de croissance dans la bactérie. Pour eux, plus la chaîne aliphatique est longue, plus les composés sont hydrophobes, et mieux ils passent à travers la membrane cellulaire, du fait de leur caractère lipophile.

#### 4°/ - Oligosaccharides du lait de femme :

Il ne faut toutefois pas perdre de vue que l'élément naturel qui fait croître B.b. chez le nourrisson est essentiellement le lait maternel. Ce sont surtout, les patientes recherches de KUHN, MONTREUIL, KOBATA et GRIMMONPREZ (39, 41, 42, 65) qui ont permis de mieux connaître la structure des oligosaccharides du lait humain. Ils peuvent être classés en deux groupes : les oligosides neutres et les oligosides acides.

##### a) - Les oligosaccharides neutres :

On distingue les oligosaccharides neutres azotés et les non azotés suivant qu'ils contiennent ou non de la glc NAC (40).

Les schémas généraux des structures de ces composés sont précisés dans les tableaux 4 et 5.

Il convient de noter que tous ces sucres du lait humain sont constitués essentiellement en proportions variées de : D-glucose, D-galactose, L-fucose et N-acétyl-glucosamine GRIMMONPREZ et MONTREUIL (39). Par contre, ils ne renferment pas de mannose, ni de galactosamine dans leur structure. Il est remarquable de constater non seulement que tous ces oligosides possèdent dans leur molécule un résidu de lactose en position terminale, mais aussi que le reste de leur molécule est formé soit d'une unité de la N-acétyl lactosamine, soit de la N-acétyl-isolactosamine, soit de la répétition de ces deux oligosaccharides.



NOMENCLATURE	STRUCTURE
<u>2°/ OLIGOSACCHARIDES AZOTÉS (SUITE)</u>	
LACTO-N-NÉOHEXAOSE	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,6}} \\  \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \\  \qquad \qquad \qquad \searrow \qquad \nearrow \\  \qquad \qquad \qquad \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc}  \end{array}  $
LACTO-N-FUCOPENTAOSE I.	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\  \uparrow \alpha-1,2 \\  \text{Fuc}  \end{array}  $
LACTO-N-FUCOPENTAOSE II.	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\  \uparrow \alpha-1,4 \\  \text{Fuc}  \end{array}  $
LACTO-N-FUCOPENTAOSE III.	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\  \uparrow \alpha-1,4 \\  \text{Fuc}  \end{array}  $
LACTO-N-DIFUCOHEXAOSE I.	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\  \uparrow \alpha-1,2 \quad \uparrow \alpha-1,4 \\  \text{Fuc} \quad \text{Fuc}  \end{array}  $
LACTO-N-DIFUCOHEXAOSE II.	$  \begin{array}{c}  \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\  \uparrow \alpha-1,4 \qquad \qquad \qquad \uparrow \alpha-1,4 \\  \text{Fuc} \qquad \qquad \qquad \text{Fuc}  \end{array}  $

TABLEAU 5 : Structure des oligosaccharides neutres du lait maternel, d'après GRIMMONPREZ et MONTREUIL (38, 39, 42), KOBATA et Coll. (65)

Dans le cas des structures linéaires, le reste de la molécule est lié au lactose en position  $\beta$ -1,3. Pour les structures ramifiées, ce sont surtout des liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ 1,6 qui rattachent les branches au résidu de lactose.

A cause de cette particularité de la présence d'un reste de lactose dans chaque oside, MONTREUIL et MULLET cités par GRIMMONPREZ (41) formulent l'hypothèse qu'il existe une relation métabolique entre les osides du gynolactose et le lactose. En particulier, l'examen des formules des fucosido-lactoses et du lacto-difucotétraose montre que le passage de ces sucres au lactose peut s'effectuer sous l'action des fucosidases. Ces auteurs ont émis cette hypothèse par suite d'une étude faite en 1960 sur l'évolution des oligosides du lait de femme au cours de la lactation. Ils ont observé en effet, que le taux de lactose et de gynolactose varient en sens inverse. En outre, la quantité de fucosido-lactoses et de lactodifuco-tétraose, très élevée dans le colostrum, décroît rapidement tandis que les taux du lactose et des polysides supérieurs augmentent dans le lait définitif.

Seuls les oligosaccharides contenant de la glc NAC sont actifs commé facteur bifidus I. Les oligosides neutres apportés par le lait maternel constituent donc une des sources naturelles de facteur bifidus I selon RAYNAUD.

Pour GRIMMONPREZ (41), l'activité B.b. var. Penn contenue dans le lait de femme, est associée essentiellement au motif structural de la N-acétyl-lactosamine. Ainsi s'expliquerait que le lacto-N-néotétraose possède une activité de croissance B. bifidus supérieure à celle du lacto-N-tétraose. Car, le premier possède contrairement au second, un reste de N-acétyl-lactosamine

#### b) - Les oligosaccharides acides :

La présence d'acide sialique dans le lait de femme a été démontrée par HOOVER, BRAUN et GYORGY (56) et par ZII IKEN, BRAUN et GYORGY (162) qui l'appellent acide gynaminique. C'est KUHN et BROSSMER (70) qui ont identifié ultérieurement cet acide comme étant l'acide N-acétyl neuraminique.

Ces résultats conduisent à l'isolement de nombreux sialosides de lait maternel. C'est ainsi qu'en 1962, KUHN et GAUHE (71) isolent de ce lait deux formes combinées de l'ANAN et du lactose dénommées 3' et 6'-lactaminyllactose, puis trois pentaoses acides (TABLEAU 6).

Plus récemment, GRIMMONPREZ et MONTREUIL (39) isolent six nouveaux oligosides acides en appliquant l'électrophorèse préparative sur papier à l'adialysable de la fraction S9 du lait maternel.

L'application des méthodes d'acétylyse, d'hydrolyse partielle, d'oxydation périodique, de perméthylation et des hydrolyses enzymatiques a permis à ces derniers chercheurs de proposer le schéma de structure suivant pour l'oligoside 6 ou dilactaminyllacto-N-tétraose (figure 7).

D'une manière générale, tous les oligosaccharides du gynolactose sont des produits de substitution du lacto-N-tétraose ou du lacto-N-néotétraose par du fucose ou de l'ANAN ; ou plus rarement par une chaîne de lactosamine, créant ainsi une structure ramifiée. L'équipe de KOBATA (65) a joué un rôle essentiel pour l'isolement et l'étude de la structure de ces oligosides. En 1974, GYORGY, JEANLOZ, NICOIAI et ZILLIKEN (50) en travaillant sur la fraction non dialysable du lait de femme, par chromatographie sur colonne de DEAE sephadex aboutissent aux mêmes résultats pour dire que la structure de base des oligosaccharides de haut poids moléculaire est formée des unités de lacto-N-tétraose ou de lacto-N-néotétraose.

Les mêmes auteurs ont étudié l'activité biologique de ces sucres acides. Et ils constatent que ceux-ci ne favorisent pas la croissance de la souche Penn. Ils ne deviennent des facteurs de croissance microbienne qu'après avoir été traités par de la Neuraaminidase de vibrio Comma, donc après élimination des acides sialiques. On obtient le même résultat lorsque l'acide sialique est éliminé par hydrolyse acide douce.

Ces résultats démontrent que les acides sialiques liés à la chaîne oligosidique exercent un effet protecteur contre la dégradation de ces composés par B. bifidum var. Penn.

En outre, ceci permet de supposer que Penn. ne possède pas la neuraminidase capable de couper la liaison osidique qui lie l'acide sialique à la chaîne

NOMENCLATURE DE KUHN	STRUCTURE
3'-LACTAMINYL-LACTOSE	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\ \uparrow \alpha-2,3 \\ \text{ANAN} \end{array}$
6'-LACTAMINYL-LACTOSE	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\ \uparrow \alpha-2,6 \\ \text{ANAN} \end{array}$
X-LACTAMINYL-LACTO-N-TETRAOSE (PENTAOSE A)	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\ \uparrow \alpha-2,3 \\ \text{ANAN} \end{array}$
Z-LACTAMINYL-LACTO-N-TÉTRAOSE (PENTOSE B)	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\ \uparrow \alpha-2,6 \\ \text{ANAN} \end{array}$
X-LACTAMINYL-LACTO-N-NÉOTÉTRAOSE (PENTOSE C)	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glcNAC}^{\underline{\beta-1,3}} \text{) gal}^{\underline{\beta-1,4}} \text{) glc} \\ \uparrow \alpha-2,6 \\ \text{ANAN} \end{array}$

TABLEAU 6 : Structure des oligosaccharides acides du lait humain d'après KUHN et GAUHE (71).



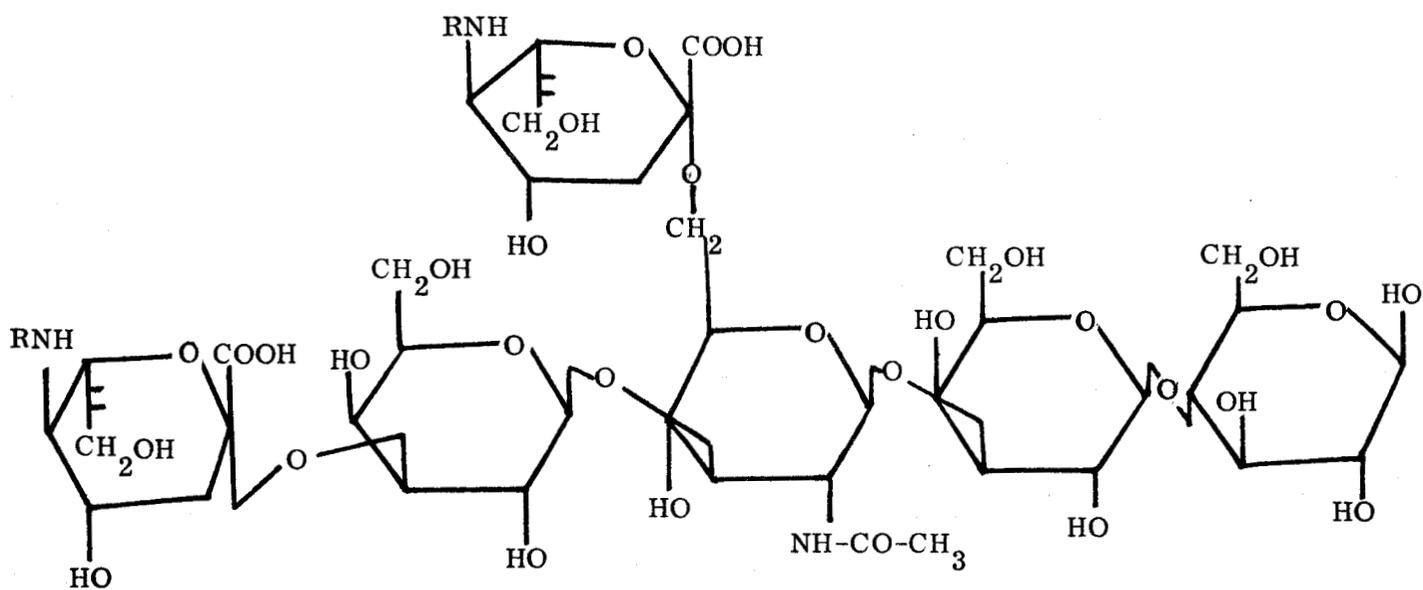


FIGURE 7 : Dilactaminyl-lacto-N-tétraose  
 GRIMMONPREZ et MONTREUIL (38, 40, 41).  
 $R = \text{CH}_3 - \text{CO}$  (acétyl)

oligosidique. Dans ces conditions, le microorganisme est incapable de libérer les résidus de N-acétyl-glucosamine pour l'utiliser dans la synthèse de sa paroi bactérienne. NICOIAI et ZILIKEN (103) avaient déjà fait des observations analogues en 1972. En effet, ils ont constaté à l'époque que le pouvoir bifidigène des oligosaccharides contenant l'ANAN était multiplié par 50, après hydrolyse à la Neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Ensuite, les mêmes auteurs ont montré en 1972, puis en 1974 chez *B. bifidus* var. Penn l'existence d'une neuraminidase spécifique de la liaison (2-3) qui lie l'ANAN à la chaîne oligosidique. Cependant ces liaisons dans le cas des oligosaccharides du lait humain sont essentiellement de type (2-6). Ce qui expliquerait la résistance de ceux-ci à la neuraminidase.

α) Relation des oligosides neutres avec les substances de groupes sanguins :

Plusieurs auteurs, en particulier WATKINS et MORGAN (166), KOBATA et GINSBURG (167) dont les travaux ont été rapportés par GRIMMONPREZ (40) ont démontré que certains oligosides du lait de femme possèdent les propriétés de facteurs de groupes sanguins Lewis (Le) : le lacto-difuco-tétraose et le lacto-N-difuco-hexaose I, par exemple, présentent une activité de groupe sanguin Le<sup>b</sup>. Tandis que le lacto-N-fucopentaose II et plus faiblement, le lacto-N-difucohexaose II possèdent une activité Le<sup>a</sup>. Pour GRIMMONPREZ, l'activité de ces oligosaccharides est due à leur structure similaire à la copule glucidique terminale des substances de groupes sanguins. Tous ces composés contiennent du fucose dans leur structure. Et sa fixation sur les oses du lait et les composés de groupes sanguins nécessite l'intervention d'une même fucosyl transférase spécifique. Les auteurs expliquent également ces inter-relations par le fait que les enzymes responsables de la biosynthèse des substances de groupes sanguins sont les mêmes que ceux qui participent à la formation des oligosaccharides du lait humain.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats à ceux qui ont été obtenus récemment à propos de l'urine humaine. En effet, celle-ci est riche en digosaccharides dont certains sont identiques à ceux du lait maternel, STRECKER (168), STRECKER et MONTREUII (169).

D'après les auteurs, leur présence est fonction également du groupe sanguin. Mais il est difficile de rattacher le métabolisme des oligosaccharides du lait de femme à celui des antigènes de groupes sanguins, car ces derniers ne renferment pas de glucose dans leur structure (40). Pour GRIMMONPREZ, l'activité des oligosaccharides du lait est due probablement à de simples analogies de structures avec celles des substances de groupes sanguins.

c) - Les glycoprotéines et glycopeptides du lait de femme :

Une activité de facteur de croissance pour *B. bifidum* var. Penn. peut être retrouvée dans d'autres composants du lait de femme que les oligosaccharides précédemment cités. Les premières études menées par HIRANO et Coll. (55) ont permis l'isolement à partir du colostrum humain de glycopeptides et de glycoprotéines (poids moléculaire compris entre 1900 et 18 000) présentant une activité bifidigène sur la souche Penn. comme sur celle de TISSIER.

Par la suite, l'équipe de BEZKOROVAINY s'est également penchée sur la question des glycoprotéines du colostrum et du lait humain. Ainsi, en 1973, une glycoprotéine acide (p.m. 31 200) a été isolée du colostrum (105). Elle contient 27% de galactose, 21,7% d'hexosamine, 8% de fucose et 11% d'acide sialique.

En 1974, à partir de la même fraction colostrale, six autres glycoprotéines (de p.m. variant entre 26 600 et 35 000) ont été isolées (102). Elles contiennent toutes de la glcNAC et présentent toutes une activité biologique qui semble proportionnelle à la teneur globale en oses. De même en 1976, les mêmes auteurs décrivent deux glycoprotéines (9) du lait de femme. L'une est proche de l'orosomucoïde du sérum humain ; l'autre étant spécifique du lait maternel. Cette dernière peut être rapprochée des glycoprotéines précédemment isolées du colostrum par son poids moléculaire voisin de 30 000 et par sa copule glucidique qui représente 70% de la molécule et dont la composition est semblable. Mais elle en diffère par sa composition en amino-acides.

Elle est également active sur la croissance de la souche Penn.

L'activité bifidigène de la caséine a également été étudiée.

Ce sont KEHAGIAS, JAO et HANSEN (63) qui ont abordé les premiers cette question. En travaillant sur la caséine bovine, ils ont isolé en 1977, à partir de celle-ci, une fraction pauvre en sucres, et très riche en amino-acides qui stimule la croissance de la souche Penn. au même degré que la glcNAC. Mais, ces derniers n'ont jamais réussi à bien définir ce composé actif de la caséine bovine. Ils ont simplement rapporté que l'activité retrouvée est due en fait à des produits d'hydrolyse de la K caséine.

Reprenant le problème de la caséine, BEZKOROVAINY, GROHLICH et NICHOLS (11) observent en 1979 que la caséine humaine possède peu ou pas d'activité de croissance Penn. Cependant, quand elle est digérée par des enzymes protéolytiques, elle devient un facteur de croissance pour cette souche bactérienne.

D'après BEZKOROVAINY et Coll. la digestion de la caséine par la chymotrypsine est préférable à celle par la trypsine. Puisque le premier enzyme conduit à une digestion complète, alors que le second donne naissance à un taux élevé de produits insolubles.

Cette constatation laisse supposer que les facteurs actifs de la caséine ne sont pas ou sont peu accessibles aux micro-organismes intestinaux du nourrisson. Ils ne le deviennent qu'après digestion enzymatique du matériel biologique.

La question est de savoir s'il existe dans le système gastro-intestinal du nouveau-né, des enzymes protéolytiques capables de digérer la caséine afin de libérer tous ses facteurs actifs. Pour cela, il serait intéressant de rechercher la présence de tels enzymes chez le nourrisson.

Pour appuyer sa démonstration, l'équipe de BEZKOROVAINY (11) entreprend un fractionnement par gel filtration de la caséine digérée au préalable par la chymotrypsine. Elle obtient dans ces conditions en 1979, une fraction glycopolypeptidique, très riche en oses.

L'étude des propriétés chimiques et biologiques de celle-ci, et la détermination de la masse moléculaire faite par chromatographie sur colonne de biorad P 300 et de Séphadex G 200 ont permis aux auteurs de découvrir l'analogie

existant entre le matériel glycopolypeptidique isolé du lait définitif en 1976 et le composé obtenu 3 ans plus tard à partir de la caséine humaine.

Les deux composés ont un poids moléculaire de l'ordre de 30 000. On retrouve les mêmes oses dans leur structure, notamment : du galactose, de la N-acétyl-glucosamine, de la galactosamine, du fucose et de l'acide sialique. Les amino-acides qui prédominent restent les mêmes dans les deux cas. En outre, ils stimulent tous deux et au même degré, la croissance de Penn. D'après les auteurs, bien qu'il existe des différences quantitatives, par exemple dans la valeur du rapport glucosamine/galactosamine, il est possible de supposer que la fraction glycopolypeptidique isolée précédemment du lait proviennent en partie ou en totalité de la caséine digérée par des enzymes protéolytiques présents dans le lait ou plus précisément de la K caséine, seul composant des caséines contenant des oses.

En 1981, BERKOROVAINY et TOPOUZIAN (12, 13) reprennent l'étude des caséines humaines et bovines. Et ils retrouvent cette fois une faible activité pour la caséine humaine. Celle-ci est retrouvée dans la copule glucidique séparée par  $\beta$  élimination. Cette dernière a été fractionnée par gel filtration, puis par chromatographie échangeuse d'ions. L'activité bifidigène des différentes préparations ainsi obtenues est proportionnelle à leur teneur en hexosamines. Il est intéressant de noter que la caséine résiduelle après  $\beta$  élimination de 90% des oses, présente une activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance bactérienne. Il s'agit d'une inhibition compétitive que les auteurs expliquent en supposant l'existence de sites de fixation spécifiques à la surface de la bactérie test.

A ce niveau, la caséine débarassée de ses sucres, peut entrer en compétition réversible avec les facteurs de croissance bactérienne présents dans le lait. Ce qui démontre indiscutablement que l'activité des facteurs bifidigènes est inhérente aux unités oligosaccharidiques contenues dans le lait et la caséine humains. L'importance du rôle de la copule glucidique est confirmée par le fait que la caséine bovine ne présente pas d'activité bifidigène. En effet, selon FOURNET et Coll. (170), la copule glucidique de la K caséine de vache ne contient pas de glcNAC.

En guise de conclusion, BEZKOROVAINY et Coll. attribuent en définitive à la caséine humaine, une double fonction :

- celle de fournir les amino-acides essentiels et de satisfaire les besoins énergétiques du nourrisson ;
- celle de mettre à la disposition du tout petit, les substances stimulatrices de la croissance du B. bifidum var. Penn. Celle-ci apporte ainsi une contribution appréciable à la protection de l'enfant contre les désordres intestinaux.

#### 5°/ - Applications cliniques du facteur de GYORGY :

Von E. WALCH (171) a pu expérimenter cliniquement en 1956, le facteur bifidigène de GYORGY.

Ce chercheur a constaté qu'une addition de 400 mg d'un mélange d'oligosaccharides extraits du lait de femme dans 100 ml de lait de vache, exalte considérablement la croissance de Penn. L'effet peut atteindre un degré comparable à ce que l'on obtient avec l'allaitement au sein.

L'auteur a par ailleurs testé l'influence sur l'organisme humain du  $\beta$ -éthyl-N-acétyl-D-glucosaminide dénommé (N 180), composé de synthèse très actif sur la croissance de la souche Penn.

Pour cela, il donne à des nourrissons dont la mère ne peut pas allaiter :

- { 50 g de lait de vache demi-écrémé ;
- { 50 g du composé N180 ;
- { 5 g de saccharose
- { Bouillie à 6% de flocon d'avoine.

Pendant la phase d'observation, ce dernier constate que parmi les nourrissons étudiés, un certain nombre présentent toujours une flore intestinale à prédominance B. bifidum. A côté de ceux-ci, un deuxième groupe présente pendant ce temps un taux relativement faible de B.b. Ce qui lui permet de dire que les diverses souches de B. bifidum réagissent différemment en présence du composé N 180.

Il a observé également qu'une augmentation de la dose du produit N180 se traduit par une augmentation du pourcentage de B.b. dans la flore fécale des patients. Il démontre donc ainsi le pouvoir stimulant du composé précédemment décrit.

Un essai analogue réalisé à partir du "lait Humana" lui a permis d'obtenir des résultats nettement meilleurs que les précédents puisqu'il obtient avec la même dose de 50 mg du produit N180 pour 100 g de lait Humana, une flore fécale composée à 90% de B.b.

Pour WALCH V. E. tous ces résultats méritent encore un examen critique par des pédiatres. Pour le moment, ils démontrent tout simplement, qu'il est encore possible de progresser dans la maternisation du lait de vache.

Il convient de noter que ces résultats ont été obtenus par simple examen de frottis sur lame des selles de nourrissons après coloration par la méthode de Gram. Et cette technique de recherche n'offre aucune garantie bactériologique et conduit souvent à des erreurs (120).

En effet, à l'examen microscopique, on a tendance à considérer comme B. bifidum toutes les bactéries en forme de bâtonnets gram-positifs avec un aspect bleu. Or toutes les bactéries gram-positifs ne sont pas des B.b. Si l'enfant est élevé au sein, il y a concordance entre l'aspect des lames et celui de la flore fécale, mais celle-ci n'est ni absolue ni régulière.

Par contre, si le taux de B.b. est faible dans le milieu, cas des nouveau-nés alimentés au biberon, les cultures contiennent surtout des colibacilles gram-négatifs. Et les quelques B.b. qui y sont présents peuvent être eux-mêmes partiellement gram-négatifs par vieillissement.

Donc ces résultats doivent être examinés avec beaucoup de réserve et méritent une confirmation par culture sur un milieu approprié.

D'autres essais cliniques ont été faits en 1960 par LEVESQUE, JONET et RAYNAUD qui utilisent des quantités relativement élevées de glcNAC de l'ordre de 500 mg par jour.

Le principe de leur expérience consiste à sélectionner dans une pouponnière quatre à huit nourrissons ne contenant pas de B.b. décelable dans leurs selles avant le début de l'expérience.

La recherche des B.b. est effectuée par culture sur milieu BIAUROCK additionné d'acide sorbique.

Les auteurs rapportent que :

- l'administration du facteur de GYORGY, sous forme de glcNAC a fait apparaître le B.b. dans les selles. L'arrêt de l'administration régulière de ce composé provoque la disparition du germe.

Des essais cliniques ont été également réalisés par la firme GALLIA, en utilisant du lait complété en mucine gastrique solubilisée de porc.

Afin de faciliter la digestion de la mucine de porc, la firme GALLIA utilise ce produit sous forme partiellement hydrolysée qu'elle incorpore à l'alimentation des enfants.

Il ressort de cette étude que les enfants ayant reçu l'aliment complété en mucine gastrique de porc, présentent une augmentation appréciable du taux de B. bifidum dans leur flore fécale. Donc, ce résultat confirme ce que l'équipe de GYORGY avait déjà trouvé en 1954. La commercialisation de ce lait ne semble cependant pas avoir été poursuivie.

#### IV. - Autres composés pourvus d'activité bifidigène :

##### 1°/ - Facteur bifidus II de RAYNAUD :

Plusieurs auteurs, en particulier RAYNAUD (118, 119), RAYNAUD et BIZZINI (122) démontrent qu'il existe un autre facteur qui est nécessaire pour la croissance des souches habituelles de lactobacillus bifidus de la flore fécale de l'enfant.

Les oligosaccharides azotés, selon eux, n'agissent en effet que sur la souche Penn., mutant qui a perdu la capacité de synthétiser la glucosamine.

RAYNAUD et BIZZINI ont dénommé ce deuxième facteur de croissance microbienne "facteur bifidus II" ou "BFII". Il s'agit d'une substance de nature peptidique qui prend naissance sous l'influence des protéases agissant sur diverses protéines, en particulier la caséine du lait de vache et présente les propriétés suivantes :

- elle est un facteur de croissance essentiel pour la majorité des

- souches de B. bifidum que l'on peut isoler à partir des selles de nourrissons élevés au sein, en particulier pour la souche de TISSIER ;
- ce composé est différent du facteur bifidus I de GYORGY et de la strepogénine qui est un ensemble de peptides qui exercent un effet stimulant sur la croissance de certaines bactéries comme les lactobacilles et les streptocoques ;
  - ce deuxième facteur provoque en deux ou trois jours l'apparition d'une flore bifide prédominante chez les nourrissons qui ne présentent pas de B.b. décelables dans leurs selles, lorsqu'on l'ajoute à un régime artificiel ordinaire non bifidigène.

L'auteur définit l'unité du BF II, comme étant la plus faible quantité de ce facteur qui dans les conditions indiquées donne une croissance correspondant à une acidité totale de 1 ml d'acide 0,1N.

a) - Etude de la nature chimique du BF II :

Dans le but de trouver des sources naturelles pourvues d'activité comme BF II, RAYNAUD détermine le titre en BF II de divers produits biologiques. Le tableau n° 7 donne les résultats obtenus.

Il révèle que les sources naturelles sont en fait très pauvres en BF II. Les hydrolysats enzymatiques de protéine sont les seuls produits riches en ce facteur de croissance. Mais, RAYNAUD trouve que leurs titres sont très variables. D'où la nécessité, avant d'entreprendre une étude de la nature chimique du composé actif, de trouver une source commerciale facilement accessible d'une part et de rechercher par ailleurs les conditions d'hydrolyse protéasique les plus favorables pour isoler ce facteur.

Ce double objectif incite les auteurs à étudier l'effet d'un grand nombre de protéases : trypsine, papaïne, pronase. Elles font toutes apparaître par digestion de la caséine, des taux élevés de facteur bifidus II. Cela leur a permis de sélectionner deux types d'hydrolysats de caséine. Le premier est obtenu avec des

S U B S T A N C E S	TITRES (EN UNITÉ/G)
- Lait humain de mélange	1 à 20 u/g
- Lait humain traité par la papaïne	20 à 100 u/g
- Pepsine commercialisée brute	1 à 250 u/g
- Trypsine	85 u/g
- Papaïne	100 u/g
- Extrait d' <i>Aspergillus orizae</i>	500 à 100 u/g
- Extrait de foie	20 à 660 u/g
- Digestion papaïnique de foie de veau	2 500 u/g
- Caséine brute	inactive ( 50 u/g)
- Hydrolysats de caséine par :	
. la papaïne	800 u/g
. la pepsine	500 u/g
. la trypsine	500 u/g

TABLEAU 7 : Titre en facteur bifidus II de diverses substances d'après RAYNAUD (118).

Unité = plus faible quantité de BF II qui donne une croissance correspondant à une acidité totale de 1ml d'acide N/10

broyats de muqueuse de porc ; le deuxième avec la pronase. Ils font alors un fractionnement des deux hydrolysats de caséine à l'aide de diverses techniques chromatographiques. Ils obtiennent en définitive deux fractions avec un rendement faible en facteur bifidus II. De l'aveu de RAYNAUD, les fractions obtenues sont encore très hétérogènes, si bien que la nature chimique exacte du BF II reste toujours à préciser. Cela démontre que les facteurs de croissance de nature peptidique constituent un groupe encore mal connu.

#### D. - CONCLUSION.

Il serait intéressant de comprendre le mécanisme d'action des facteurs bifidigènes. Dans le cas des composés de nature peptidique (facteur de RAYNAUD, glycoprotéines du colostrum et de la caséine) ceci paraît très difficile, du fait que la structure de ces composés reste encore très mal connue.

Quant à la glcNAC et ses dérivés, les travaux de O'BRIEN, GLICK et ZILLIKEN (107, 108), de LAMBERT, SAITO et VEERKAMP (75), de VEERKAMP (173) ont montré que l'activité de l'hexosamine est due à sa participation à la biosynthèse de l'acide muramique, composé de base de la paroi bactérienne. Ainsi, la nécessité pour B. bifidum d'un apport extérieur de la glcNAC reste mal expliquée. Il en est de même pour la différence d'activité bifidigène de l'hexosamine libre et de ses formes combinées naturelles (oligosaccharides) ou de synthèse. Ce dernier fait qui donne toute son importance à l'apport de la glcNAC sous forme d'oligosaccharides présents dans le lait maternel découlerait selon LAMBERT et ZILLIKEN (74) de l'existence d'une phosphorylase hypothétique permettant l'obtention de la glcNAC 1 (P) forme directement utilisable par B. bifidum.

CHAPITRE III. - TRAVAUX PERSONNELS

## A. - INTRODUCTION.

La réalisation de ce travail a été rendue possible en partie grâce aux travaux de recherches entrepris depuis quelques années d'abord par BEEERENS sur la toxonomie des Bifidobactérium, puis par ROMOND, NEUT et BEEERENS sur la composition de la flore intestinale des nourrissons élevés au sein ou au lait artificiel.

A partir d'une étude réalisée sur les selles de 50 enfants dont 39 étaient nourris artificiellement et 11 recevaient du lait maternel, ils montrent que dans le cas de l'alimentation au lait de femme, la souche B. bifidum reste prédominant dans les selles puisqu'elle représente 72% des souches isolées. Par contre, lorsqu'on s'adresse à l'alimentation artificielle, le taux de B.b. n'est plus que de 13% et la souche B. longum devient majoritaire avec un taux de 60% de la flore fécale totale. L'espèce B. infantis étant également bien représentée avec une valeur de 18%. Pour l'équipe de ROMOND, les bactéries isolées des selles de nourrissons peuvent être réparties en deux groupes : un premier qui comprend les espèces longum et infantis dont la croissance est favorisée par l'alimentation artificielle. Un deuxième groupe formé par l'espèce B. bifidum qui est favorisée exclusivement par le lait maternel.

Les auteurs concluent donc à l'existence probable de facteurs spécifiques dans le lait de femme, ayant la propriété de stimuler la croissance du B. b.

## B. - PREPARATION DE LA FRACTION ACTIVE DU LAIT MATERNEL.

### I. - Etudes préliminaires :

Disposant d'un test microbiologique de mise en évidence de l'activité bifidigène, nous avons appliqué au lait maternel, différentes méthodes classiques de préparation et de fractionnement, dans le but d'isoler et concentrer à partir de celui-ci, les composants responsables de son activité biologique.

Le lait de femme fourni par le lactarium de l'Institut Pasteur de Lille est un lait de mélange provenant de plusieurs donneuses.

Ce lait a fait l'objet de plusieurs essais de centrifugation. Et, nous avons constaté que la centrifugation à une vitesse de l'ordre de 15 000 t/mn à 4°C pendant une heure permettait d'obtenir un lait écrémé, plus clair, qui garde toute son activité bifidigène. Dans ces conditions tous les échantillons de lait ont été systématiquement délipidés avant utilisation.

## II. - Fractionnement du lait maternel :

### 1°/ - Précipitation de la caséine :

#### a) - Mode opératoire :

La caséine est précipitée selon la méthode de DUNN, par abaissement du pH au voisinage de son point isoélectrique  $pHi = 4,6$  à l'aide d'acide chlorhydrique N/10, suivie d'une centrifugation à 4°C pendant une heure à 15 000 t/mn.

Le lactosérum surnageant est ajusté à pH7 par addition de soude, NaOH N. Tandis que la caséine précipitée est redissoute dans un volume de tampon phosphate 0,1 M pH7 égal au 1/7<sup>è</sup> du volume de lait utilisé.

#### b) - Résultats :

Nous constatons que la précipitation de la caséine n'altère pas l'activité bifidigène du lait de départ, puisqu'on la retrouve après précipitation de celle-ci dans le lactosérum, (TABLEAU 8).

On peut aussi noter la présence d'une activité biologique dans la caséine pour les souches de B. bifidum testées : AA 2/2 et B 536. Mais celle-ci reste faible, puisque à la dilution du 1/5, l'activité disparaît déjà. Cela confirme les résultats obtenus par BEZKOROVAINY et Collaborateurs qui ont trouvé également de l'activité bifidigène, dans les fractions de caséine humaine.

Composé étudié	Espèce B. bifidum			Espèce B. Longum			B. infantis	
	AA 2/2	Penn.	B536	Nantes	Long Coll	LMa3	Inf.S2	C6
Lait de femme délipidé	+ $\frac{1}{10}$	+ pur	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{5}$	+ $\frac{1}{5}$	-	+ pur	+ $\frac{1}{5}$
Lacto-sérum	+ $\frac{1}{10}$	+ pur	+ $\frac{1}{5}$	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{5}$	-	+ pur	+ $\frac{1}{10}$
Caséine	+ pur	-	+ pur	-	-	-	-	+ pur

**TABLEAU 8** : activité biologique du lactosérum et de la caséine humaine sur la croissance de 8 souches de *Bifidobactérium* appartenant aux espèces : *bifidum*, *longum* et *infantis*.  
(L'activité biologique étant représentée par la dernière dilution positive).



## 2°/ - Fractionnement au sulfate d'ammonium :

### a) - Mode opératoire :

Le lactosérum est fractionné par addition de sulfate d'ammonium sec, avec agitation constante à 4°C pendant une heure.

Les trois fractions précipitant respectivement à 33%, 50%, 75% de saturation en sulfate d'ammonium, sont recueillies par centrifugation pendant une heure à 15 000 t/mn. Les précipités obtenus P1, P2, P3 sont redissous dans du tampon phosphate 0,1 M pH7. Les solutions qui en résultent et le surnageant final "S3" sont dialysées en boudins de cellophane, une nuit à 4°C contre de l'eau, puis, contre du tampon phosphate pendant une journée. Elles sont ensuite concentrées par ultrafiltration à l'aide de membranes Annicon type UM<sub>10</sub> pour obtenir un volume égal au 1/10<sup>e</sup> du volume de lactosérum de départ. La figure 8 illustre le schéma de fractionnement du lactosérum que nous avons appliqué.

Une étude de l'activité biologique a été faite sur les différentes fractions.

### b) - Résultats :

Le tableau n°9 révèle la présence d'une faible activité biologique dans les précipités P1 et P2 ; par contre, elle est beaucoup plus apparente dans le P3 avec toutes les souches de Bifidobactérium même avec celles qui sont retrouvées chez les nourrissons alimentés au lait de vache. Quant au surnageant final "S3", il semble ne favoriser que la croissance des souches AA 2/2 et B 536 appartenant à B. bifidum, spécifique des nourrissons élevés au sein, puisque le test microbiologique est négatif sur les autres souches.

Il convient de noter l'existence de petites différences dans les résultats d'un essai à l'autre.

Cela est dû, sans doute, aux difficultés de reproductibilité du test bactériologique. En effet, si la souche est mal activée, elle réagit difficilement en présence des facteurs. Néanmoins, l'essentiel des résultats reste reproductible d'un essai à l'autre.

Notons également la faible réactivité de la souche Penn. vis-à-vis de ces facteurs de croissance.

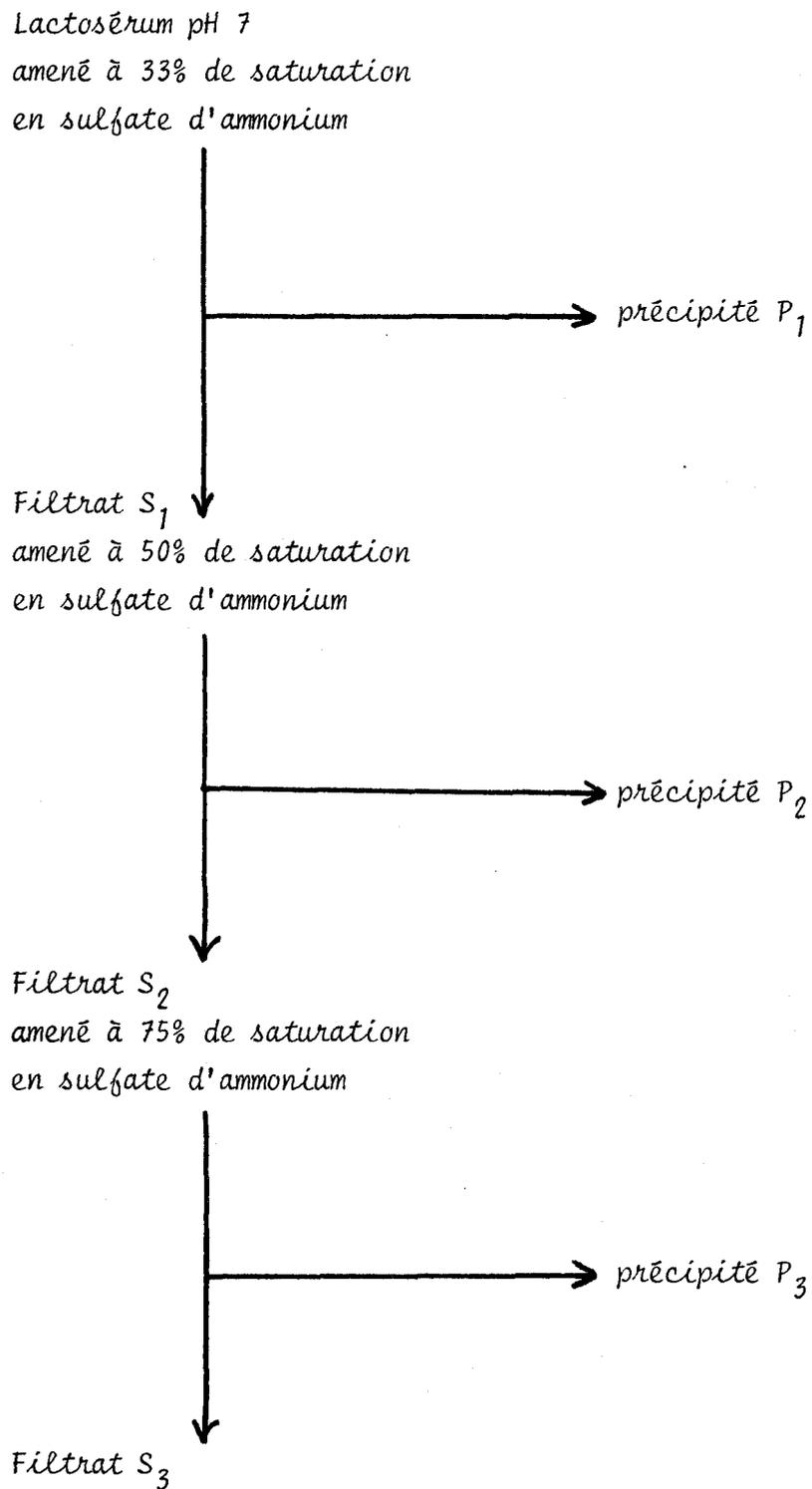


FIGURE 8 : schéma de fractionnement du lactosérum au sulfate d'ammonium.



	Espèce <i>B. bifidum</i>			Espèce <i>B. longum</i>			<i>B. infantis</i>	
	AA 2/2	B 536	Penn.	Nantes	Long. coll	LMa3	Inf. S2	C6
Lactosèrum	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{5}$	+ pur	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{5}$	-	+ pur	+ $\frac{1}{5}$
1er essai	P1	-	-	+ $\frac{1}{10}$	-	-	-	+ pur
	P2	+ pur	+ pur	+ pur	+ pur	-	-	-
	P3	+ pur	+ pur	+ pur	+ $\frac{1}{10}$	+ pur	+ pur	+ pur
	S3	+ $\frac{1}{100}$	+ $\frac{1}{100}$	+ pur	+ $\frac{1}{10}$	-	-	+ pur
2eme essai	P1	+ pur	-	-	-	-	-	+ pur
	P2	+ $\frac{1}{10}$	-	-	-	+ pur	-	+ pur
	P3	+ $\frac{1}{10}$	+ pur	+ pur	+ pur	+ pur	+ pur	+ pur
	S3	+ $\frac{1}{100}$	+ $\frac{1}{100}$	+ pur	-	-	-	-

TABLEAU N° 9 - Activité biologique des fractions obtenues par fractionnement du lait maternel au sulfate d'ammonium ; P1, P2, P3 précipités obtenus à 33% - 50% - 75% de saturation en  $SO_4(NH_4)_2$  ; S3 = surnageant final. Huit souches réparties en 3 espèces (*Bifidum*, *longum*, *infantis*) ont été testées.



### 3°/ - Précipitation à l'acide perchlorique :

#### a) - Mode opératoire :

De l'acide perchlorique pur est ajouté au lait de femme écrémé, jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 0,6 N. On laisse sous agitation constante à 4°C pendant une heure. La solution obtenue est ensuite centrifugée à 15 000 t/mn pendant une heure.

Le précipité formé est remis en suspension dans du tampon phosphate pH7. Le surnageant limpide est neutralisé par de la potasse, KOH 2N.

On laisse précipiter le perchlorate de potassium à 4°C pendant une nuit. Celui-ci est alors éliminé par décantation. Le surnageant final, dénommé "Sf" est concentré par ultrafiltration à l'aide de membrane amicon UM 10.

#### b) - Résultats :

Les résultats du traitement du lait humain par l'acide perchlorique nous permettent de faire deux constatations :

- le facteur spécifique qui facilite la croissance de la souche AA 2/2 se retrouve dans le surnageant de précipitation perchlorique. Il filtre à travers la membrane UM10 ; il correspond donc au facteur précédemment décrit, et restant dans le surnageant après fractionnement au sulfate d'ammonium (TABLEAU 10) ;
- cependant, on retrouve une certaine activité vis-à-vis d'autres souches n'appartenant pas à l'espèce B.b.

On peut donc penser que l'acide perchlorique précipite certains facteurs précipitables par le sulfate d'ammonium qui sont non spécifiques des souches B.b. et qui sont en partie dénaturés par le traitement perchlorique. Des résultats similaires ont été obtenus par précipitation alcoolique du lactosérum.

Fraction de lait	B. bifidum			B. Longum			B. infantis	
	AA 2/2	B 536	Penn.	Nantes	Long. coll.	LMa3	Inf. S2	C6
Lait de femme délipide	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{20}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{20}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{5}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{5}$
Précipité perchlorique	-	$+\frac{1}{5}$	-	$+\frac{1}{5}$	-	-	-	-
Sumageant final	$+\frac{1}{50}$	$+\frac{1}{50}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{50}$	$+\frac{1}{50}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{50}$	$+\frac{1}{50}$

TABLEAU 10 - Activité bifidigène des différentes fractions obtenues par fractionnement à l'acide perchlorique 69  
0,6 N du lait de femme.

L'activité de facteurs de croissance a été étudiée sur 8 souches réparties en 3 espèces (*bifidum*, *longum*, *infantis*).



### III. - Etude de la fraction active du lait maternel :

Les résultats précédemment rapportés montrent qu'un facteur de croissance pour l'espèce B. bifidum se retrouve dans le surnageant après précipitation par le sulfate d'ammonium ou l'acide perchlorique.

Ce dernier procédé, d'utilisation plus aisée, a donc été retenu et une étude plus approfondie des propriétés de la fraction ainsi obtenue (Sf) a été entreprise.

#### 1°/ - Concentration :

##### a) - Ultrafiltration :

Dans le but de concentrer le Sf, différents types de membranes amicon ont été essayés : UM 10, DM5, UM2 et UM 05 dont les limites de rétention se situent respectivement à 10 000, 5 000, 1 000 et 500 daltons. Grâce à celles-ci, les essais sont concentrés au 1/3 du volume de Sf de départ.

D'après les résultats obtenus (TABLEAU 11), nous constatons une diminution relative de l'activité bifidigène du filtrat à partir de la membrane DM5. Celle-ci disparaît totalement quand on utilise la membrane UM05.

Dans ces conditions, on peut penser que la fraction active est très hétérogène et que la masse moléculaire des composés actifs s'échelonne entre 500 et 10 000. Cependant, la technique d'ultrafiltration n'est pas utilisable pour concentrer nos préparations, du fait des nombreux inconvénients qu'elle présente. En effet, le volume des cellules ne permet pas de travailler sur de grandes quantités de fractions de lait. Elle impose des heures d'attente pour obtenir la concentration voulue. Le nettoyage des cellules et des membranes demande un temps relativement long.

Ces difficultés nous ont donc contraint à essayer d'autres moyens de concentration, comme la lyophilisation et l'évaporation rotative sous pression réduite.

SOUCHES	S3	Ultrafiltration/UM 10		Ultrafiltration/DM 5		Ultrafiltration/UM 2		Ultrafiltration/UM05	
		Sol. concentré	Filtrat	Sol. conc.	Filtrat	Sol. conc.	Filtrat	Sol. conc.	Filtrat
AA 2/2	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{5}$	$+\frac{1}{20}$	$+\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{5}$	+ pur	$+\frac{1}{10}$	-
LMa3	-	-	-	-	-	+ pur	-	-	-

TABLEAU II - Concentration du S6 (surnageant final du fractionnement au  $SO_4(NH_4)_2$ ) par ultrafiltration sur membranes : UM10, DM5, UM2, UM05.



b) - Lyophilisation :

Quelques essais ont été réalisés à partir du Sf de précipitation perchlorique. Le résidu obtenu est difficile à remettre en solution, malgré l'addition d'un faible volume d'éthanol. La suspension est alors centrifugée à 4 000 t/mn pendant 10 minutes. Le culot et le surnageant sont testés bactériologiquement.

Les résultats obtenus montrent que l'activité de croissance microbienne observée dans le Sf se trouve répartie dans le surnageant et le culot.

Les difficultés rencontrées pour la remise en solution ne semblent pas dues à la présence de graisses, puisque l'extraction du Sf par les mélanges : alcool/éther, éthanol/chloroforme et par l'hexane n'entraîne pas de quantité mesurable de produit dans la phase organique.

En définitive, la méthode de concentration que nous avons retenue est l'évaporation sous pression réduite, puisqu'elle permet de concentrer en peu de temps, nos préparations à volonté et sans perdre leur activité biologique.

2°/ - Traitement par la chaleur :

Les travaux de BEERENS, ROMOND et NEUT (5) avaient déjà montré la thermostabilité des facteurs bifidigènes dans le lait de femme.

Nous avons voulu vérifier que nos préparations présentaient également les mêmes caractéristiques. Effectivement, celles-ci gardent leur activité après chauffage à 60°C/1heure, 100°C/1heure, 120°C/40 minutes, 120°C/1heure.

3°/ - Hydrolyse acide :

Etant donné cette stabilité particulière à la chaleur, nous avons cherché à préciser la nature chimique des facteurs de croissance en testant leur acidostabilité. Ceci a été étudié de la manière suivante :

Essai 1 :

Du Sf est chauffé à reflux pendant 15 heures à 100°C, en présence d'acide chlorhydrique 6 N.

Le mélange est ensuite évaporé à sec, repris par un faible volume d'eau, puis évaporé à sec à nouveau. Le résidu est finalement repris dans l'eau et neutralisé pour être testé bactériologiquement.

Parallèlement, un témoin a été préparé par neutralisation immédiate de l'acide chlorhydrique.

### Essai 2 :

D'autres essais ont été réalisés en chauffant le Sf à 100°C pendant 2 heures en présence d'acide chlorhydrique N et N/10. Les solutions sont ensuite neutralisées par addition de soude. Des témoins ont été préparés parallèlement comme décrit plus haut.

Les différents essais font l'objet d'un test d'activité microbienne. Il en ressort que dans les hydrolysats chlorhydriques 6 N et N, l'activité biologique est totalement détruite puisque les deux essais se montrent inactifs sur la souche AA 2/2, sauf dans les témoins.

Par contre, dans l'hydrolysat N/10, une faible activité a été détectée. Ceci s'explique peut être par le fait qu'à cette concentration d'acide, les facteurs actifs sont partiellement dégradés.

### 4°/ - Conclusion :

A ce stade de notre travail, nous pouvons dire que les facteurs bifidigènes, responsables de l'activité biologique du lait de femme, peuvent être retrouvés dans une fraction non précipitable par le sulfate d'ammonium à 75% de saturation, par l'alcool à 80%, par l'acide perchlorique 0,6 N. Bien que cette dernière méthode soit moins spécifique pour préparer la fraction de lait active sur la croissance de B. bifidum, nous l'avons quand même retenue compte-tenu des nombreux avantages qu'elle présente par rapport au fractionnement au sulfate d'ammonium.

- En effet, elle permet d'obtenir la préparation de lait en quelques heures, ce qui est pratiquement impossible avec la première méthode ;
- d'autre part, l'élimination du perchlorate de potassium est très aisée. On évite donc ici toute la phase de dialyse, qui est nécessaire dans le cas du fractionnement au sulfate d'ammonium pour éliminer les sels ;
- enfin, la méthode à l'acide perchlorique fait appel à du lait délipidé, alors que la première comme la précipitation alcoolique exigent l'utilisation du lactosérum qu'il faut d'abord préparer.

Les résultats de l'étude préliminaire de la fraction active ainsi obtenue à partir du lait humain ont montré que : celle-ci garde son activité après lyophilisation ou après concentration par évaporation sous pression réduite ; qu'elle présente une

stabilité remarquable à la chaleur ; que par contre, elle est totalement dénaturée par hydrolyse acide ménagée.

Ces caractéristiques nous permettent de formuler l'hypothèse que les facteurs actifs du lait de femme peuvent être de nature glucidique.

Mais la préparation de lait reste encore très hétérogène. Nous avons alors jugé nécessaire de la purifier, en appliquant les techniques classiques de gel filtration sur colonne de gel de polyacrylamide.

#### IV. - Chromatographie par gel filtration de la fraction active de lait de femme :

##### 1°/ - Gel filtration sur biogel P6 :

##### a) - Mode opératoire :

La fraction (Sf), obtenue par précipitation perchlorique est neutralisée à pH7, puis concentrée au 1/5ème de son volume initial.

Elle est déposée en 3 fois, à raison de 15 ml par dépôt sur une colonne, type pharmacia K26 (55 x 2,6 cm) de biogel P6 (100 - 200 mesh). L'élution se fait avec du tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH7. L'éluat est recueilli par fractions de 7,5 ml en 20 minutes sur un collecteur de fractions.

L'absorbance des différents composés est lue à 254 nm. Les oses ont été dosés dans les différentes fractions recueillies par la méthode à l'orcinol sulfurique en flux continu.

En fonction des résultats du test bactériologique, les fractions actives récupérées lors des 3 gel filtrations sont réunies et concentrées à 10 ml soit 1/25ème du volume de lait dont on est parti.

##### b) - Résultats :

Le profil d'élution des différents composés est représenté sur la figure n° 9. Les fractions bifidigènes sont éluées entre le 10ème et le 34ème tube, donc dans une zone assez large, ce qui démontre leur hétérogénéité. Ces résultats viennent donc confirmer ceux que nous avons obtenus par ultrafiltration du Sf perchlorique, et qui nous ont permis de dire que la masse moléculaire des facteurs

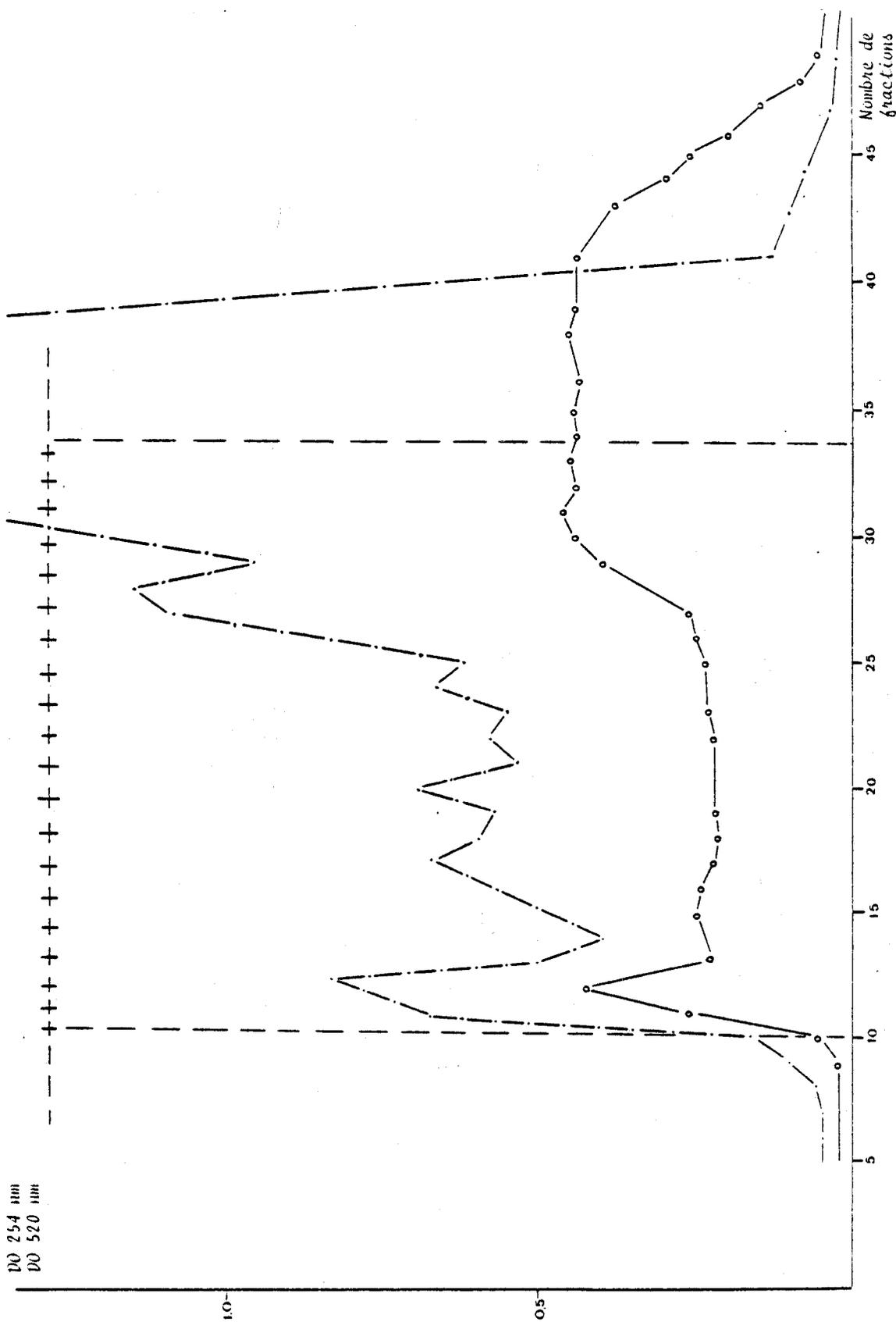


FIGURE 9 - Chromatographie sur colonne (55 x 2,5 cm) de biogel P6 (100 - 200 mesh) du surnageant final (S<sub>6</sub>), obtenu par fractionnement du lait maternel à l'acide perchlorique 0,6 N et neutralisé par la potasse 2 M. Dépôt : 15 ml ; éluant : tampon très HCl 0,05 M pH7 ; débit : 23 ml/heure.

En ordonnées : absorbance à 254 nm et DO mesurée à 510 nm après réaction à l'orcinoïol sulfurique.



- o—o—o : diagramme d'élué
- : repérage des oses à l'orcinoïol sulfurique
- + + + + + : activité bifidigène sur la souche AA 2/2 de l'espèce B. bifidum.

bifidigènes était comprise entre 500 et 10 000. Notons également la coïncidence remarquable entre la présence des sucres et la zone de localisation des composés actifs élués. La fraction majeure des oses correspond certainement au lactose qui ne paraît pas supporter l'essentiel de l'activité biologique.

Pour parfaire l'élimination de ce dernier et des composés de faible masse moléculaire, une deuxième chromatographie par gel filtration sur colonne de biogel P2 a été réalisée.

## 2°/ - Gel filtration sur biogel P2 :

### a) - Mode opératoire :

La préparation précédemment obtenue (10 ml) est déposée en 3 fois sur une colonne (90 x 1,5 cm) de biogel P2 (100 - 200 mesh ).

L'élution se fait avec de l'eau bidistillée.

L'éluat est collecté par fraction de 5,5 ml en 15 minutes.

L'absorbance des composés est lue à 280 nm.

Comme dans le cas précédent, un repérage des sucres et un test d'activité microbiologique sont effectués.

### b) - Résultats :

Les facteurs de croissance pour AA 2/2 sont ici présents dans une zone assez restreinte (figure 10) qui va du 10<sup>e</sup> au 18<sup>e</sup> tube et qui coïncide avec les fractions riches en sucres.

Cependant, cette préparation reste encore très hétérogène. Nous avons alors pensé qu'il serait intéressant d'appliquer d'autres moyens de purification tels que la chromatographie sur résines échangeuses d'ions.

Ceci aura l'avantage de nous permettre de connaître la charge des différents composés actifs sur la croissance de B. bifidum. Pour cela, nous avons utilisé deux types de résines :

- une résine échangeuse de cations Dowex 50 x 8 ;
- et une résine échangeuse d'anions Dowex 1 x 8.

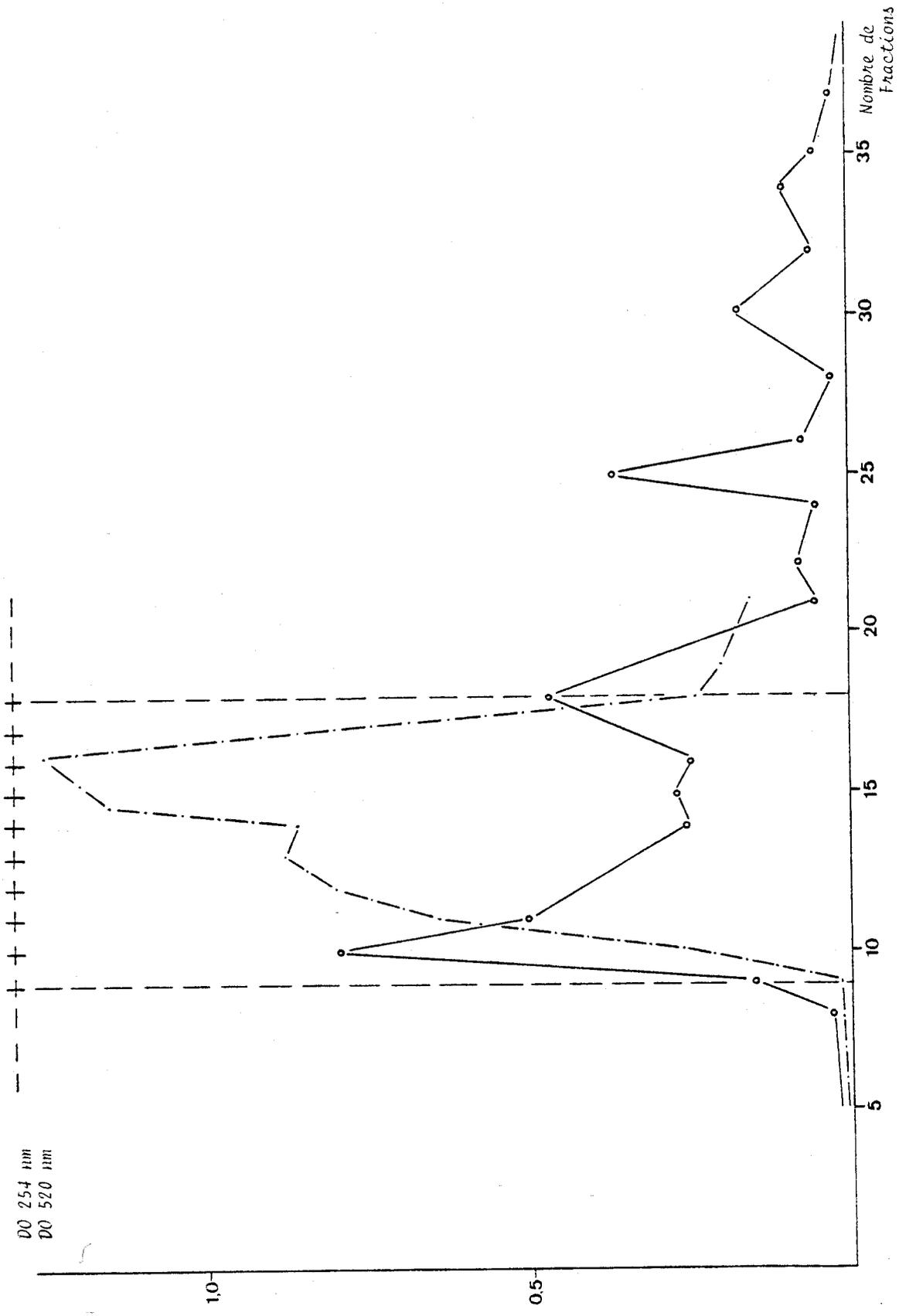


FIGURE 10 - Chromatographie sur colonne (90 x 1,5 cm) de biogel P2 (100 - 200 mesh) de la fraction active de lait maternel préalablement purifiée sur du biogel P6  
 Dépôt = 3 ml ; éluant : eau distillée, débit 22 ml/heure



○—○—○ : diagramme d'éluéion  
 ○—○—○ : repérage des oses  
 + + + + : activité bifidigène étudiée sur la souche AA 2/2 de l'espèce B. bifidum.

V. - Chromatographie sur résines échangeuses d'ions :

1°/ - Résines échangeuses de cations, Dowex 50 x 8 (200 - 400 mesh),  
forme acide.

Nous avons déposé 5 ml de la préparation obtenue précédemment, sur une colonne (15 x 1 cm) contenant la résine Dowex 50 x 8 (200 - 400 mesh), forme acide. Les produits non fixés sur la résine sont élués avec de l'eau distillée 3 x 10 ml. Ceux qui sont retenus sont déplacés par de l'ammoniaque 2 N.

Les éluats sont évaporés à sec et repris par 5 ml d'eau distillée. Dans les mêmes conditions opératoires, on réalise un témoin en traitant 5 ml de produit par de l'ammoniaque pour ajuster la concentration à 2 N. La solution obtenue est également évaporée à sec, puis repris par 5 ml d'eau distillée.

Les résultats du test bactériologique montrent que les facteurs de croissance bactérienne se retrouvent uniquement dans la fraction éluee avec l'eau et dans le témoin. Cela signifie que les produits actifs ne sont pas retenus par la résine et qu'ils ne sont donc pas chargés positivement dans les conditions utilisées. Du fait que l'activité ne disparaît pas après traitement à l'ammoniaque, il semble bien qu'aucun produit actif n'ai été retenu par la résine.

L'échantillon actif de lait de femme ainsi obtenu après purification sur résine Dowex 50 x 8 est défini comme étant la fraction (FA).

Des dosages à la ninhydrine ont été réalisés avant et après passage de la préparation de lait sur Dowex 50 x 8. Les résultats obtenus montrent une forte diminution des chromogènes correspondants.

Quant à l'activité biologique observée initialement, elle reste pratiquement au même niveau avant et après purification sur résine cationique. Ce résultat démontre que les composés actifs contenus dans le produit FA ne sont sans doute pas de nature peptidique puisque la rétention des peptides par la Dowex 50 x 8 ne s'accompagne pas d'une baisse notable de l'activité bifidigène dans la fraction de lait humain.

2°/ - Fractionnement de FA sur résine échangeuse d'anions Dowex

1 x 8 (200 - 400 mesh), forme acétate :

a) - Mode opératoire :

La fraction FA a été soumise à un fractionnement sur Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh), forme acétate. Cette méthode a déjà été appliquée en 1975 par GRIMMONPREZ et MONTREUIL (42) à l'adialysable de la fraction S9 du lait de femme. Ce qui leur a permis d'obtenir 4 sous-fractions à partir de ce produit.

Le fractionnement se déroule selon le procédé suivant :

- sur une colonne (50 x 2 cm) contenant la Dowex 1 x 8, sont déposés 5 ml de la préparation FA.

L'élution avec l'eau distillée fournit une fraction F1.

Le déplacement des composés fixés sur la colonne est réalisé par le passage successif de tampon acétate de pyridine pH 5,5 de molarité 0,01 M - 0,05 M, 0,15 M.

L'éluat est fractionné en fonction des résultats du repérage des oses à l'orcinol sulfurique. Après lyophilisation, les résidus sont repris par un faible volume d'eau.

Les différentes solutions ainsi obtenues font l'objet d'un test bactériologique, d'un dosage de sucres et d'une analyse électrophorétique sur papier Whatman 3 MM dans les conditions suivantes :

- tampon de migration : pyridine/acide acétique /eau (3/1/387)

voltage 7v/cm ; durée de l'électrophorèse = 16 heures.

Révèlation par le réactif à l'oxalate d'aniline.

b) - Résultats :

La chromatographie sur colonne de Dowex 1 x 8 de la fraction FA permet d'isoler 7 sous-fractions (figures 11, 12) avec desteneurs variables en oses neutres (TABLEAU 12). Les produits de la fraction F1 sont formés de composés neutres, non retenus par la résine.

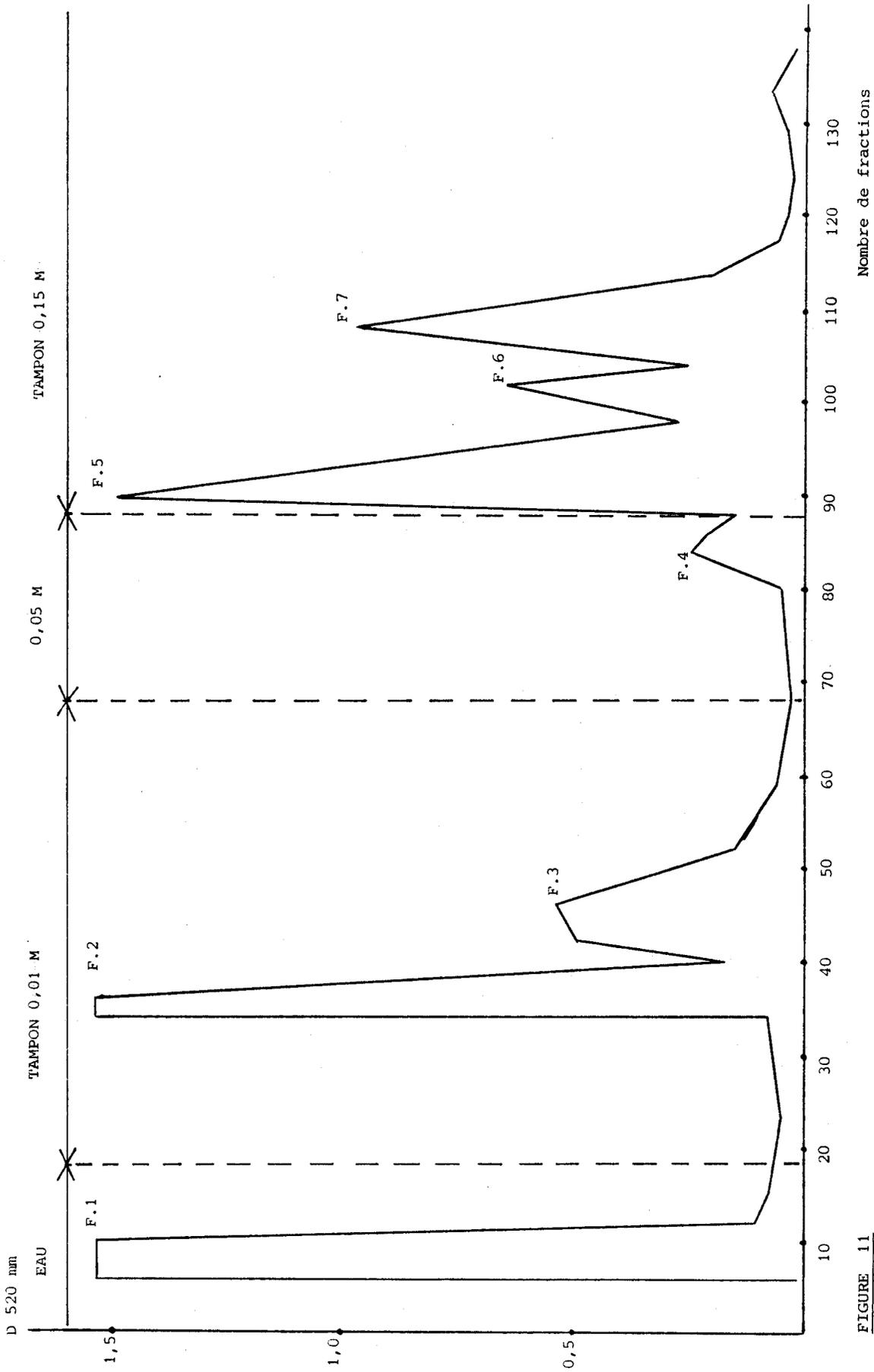
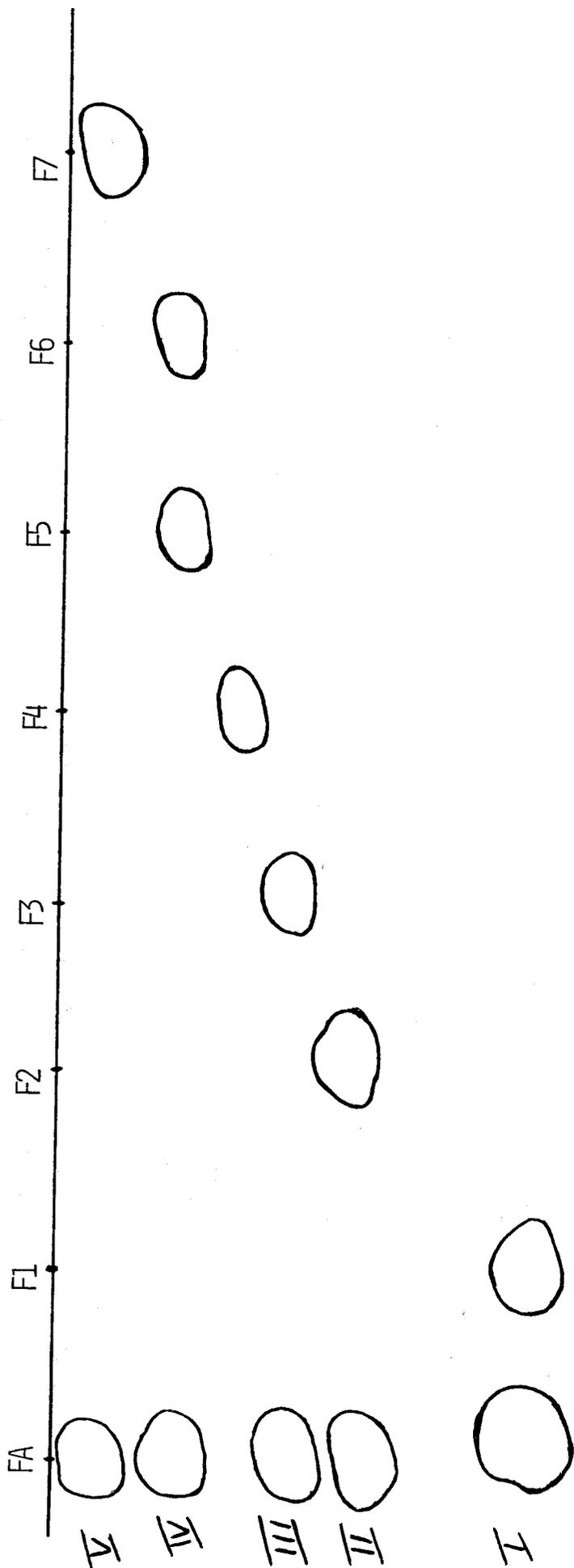


FIGURE 11

FIGURE 11 - Chromatographie sur colonne (50 x 2 cm) de Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh, forme acétate) de la fraction active FA (5 ml) du lait de femme. L'éluion des composés se fait par du tampon acétate de pyridine pH5,5 à différentes concentrations : 0,01 M - 0,05 M - 0,15 M.  
 En abscisses : nombre de fractions de 5,5 ml recueillies.  
 En ordonnées : densité optique mesurée à 520 nm après réaction à l'orcinol sulfurique.





**FIGURE 12**

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 des sous-fractions obtenues par chromatographie sur colonne de Dowex 1 x 8, forme acétate de la fraction FA du lait de femme. I à V : constituants électrophorétiques de la fraction active FA du lait de femme.

Conditions de l'électrophorèse : tampon : Pyridine/acide acétique / eau : 3/1/387 , pH5,4  
Révélation par le réactif à l'exalate d'aniline.

SOUS-FRACTIONS	TENEUR EN OSES NEUTRES (en g/l)	ACTIVITE BIFIDIGENE SUR LA SOUCHE AA 2/2
F1	24,46	+ $\frac{1}{500}$
F2	3,09	+ $\frac{1}{100}$
F3	2,1	+ $\frac{1}{20}$
F4	0,64	+ $\frac{1}{20}$
F5	2,5	+ $\frac{1}{20}$
F6	1,57	+ $\frac{1}{20}$
F7	1,34	+ $\frac{1}{100}$

TABLEAU 12 : Activité bifidigène des différentes sous-fractions obtenues par chromatographie sur colonne de DOWEX 1 X 8 (200-400 mesh), forme acétate de la fraction FA du lait de femme sur la croissance de la souche AA 2/2 (*B. bifidum*), spécifique des selles de nourrissons alimentés au lait de femme.



Ils représentent la majeure partie des sucres élués. F1 correspond au constituant électrophorétique I.

Une rétention accrue des autres composés glucidiques sur la colonne de résine se traduit par une diminution de leur mobilité électrophorétique.

Les fractions F2, F3 et F7 correspondent aux composants II, III et V de l'électrophorégramme. F5 et F6 migrant pratiquement au même niveau représentent le composant IV. Quant à la sous-fraction F4, elle est en concentration très faible pour être visible au niveau du mélange de départ.

Le comportement électrophorétique des produits élués confirme donc la qualité du fractionnement réalisé.

L'étude de l'activité biologique des sous-fractions montre que les facteurs de croissance pour B. bifidum sont répartis dans toutes celles-ci. Ramené à une même concentration en sucres, le niveau d'activité bifidigène exprimé par la plus faible dilution active est approximativement le même pour chacune des sous-fractions.

Les facteurs bifidigènes sont donc formés à la fois par des molécules chargées négativement et par des dérivés neutres.

#### VI. - Conclusion :

La chromatographie par gel filtration nous a permis non seulement de purifier la préparation de lait de femme (Sf) obtenue par précipitation perchlorique, mais aussi de mettre en évidence l'hétérogénéité des facteurs de croissance microbienne contenus dans celle-ci. La position de ces éléments actifs coïncide sur le diagramme d'élution avec celle des fractions riches en oses.

Le passage sur la résine Dowex 50 x 8 du produit résultant de la chromatographie de gel filtration révèle que les facteurs bifidigènes ne correspondent probablement pas à des substances peptidiques. Cette hypothèse se trouve vérifiée par le fractionnement du produit FA effectué grâce à l'application de la méthode de chromatographie sur résine Dowex 1 x 8 forme acétate, spécifique des sucres. Ceci confirme l'hypothèse de la nature oligosaccharidique des éléments actifs du lait humain formulée auparavant.

Avant d'aborder une étude structurale des composés responsables de l'activité biologique de la préparation FA de lait de femme, il serait intéressant de connaître le comportement des souches bactériennes autres que B.b., mais appartenant au même genre *Bifidobacterium* vis-à-vis de celle-ci.

C. - ETUDE DE L'ACTIVITE BIFIDIGENE DE LA FRACTION FA DE LAIT  
MATERNEL SUR LA CROISSANCE DES SOUCHES APPARTENANT  
AU GENRE BIFIDOBACTERIUM.

1°/ - Mode opératoire :

L'étude a été réalisée à partir de la fraction FA de lait de femme préparée suivant le procédé décrit précédemment et dont on connaît l'activité biologique sur la souche AA 2/2. Les essais ont été effectués sur 43 souches réparties en trois espèces différentes appartenant au genre Bifidobactérium :

- 30 souches de *B. bifidum* ;
- 7 souches de *B. longum* ;
- 6 souches de *B. infantis*.

Elles proviennent toutes soit d'isolements récents des selles de nourrissons élevés au sein ou au lait maternisé, soit de la collection du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille. Le choix a été fait en fonction de leur taxonomie et surtout ce sont les trois espèces que l'on rencontre dans les selles des nouveau-nés. Nous avons retenu un nombre plus important de l'espèce *B. bifidum* puisque les travaux antérieurs de ROMOND, NEUT et BEERENS (97, 98, 126) ont déjà montré l'absence d'activité du lait maternel pasteurisé sur les espèces *B. longum* et *B. infantis*. Toutes les souches choisies sont conservées à -18°C dans un milieu de Rosenow.

Avant tout essai, on procède d'abord à une vérification de l'identité et de la pureté de chaque souche selon les critères d'identification retenus par BEERENS, ROMOND et NEUT.

La méthode utilisée pour faire cette étude est la même que celle pratiquée pour la mise en évidence de l'activité bifidigène des différentes préparations de lait.

2°/ - Résultats :

Nous constatons d'après les résultats rassemblés dans le tableau 13 que la croissance de toutes les souches appartenant à l'espèce *B. bifidum* est activée,

Espèces	43 souches bactériennes appartenant au genre <i>Bifidobacterium</i>	Activité biologique de la fraction FA de lait humain.	
		<u>1er essai</u>	<u>2ème essai</u>
<i>B. bifidum</i>	- AA 6/5, 150, 154	+ $\frac{1}{600}$	+ $\frac{1}{800}$
	- <u>AA 2/2</u> , AA 2/8, AA 5/4	+ $\frac{1}{500}$	+ $\frac{1}{500}$
	- AA 8/7	+ $\frac{1}{400}$	+ $\frac{1}{400}$
	- B. <i>bif.</i> var. a.	+ $\frac{1}{250}$	+ $\frac{1}{250}$
	- AA 4/1, AA 4/9, B 609, B 536, B 601	+ $\frac{1}{200}$	+ $\frac{1}{200}$
	- 88, 158, B 594	+ $\frac{1}{100}$	+ $\frac{1}{100}$
	- 1, 30, 85, 91, 125, 148	+ $\frac{1}{50}$	+ $\frac{1}{50}$
	- AA 3/9, 36, 58	+ $\frac{1}{20}$	+ $\frac{1}{20}$
	- Penn., AA 7/11, 12	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
	- AA 1/6, B 578	+ pur	+ pur
<i>B. longum</i>	- B Nantes, LMa3, B. <i>long</i> , 22	-	-
	- BN20, A 4/4, <i>Bif.</i> 7/4	-	-
<i>B. infantis</i>	- B 596, C6, B. <i>inf.</i> S2	-	-
	- B. <i>breve</i> , <i>Bif.</i> 7, 25	-	-



TABLEAU 13 : Etude du comportement des souches bactériennes réparties en 3 espèces (*bifidum*, *longum*, *infantis*) appartenant au genre *Bifidobacterium*.

L'activité biologique étant représentée par la dernière dilution positive.

AA 2/2, souche spécifique des selles de nourrissons alimentés au lait de femme.

RESULTAT DU TEST DE DOSAGE DE L'ACTIVITE BIFIDIGENE SUR LES SOUCHES AA 2/2 et B 536

alors que celle des souches faisant partie des espèces B. longum et B. infantis est pratiquement nulle, en présence de la préparation FA. Cela signifie que seules, les premières souches bactériennes y trouvent leurs facteurs de croissance. Ceci démontre bien dans l'ensemble que l'espèce B. bifidum est homogène et se distingue nettement des autres espèces (longum et infantis). Ce qui confirme les résultats obtenus en 1981 par NEUT, ROMOND et BEERENS (97, 98) qui sont parvenus à la même conclusion en identifiant les bifidobactérium en fonction de leurs besoins nutritionnels.

Néanmoins, nous observons une petite différence de comportement des souches de B.b. en présence de FA. En effet, 22 souches sur 30 de B.b. présentent une croissance jusqu'aux dilutions comprises entre 1/50 et 1/600 du produit à tester. A côté de celles-ci se trouve un deuxième groupe dont la croissance disparaît déjà à la dilution du 1/20. Cette petite différence oblige d'ailleurs ROMOND et Collaborateurs à employer plutôt le terme de "homogénéité relative" de l'espèce B. bifidum. Parmi ces dernières, la souche Penn., bien qu'elle soit de l'espèce B. bifidum ne réagit que faiblement à la fraction de lait obtenue. Ceci s'explique peut-être par le fait qu'il s'agit d'une souche maintenue longtemps en collection.

La fraction FA apparaît donc contenir les facteurs de croissance de l'ensemble des souches de l'espèce B. bifidum, spécifiques des enfants nourris au sein. Une étude structurale de ces derniers a donc été entreprise.

D. - ETUDE STRUCTURALE DE LA FRACTION FA DU LAIT DE FEMME.

I. - Définition du motif structural bifidigène.

"Ce travail a été rendu possible grâce au concours du Laboratoire de Chimie Biologique dirigé par le Professeur J. MONTREUIL (LILLE I) qui s'est attaché depuis longtemps à l'étude des composants du lait de femme".

Cette étude a été abordée de deux manières différentes :

- Par l'étude de l'activité bifidigène des oses et oligosides de structure connue. En effet, l'ensemble de nos résultats démontrant la nature oligosaccharidique des facteurs de croissance, nous avons testé l'activité biologique des oligosaccharides isolés du lait de femme.

Celle-ci a ensuite été étendue à d'autres dérivés structurellement apparentés.

- Par dégradation ménagée du lacto-N-tétraose et de la fraction FA du lait humain.

1°/ - Etude de l'activité bifidigène des oligosaccharides de structure connue.

a) - Mode opératoire :

Les sucres utilisés dans nos expérimentations nous ont été fournis par le Laboratoire de Chimie Biologique (Professeur J. MONTREUIL) de l'Université de LILLE I.

La plupart ont été isolés du lait de femme et des urines humaines.

Chaque échantillon de sucre est repris par un faible volume d'eau distillée pour obtenir une concentration voisine de 5g/l. L'activité biologique des différentes solutions de sucre est ensuite étudiée sur la croissance des souches AA 2/2 et Penn., appartenant à l'espèce B. bifidum et L Ma3 à l'espèce longum. 30 oligosaccharides (dont 9 provenant du lait de femme) ont été étudiés.

b) - Résultats :

Les résultats rassemblés dans les (tableaux 14, 15) montrent que parmi les 9 sucres du lait de femme qui ont été étudiés, 6 sont utilisés comme facteurs de croissance pour la souche AA 2/2.

Cette activité des sucres est faible puisqu'elle excède rarement la dilution du 1/10.

Il est à noter que les 6 oligosaccharides stimulant la croissance de AA 2/2 sont des composés azotés. Ils contiennent tous de la glcNAC dans leur structure.

Au contraire, les oses inactifs ne contiennent pas de glcNAC. C'est le cas des oligosides 1, 2, 3.

Cette constatation rejoint les résultats obtenus pour la souche Penn. par GYORGY et Collaborateurs (44, 45, 46) en 1954. Le lacto-N-tétraose (LNT), oligoside 4 présente une activité du même ordre que celle de ses dérivés fucosylés, sialidés ou de composé plus complexe comme l'oligosaccharide 9.

La souche AA 2/2 semble donc disposer d'un équipement enzymatique très complet, notamment de fucosidases spécifiques des liaisons (1→2) et (1→4), et de neuraminidases spécifiques des liaisons (2→3) et (2→6) lui permettant d'utiliser au mieux les oligosaccharides 7, 8, 9. Ceci confirme les résultats de NICOLAI et ZILLIKEN (103) qui ont trouvé en 1972, des quantités importantes de fucosidases, de  $\beta$  galactosidase et de la N-acétyl glucosaminidase dans la souche Penn.

La glcNAC à l'état pur présente une activité biologique non négligeable. Mais à poids égal, elle est environ 10 fois moins active que les composés 13, 14, 15 qui la contiennent. Si l'on se rapporte à la quantité de glcNAC présente, la différence est encore plus importante. Elle se montre faiblement active quand elle est, soit sous forme de mélange avec le galactose, soit sous forme de dimère comme le chitobiose. Donc l'activité est bien fonction de la présence du galactose associé à la glcNAC par une liaison covalente (Tableau 16).

Le disaccharide 14 ayant la glcNAC en position terminale réductrice se révèle légèrement plus actif que le composé 16 de même composition, mais comportant le galactose en position réductrice.

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME	ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LA SOUCHE AA 2/2	
	1er essai	2ème essai
1-Lactose : gal $\beta$ -1,4) glc	-	-
2-Galactosyl lactose : gal $\beta$ -1,6) gal $\beta$ -1,4) glc	-	-
3-Lacto-di-fuco-tétraose : gal $\beta$ -1,4) glc $\uparrow$ $\alpha$ -1,2 $\uparrow$ $\alpha$ -1,3 Fuc Fuc	-	-
4-Lacto-N-tétraose : gal $\beta$ -1,3) glcNAC $\beta$ -1,3) gal $\beta$ -1,4) glc	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
5-Lacto-N-fucopentaose I : gal $\beta$ -1,3) glcNAC $\beta$ -1,3) gal $\beta$ -1,4) glc $\uparrow$ $\alpha$ -1,2 Fuc	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
6-Lacto-N-fucopentaose II : gal $\beta$ -1,3) glcNAC $\beta$ -1,3) gal $\beta$ -1,4) glc $\uparrow$ $\alpha$ -1,4 Fuc	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{100}$

AMS  
1988

TABLEAU 14 : Activité bifidigène des oligosaccharides isolés du lait humain (l'activité étant représentée par la dernière dilution positive).

AA 2/2 : souche appartenant à l'espèce *B. bifidum*, spécifique des selles des enfants nourris au lait de femme.

STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE FEMME (SUITE)	ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LA SOUCHE AA 2/2	
	1er essai	2ème essai
<p>7-Lacto-N-difucohexaose I :</p> $\begin{array}{c} \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{glcNAC} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{glc} \\ \uparrow \alpha-1,2 \quad \uparrow \alpha-1,4 \\ \text{Fuc} \quad \quad \text{Fuc} \end{array}$	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
<p>8-Disialyllacto-N-tétraose :</p> $\begin{array}{c} \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{glcNAC} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{glc} \\ \uparrow \alpha-2,3 \quad \uparrow \alpha-2,6 \\ \text{NeuAC} \quad \quad \text{NeuAC} \end{array}$	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
<p>9-Sialylfucosyllacto-N-hexaose I :</p> $\begin{array}{c} \text{Fuc} \\ \downarrow \alpha-1,4 \\ \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{glcNAC} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{gal} \xrightarrow{\beta-1,4} \text{glc} \\ \uparrow \alpha-2,3 \\ \text{NeuAC} \end{array}$	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$



TABLEAU 15 : Etude de l'activité biologique des oligosaccharides du lait de femme.

STRUCTURE DES OSES ET OLIGOSACCHARIDES DE STRUCTURE PROCHE DE CELLE DU LAIT DE FEMME.	ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LA SOUCHE AA 2/2	
	<u>1er essai</u>	<u>2ème essai</u>
10-N-acétyl glucosamine : glc NAC	+ pur	+ $\frac{1}{10}$
11-NN'-diacétyl-chitobiose : glcNAC $\overset{\beta-1,4}{\text{}}$ glcNAC	+ pur	+ pur
12- mélange : glcNAC + gal	+ pur	+ pur
13-N-acétyl lactosamine : gal $\overset{\beta-1,4}{\text{}}$ glcNAC	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
14-N-acétyl isolactosamine : gal $\overset{\beta-1,3}{\text{}}$ glcNAC	+ $\frac{1}{100}$	+ $\frac{1}{10}$
15- : glcNAC $\overset{\beta-1,4}{\text{}}$ gal	+ $\frac{1}{10}$	+ $\frac{1}{10}$
16- : glcNAC $\overset{\beta-1,3}{\text{}}$ gal	+ $\frac{1}{10}$	+ pur

TABLEAU 16 : Activité biologique des oses et oligosaccharides de structure proche de celle du lait de femme.  
(l'activité est représentée par la dernière dilution positive).



Bien que la méthode de dosage ne nous permette pas de faire une estimation précise de l'activité de facteur de croissance, nous pouvons dire que la N-acétyl-isolactosamine (isolac N-AC), disaccharide 14 présente une activité légèrement supérieure à celle de la Lac NAC, disaccharide 13. Ceci est en désaccord avec RAYNAUD qui, rapportant des résultats obtenus dans la littérature, conclue à une activité plus grande pour la Lac NAC.

Partant de ces résultats, nous avons étudié l'activité d'autres oses et oligosaccharides structurellement apparentés à ceux du lait de femme (Tableaux 17, 18, 19). Nous constatons que : ni l'acide sialique, ni la N-acétyl mannosamine (Man NAC), ni la N-Asparaginyll N-Acétyl lactosamine ne sont utilisés comme facteurs de croissance par B. bifidum. Donc, la présence de l'Asparagine bloque l'utilisation de la glcNAC. Quant aux fucosides 22 et 23, l'absence de glcNAC dans leur structure explique leur activité nulle sur AA 2/2 ; celle-ci ne peut être remplacée par la galNAC. Ceci vient apporter une preuve supplémentaire de l'importance de la présence de la glcNAC dans la structure des composés actifs.

L'hypothèse de l'existence probable de neuraminidases spécifiques des liaisons (2→6) semble se confirmer du fait de l'activité positive que présentent les oligosaccharides 26 et 27 sur la souche AA 2/2.

Cette dernière souche se distingue donc de la var. Penn. pour laquelle une activité réduite vis-à-vis de la liaison (2→6) a été signalée par NICOLAI et ZILLIKEN (103).

AA 2/2 possède donc un équipement enzymatique plus complet que Penn., puisqu'elle est capable d'utiliser l'ensemble des sialyloligosaccharides du lait maternel.

Les composés 25, 26, 27, bien que d'origine différente, stimulent tous la croissance de B. bifidum pratiquement au même niveau. Ce comportement identique s'explique certainement par la présence du même motif structural dans la molécule de ces trois produits. Contrairement à l'oligoside 21, où l'Asp. bloque l'utilisation de la glc NAC, la présence du reste peptidique formé de Asn, gln, val n'empêche pas la bactérie d'utiliser la glucosamine contenue dans la structure du glycopeptide 27.



OLIGOSACCHARIDES DE STRUCTURE PROCHE DE CELLE DU LAIT DE FEMME (Suite)	ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LA SOUCHE AA 2/2	
	1er essai -----	2è essai -----
25 - $\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,3} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$ $\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{10}$
26 - $\text{NeuAC}^{\underline{\alpha-2,6}}\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\beta-1,3} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$ $\text{NeuAC}^{\underline{\alpha-2,6}}\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{10}$
27 - $\text{NeuAC}^{\underline{\alpha-2,6}}\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,3} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$ $\text{NeuAC}^{\underline{\alpha-2,6}}\text{gal}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,2}}\text{Man} \xrightarrow{\alpha-1,6} \text{Man}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}^{\underline{\beta-1,4}}\text{glcNAC}$ $\downarrow$ $\text{Asn}$ $\downarrow$ $\text{gln}$ $\downarrow$ $\text{Val}$	$+\frac{1}{10}$	$+\frac{1}{10}$

ADS  
LILLE

TABLEAU 18 - Activité bifidigène des oligosaccharides isolés à partir  
des urines humaines : 25 et 26 et de la sérotransferrine : 27

OLIGOSACCHARIDES PRESENTS DANS LES URINES HUMAINES ET AVANT UNE ACTIVITE DE GROUPES SANGUINS		ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR AA 2/2		
		1er essai -----	2è essai -----	
OLIGOSACCHARIDES AVANT UNE ACTIVITE DE GROUPE A.	28	$\begin{array}{c} \text{galNAC}^{\alpha-1,3} \text{) gal}^{\alpha-1,3} \text{) glcNAC}^{\alpha-1,3} \text{) gal} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \alpha-1,2 \quad \alpha-1,4 \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \end{array}$	-	-
	29	$\begin{array}{c} \text{galNAC}^{\alpha-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,3} \text{) glcNAC}^{\beta-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,4} \text{) glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \alpha-1,2 \quad \alpha-1,4 \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \end{array}$	-	-
	30	$\begin{array}{c} \text{galNAC}^{\alpha-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,4} \text{) glcNAC}^{\beta-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,4} \text{) glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ \alpha-1,2 \quad \alpha-1,4 \quad \alpha-1,3 \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \end{array}$	-	-
OLIGOSACCHARIDES AVANT UNE ACTIVITE DE GROUPE B.	31	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\alpha-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,4} \text{) glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \alpha-1,2 \quad \alpha-1,2 \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \end{array}$	-	-
	32	$\begin{array}{c} \text{gal}^{\alpha-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,3} \text{) glcNAC}^{\beta-1,3} \text{) gal}^{\beta-1,4} \text{) glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \alpha-1,2 \quad \alpha-1,4 \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \end{array}$	-	-

TABLEAU 19 - Activité biologique des oligosaccharides isolés à partir des urines humaines.

Dans ces conditions, il n'est pas étonnant qu'une activité bifidigène ait été mise en évidence pour des glycoprotéines telles que l'orosomucoïde qui comporte des copules glucidiques analogues, dans leur structure.

Le composé 24, dérivé de l'ovomucoïde n'est pas utilisé par B. bifidum comme facteur de croissance, contrairement au résultat attendu, ceci apparaît surprenant, compte-tenu de la richesse de ce composé en glcNAC.

L'hypothèse d'un encombrement stérique qui empêcherait les enzymes spécifiques d'agir est envisageable.

De même, compte-tenu de la taille du composé 24, il est possible qu'il ne puisse pas pénétrer dans la bactérie et ainsi être utilisé.

Les oligosaccharides 28, 29, 30 dont les structures sont apparentées à celles des substances de groupe A bien que possédant de la glcNAC, ne stimulent pas la croissance de B. bifidum. Cela s'explique sans doute par la présence de la N-acétylgalactosamine (gal N-AC), fixée en  $\alpha$ -1, 3 qui empêche l'utilisation de la glcNAC. On peut donc supposer que B.b. ne possède pas l' $\alpha$  galactosaminidase nécessaire. De même, l'activité nulle des oligosides 31 et 32 de structure proche de celle des substances de groupe B s'explique par l'absence de  $\alpha$  galactosidase chez B. bifidum.

Quant à la souche Penn. elle réagissait faiblement vis-à-vis des différents composés au début de nos essais. Mais, par la suite, elle s'est comportée de la même façon que la souche AA 2/2. Cette différence de comportement est due au fait que celle-ci demande un temps d'activation assez long qui s'explique par son entretien pendant longtemps en collection.

La souche LMa3 par contre, ne trouve aucun facteur de croissance parmi tous les oligosides étudiés, ce qui confirme la différence existant entre l'espèce longum et l'espèce B. bifidum au point de vue besoins nutritionnels.

## II. - Dégradation ménagée du lacto-N-tétraose :

### 1°/ - Hydrolyse acide partielle :

Le lacto-N-tétraose est non seulement l'un des oligosides les plus actifs du lait de femme, mais il représente également le motif structural de base de tous les composés actifs.

200 mg de INT ont été hydrolysés par  $H_2SO_4$  0,5 n à  $100^\circ C$  pendant 10 minutes. Les traces d'acide sont éliminées par passage de l'hydrolysât sur une colonne (20 x 2 cm) de Dowex 1 x 8 (100 - 200 mesh). Le produit obtenu est élué par l'eau. Après évaporation sous pression réduite, le résidu, repris par un faible volume d'eau, est soumis à une chromatographie préparative sur papier Whatmann 3 dans un système solvant : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau : (5/5/1/3) pendant une nuit. Réalisée dans ces conditions, l'hydrolyse partielle du lacto-N-tétraose conduit essentiellement à l'obtention d'un mélange d'oligosaccharides représentés par trois disaccharides : 1, 2, 3 dont le lactose et la N-acétyl isolactosamine et par deux trisaccharides : 4,5. Ceux-ci ont été identifiés par leur vitesse de migration relative (figure 13).

Le test d'activité bifidigène réalisé (TABLEAU 20) à partir des produits obtenus révèle que les composés 1, 2, 4,5 sont utilisés comme facteurs de croissance pour AA 2/2. Il apparaît que les produits actifs contiennent tous de la glcNAC.

### 2°/ - Désacétylation par hydrazinolyse

Compte-tenu de la labilité des oses réducteurs en présence d'hydrazine, la désacétylation nécessite une réduction préalable du LNT par le  $BH_4K$

#### a) - Réduction du LNT :

Elle a pour but de transformer en glucitol le glucose en position terminale réductrice. 50 mg de LNT sont d'abord dissous dans 200 ml d'eau distillée, puis traités par 100 mg de  $BH_4K$ . La réaction se déroule à la température ambiante pendant 2 heures. L'excès de  $BH_4K$  est neutralisé par addition de résine Dowex 50 x 8.

Le filtrat et les eaux de rinçage sont évaporés à siccité. Le résidu sec est

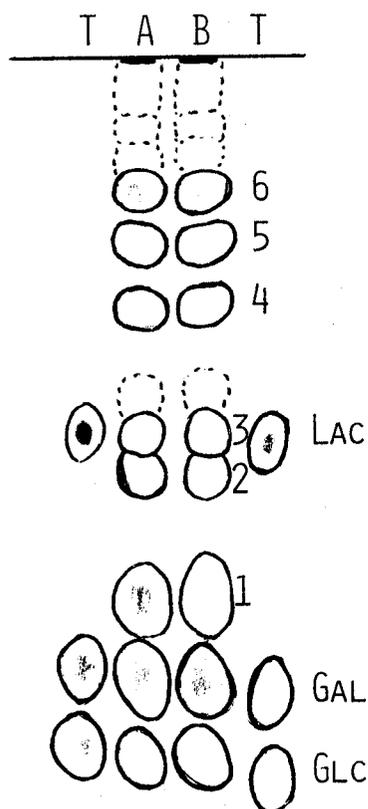


FIGURE 13 - Chromatographie sur papier Whatman 3 de l'hydrolysatsulfurique partiel ( $H_2SO_4$  0,5 N  $100^\circ C$  pendant 15 minutes) du Lacto-N-tétraose.

Système solvant : Pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau : (5/5/1/3), révélation par le réactif à l'oxalate d'aniline

Durée de la chromatographie : 16 heures

T = mélange de Lac, Gal et Glc.



TYPE DE REACTION	STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES ETUDIES	Rf calculé par rapport au galactose	ACTIVITE BIFIDIIGENE SUR AA 2/2
- Lacto-N-tétraose (LNT)	6- gal $\beta$ -1,3-glcNAC $\beta$ -1,3-gal $\beta$ -1,4-glc		+ $\frac{1}{70}$
- Oligosaccharides obtenus par hydrolyse partielle (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M, 100°C pendant 10 min.) du LNT	1- gal $\beta$ -1,3-glcNAC 2- glcNAC $\beta$ -1,3-gal 3- gal $\beta$ -1,4-glc 4- gal $\beta$ -1,3-glcNAC $\beta$ -1,3-gal 5- glcNAC $\beta$ -1,3-gal $\beta$ -1,4-glc	0,85 0,66 0,60 0,39 0,30	+ pur + pur - + pur + pur
- LNT réduit par BH <sub>4</sub> K	33- gal $\beta$ -1,3-glcNAC $\beta$ -1,3-gal $\beta$ -1,4-glcitol		+ $\frac{1}{70}$
- LNT désacétylé par hydrazynolyse	34- gal $\beta$ -1,3-glcN $\beta$ -1,3-gal $\beta$ -1,4-glcitol		-

TABLEAU 20 - Etude de l'activité bifidigène des hydrolysats de LNT, du LNT réduit, du LNT désacétylé par l'hydrazine. Bactérie-test : AA 2/2 de l'espèce B. bifidum.



repris par du méthanol de manière à distiller les sels de borate formés, puis remis en solution dans un faible volume d'eau pour être lyophilisé.

b) - Désacétylation du LNT

Le LNT réduit est traité par de l'hydrazine anhydre (1 ml/50 mg) jusqu'à dissolution complète du produit. La solution est chauffée à 100°C pendant 24 heures. Elle est ensuite évaporée sous pression réduite en présence de toluène. Le résidu est repris par un faible volume d'eau, puis déposé sur une colonne (90 x 1,5 cm) de biogel P2 (100 - 200 mesh).

L'élution se fait par l'eau. Les différentes fractions sont réunies, concentrées et lyophilisées en fonction du résultat de la chromatographie sur couche mince dont elles font l'objet. Celle-ci se fait sur une plaque de gel de silice (sans indicateur de fluorescence) dans un système solvant : butanol/acide acétique/eau : (2/1/1).

Les produits sont révélés par le réactif à l'orcinol sulfurique selon le procédé suivant : 200 mg d'orcinol sont dissous dans 100 ml de  $H_2SO_4$  20%, après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100°C pendant 10 minutes.

c) - Résultats :

L'activité de facteur de croissance de LNT, observée initialement, reste inchangée avant et après réduction par le  $BH_4K$ . Cela signifie que le glucose en position terminale réductrice n'a aucune influence sur l'activité biologique du LNT. Par contre, cette activité disparaît totalement quand le LNT est désacétylé. Ceci laisse à penser que l'hexosamine est utilisée comme un facteur de croissance, sous forme N substituée.

L'AMBERT et ZILIKEN (74) ont montré que la substitution de la fonction amine par des groupements divers (éthyl, méthyl, n propyl, n butyl, phényl, carboéthoxy etc.) pouvait conduire à l'obtention de dérivés parfois très actifs.

## II. - RECHERCHE DU MOTIF STRUCTURAL ACTIF DANS LA FRACTION FA EXTRAITE DU LAIT DE FEMME.

### 1°/ - Composition en monosaccharides :

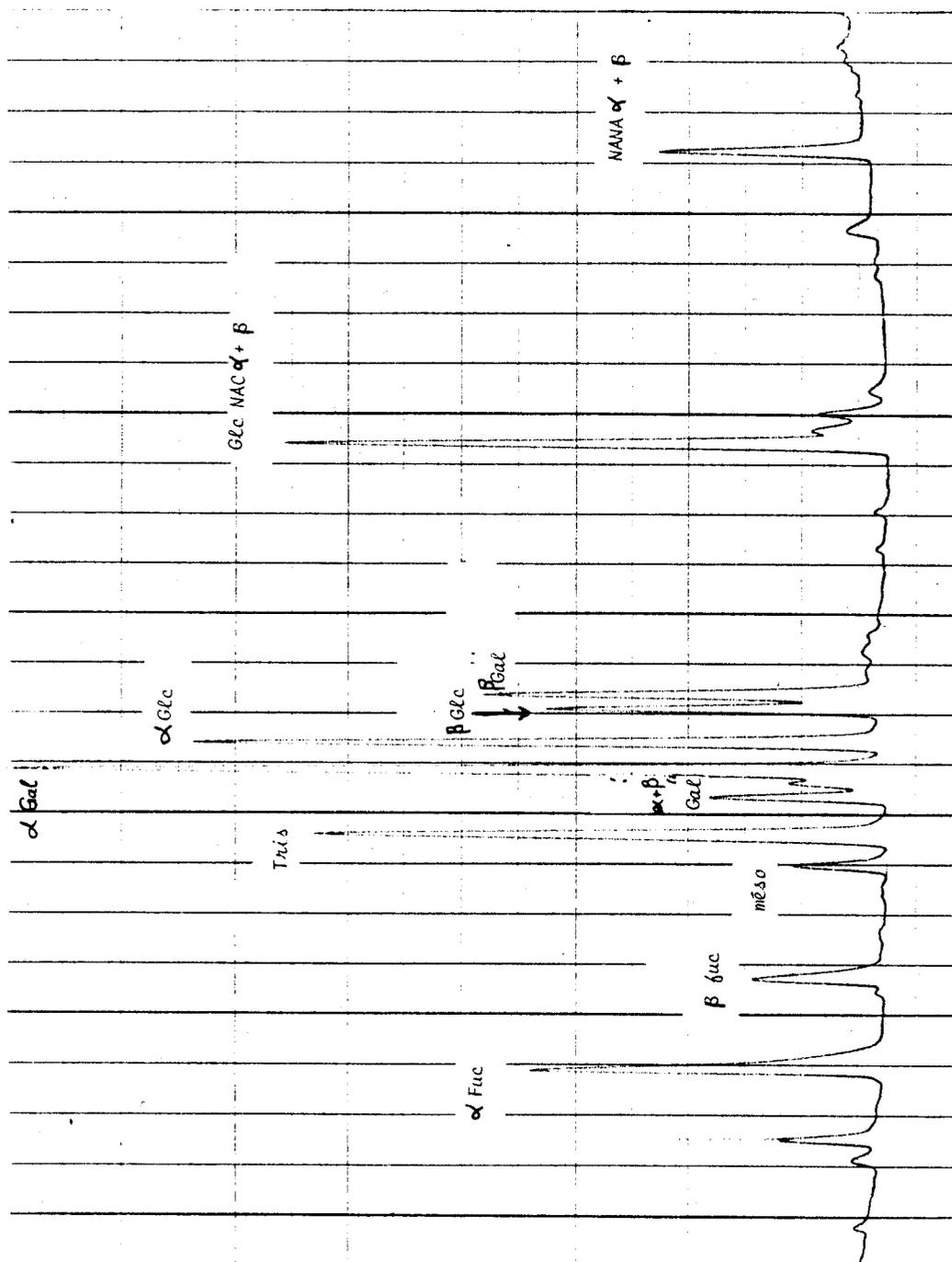
Elle a été déterminée après méthanolyse et trifluoroacétylation par chromatographie en phase gazeuse. Le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique. L'étude des méthylglycosides trifluoroacétylés nous a permis de constater que : la fraction FA du lait maternel est constituée : de galactose, de glucose, de fucose, de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétylneuraminique (Tableau 21) et (Figure 14). L'étude des rapports molaires montre la prédominance du galactose en quantité presque double de celle du glucose ou de la glcNAC. La composition en monosaccharides se rapproche donc de celle de nombreux oligosaccharides décrits par GRIMMONPREZ et MONTREUIL (39, 42) récemment revus par KOBATA et Coll. (65). Celle-ci fait surtout penser à ceux du groupe du Lacto-N-tétraose, ou Lacto-N-néotétraose.

Le pourcentage du fucose permet de penser que la fraction FA de lait contient un mélange d'oligosaccharides non fucosylés, mono et difucosylés. Il est probable donc que la fraction isolée soit essentiellement constituée de tétra, de penta et d'exasaccharides.

### 2°/ - Réduction du produit FA par $BH_4K$

A 3 ml de la fraction active FA de lait humain, contenant 70 g/l de sucres totaux, ajouter un excès de  $BH_4$  (environ 75 mg). La réaction se fait à la température ordinaire pendant 2 heures. Comme précédemment l'excès de borohydrure de potassium est neutralisé par de la résine Dowex 50 x 8. Le filtrat évaporé à siccité en présence de méthanol, est repris par 3 ml d'eau pour être lyophilisé.

L'activité de facteurs de croissance a été réalisée à partir du produit final, remis en solution dans 3 ml d'eau distillée (TABLEAU 22). Celle-ci permet de dire que les facteurs de croissance pour *B. bifidum* persistent après traitement de la fraction FA de lait de femme par le  $BH_4K$ . Ce résultat confirme celui qui a été obtenu à partir du Lacto-N-tétraose.



**FIGURE 14:** Chromatographie en phase gazeuse des méthyl glycosides trifluoroacétylés obtenus par méthanolyse et trifluoroacétylation de la fraction FA du lait maternel.

Conditions opératoires : colonnes de silicone OV 210, sensibilité :  $10^{-10} \times 8$

température programmée de  $100^{\circ}\text{C}$  à  $220^{\circ}\text{C}$  à raison de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , débit de gaz vecteur (azote)  $7,5 \text{ ml}/\text{min}$ .

		<u>RAPPORTS MOLAIRES</u>				<u>COMPOSITION CENTESIMALE</u>		
<i>Gal</i>	<i>Glc</i>	<i>Fuc</i>	<i>GlcNAC</i>	<i>NANA</i>	<i>oses neutres</i>	<i>osamines</i>	<i>acides sialiques</i>	
1,6	1	0,62	0,83	0,21	70 %	20 %	5 %	

TABLEAU 21: Composition centésimale et rapports molaires en monosaccharides de la fraction active FA du lait de femme.

ELIMINATION SELECTIVE DE L'ACIDE SIALIQUE ET DU FUCOSE PAR H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 M		REDUCTION DU PRODUIT FA PAR LE BH <sub>4</sub> K	
<u>FA avant hydrolyse</u>	<u>FA après hydrolyse</u>	<u>FA avant réduction</u>	<u>FA après réduction</u>
+ $\frac{1}{50}$	+ $\frac{1}{50}$	+ $\frac{1}{100}$	+ $\frac{1}{100}$

TABLEAU 22 : Hydrolyse acide ménagée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M à 100°C pendant 40 mn et réduction par BH<sub>4</sub>K de la fraction active FA du lait de femme.

L'activité biologique des produits a été étudiée sur la souche AA 2/2 de l'espèce B. bifidum.



### 3°/ - Hydrolyse acide ménagée :

Elle a été réalisée à partir de la fraction FA (70g/l de sucres totaux) du lait de femme selon les procédés suivants :

#### a) - Avec $H_2SO_4$ 0,05 M =====

Elle a pour but de couper spécifiquement les liaisons sialosyl et fucosyl. Le produit FA (5ml) est traité par 10 ml de  $H_2SO_4$  0,05 M à 100°C pendant 40 minutes. Les traces d'acide sont éliminées par passage du mélange sur de la résine Dowex 1 x 8. L'éluat est ensuite concentré à 5 ml.

L'étude de l'activité biologique (TABLEAU 22) réalisée avant et après défucosylation et désialidation, révèle que les facteurs de croissance pour B. bifidum initialement observés persistent avec la même intensité dans le produit FA.

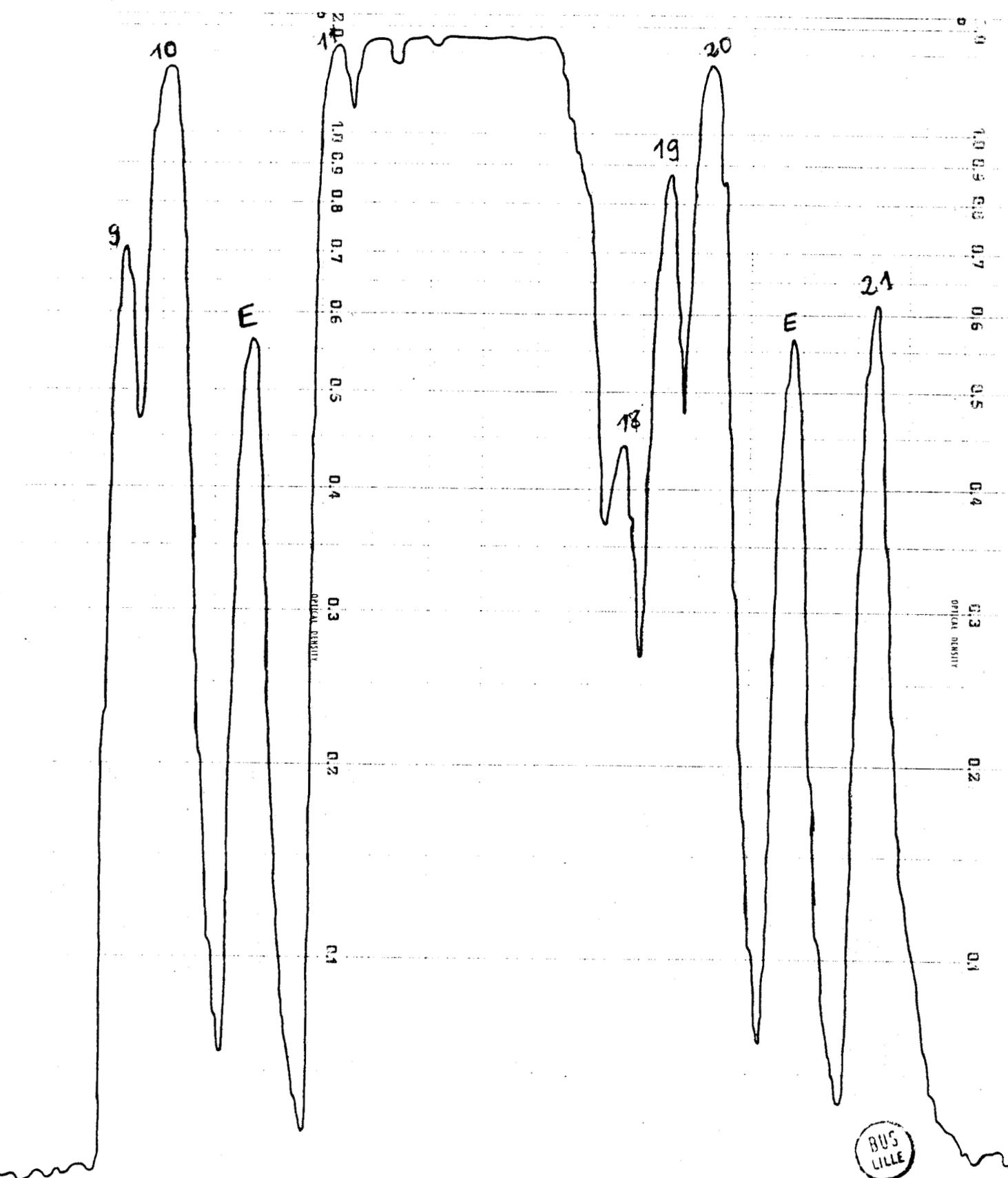
#### b) - Avec l'acide trifluoroacétique N =====

Traiter 2 ml de la fraction FA de lait par 11,5 ml d'eau distillée et 1,5 ml d'acide trifluoroacétique (concentration finale en acide N).

Le mélange est chauffé à reflux à 80°C pendant 30 minutes. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite en présence d'éthanol. Le résidu obtenu est repris par 2 ml d'eau distillée. L'hydrolysate est purifié par passage sur une colonne de biogel P2 (100 - 200 mesh) avec élution par l'eau. Le repérage des composés glucidiques se fait à l'orcinol sulfurique (figure 15).

Le test bactériologique réalisé à partir des deux fractions obtenues du produit FA montre que la sous-fraction FI reste fortement active sur la souche AA 2/2. Celle-ci contient les oligosaccharides défucosylés et désialidés, élués en premier et qui sont utilisés comme facteurs de croissance.

Quant à la fraction FII, elle contient probablement des résidus de monosaccharides, sortant en dernier et qui ne sont pas des facteurs de croissance pour AA 2/2.



**FIGURE 15 :** Repérage des oses neutres par la méthode à l'orcinol sulfurique en flux continu.  
 Conditions opératoires : température : 100°C, enregistrement de la densité optique à 520 nm.  
 Fraction FI : (9 - 17) et fraction FII : (18 - 21).

#### 4° - Conclusion :

La détermination des rapports molaires des monosaccharides indique que les oligosaccharides contenus dans la fraction FA sont surtout des dérivés plus ou moins fucosylés et sialidés du INT. Il s'agit donc de composés dont le poids moléculaire minimum est proche de 760, ce qui correspond au résultat attendu compte-tenu de leur comportement en gel filtration.

Les résultats précédents font également apparaître que la défucosylation, la désialidation et la réduction du produit FA par le  $BH_4K$  ne conduisent pas à une disparition de l'activité biologique. Ces observations sont donc en parfait accord avec les résultats obtenus auparavant à partir des oligosides de structure connue.

C'est donc bien la présence de la glcNAC au sein du motif structural de base des oligosaccharides présents dans le lait de femme qui est responsable de l'activité favorable de ces derniers sur la croissance des B. bifidum.

CONCLUSION

Le but de notre travail est l'étude des facteurs contenus dans le lait humain ayant la propriété de favoriser spécifiquement la croissance de B. bifidum,

L'application au lait humain des méthodes classiques de fractionnement a permis d'obtenir une fraction (FA) contenant l'essentiel des facteurs actifs. Celle-ci est non précipitable par le sulfate d'ammonium à 75% de saturation, par l'alcool à 80% ou par l'acide perchlorique 0,6 N. Elle se caractérise par sa résistance remarquable à la chaleur et sa sensibilité à l'hydrolyse acide ménagée, ce qui nous a permis de présumer de la nature glucidique des composés actifs présents dans le lait de femme.

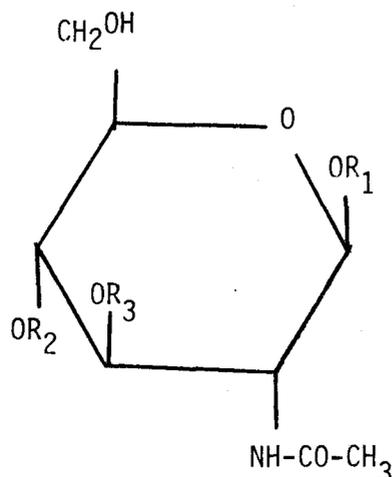
La purification de ceux-ci par gel filtration, suivi d'un repérage des oses à l'orcinol sulfurique révèle l'hétérogénéité des composés actifs dont les masses moléculaires s'échelonnent entre 500 et 10 000.

Une étude microbiologique entreprise alors montre que seules les souches bactériennes proches de B. bifidum, spécifiques des selles de nourrissons alimentés au sein utilisent ces composés comme facteurs de croissance. Ceci démontre bien la spécificité du produit isolé à partir du lait de femme et permet de démontrer l'homogénéité de l'espèce B. bifidum au sein du groupe des Bifidobactérium. La souche Penn. bien qu'elle soit de l'espèce B. bifidum, manifeste un comportement légèrement en retrait par rapport à l'ensemble des autres souches appartenant à l'espèce B.b. Cela peut s'expliquer par le fait que celle-ci a été longtemps entretenue en collection.

Une étude plus approfondie de la fraction active (FA) montre que celle-ci est très hétérogène et qu'elle est constituée à la fois de dérivés neutres et acides présentant tous une activité bifidigène qui semble équivalente sur la bactérie test.

Dans un premier temps, l'étude du motif structural responsable de l'activité biologique a été abordée en testant l'activité de facteurs de croissance d'oligosaccharides connus isolés du lait de femme, du méconium ou d'autres milieux biologiques. Il en ressort que seuls les oses et oligosaccharides renfermant de la glcNAC dans leur structure ont la propriété de favoriser la croissance de B. b.

Ces résultats nous permettent de proposer un schéma général du motif structural de base pour tous les composés naturels possédant un pouvoir bifidigène :



(N-acétyl-glucosaminide)

$R_1, R_2, R_3 =$  Radicaux

Ensuite, par dégradation ménagée (hydrolyse partielle, désacétylation) du lacto-N-tétraose pris comme modèle de composé actif, il a été possible de confirmer le rôle essentiel joué par la glcNAC.

Enfin, la détermination de la composition en monosaccharides de la fraction (FA) isolée à partir du lait maternel, démontre bien que son activité bifidigène est due à la présence des oligosaccharides apparentés au lacto-N-tétraose qui s'y trouve concentrés.

IL est très remarquable de constater que le rôle de la glcNAC, déjà mis en évidence par GYORGY, en travaillant sur la souche Penn. se confirme 24 ans après sur AA 2/2, proche de celle-ci.

Nos travaux permettent de démontrer également qu'en réalité c'est la croissance de toutes les souches appartenant à l'espèce B. bifidum qui se trouve stimulée par les oligosaccharides azotés appartenant au gynolactose.

L'ensemble de ces résultats aboutit à une meilleure connaissance de la nature des facteurs bifidigènes ; celle-ci pourrait permettre de mieux comprendre leur rôle et l'influence de la flore bifide sur le bien-être des nourrissons. De telles recherches seraient facilitées par la mise au point de méthodes chimiques ou biologiques pour la production de ces facteurs en quantité suffisante pour permettre de suivre leur effet in vivo chez l'animal et peut-être même à plus long terme chez le nouveau-né.

A P P E N D I C E      T E C H N I Q U E

I. - Préparation de l'échantillon de lait maternel.

---

II. - Méthode de mise en évidence de l'activité bifidigène.

---

1°/ - Mode opératoire

2°/ - Milieux de culture utilisés

a) - milieu coeur-cerveille cystéiné ;

b) - solution Ringer cystéinée ;

c) - milieu de Garches.

III. - Préparation des biogels P6 et P2 (100 - 200 mesh).

---

IV. - Préparation des résines Dowex 50 x 8 et Dowex 1 x 8.

---

1°/ - Dowex 50 x 8, forme acide

2°/ - Dowex 1 x 8, forme formiate.

V. - Chromatographie sur colonne de résines Dowex 1 x 8, forme acétate.

---

1°/ - Régénération de la résine

2°/ - Préparation des tampons acétate de pyridine.

VI. - Méthodes d'identification et dosage des oses.

---

1°/ - Méthode de Dubois

2°/ - Méthode à l'orcinol sulfurique

3°/ - Méthode par chromatographie en phase gazeuse.

Sont rassemblés dans cet appendice technique, les différentes méthodes utilisées au cours de l'exécution de ce travail.

## I. - PREPARATION DU LAIT MATERNEL.

Le lait maternel utilisé nous est fourni par le lactérium de l'Institut Pasteur de Lille. C'est un lait de mélange provenant de plusieurs donneuses.

Les différents échantillons de lait sont d'abord dégraissés par centrifugation à 15 000 t/mn à -4°C pendant 1 heure, puis rassemblés pour constituer un pool de lait.

Le mélange est ensuite réparti dans des flacons de 125 ml pour être conservé à l'état congelé à -25°C.

## II. - METHODES DE MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE BIFIDIGENE.

### 1°/ - Mode opératoire :

La souche de B. bifidum, conservée à l'état congelé dans un milieu de Rosenow, est repiquée dans le même milieu régénéré.

Elle estensemencée dans 100 ml de bouillon cœur-cerveille cystéiné à partir de 16 ml d'une préculture dans le même milieu. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

On centrifuge 50 ml de cette culture (4 000 t/mn pendant 15 mn) et le culot est lavé avec une solution de Ringer cystéinée afin d'éliminer toute trace de facteurs de croissance.

Après centrifugation, le culot microbien est mis en suspension dans 10 ml de milieu de garches liquide.

La densité optique de la suspension de B. bifidum est ajustée entre 1,0 et 1,5 par dilution avec du milieu de garches. 5 ml de cette suspension est ensuite homogénéisée dans 100 ml de milieu de garches gélosé. Le mélange est coulé dans

des boîtes de Pétri. On dépose sur chaque boîte ainsi préparée, des disques de papier filtre stériles imprégnés de 10  $\mu$ l du produit à analyser.

L'incubation se fait à 37°C pendant 5 jours, en atmosphère anaérobie dans des jarres "B. B. L. Gaspak". Une substance dont l'activité est positive stimule la croissance bactérienne autour du disque.

2°/ - Milieux de culture :

a) - Milieu coeur-cerveille cystéiné (en g/l) :

- bouillon coeur cerveau	37 g
- extrait de levure	5 g
- chlorhydrate de cystéine	0,5 g

Compléter le tout à 1 litre avec de l'eau distillée. Le milieu est ensuite ajusté à pH7 et stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

b) - Solution de Ringer cystéinée (en g/l) :

- NaCl	2,25 g
- KCl	1,015 g
- CaCl <sub>2</sub>	0,12 g
- NaCO <sub>3</sub>	0,05 g

Compléter le milieu à 1 litre avec de l'eau distillée pour être stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

c) - Milieu de Garches (en g/l) :

- Asparagine	5 g
- Lactose	10 g
- Acétate de sodium	3,66 g
- SO <sub>4</sub> MG, 7H <sub>2</sub> O	0,50 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	2,33 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,90 g
- Cystine	0,20 g
- Vitamin free casaminoacid	10 g

- Solution de P.A.B. 1 ml (100 ml de P.A.B. dans 100 ml d'eau distillée) ;
- Solution vitaminée 1 ml (1 mg de biotine + 100 mg de pantothénate de calcium dans 100 ml d'eau distillée).

Compléter le tout à 1 l avec de l'eau distillée. Les ingrédients sont dissous par chauffage. le pH est ajusté à 6,4 et stérilisé à 108°C pendant 30 minutes.

Le milieu est solidifié par addition de 10 g d'agar/l.

### III. - PREPARATION DES BIOGELS P6 et P2.

---

Peser 50 g de gel P6, les dissoudre progressivement dans 800 ml de tampontris 0,05 M. On laisse gonfler le gel une nuit à + 4°C. Eliminer une partie du surnageant puis dégazer le gel dans une fiole à essorer avant le remplissage de la colonne.

Afin d'éviter le développement des algues dans les colonnes, il est utile de nettoyer celles-ci par une solution d'ammonium quaternaire à 1‰.

La préparation du biogel P2 se fait dans l'eau distillée suivant le même mode opératoire que précédemment.

### IV. - PREPARATION DES RESINES DOWEX 50 x 8 et DOWEX 1 x 8.

---

Avant leur emploi, les échangeurs d'ions sont traités selon le mode opératoire suivant : rincer les résines plusieurs fois à l'eau pour éliminer les déchets.

1°/ - La Dowex 50 x 8,

échangeuse de cations est utilisée sous sa forme acide. On traite pour cela la résine par 1 l ou 2 l de HCl 2 N par agitation continue pendant 2 heures, suivie d'un lavage soigneux à l'eau distillée, jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 5. La conservation se fait dans l'eau.

2°/ - Ia Dowex 1 x 8,

échangeuse d'anions est utilisée pour la forme formiate. Ia résine est d'abord traitée par un volume de NaOH N et maintenue sous agitation constante pendant 2 H, suivie de plusieurs lavages à l'eau. Ia résine est ensuite mise sous la forme formiate par passage d'un volume d'acide formique N. Enfin, un lavage soigneux à l'eau distillée amène le pH de l'effluent à la neutralité.

V. - CHROMATOGRAPHIE SUR RESINES ECHANGEUSES D'ANIONS DOWEX 1 x 8,  
FORME ACETATE.

1°/ - Régénération de la résine

La résine, Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh) est d'abord rincée plusieurs fois à l'eau distillée. Elle est ensuite traitée avec de l'acide chlorhydrique 2 N. L'excès d'acide est éliminé par plusieurs lavages à l'eau distillée.

La résine est mise sous forme acétate par traitement avec une solution d'acétate de sodium 2 M. L'excès d'acétate de sodium est éliminé comme précédemment par lavage à l'eau distillée.

2°/ - Préparation des tampons d'acétate de pyridine pH 5,5 de molarité  
0,01 M - 0,05 M - 0,15 M

Tampon 0,01 M pH 5,5

Introduire dans une fiole jaugée d'un litre, 0,01 mole/l d'acide acétique pur, soit 0,6 ml d'acide acétique.

Y ajouter de l'eau distillée, puis ajuster le pH à 5,5 avec de la pyridine et compléter à un litre avec l'eau distillée.

Tampon 0,05 M et 0,15 M pH 5,5

Suivant le même mode opératoire que précédemment, les tampons acétate de pyridine de concentrations 0,05 M et 0,15 M ont été également préparés.

## VI. - METHODES D'IDENTIFICATION ET DOSAGE DES MONOSACCHARIDES.

---

### 1°/ - Méthode Dubois

Traiter dans un tube à hémolyse en verre 0,2 ml du produit FA pour 0,1 ml de phénol 5% et 1 ml de  $H_2SO_4$  concentré. Après agitation, laisser la réaction se dérouler pendant 15 mn.

Dans les mêmes conditions opératoires, traiter 0,2 ml d'eau distillée comme témoin.

### 2°/ - Méthode à l'orcinol sulfurique

Les oses neutres sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLEMANS et PHILIPPI (140), KESLER (174).

L'orcinol donne avec les oses, en milieu sulfurique et à chaud (100°C) une coloration brun-orangé. Le dosage se fait à 510 nm en prenant le galactose (200 mg/l) comme témoin.

#### Préparation du réactif à l'orcinol :

Mettre dans une fide jaugée d'un litre, 1,6 g d'orcinol (dihydroxy 3,5 toluène), y ajouter 97,3 ml d'eau distillée et 2,7 ml de  $H_2SO_4$  pur, agiter le mélange jusqu'à dissolution et compléter à un litre avec  $H_2SO_4$  66%. Conserver le réactif dans un flacon brun à + 4°C.

### 3°/ - Dosage des oses par chromatographie en phase gazeuse

A 1 ml de l'éluat de colonne P2 (5,3 g/l de sucres totaux), ajouter comme témoin 1 ml d'une solution de mésoinositol (100  $\mu$ g/ml), lyophiliser le mélange pendant une nuit, puis sécher sous-vide en présence de  $P_2O_5$  à 50°C pour éliminer toute trace d'eau.

Le résidu obtenu est méthanolysé par 1,5 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 heures. Les composés ainsi transformés en dérivés méthyl-glucosides sont ensuite traités par 200  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique par chauffage à 100°C dans un bain de sable, ce qui permet d'obtenir des dérivés méthylglycosides trifluoroacétylés (volatils).

Les derniers produits obtenus sont analysés dans les conditions suivantes :

- colonne de silicone OV210
- sensibilité  $10^{-10}$  x 8
- injection 3  $\mu$ l
- programmation 100°C à 220°C à raison de 2°C/mn.
- débit de gaz vecteur (azote) 7,5 ml/mn.

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

---

---

1. - PIERCE P.C., PAMBIANCO M., STRECKER G., MONTREUIL J.  
J. Europ. J. Biochem., 1968, 14, 169-178.
2. - BAYARD B.  
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Université des Sciences et  
Techniques, Lille I, 1974.
3. - BEERENS H.  
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1953-1954, 6, 36-45
4. - BEERENS H., GERARD A., GUILLAUME J.  
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1957, 9, 77-85.
5. - BEERENS H., ROMOND C., NEUT C.  
Am. J. Clin. Nutrition, 1980, 33, 2434-2439.
6. - BERGEY.  
Manual of determinative bacteriology - Williams and Wilkins Company,  
Baltimore(8th Edition) 1974, 1268.
7. - BESSAU G.  
Acta Pediat. Upps, 1933, 16, 299-324.
8. - BEZKOROVAINY A.  
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 110, 558-567.
9. - BEZKOROVAINY A., NICHOLS J.H.  
Pediat. Res., 1976, 10, 1-5.
10. - BEZKOROVAINY A.  
J. Dairy Sci., 1977, 60, , 1023-1037.
11. - BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., NICHOLS J.H.  
Am. J. Clin. Nutrition, 1979, 32, 1428-1432.
12. - BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN H.  
Clin. Biochem., 1981, 14, 135-141.
13. - BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN H.  
Int. J. Biochem., 1981, 13, 585-590.
14. - BLANC B.  
Wld. Rev. Nutr. Diet., 1981, 36, 1-89.
15. - BLAUROCK G.  
Monatsschr. Kinderheilk, 1937, 68, 304-309.
16. - BLAUROCK G.  
Hyg. Abt. Orig. 1939, 144, 75-79.

17. - BLAUROCK G.  
Dtsch. Med. Wschr. 1940, 66, 1133-1135.
18. - BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E.  
Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Company  
Baltimore 8ème Edition, 1974, 669-676.
19. - BULLEN C.L., WILLIS A.T.  
Brit. Med. J., 1971, 3, 338-343.
20. - BULLEN C.L., TEARLE P.V., STEWARD M.G.  
J. Med. Microbiol., 1977, 10, 403-413.
21. - BULLEN C.L., TEARLE P.V.  
J. Med. Microbiol., 1976, 9, 335-344.
22. - BULLEN C.L., TEARLE P.V., WILLIS A.T.  
J. Med. Microbiol., 1976, 9, 325-333.
23. - BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A.  
Manuel de techniques bactériologiques - 4ème Edition - Flammarion  
Médecine Sciences, 1974, 530-531.
24. - CHERON A.  
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Université des Sciences et Techniques  
Lille I, 1975.
25. - DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., SMITH F.  
Anal. Chem., 1956, 28, 350-356.
26. - DUCLUZEAU R. RAIBAND P., HUDAULT S., NICOLAS J.I.  
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 1981, 14, 251-265.
27. - FAMURA Z., NAKAJIMA T., SAMAJIMA K., YOSHLOKA M., NAKAMURA F.,  
NAKAMURA H.  
Proc. Jap. Med. Acad., 1972, 48, 138-143.
28. - FONTAINE G.  
J. Medecins Nord et Est, 1976, 3, 1-20.
29. - FONTAINE G.  
Naître aujourd'hui - Journée du 17/10/77 Ministère de la Santé et de la  
Sécurité Sociale 87-100.
30. - FONTAINE G.  
Synthèse des rapports Monaco, 1978, 3, C 63-C 68.
31. - FONTAINE G.  
La médecine infantile, 1978, 6, 649-681.
32. - GASSER F.  
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 106, 778-796.

33. - GAUHE A., GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R. ROSE C.R., HANS W.R., ZILLIKEN F.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 214-224.
34. - GLICK M.C., SALL T., ZILLIKEN F., MUDD S.  
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 361-363.
35. - GLICK M.C., CHEN I.W., ZILLIKEN F.  
J. Biol. Chem., 1962, 237, 981-987.
36. - GUEGUEU L.  
Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 335-381.
37. - GUILLAUME J., BEERENS H., OSTEUX H.  
Ann. Inst. Pasteur Paris, 1956, 90, 229.
38. - GRIMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., MONSIGNY M., SPIK G. MONTREUIL J.  
Europ. J. Biochem., 1970, 13, 484-492.
39. - GRIMONPREZ L., MONTREUIL J.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 843-855.
40. - GRIMONPREZ L.  
Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 39-79.
41. - GRIMONPREZ L.  
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Université des Sciences et Techniques, Lille I, 1972.
42. - GRIMONPREZ L., MONTREUIL J.  
Biochimie, 1975, 57, 695-701.
43. - GYORGY P., KUHN R., NORRIS R.F., ROSE C.S., ZILLIKEN F.  
Am. J. Disease Children, 1952, 84, 482-484.
44. - GYORGY P., ROBERT F., NORRIS R.F., ROSE C.S.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 193-201.
45. - GYORGY P., KUHN R., ROSE C.S., ZILLIKEN F.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 202-208.
46. - GYORGY P., HOOVER J.R.E., KUHN R., ROSE C.S.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 209-213.
47. - GYORGY P., GAUHE A., HOOVER J.R.E., KUHN R., RUELIUS H.W. ZILLIKEN F.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 48, 214-224.
48. - GYORGY P., ROSE C.S., KUHN R., ZILLIKEN F.  
Arch. Biochem. Biophys., 1954, 49, 123-127.
49. - GYORGY P.  
C.R. 3ème Congrès Intern. Nutr., Amsterdam, 1964, 203.

50. - GYORGY P., JEANIOZ R.W., NICOLAI H.V., ZILLIKEN F.  
Eur. J. Biochem., 1974, 43, 29-33.
51. - HALL J., WEINBERG M., NATIVELLE R., PREVOST A.R.  
Les microbes anaérobies, Edition Masson, 1973, 555.
52. - HARRISSON W., STALL R.C., NORRIS R.F., SANDENS M., GYORGY P.  
Am. J. Obstet. Gynecol., 1953, 65, 352-357.
53. - HAENEL H.  
Am. J. Clin. Nutr., 1970, 23, 1433-1439.
54. - HASSINEN J.B., DURBIN G.T., TOMARELLI R.  
J. Bactériol., 1951, 62, 771-777.
55. - HIRANO S., HAYASHI H., MASUDA F., ONODERA K.  
Agr. Biol. Chem., 1966, 30, 212-219.
56. - HOOVER J.R.E., BROWN G.A., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys., 1953, 47, 216.
57. - HOWER H.R.  
J. Med. Res., 1919, 36, 481.
58. - HUBERTUS N.V., ZILLIKEN F.  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1972, 353, 1015-1016.
59. - POUPARD J.A., HUSAIN J., NORRIS R.F.  
Biol. Bifidobacteria, Bacteriol. Reviews 1973, 136-165.
60. - NICHOLS J.H., BEZKOROVAINY Y.  
Biochem. J. 1973, 135, 875-880.
61. - JELLIFFE D.B., JELLIFFE E.F.P.  
Chron. O.M.S., 1971, 25, 579-582.
62. - JERMYN M.A., ISHERWOOD F.A.  
Biochem. J., 1949, 44, 290-323.
63. - KEHAGIAS C., JAV V.C., MIKOLAJA K., HANSEN P.M.T.  
J. Food Sci., 1971, 42, 146-150.
64. - KLING G.  
Ann. Inst. Pasteur, 1914, 28, 797-806.
65. - KOBATA A., YAMASHITA K., TACHIBANA Y.  
Method. Enzymol., 1978, 50, 216-220.
66. - KUHN R., TIEDMANN H.  
Z. Naturforsch., 1953, 86, 428-436.
67. - KUHN R., KIRCHENLOHR W.  
Chem. Berichte, 1954, 87, 1547-1552.

68. - KUHN R.  
Angew. Chem., 1955, 67, 184
69. - KUHN R., KIRSCHENLOHR W.  
Ann. der. chemie, 1956, 600, 135-144.
70. - KUHN R., BROSSMER R.,  
Angew. Chem., 1956, 68, 211-216.
71. - KUHN R., GAUHE A.  
Chem. Berichte 1962, 95, 513-521.
72. - KUHN R.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 297-302.
73. - KUHN R., KIRCHENLOHR W.  
Chem. Berichte, 1954, 87, 384-389.
74. - LAMBERT R., ZILLIKEN R.  
Arch. Biochem. Biophys. 1965, 110, 544-550.
75. - LAMBERT R., SAITO Y., VEERKAMP J.H.  
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 110, 271-277.
76. - LAUER E., KANDLER O.  
Arch. Mikrobiol., 1976, 110, 271-277.
77. - LESTRADET H.  
La santé de l'homme, 1974, 190, 22-26.
78. - LESTRADET H.  
Documents scientifiques Guigoz, 1960, 82, 10-16.
79. - LEVESQUE J., AICARDI P., GAUTIER M.  
Ann. Ped., 1959, 35, 30-36.
80. - LEVESQUE J.  
Ann. Ped., 1959, 35, 36-38.
81. - LEVESQUE J.  
Ann. Ped., 1959, 35, 5-7.
82. - LEVESQUE J., GEORGES-JANET L., RAYNAUD M.  
Arch. Ped., 1960, 17, 533-540.
83. - MALYOTH G.  
Ann. Péd. Basel, 1949, 173, 34-50.

84. - MAIYOTH G., STEIN H.W.  
Klin. Wschr., 1953, 31, 36-38.
85. - MANCIAUX L.  
Thèse Université de Nancy, Médecine, 1958, n°70, 55-62.
86. - MATA L.J., URUTIA J.J., GARCIA B., FERNANDEZ R.  
Ann. J. Dis. Child., 1969, 117, 142-146.
87. - MATTEUZZI D.  
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 1981, 14, 13-17.
88. - MAYER J.B., MOSSER L.  
Z. Kinderbeilk, 1964, 67, 455-460.
89. - MAYER J.B.  
Engebir inn. Med. Kinderbeilk, 1956, 7, 429-492.
90. - MENDEZ A., OLANO A.  
Dairy Sciences Abstracts, 1979, 41, 531-535.
91. - MONTREUIL J., SPIK G.  
Lab. Chim. Université des Sciences et Techniques de Lille I, 1963.
92. - MONTREUIL J.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1399-1404.
93. - MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S.  
C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 732-736.
94. - MONTREUIL J.  
Ann. Nutr. Alim. 1971, 25, 1-37.
95. - MOORE W.E.C., CATO E.P., HOLDEMAN L.V.  
J. Infect. Dis. 1969, 119, 641-649.
96. - MOORE C.E.W., LILLIAN V., HOLDEMAN L.V., CATO E.P.  
Anaerobe Laboratory Manual 4ème édition, 1977, 1-152.
97. - NEUT C., ROMOND C., BEERENS H.  
Reprod. Nutr. Developp., 1980, 20, 1679-1684.
98. - NEUT C., ROMOND C., BEERENS H.  
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 1981, 14, 19-26.
99. - NEUT C., ROMOND C., BEERENS H., CATTEAU M.  
Journée de microbiologie, Centre Hospitalier de Ste Ode, Belgique, 1980.

100. - NEIMANN N., LAVERGUE E., MANCIAUX M., STERLIN S., PERCEBOIS  
Pédiatrie, 1965, 139-145.
101. - NICHOLS J.H., BEZKOROVAINY A., PAQUE R.  
Biochim. Biophys. Acta, 1975, 412, 99-108.
102. - NICHOLS J.H., BEZKOROVAINY A.  
Life Sci., 1974, 14, 967-976.
103. - NICOLAI H.V., ZILLIKEN F.  
Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem., 1972, 353, 1015-1016,
104. - NICOLAI H.V., HANS MULLER E., ZILLIKEN F.  
Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem., 1978, 359, 393-398.
105. - NICHOLS<sup>J</sup> H., BEZKOROVAINY A.  
Biochem. J., 1973, 135, 875-880.
106. - NORRIS R.F., FLANDERS T., TOMARELLI R.M., GYORGY P.  
J. Bact., 1950, 60, 681.
107. - O'BRIEN P.J., GLICK M.C., ZILLIKEN F.  
Biochim. Biophys. Acta., 1960, 37, 357-360.
108. - O'BRIEN P.J., GLICK M.C., ZILLIKEN F.  
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 361-363.
109. - ORLA - JENSEN S.  
Le lait, 1924, 4, 468-480.
110. - PARTRIDGE S.M.  
Biochem. J., 1948, 42, 238-248.
111. - PARTRIDGE S.M.  
Biochem. Soc. Symp., 1950, 3, 52.
112. - PATTE C., TANCREDE C., RAIBAND P., DUCLUZEAU R.  
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1979, 130 A, 69-84.
113. - PETUELY F., LYNAU V.  
Biochem. Zts., 1956, 62, 326.
114. - PETUELY F.  
Biochem. Zts., 1957, 65, 426-433.
115. - POPES S., TOMARELLI R.M., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys., 1957, 68, 362-366.
116. - PREVOT A.R., RAYNAUD M.  
Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 229.
117. - PREVOT A.R.  
Traité de systématique bactérienne.  
DUNOD 1961, tome 2, 508.

- 118 - 119 RAYNAUD M.  
Ann. Pédiat., 1959, 35, 8-23.
120. - RAYNAUD M., LEVESQUE J.  
Ann. Pédiat., 1959, 35, 27-29.
121. - Référence perdue.
122. - RAYNAUD M., BIZZINI B.  
Ann. Nutr. Alim. 1971, 25, 209-223.
123. - REUTER G.  
Inst. J. Syst. Bactériol 1971, 21, 273-275.
124. - RESNICK I.G., LEVIN M.A.  
Appl. Environ. Microbiol. 1981, 42, 433-438.
125. - RIBADEAU D.B.  
Ann. Nutr. Alim. 1971, 25, 181-191.
126. - ROMOND C., BEERENS H., NEUT C., MONTREUIL J.  
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1980, 131, 309-314.
127. - ROSE C.S., KUHN R., ZILLIKEN F., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 49, 123-129.
128. - SCARDOVI V., TROVATELLI L.D.  
Zbl. Bakt. Par. Inf. Hyg. Abt. II, 1969, 123, 64-88.
129. - SCARDOVI V., TROVATELLI L.D.  
Int. J. Syst. Bact. 1971, 21, 276-294.
130. - SEGARD E.  
Mémoire de D.E.S. de Chimie, Université des Sciences et Techniques de Lille I., 1961.
131. - SCHEMER M.P., SINDOU T., ENJALBERT L.  
Médecine et maladies infectieuses, 1978, 8, 363-375.
132. - SCHÖNFELD H.  
Jahrb Kinderh, 1926, 113, 19-24.
133. - SCHRAUM M., KLYBAL V., RACKER E.  
J. Biol. Chem. 1958, 233, 1283-1288.
134. - SCHNEEGANS E., COHEN A., CRONMULLER G.  
Med. et Hyg. 1977, 35, 641-666.

135. - SEBALD M., GASSER F., WERNER H.  
Ann. Inst. Pasteur, 1965, 109, 251-269.
136. - SMITH H.W., CRABB W.E.  
J. Pathol. Bacteriol., 1961, 82, 53-61.
137. - SMITH L.D., HOLDEMAN I.V.  
J. Pathol. Bacteriol. 1968, 89, 423-432.
138. - TASSOVATZ B., KOTSICH A.  
Ann. Péd., 1961, 37, 285-288.
139. - TASSOVATZ B., KRAGOUYEVITCH  
Ann. Péd. 1964, 40, 291-297.
140. - TILLMANS J., PHILIPPI K.  
Biochem. Z. 1929, 36, 215.
141. - TISSIER H.  
Ann. Inst. Pasteur 1905, 19, 109.
142. - TISSIER H.  
C.R. Soc. Biol. 1906, 60, 359-361.
143. - TISSIER H.  
Ann. Inst. Pasteur 1908, 22, 189.
144. - TISSIER H.  
Bull. Inst. Pasteur 1923, 20, 577-634.
145. - TISSIER H.  
Bull. Inst. Pasteur 1923, 21, 362.
146. - TOMARELLI M., NORRIS R.F., GYORGY P.  
J. Biol. Chem. 1949, 181, 879.
147. - TOMARELLI M.R., HASSIMEN J.B., ECKHARDT E.R., CLARK R.H.  
BERNHART F.W.  
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 48, 225-232.
148. - VERMEIL G.  
Concours Med. 1975, 97, 475-786.
149. - VIS H.I.  
Enfant (Bruxelles) 1974, 49, 423-445.
150. - VON NICOLAI H., ZILLIKEN F.  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1972, 353, 1015-1016.

151. - VON NICOLAI H., ESSER P., LAWER E.  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1972, 353, 1015-1016
152. - VON PLOTHO O.  
Zbl. Bakt. Abt. Orig. n. 47, 90, 152-154.
153. - VRIES W., STOUTHAMER A.H.  
J. Bacteriol. 1967, 93, 574-576.
154. - WAGNER M., STARR T.J.  
Germfree Biology, Plenum Press New York, 1969, 5, 389-398.
155. - WILLIS A.T., BULLEN C.L., WILLIAMS K.  
Brit. Med. J. 1973, 4, 67-72.
156. - WILLIS N.B., NORRIS R.F., GYORGY P.  
J. Infect. Dis. 1953, 103, 121-131.
157. - ZILLIKEN F., SMITH P.N., ROSE C.S., GYORGY P.  
J. Biol. Chem. 1954, 208, 299-305.
158. - ZILLIKEN F., SMITH P.N., TOMARELLI R.M., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 54, 398-405.
159. - ZILLIKEN F., ROSE C.S., BRAUN G.A., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 54, 392-397.
160. - ZILLIKEN F., SMITH P.N., ROSE C.S., GYORGY P.  
J. Biol. Chem. 1955, 217, 79-82.
161. - ZILLIKEN F., O'BRIEN P.J., GLICK M.C.  
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 357-360.
162. - ZILLIKEN F., BRAUN G.A., GYORGY P.  
J. Biol. Chem. 1956, 63, 394.
163. - ZILLIKEN F., SMITH P.N., TOMARELLI R.M., GYORGY P.  
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 54, 398-405.
164. - HAYWARD A.A., HALE C.M.F., BISSET K.A.  
J. Gen. Microbiol. 1955, 13, 292-294.
165. - ROMOND C., BEERENS H., NEUT C., CATTEAU M.  
Journée de microbiologie, Centre Hospitalier de Ste Ode, Belgique, 1980.
166. - WATKINS W.M., MORGAN W.T.J.  
Nature 1957, 180, 1038.
167. - KOBATA A., GINSBURG V.  
J. Biol. Chem. 1969, 244, 5496-5502.
168. - STRECKER G.  
Thèse d'Etat es-Sciences, Université des Sciences et Techniques de Lille I.,  
1970.

169. - STRECKER G., MONTREUIL J.  
Hoppe's Seyler's Z. Physiol. Chem. 1969, 350, 14.
170. - FOURNET B., FIAT A.M., ALAIS C., JOLLES P.  
Biochim. Biophys. Acta 1979, 576, 336-346.
171. - WALCH V.E.  
Dtsch. Med. Wschr. 1956, 81, 661-664.
172. - VEERKAMP J.H.  
Arch. Biochem. Biophys. 1971, 143, 204-211.
173. - KESLER  
Anal. Chem. 1967, 39, 1416.
174. - METCHNIKOFF B.  
Ann. Inst. Pasteur, 1894, 529.



NOM DU CANDIDAT : Seka ASSY

JURY : Président : J. MONTREUIL  
Rapporteur : G. SPIK  
G. STRECKER  
J. MIZON  
C. ROMOND

TITRE DE LA THÈSE : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FACTEURS BIFIDIGÈNES  
PRÉSENTS DANS LE LAIT MATERNEL.

MOTS-CLEFS : Lait maternel, facteurs bifidigènes. Bifidigènes (facteurs), structure chimique  
Bifidobacterium bifidum.

#### RÉSUMÉ

L'action bénéfique du lait maternel sur le nourrisson est bien connue. On sait, en particulier, que les nouveau-nés allaités par leur mère souffrent moins de troubles digestifs et de diarrhées infectieuses. Il est reconnu, par tous, que le mécanisme protecteur est très complexe et fait intervenir des facteurs bifidigènes présents dans le lait de femme et ayant la propriété de favoriser la croissance de la souche de *Bifidobacterium bifidum* spécifique des enfants nourris maternellement. Celle-ci serait alors à l'origine de la résistance relative de ces derniers aux diarrhées infectieuses.

Par application des méthodes biochimiques usuelles de fractionnement (précipitation, chromatographie de gel, filtration et d'échanges d'ions), nous sommes parvenus à isoler et à purifier une fraction de lait maternel contenant l'essentiel de son activité biologique. Celle-ci est caractérisée par sa spécificité sur la croissance de *B. bifidum*, sa résistance remarquable à la chaleur, sa labilité en présence d'acide et son faible poids moléculaire compris entre 500 et 10 000.

Ces résultats nous permettent de présumer de la nature glucidique des facteurs bifidigènes présents dans le lait de femme. L'étude structurale de ceux-ci a été abordée de deux manières :

- Dans un premier temps, l'activité bifidigène d'oligosaccharides connus isolés du lait de femme et d'autres milieux biologiques a été déterminée. Celle-ci est retrouvée pour tous les composés contenant de la glcNAC.
- Dans un deuxième temps, par dégradation ménagée du lacto-N-tétraose pris comme modèle de composé actif et par la détermination des rapports molaires et de la composition en monosaccharaides de la fraction de lait isolée, nous avons mis en évidence le motif structural responsable de l'activité bifidigène du lait maternel.

Soutenance prévue le 15 Novembre 1982 à l'Université de LILLE I

Bâtiment Chimie Enseignement Amphithéâtre François